

T細胞疲弊や老化に抵抗性をもつCAR-T細胞の開発

獨協医科大学 医学部 布矢 純一

1. 研究の目的

慢性感染症や癌では持続的な抗原刺激が起こり、抗原排除に重要な役割を担う細胞傷害性T細胞(CTL)の機能異常や機能減弱が見られる。癌治療では、腫瘍抗原に特異的なキメラ抗原受容体(CAR)を遺伝子導入して作製した人為的改変T細胞(CAR-T細胞)による免疫治療が試みられており、B細胞悪性腫瘍に対するCD19を標的としたCAR-T細胞による免疫治療は臨床試験において良い成績を得ている。これまでのCAR-T細胞の開発研究から、十分な抗腫瘍活性を示すには*in vivo*でCAR-T細胞が効率よく増殖・維持されることが必要であるが、*in vitro*で十分な細胞傷害活性を示すにも関わらず、*in vivo*での増殖・維持が限られ、不十分な抗腫瘍活性しか示さないCAR-T細胞が存在する例が知られている。その原因の一つに、抗原非依存的な刺激によるCAR-T細胞の早期疲弊がある。従って、T細胞疲弊に抵抗性のCAR-T細胞を作製できれば、慢性感染症や固形腫瘍に対して有効に作用する免疫治療法を開発できるかもしれない。本研究ではCARに含まれる共刺激シグナル配列に着目し、疲弊抵抗性CAR-T細胞の開発を試みた。

2. 研究の計画・方法

(1) CAR-T細胞評価系の確立

HIV Env(NL4-3株)タンパク質の発現プラスミドpRE11(Teeranaipong P et al, J Int AIDS Soc, 2013)からHIV EnvをコードするcDNA断片をレンチウイルスベクターに挿入し、HIV EnvおよびGFPを発現するレンチウイルスベクターを作製した。ポリブレン法を用いてCHO細胞にHIV EnvおよびGFP遺伝子を導入後、5 μ g/mLのブラストシジンを含む培地で選択し、コロニーの単離を行った。得られた細胞クローンをMAGI-X4細胞と共培養し、細胞融合を指標として、HIV Env発現細胞のスクリーニングを行った。

(2) CAR-T細胞の作製

本研究では、HIV EnvのレセプターであるCD4分子の細胞外ドメインを抗原認識部位として有するCARおよびGFP遺伝子を発現レンチウイルスベクタープラスミドを用いた。レンチウイルスベクタープラスミドをサポートリングプラスミドと共に293FT細胞にトランスフェクションして、レンチウイルスベクターを作製した。レンチウイルスベクターを含む培養上清を回収し、0.45 μ mのフィルターで細胞残渣を除いた後に高速遠心を行い、レンチウイルスベクターの濃縮を行った。

ヒトPBMCは健常人ボランティアの末梢血液からFicollを用いて分離した。細胞培養プレートに接着する細胞を除いた後、抗CD3/CD28抗体磁気ビーズを用いてT細胞を活性化させた。活性化3日後に磁気ビーズを除き、レトロネクチンを用いてCAR発現レンチウイルスベクターによる遺伝子導入を行った。翌日、同様にして、二回目の遺伝子導入を行った。この後は、300U/mL IL-2と5%FBSを含むAIM-V培地を用いて、2-3日に一度培地交換を行いながら培養を行った。細胞が十分な数に増殖した時点でGFPを指標としてセルソーティングを行い、CAR-T細胞の純化を行った。

(3) CAR-T細胞の解析

CAR-T細胞の増殖を調べるため、経時的に細胞数およびGFP陽性細胞の頻度を解析した。抗原特異的なCAR-T細胞の活性化および細胞傷害活性を調べるため、作製したHIV Envタンパク質発現CHO(CHO-Env-GFP)細胞あるいはGFP発現CHO(CHO-GFP)細胞とCAR-T細胞を共培養し、24時間後の培養上清中に含まれるIL-2および乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)量を測定した。細胞の活性化に伴うCAR-T細胞の疲弊を調べるため、疲弊マーカーであるPD-1の発現をフローサイトメトリーで解析した。

3. 研究の特色

- (1) 免疫チェックポイント分子に対する抗体を用いた阻害療法が癌に対して高い治療効果を示している。免疫チェックポイント分子阻害療法は、細胞表面に発現している免疫チェックポイント分子の相互作用を阻害し、免疫学的なブレーキを解除するというアイデアである。一方、本研究では、免疫チェックポイント分子の発現を内在的に制御し、養子免疫で用いるCAR-T細胞に免疫学的なブレーキを踏ませないというアイデアである。このように異なる作用機序で働く治療法を開発することは、それ単体での治療効果だけでなく、組み合わせることにより更なる治療効果の向上が期待できる。
- (2) 本研究ではCARに含まれる共刺激シグナルに着目したが、CAR-T細胞の疲弊抵抗性における共刺激シグナルの意義が明らかになれば、今後適切な共刺激シグナルを選択することでより有効に機能するCAR-T細胞を作製できると期待される。

4. 研究の成果

- (1) CAR-T細胞評価系の確立
U373-MAGI-CXCR4_{CEM}細胞との細胞融合アッセイにおいて多核を有する合胞体形成が認められ、CHO-Env-GFP細胞を樹立できた。また、CHO-GFP細胞も合わせて樹立した。
- (2) CAR-T細胞の作製および機能解析
4-1BBを共刺激シグナルとして有するCARを用いて、CAR-T細胞の作製を試みた。フローサイトメトリーで遺伝子導入率を解析すると、CAR遺伝子の導入率は5~10%であった。より純度の高いCAR-T細胞を得るためセルソーティングを行い、増殖後の細胞を解析したところ、約50%の純度のCAR-T細胞を樹立できた。作製したCAR-T細胞の機能を解析するため、標的細胞とCAR-T細胞を1:1で共培養し、24時間後の培養上清中の産生されるIL-2量をELISAで測定した。抗原を発現しないCHO-GFP細胞との共培養ではIL-2の産生は見られなかったが、抗原を発現するCHO-Env-GFP細胞では有意なIL-2産生を認めた。また、CHO-GFP細胞との共培養では細胞傷害活性が見られなかったが、CHO-Env-GFP細胞と異なる比率で共培養すると比率依存的な細胞傷害活性を示した。この結果から、CAR-T細胞の細胞傷害活性は抗原依存的であると考えられた。
- (3) CAR-T細胞表現型の解析
共刺激シグナルとしてCD28、4-1BB、HVEMを有するCAR-T細胞を作製し、増殖性の解析を行った。培養20日目で、CD28では約150倍に増殖したのに対して、4-1BBおよびHVEMでは約500倍に増殖していた。また、経時的にGFP陽性率を解析したところ、CD28を有するCAR-T細胞は培養16日目以降でGFP陽性細胞の頻度が減少したが、4-1BBあるいはHVEMを有するCAR-T細胞のGFP陽性細胞の頻度の減少は見られなかった。CAR-T細胞増殖の差がT細胞疲弊と関連するかを解析するため、疲弊マーカーの一つであるPD-1の発現を解析した。培養18日目において、CD28を有するCAR-T細胞は約60%の細胞がPD-1を発現していたのに対して、4-1BBでは約2%、HVEMでは約10%であった。これらの結果から、CD28を有するCAR-T細胞は細胞の活性化に伴う早期疲弊に陥っているのに対して、4-1BBあるいはHVEMを有するCAR-T細胞は早期疲弊に抵抗的な性質を持っていると考えられた。
- (4) 研究の総括
本研究によりHIV特異的CAR-T細胞の作製および評価系を構築することができた。今後、遺伝子導入効率の改良や新規CARのデザインを行い、より良いCAR-T細胞の作製系を構築したいと考えている。また、共刺激シグナルに注目した解析から、4-1BBやHVEMを有するCAR-T細胞ではCD28を有するCAR-T細胞で見られたような疲弊T細胞の特徴が見られず、疲弊抵抗性のCAR-T細胞であることが示唆された。これらの結果は、適切な共刺激シグナルを選択することで疲弊抵抗性のCAR-T細胞を作製できることを示唆している。今後、細胞傷害活性やメモリー表現型などの解析を行い、疲弊抵抗性CAR-T細胞の作製に向けた基礎的知見を得ていきたい。

慢性腎臓病の治療法開発のための基礎的研究 —慢性腎臓病抵抗性メカニズムの解明—

北里大学 獣医学部 佐々木 隼人

1. 研究の目的

腎臓は血液を濾過して余分な水分や酸・電解質、老廃物を尿として排泄し、必要なものは再吸収して体内を一定の環境に維持する働きをしている。慢性腎臓病は急性腎障害を除く全ての腎疾患に共通する腎機能停止までの慢性的な病態であり、慢性的な糸球体傷害から腎機能の低下及び腎障害が徐々に進行し、最終的に透析が必要となる末期腎不全に至る。腎不全は病死の第5位であり、三大死因である心疾患の原疾患でもある。その予備軍である慢性腎臓病は現在、成人の約8人に1人が罹患していると推定されており、事態は悪化していくと予想されるが、未だ根治療法は開発されていない。これまで各国で全ゲノム関連解析に基づくヒト腎症感受性遺伝子の探索研究が行われてきたが、見出された疾患感受性遺伝子は発症に対する影響度が極めて小さく分子標的治療のシーズ発見に至っていない。これはCommon diseaseである慢性腎臓病の治療において、疾患原因に対する治療的なアプローチよりも、慢性腎臓病の進行を止める治療が広く効果的であることを指し示しており、そのような治療法の開発が求められている。

ICGNマウス（以下、ICGN）は腎症を自然発症し、最終的に末期腎不全となる慢性腎臓病モデルマウスである。疾患原因は、腎糸球体の濾過機能を担う足細胞における $tensin2$ の欠失（ $Tns2^{ph}$ ）によって、足細胞が変性することに起因する。採択者は本変異が引き起こす腎症の重篤度はマウス系統によって著しく異なることを明らかにしてきた。ヒト慢性腎臓病においても著しい人種差があることが報告されている。これらの知見から慢性腎臓病の進行を抑制する因子の存在が示唆された。そこで採択者はICGNと抵抗性系統であるC57BL/6J（以下、B6）の交配群を用いて、腎障害を量的形質にした全ゲノム関連解析を行い、第2染色体に慢性腎臓病抵抗性遺伝子座を見出した。続いて、抵抗性系統であるB6の第2染色体に由来する部分断片をICGNに導入したコンジュニック系統の解析により、マウス第2染色体上に、足細胞傷害に対して抵抗する領域と、慢性腎臓病の終末病態である尿細管間質傷害に対して抵抗する領域が別々に存在することを明らかにした。本研究では、それら原因遺伝子の同定を試みた。

2. 研究の計画・方法

(1) 足細胞傷害抵抗性

B6由来の原因遺伝子座を持つICGNコンジュニック系統から引き続きサブコンジュニック系統を作製して腎症の評価を行い、原因遺伝子座を限局する。腎症評価には尿中アルブミン量測定、腎糸球体の病理組織学的解析・超微細構造解析を用いた。

(2) 尿細管間質傷害抵抗性

原因遺伝子座上にある遺伝子について、B6由来の原因遺伝子座を持つICGNコンジュニック系統とICGNを用いて腎臓における発現量を比較し、候補遺伝子を決定する。初代培養尿細管上皮細胞に候補遺伝子を標的とするsiRNAを導入後、腎線維化マーカーの発現量を調べ、候補遺伝子を絞り込む。実際には候補遺伝子がコードするタンパクの活性化の影響も検討した。

3. 研究の特色

現在、慢性腎臓病の病態である尿細管間質傷害を抑制する治療薬の開発が進められているが、齧歯類の実験モデルで顕著な効果が見られた薬でも、ヒト治験では尿細管間質傷害を抑制する作用が認められていない。この原因には、治験に用いられる片側尿管結紮モデルや腎臓摘出モデルなど、腎臓病研究に頻用される実験モデルは傷害から腎不全、さらに回復まで急性に経過するため、その病態は急性腎障害に近く、慢性的な糸球体傷害から末期腎不全まで不可逆的に経過する慢性腎臓病を再現出来ていないことが挙げられる。これに対して、本研究で用いるICGNは、①腎臓の血液濾過装置である糸球体足細胞の傷害と尿中へのタンパク漏出、②漏出タンパクによる尿細管間質傷害や腎性貧血、③最終的に末期腎不全に至るヒト腎症の病態ステージを順次示すヒト病態に近似した自然発症モデルである。この腎症モデルマウスを用いて明らかとなった①と②の病態に対する2つの抵抗性遺伝子座位には既知の腎障害関連遺伝子は座位しておらず、新規抵抗性遺伝子の同定と分子動態の解析、慢性腎臓病の病理発生の理解、診断・創薬・治療の新規ターゲットの解明に繋がる可能性がある。

4. 研究の成果

(1) 足細胞傷害抵抗性

足細胞傷害抵抗性遺伝子領域をB6マウス由来に持つICGNコンジェニックマウスから、遠位部分でB6由来の染色体断片を持つサブコンジェニック系統のみを得ることができた。このマウスの足細胞傷害は軽減されておらず、足細胞傷害抵抗性遺伝子領域は遠位部分を除いた領域に局限された。今後は更なるサブコンジェニック系統の作出と並行して、腎糸球体を用いたRNA-seq解析により候補遺伝子を絞り込む予定である。

(2) 尿細管間質傷害抵抗性

尿細管間質傷害抵抗性遺伝子領域をB6マウス由来に持つICGNコンジェニックマウスとICGNマウスの腎臓におけるRNAの発現レベルの比較から、候補遺伝子を1つ見出した。初代培養尿細管上皮細胞を用いたノックダウン実験では、候補遺伝子をターゲットにするsiRNAを導入した細胞で、間葉系マーカーの α -SMAの発現が顕著に増加した。また、候補遺伝子がコードするタンパクの賦活剤投与により尿細管上皮細胞の上皮間葉転換が減少した。この結果より、傷害因子に暴露された尿細管上皮細胞では候補遺伝子の発現量が変化して上皮間葉転換が誘導され、尿細管間質傷害へ進行することが示唆された。B6マウスの尿細管上皮は傷害因子によって候補遺伝子の発現量が変化しにくいために、尿細管間質傷害抵抗性になっていると考えられる。今後、尿細管上皮細胞における候補遺伝子のホメオスタシスを詳しく研究することで、尿細管間質傷害の予防および治療につながることを期待される。

インスリン分泌における細胞膜脂質非対称の生理学的意義の解明 ーコレステロールの二重膜間輸送が及ぼす影響ー

杏林大学 医学部 岸本 拓磨

1. 研究の目的

インスリン分泌（IS）不全は糖尿病の原因の一つであり、糖尿病の成因解明、新規治療薬の開発のためにインスリン分泌機構を明らかにする事は急務の課題である。ISは、膵臓β細胞内のゴルジ体から生成されたインスリン顆粒（顆粒）が輸送されて細胞膜に結合、血中グルコース濃度上昇に応答して顆粒が細胞膜と融合しインスリンが細胞外へ放出する、という過程を経る。しかし、脂質については、多くの報告があるにもかかわらずそれらの多くは未解明である。脂質代謝異常は、糖尿病リスク要因になる重要な問題で、脂質の機能を解明する必要がある。本研究では、コレステロール（Chol）に着目した。Cholは細胞膜の主要脂質である。Cholは細胞膜での分布は均一ではなく、関連蛋白質を取り囲む微小（100 nmオーダー）な脂質ドメインを作り分泌に影響を及ぼすと推測される。加えて、Cholは細胞膜内層に多く分布しているとされるが、外層に分布が偏るような変化が膜貫通蛋白質や脂質修飾蛋白質等の機能に影響する事が示唆されている。このような事から本研究では膵β細胞の顆粒融合作用機序における細胞膜Cholの機能を解明するため、分布という観点から解析を行った。

2. 研究の計画・方法

本申請は顕微鏡観察を中心に細胞生物学的アプローチで進めた。以下をもとに、膵β細胞の顆粒におけるChol分布と分泌関連蛋白質の局在に対する相関を解析した。

- (1) **細胞膜Chol分布とISの相関の解析** 予備実験から顆粒が細胞膜内層側のCholが少ない部位から高い頻度で融合する事を明らかにした。この結果はCholの不均一な分布が制御される事がISにおいて重要になる可能性を示唆する。この分布は脂質分子が細胞膜で横方向移動するだけでなく、細胞膜外-内層間で輸送されることでも制御される可能性も考えられた。そのため、平面的な分布だけではなくChol外-内層分布の変化も調査し、Cholと関連蛋白質の分布の相関を解析した。
- (2) **細胞膜Cholの分泌関連蛋白質の制御** Chol量を変化させる方法（減少法＝①Methyl-β-Cyclodextrin(MβCD)処理、②Chol輸送阻害剤処理、増加法＝③MβCD-Chol複合体処理）を行い、細胞膜Cholと関連蛋白質の分布の変化及び分泌への影響を観察した。
- (3) **ABC輸送体のChol分布やISへの機能の解析** 細胞膜Chol外-内層分布の変化を引き起こすABCトランスポーターABCA1の機能に着目した。RNA干渉法によりABCA1をノックダウン(KD)し、細胞膜の関連蛋白質の分布及び分泌への影響を観察した。

実験には膵β細胞株MIN-6細胞を用いた。主要な関連蛋白質の観察は固定細胞では免疫染色にて、生細胞ではadeno virusでは蛍光蛋白質融合体を発現させて可視化し、共焦点顕微鏡にて撮影した。顆粒融合の過程は、細胞膜近傍の観察を可能とする全反射蛍光顕微鏡を用いたライブイメージングで観察した。所属研究室では、この顆粒融合可視化技術により分泌を担う顆粒の融合様式を特定している。この顆粒融合可視化法と結合性蛋白質プローブによる観察(Perfingolysin 0 domian4、Cholプローブ＝細胞膜内層は蛍光蛋白質融合体を細胞内発現、外層は同様の精製タンパク質)を組み合わせた同時観察法を用いた。顕微鏡画像はImageJによる定量的解析した。

3. 研究の特色

- (1) IS研究において数少ないChol観察技術による機能解析である。
脂質分子の存在量を特定する生化学的手法によりISにおけるCholの関与は示唆されるが、

作用機序は未解明である。申請者はこの解明には脂質分子の位置情報を特定し分布の観点から解析する必要があると考え同時観察法を確立した。

(2) **細胞膜表裏（外層と内層）における脂質の観察。**

Cholが細胞膜上で①不均一なドメイン構造を形成する事、②細胞膜外-内層で分布が異なる事、③顆粒や関連タンパク質はChol分布と逆相関して分布している事を明らかにした。本研究は顆粒融合過程での細胞膜Cholの存在の重要性に加え、細胞膜外-内層のChol分布のバランスが、その機能を調節する可能性を示す新しい知見となり、詳細な作用機序を解明する上で大きく貢献しうる。

4. 研究の成果

- (1) Chol可視化を同時に行った融合過程の観察から、細胞膜内層ではCholが少ない領域から高頻度で顆粒が融合する事を明らかにした。また、顆粒融合を制御するSyntaxin-1のクラスターの局在も、Cholが少ない領域に多く局在した。さらに、これらの蛋白質はCholが多い領域には存在せず、その領域の近傍に隣接していた。
- (2) Cholが減少する処理を行った場合(M β CD処理等)、細胞膜Cholは劇的に減少するが、それと相関して顆粒及びSyntaxin-1クラスターの局在が減少した。また、それに伴い顆粒融合が低下した。一方、Cholの量を増加させた場合(M β CD-Chol複合体処理)は、細胞膜でのCholは増大したが、局在の変化はなかった。
- (3) RNA干渉法によりABCA1をKDした場合、Cholの外層の分布量が減り、内層側に分布が偏っていた。また、ブドウ糖刺激でバッチ実験を行ったところ、KDにより顆粒融合の低下が確認された。さらに分泌様式の解析では、ABCA1のKDによる顆粒の融合は低下した事から、融合の際に受け側となる細胞膜内層のCholの量だけではなく、分布が影響しうる可能性が考えられた。この結果と相関して、ABCA1のKDによりSyntaxin-1のクラスターの減少が確認された。

以上の結果から細胞膜におけるChol量に加えてChol外-内層分布のバランスが、関連因子の分布や顆粒融合の制御に関わる可能性が確認された。引き続き詳細な機構を解析する予定である。

微生物由来金属酸化物から着想を得た非晶質鉄酸化物ナノ多孔体の作製と応用

工学院大学 先進工学部 橋本 英樹

1. 研究の目的

申請者はこれまでに微生物が創り出した鉄酸化物ナノ材料の構造解析と機能性材料への応用に関する研究を行ってきた。その結果、微生物由来鉄酸化物は①非晶質物質で、②最小構成一次粒子が3 nmで、③それらが繋がることで数十nmの繊維状二次構造体が形づくられ、④それらが更に重なり合うことで最終的に直径約1 μm のチューブ状三次構造体を形成していることを明らかにした。更にこの物質が、リチウムイオン電池電極材料、高彩度赤色顔料、高効率触媒等として優れた機能を示すことを見出した。また、この物質の原子配列を模した材料を作製しリチウムイオン電池の電極として評価したところ、人工的に合成した酸化鉄を凌ぐ特性を示すことも明らかにした。しかし、微生物由来鉄酸化物の高度に制御されたナノ構造と高次構造を人工的に模倣するには至っていない。ナノ構造・高次構造を制御することで新機能の発現や更なる特性の向上が期待される。そこで本申請では、微生物由来鉄酸化物の原子配列を模した鉄酸化物ナノ材料を基盤として、これを用いて3次元多孔質構造体を作製することを目的とした。更に得られた構造体を電極として水分解光触媒としての可能性を探索する。

2. 研究の計画・方法

図1に研究方法の模式図を示す。①微生物由来鉄酸化物の原子配列を模した鉄酸化物ナノ粒子ゲルを合成する。②ポリスチレン (PS) 微粒子の自己組織化によりオパール構造を作製する。③オパール構造の隙間に鉄酸化物ゲルを流し込みPS粒子を除去し、鉄酸化物ナノ粒子の3次元多孔質構造（インバースオパール構造）を作製する。④得られた構造体を電極として水分解の光触媒としての機能を評価する。



図1 PSの自己組織化→鉄酸化物ゲル導入→PS除去→鉄酸化物3D構造体。

3. 研究の特色

人類の今後の存続と発展を決定づけるエネルギー、資源、食糧、水に関わる多くの問題を解決するには、従来の常識に捕らわれずに新たな発想で新材料を創出することが重要である。申請者は、自然界に生息し代謝のために鉄酸化物やマンガン酸化物を人知れず生産する細菌に注目し、その産物を解析し応用してきた。細菌由来の金属酸化物は材料科学の分野では全く着目されていなかったが、その中には実に興味深い化学が詰まっており、この材料は人工物では実現できないようなリチウムイオン電池の特性を示すなど驚くべき機能を示した。このような自然由来の材料をヒントに新しい材料を創出することは、材料科学に新たなブレイクスルーをもたらすと確信している。申請者は、微生物由来鉄酸化物の原子配列を模した鉄酸化物の合成を基盤として、これにナノ構造・高次構造を付与し新しい材料を開発する。合成した材料を太陽光を利用したエネルギー獲得の触媒として利用することで、エネルギー問題に貢献する。

4. 研究の成果

アセトン脱脂したITOガラス板にシリコン製Oリング（ ϕ 5.8 mm）を載せ、ポリスチレン（PS、粒子径： ϕ 0.5 μ m、 ϕ 1 μ m、 ϕ 3 μ m）懸濁液を滴下し、湿度95 %以上の容器内で1週間乾燥させた。その後、作製したオパール試料に水酸化鉄懸濁液を滴下し、真空排気することで水酸化鉄懸濁液をオパール構造内の間隙に充填し、溶媒が完全に乾燥するまで排気し続けた。その後、300 $^{\circ}$ Cで3時間加熱した。また、PS懸濁液と水酸化鉄懸濁液の混合液を用い同様にインバースオパールの作製を検討した。作製した試料の構造を走査型電子顕微鏡（SEM）により評価した。図2にオパール構造へ水酸化鉄を充填させた後、200 $^{\circ}$ Cで加熱することで鑄型としたPSを除去した後の構造体のSEM像を示す。PSでオパール構造を作製して水酸化鉄を充填したところ、試料表面の微細構造によりロータス効果が現れ、水酸化鉄が鑄型に充填されにくかった。一方、PSと水酸化鉄の混合懸濁液で複合体を作製した結果、充填度は改善されたが、PSより先に基板上に沈降した水酸化鉄粒子によりオパール構造の周期が乱れ、規則構造が得られにくかった。PSオパール構造を鑄型にした方法でも、PSと水酸化鉄の混合懸濁液を用いる方法でも、PS粒子径が大きいほど規則的な構造が形成されており、インバースオパール構造の製作難度はPS粒子径に依存した。これは水酸化鉄懸濁液の充填時にPS粒子自体の重さによりオパール構造を作っている粒子が固定されたことと、間隙が大きくなることで水酸化鉄懸濁液が浸入しやすくなったためと考えられる。また、300 $^{\circ}$ Cで加熱してPSを除去した水酸化鉄試料も作製した。300 $^{\circ}$ Cで加熱した試料の外観写真を図3左に示す。300 $^{\circ}$ Cで加熱した試料は赤みがかっており、水酸化鉄が α -Fe₂O₃に変化したと考えられる。300 $^{\circ}$ Cで加熱した酸化鉄試料の表面と断面のSEM像を図3a、bに示す。 α -Fe₂O₃に変化したことで骨格が収縮し、インバースオパール構造の周期が縮小した。断面を観察すると捲れ上がっている箇所も存在するが、本研究目的である多孔質構造の酸化鉄骨格インバースオパールの作製を確認した。作製した試料を電極として、水の電気分解の電位の測定を試みたが、測定中に試料が基板から剥がれ落ちたため評価することができなかった。この材料を電極として評価する際には、今後、作製した酸化鉄構造体と基盤との密着性の改善や酸化鉄自体の濡れ性の向上が求められる。

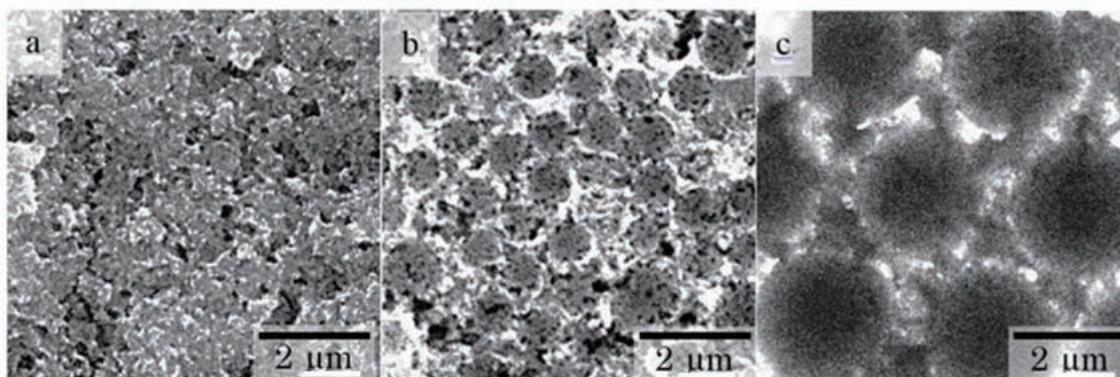


図2 オパール構造を鑄型にしたインバースオパール構造水酸化鉄のSEM像。

(a) PS粒子径 ϕ 0.5 μ m、(b) ϕ 1 μ m、(c) ϕ 3 μ m。

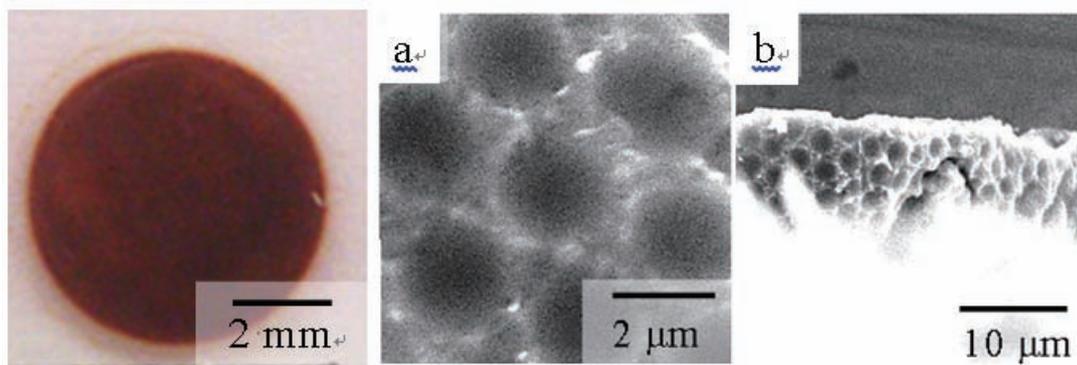


図3 左の写真は300 °Cの加熱で α -Fe₂O₃に変化した試料の外観写真。(a)PS粒子径 ϕ 3 μmを用いて作製したインバースオパール構造の表面SEM像。(b)断面SEM像。

生理学的・バイオメカニクスの観点から解明する筋硬度の意義

芝浦工業大学 システム理工学部 赤木 亮太

1. 研究の目的

近年開発された超音波エラストグラフィにより定量可能な筋硬度は、筋の状態の客観的な評価指標であり、“筋が柔らかい＝筋の状態が良好である”という考えに基づいて研究がなされている。しかしながら、筋硬度と筋機能や身体運動との関連性については検討されていない。一方、筋硬度は、筋の剛性率やヤング率で表されるものであり、筋の機械的性質を表す指標ともいえる。すなわち、バイオメカニクスの観点から筋硬度に着目することにより、ヒトの筋を材料として捉えた際の特性を評価することが可能となる。筋収縮の目的が関節運動ひいては身体運動を引き起こすことであることから、筋の材料特性が筋機能や身体運動にどのように貢献するのかを明らかにすることは、材料としての筋を評価するうえで不可欠である。特に、材料としての筋が疲労の蓄積により劣化（経年劣化）することを踏まえれば、年齢が筋硬度に及ぼす影響を加味して、筋機能や身体運動との関連性を明らかにすることは重要である。以上のことから、筋硬度と筋機能との関連性の検討を通じて、筋硬度の意義を生理学的及びバイオメカニクスの観点から明らかにしていくことを本研究の目的とした。

2. 研究の計画・方法

(1) 足関節底屈筋群を対象とした実験

被験者は、健常な若年（20～30歳）男性20名及び女性20名、健常な高齢（66～81歳）男性19名及び女性14名であった。下腿長近位30%部位における足関節底屈筋群の筋厚及びせん断波伝搬速度を、超音波診断装置及び搭載されているエラストグラフィ機能を用いて測定した。筋厚及び下腿長から当該筋群の筋体積を推定し、筋サイズの指標とした。また、変換式を用いて、せん断波伝搬速度から筋の剛性率を算出し、筋硬度の指標とした。筋機能として、数秒間の最大随意収縮による等尺性筋力及び電気刺激によって算出した随意的動員度を加味した最大筋力の2種類を評価した。

(2) 膝関節伸展筋群を対象とした実験

被験者は、健常な若年（20～30歳）男性27名及び女性19名であった。測定部位は大腿長近位50%とした。測定項目は、(1)と同様に、筋厚及び大腿長から推定した筋体積、せん断波伝搬速度から算出した筋の剛性率、等尺性筋力及び最大筋力であった。

3. 研究の特色

(1) “超音波エラストグラフィ法による筋硬度評価”というテーマの新規性

研究代表者がこれまで実施してきた、超音波エラストグラフィ法を用いた筋硬度に関する数多くの研究成果は、スポーツ科学や生理学、医学分野において、世界的に著名な国際学術誌に多数掲載されている。そして、上記の研究に追従する形で、ここ数年で超音波エラストグラフィ法を用いた研究が世界中で盛んになってきた。このように、超音波エラストグラフィ法を用いた筋硬度評価自体が、独創性・新規性に富んだものである。

(2) 筋硬度の筋機能への貢献を生理学的・バイオメカニクスの観点から検証する独創的アプローチ

本研究では、筋硬度を“筋の状態の客観的な評価指標”及び“材料としての筋の機械的性質”の2つの観点から捉える。すなわち、筋硬度が筋機能に果たす貢献について生理学的・バイオメカニクスの観点の双方から検証することで、筋硬度の意義を明らかにする。これは、これまで世界中で実施された筋硬度に関する研究とは一線を画する独創的なアプローチであり、スポーツ科学を専門とする傍ら、工学系大学において材料に関する専門科目（材料力学／生体材料学）を担当し

ている申請者だからこそ実施可能な研究といえる。

(3) ヒトの身体運動のメカニズム解明への寄与

筋硬度（筋の状態）を加味することにより、筋機能に対する理解をより深化させることができるため、本研究で得られる知見はヒトの身体運動のメカニズム解明に寄与する。

4. 研究の成果

筋体積と筋機能の関係は、いずれの場合も有意であった。しかしながら、筋の剛性率は、両筋群において、筋機能と有意な相関を示さなかった。また、筋体積及び筋の剛性率を独立変数、筋機能（等尺性筋力あるいは最大筋力）を従属変数として、ステップワイズ法による重回帰分析を行ったところ、単回帰分析の時と同様に、筋の剛性率は有意な説明変数として選択されなかった。

本研究の結果を踏まえ、生理学的観点に基づいた“筋が柔らかい＝筋の状態が良好である”という考えについて再検討する。今回は、個人間の違いに着目した研究であったが、筋の状態が筋機能に及ぼす影響については、個人内の変動を見ることによって、より鮮明にできる可能性がある。今後、この点を解決することにより、筋硬度の生理学的意義について正確に議論したい。一方、バイオメカニクスの観点に基づき、筋硬度の年齢差から見た“材料としての経年劣化”については、先行研究においても意見が一致しておらず、現時点で結論を出すことは難しい。今回、過去/現在の運動習慣の把握自体はできたものの、それらを考慮して議論できるほど、被験者数を確保できなかったため、今後被験者をさらに増やすことで、これらの点について議論を深めたい。

炎症性骨破壊に対するデノスマブの作用機序解明

昭和大学 歯学部 唐川 亜希子

1. 研究の目的

慢性歯周炎は細菌感染により惹起され、歯周組織の炎症と歯槽骨破壊に伴う歯牙欠損を生じる疾患である。歯周病の治療薬にはミノサイクリン塩酸塩軟膏や、エナメルマトリックス蛋白エムドゲインなどが用いられているが、歯槽骨に直接作用する歯周病治療薬はまだ開発されていない。

骨吸収抑制薬デノスマブ（抗RANKL抗体）は、破骨細胞の分化誘導因子RANKLの破骨細胞前駆細胞への結合を阻害して破骨細胞分化を抑制する完全ヒト型抗RANKLモノクローナル抗体であり、2012年に本邦で認可された。申請者らはこの新規骨吸収抑制薬デノスマブ（抗RANKL抗体）の、炎症性骨破壊に及ぼす影響の解明および歯周疾患局所治療薬としての適応拡大の検討を目的として本研究を行った。

2. 研究の計画・方法

デノスマブはマウスのRANKLに結合しないため、全く同じ薬理作用を持つ抗マウスRANKL抗体（OYC1、オリエンタル酵母社製）を使用した。

(1) 正常歯槽骨における抗RANKL抗体の作用解析

雄性C57BL/6マウス（5-10週齢）の上顎第一臼歯近心骨膜下に、3mg/kgの抗RANKL抗体を投与し、1週間後に μ CTにて上顎歯槽骨の解析を行った。

(2) 炎症性骨破壊モデルマウスにおける抗RANKL抗体の局所作用の解析

①炎症性骨破壊モデルマウス作成

マウス頭蓋冠骨膜下にLPS（リポ多糖、25mg/kg/ml）を投与し局所炎症を誘発した。LPSの基剤には精製水もしくはコラーゲンを、薬剤滞留時間が局所に及ぼす影響を検討した。

②骨吸収抑制薬投与

LPS投与1日後の同部位に、抗RANKL抗体（3mg/kg）、ゾレドロネート（ビスホスホネート製剤として比較検討に使用、2mg/kg）もしくは生理食塩水を骨膜下注射にて局所投与し、炎症性骨破壊に対する抑制効果を探した。基剤には生理食塩水またはコラーゲンをを用いた。

③局所作用の解明

LPS投与5日後に頭蓋冠を採取し、 μ CTおよび組織切片にて解析を行った。

④全身作用の解明

マウス腹腔内に抗RANKL抗体を投与すると脛骨骨端部の海綿骨骨密度が増加することから、頭蓋冠への局所投与時の全身作用についても検討を行った。LPS投与5日後に大腿骨・脛骨を採取し、 μ CTおよび組織切片を用いて解析を行った。

(3) 局所投与至適濃度・投与間隔の検索

骨粗鬆症治療時のデノスマブの投与間隔は1回投与を6か月毎であり、適切な投与間隔・期間が歯周病治療時の成否を左右すると考えられる。そこで、マウス体内にプログラマブル・マイクロインフュージョンポンプ（iPRECIO SMP-300、プライムテック社製）を埋入し、パソコンによるプログラム制御下で抗RANKL抗体の投与間隔・期間の変化が及ぼす影響を検討した。

3. 研究の特色

現在用いられている骨吸収抑制薬は全身を標的としており、局所炎症に対しての有用性は不明である。また抗RANKL抗体は、従来の骨吸収抑制薬であるビスホスホネート製剤とは異なる作用部位を持ち、強い骨吸収抑制作用を示すことから、将来的に歯周病への応用が期待される。本研究では、抗RANKL抗体デノスマブの炎症性骨破壊への作用機序を解析することで、歯周病治療薬としての新たなアプローチについて検討した。

本研究の特色として以下の2点が挙げられる。

- (1) 実験モデルに炎症性骨破壊モデルを使用した。従来の歯周病実験には過負荷な機械的刺激により急性炎症を惹起したモデルで実験が行われてきたが、本研究ではLPSの局所投与により、慢性歯周病の原因菌による歯槽骨破壊機序を再現した。また、コラーゲンゲルを用いて炎症性物質や薬剤を投与部位に長時間滞留させ、局所作用を詳細に解析した。
- (2) 抗RANKL抗体の至適濃度および投与間隔の検討のため、マイクロインフュージョンポンプを用いた検討を行った。抗RANKL抗体による全身治療では投与間隔や濃度が効果に影響を及ぼすことが知られており、局所使用における至適な投与間隔について、パソコンによるプログラム制御下での検討を試みた。

4. 研究の成果

- (1) 正常歯槽骨における抗RANKL抗体の作用解析

マウス正常歯槽骨への抗RANKL抗体投与後の μ CT像を対照群と比較したところ、抗RANKL抗体投与群と対照群に差は認めなかった。この時、大腿骨骨端部の骨量は増加したため、抗RANKL抗体が歯槽骨内に留まることなく全身作用を生じている可能性が考えられた。歯槽骨は骨組織のなかでも多孔性であり薬剤の血中移行が早いことから、歯槽骨に影響が認められなかった可能性が考えられるため、現在は歯槽骨への抗RANKL抗体の投与方法および解析法について検討を行っている。

- (2) 炎症性骨破壊モデルマウスにおける抗RANKL抗体局所作用の解析

LPS投与5日後、対照群では μ CT像にて頭蓋骨の骨吸収が認められ、組織切片のTRAP染色にて破骨細胞は増加した。抗RANKL抗体もしくはゾレドロネートの投与により骨吸収は抑制され、破骨細胞数も減少した。また、コラーゲンゲルを基剤とした実験群では炎症の波及速度が低下し骨吸収も軽微となったが、この時骨吸収抑制薬を投与すると骨破壊が抑制された。いずれの群でも抗RANKL抗体およびゾレドロネート投与下での大腿骨量への影響は見られなかった。従って、頭蓋骨骨膜下に抗RANKL抗体を投与する本実験系は局所の慢性炎症性骨吸収モデルとして応用できること、また抗RANKL抗体およびゾレドロネートの局所投与は全身に影響を及ぼさないことが明らかになった。

骨吸収抑制薬の局所投与が細胞レベルで全身に及ぼす影響を確認するため、投薬後のマウスから骨髓細胞を採取した。今後セルソーティングなどにより細胞レベルでの研究を遂行する予定である。

- (3) 局所投与至適濃度・投与間隔の検索

マイクロインフュージョンポンプを用いて、週1回、4週間連続で抗RANKL抗体およびゾレドロネートを腹腔内に投与すると、大腿骨および脛骨は大理石骨病様を示した（予備実験）。現在ポンプはマウス背部に埋入し先端のみを目的とする腔などに誘導しているが、頭部への先端の埋入については検討例がないため、手技の取得と妥当性の確認を行っている。手技確立後に投与間隔の検討を行う予定である。

炎症性骨破壊に対するデノスマブの作用機序解明のため、(1) - (3) の検討を今後も継続する。

競合企業の参入が企業の価格と利潤に及ぼす影響について

昭和女子大学 グローバルビジネス学部 山田 麻以

1. 研究の目的

本研究の目的は、競合企業の参入により現存企業の価格と利潤が増加しうることを、ゲーム理論の枠組みの中で企業の戦略的行動を定式化し、理論分析により示すことである。

一般的に競合企業が参入すると現存企業の価格と利潤が低下することが知られており、ゲーム理論による分析でもこのことは証明されている。しかし、近年の実証分析（Ward et al. [2002], Frank and Salkever [1997], Pauwels and Srinivasan [2004]）では、小売業などの様々な産業で競合企業の参入により価格や利潤の上昇が生じたことが示されている。本研究は、現実で観察されたこのような実証分析の結果が、どのようなメカニズムによって引き起こされるのかを、川上企業と川下企業との垂直取引構造や企業間の技術といった要因に着目して明らかにする。

競合企業の参入により現存企業の価格や利潤が増加するメカニズムを示すことは、企業活動や競争政策の観点から有用性がある（松島[2013]）。企業側からすれば、現存企業が競合相手の参入により自社の利潤が損なわれると考えているのであれば、競合企業の参入を阻止するだけでなく、独占を維持するためのロビー活動による訴えなどで費用がかかることにもなる。しかし、競合企業の参入というのはむしろ自社の価格と利潤を増加させうることを企業が知れば、その余計な費用を削減できる。また、競争政策の観点からも、競合企業の参入を促進した結果、現存企業の製品価格が上昇して消費者の厚生を損なうことになれば、競争政策が本来達成すべき消費者の厚生の改善ができなくなるので、競合企業の参入の促進により価格が上昇する市場メカニズムが存在することを明示することは政府にとっても有益である。

2. 研究の計画・方法

本研究は、競合企業の参入が現存企業の価格と利潤を増加させるという実証分析による結果が生じたメカニズムをゲーム理論の枠組みで示すものなので、まずゲーム理論による既存研究のサーベイを行ったうえで、数理モデルの構築を行う。

(1) 既存研究のサーベイ（2016年4月～5月）

企業数と現存企業の利潤に関する研究のサーベイを行う。競合相手の参入が現存企業の価格や利潤を増やしうることを理論的に示した先行研究（Rosental [1980]、Pal and Sarkar [2001]、Inderst [2002]、Davis et al. [2004]、Chen and Riordan [2007, 2008]、Coughlan and Soberman [2005]、Ishibashi and Matsushima [2009]）では、製品が消費者の好みの意味で差別化されている状況や、品質の意味で差別化されている状況を想定しているものが多く、そのような状況では企業間の競争が緩和され価格や利潤が増加しうることを明らかにしている。

(2) 数理モデルの構築（2016年6月～7月）

競合企業の参入により現存企業の価格と利潤が増加するような数理モデルの構築を行う。この際、川上企業と川下企業の垂直取引構造と企業間の技術格差を取り入れることに加えて、現存企業の戦略的行動には既存の研究（販売量、数量、投資、水平的・垂直的製品差別化）にはないものを取り入れることを試みる。

(3) 数理モデルの修正と関連研究のサーベイ（2016年7月～8月）

既存の研究にはない現存企業の戦略的行動として考えられるものは、営業時間の選択である。

営業時間を戦略変数として分析した既存研究で代表的なものは Inderst and Irmen (2005) であ

る。

彼らは営業時間は差別化のツールとして有効であることを示し、価格競争が緩和されることを示した。Inderst and Irmen (2005)の数理モデルの枠組みを拡張したものとしては Shy and Stenbacka (2008), Wenzel (2010), Wenzel (2011)があり、いずれも営業時間の選択と価格競争の関係や、社会厚生への影響が分析されている。これらの既存研究を参考に数理モデルを修正する。

(4) 研究会への参加（2016年8月～9月）

信州大学での産業組織・競争政策研究会や沖縄国際大学での経済研究セミナーに参加し、企業間競争に関する新たな知見を得る。

(5) 数理モデルの分析（2016年10月～3月）

研究会で得た新たな知見を取り入れた数理モデルを再構築する。市場を小売業による寡占競争として市場環境を設定し、営業時間と価格を戦略変数とした数理モデルを解いて小売業による最適な営業時間や価格を導出する。解析的に解けない場合には計算ソフト mathematica を購入し、数値計算によって分析を行う。

3. 研究の特色

本研究の特色は、価格と営業時間を小売業の戦略変数として扱い、現存の小売業が新規の小売業の参入を阻止ができるような（つまり市場の独占）価格と営業時間を設定するか、参入を容認するような（この場合、市場での企業数が増える）価格と営業時間を設定するかのどちらかが現存の小売業の利潤を高めるかを調べる点にある。また、現存の小売業が新規の小売業を容認して市場での企業数が増える場合に価格が上昇するかどうかについても調べている。

4. 研究の成果

(1) 数理モデルの基本設定

現存の小売業と新規の小売業の2つが存在するとする。現存企業は新規企業の参入を阻止するか容認するかの選択肢をもつ。また現存の小売業と新規の小売業は営業時間と価格を戦略変数としてもつ。現存の小売業は営業時間に応じて労働者を雇い、その全ての労働者と終身雇用契約を結ぶ。つまり、労働費用が固定費用（サンクコスト）となる。

(2) ゲーム構造

ゲームは下記の3段階ゲームとし、バックワードインダクションによりゲームを解く。

Stage 1：現存企業と独占の川上企業が契約する。

Stage 2：現存企業は終身雇用契約を結び、営業時間と価格を同時に決定する。

この時の現存企業の行動は「参入阻止の営業時間」参入容認の営業時間

Stage 3：企業 E が市場に参入するかどうかを決める。参入する場合は営業時間と価格を同時に決定する。

(3) 分析結果

現存の小売店にとって新規の小売店の参入を阻止するような価格と営業時間を設定して市場で独占となる方が利潤が高いか、それとも参入を容認するような価格と営業時間を設定して市場で

競争する方が利潤が高いかについて調べる。結果、消費者の持つ移動コストのパラメータが十分に低い場合には、価格も参入を容認する方が（市場における企業数が多い方が）高くなり競争が緩和されることがわかった。また営業時間という戦略変数は先行研究にあるような競合他社との製品差別化ツールとしてだけでなく、参入阻止のツールとしても使えるということも示唆された。

（4）課題

本研究で得られた営業時間が参入阻止のツールとして使えるという示唆は、営業時間の既存研究だけでなく参入阻止の既存研究にもないまったく新しい視点なので今後も続けたい。また今回はパラメータの数が多く分析で得られた解が煩雑となったので数値例による確認までしかできなかったが、今後はより解析的な分析を行いたい。分析の結果は、沖縄国際大学の研究セミナーなどで報告予定である。

「集団自決」訴訟における宮平秀幸証言の再検討 —矛盾する語りにもみる「沖縄差別」の認識—

専修大学 人間科学部 服部あさこ

1. 研究の目的

- (1) 歴史の証言者としては一見、虚言を弄する者に見える証言者が、複数の証言活動を通じて実は、「事実を証言した」とされる人々と同様、ヤマト（本土）による沖縄の被害を伝えていたことを、インタビューの構築主義的アプローチによって明らかにする。

太平洋戦争末期、日本の民間人が生活していた複数の場所で生じた「集団自決」は、皇民化教育による殉国精神の内面化や、民間人と親しく交流していた日本兵から、敵国の捕虜となった際にどれほど残虐な扱いを受けるかを聞かされていたためなど、状況に強いられたものであることはすでに指摘されている。しかしながら、隊長による自決命令はなかったとする、控訴審における宮平秀幸氏の証言は、日本の沖縄に対する加害性を否定する立場の人々に今日に至っても利用されている。

とはいえ、裁判の証人として宮平氏が語ったことは、彼の認識の一部にすぎない。他の場での証言活動を行ってきた宮平氏の語りをもとに、その認識を全体的に理解すれば、宮平氏もまた、「集団自決」が、日本社会が沖縄を下位に置いていた結果の状況に強いられたものであることを伝えていることが読み取れる。本研究は、宮平氏の複数の語りをもとに、日本の加害性を否定するかに見える証言者もまた、沖縄差別を告発していたことを明らかにするものである。

2. 研究の計画・方法

(1) 資料の提示

- ①「集団自決」訴訟における宮平氏の証言に対して言及された雑誌・新聞記事において、宮平氏が“事実性に疑いのある証言をした人”として取り扱われていることを確認した。
- ②座間味村民の証言資料、手記、座間味島の史資料を参照した。座間味島の集団自決に関して、すでに“事実”として流通しているストーリーが存在し、それが“実際の出来事”としては宮平氏の証言と異なることを確認した。
- ③上述②に関連して、“事実”として流通する証言をした人々の心情について語られた資料を参照した。事実としての被害はあった一方で、座間味村民が、駐留の日本兵には恨みを抱いておらず、むしろ親愛の情を表明していたことが確認された。

(2) 現地調査

- ①宮平氏の遺族の方々に、内容に大きな過誤がないことを確認し、公表の許可を頂いた。
- ②個人で集団自決に関する史資料を収集し研究している人物に協力していただいた。収集されている資料の提示、証言に登場する場所の案内などを受けた。
- ③村史などの史資料に証言が掲載されておらず、裁判当時も証言者とならなかった人物に会い、インタビューを行った。

(3) インタビュー資料の分析

宮平氏へのインタビューをライフストーリーとして編集し、氏が事実として語った内容を整理する。ついで、当時を振り返って語られた心情などから、流通している“事実”と異なる語りが生まれるに至った心境を描き出した。

3. 研究の特色

(1) 見過ごされてきた証言資料の価値を見出す

歴史的事実を争う証言としては虚偽、すなわち無意味なものとしてとらえられてきた証言について、社会学的には十分な意義のあるものであることを明らかにした。これは「なにが」語られたかではなく、「なぜ」語られたかを理解する構築主義的な分析によって可能になるものである。

(2) 沖縄の離島からみた本島の連続性を示す

すべてのマイノリティがそうであるように、沖縄もまた均質な一枚岩の集団ではない。本島住民が離島出身者に差別的まなざしを向けていることは沖縄研究においてしばしば言及されることである。しかしながら、戦争の被害経験という点においては、日本社会から等しく差別的扱いをされていた存在として共通点が見いだせることを明らかにした。これは、沖縄県内の人々の多様性を超えて沖縄が一つの集団として団結していける可能性を示すものである。

4. 研究の成果

(1) 学会報告

2016年9月、第32回日本解放社会学会大会において、「軍国少年の記憶と沖縄差別の認識——『集団自決』訴訟における軍命否定証言の背景——」の題目で報告を行った。証言者へのインタビュー資料について構築主義アプローチによる解釈を提示し、沖縄差別問題研究において、一般的にはもう過去のものになっている証言が、県住民当事者の認識を表すものとして資料的価値があることを指摘した。

(2) 論文

①2016年11月発行の『専修人文論集』第99号掲載の、「軍国少年の記憶と沖縄差別の認識：沖縄戦『集団自決』訴訟におけるある証言者のライフストーリーから」を執筆した。本稿では、戦後日本の変化を経験した証言者が、軍国少年として沖縄戦を生きただけを参照する語りに特に注目し、座間味島の集団自決について、日本政府の沖縄への差別的扱いに起因するものとする認識を指摘した。これは上述の4-(1)と同様、沖縄差別問題の一部として集団自決問題を位置付けられることを示すものである。

②2017年3月発行の『専修大学人間科学論集社会学篇』第7巻第2号掲載の「『集団自決』訴訟における軍命否定証言の背景」を執筆した。本稿では、証言者についてホーリスティックなライフストーリーを紹介し、裁判当時マスメディアに興味本位で取り上げられてきた証言者について、言説行為そのものの意味づけ——もっと日常的な表現をすれば、“なぜそんな証言をしたのか”——を説得的に示した。これはインタビュー資料について、“何が語られたか”ではなく“なぜ語られたか”を理解する構築主義的アプローチが、埋もれてきた資料に社会学的な意義を付与することを示した点で、社会学の生活史研究における資料解釈の方法論の一角を傍証する研究となったと認識している。

金-パラジウムナノ粒子を固定化した ヘテロコア光ファイバLSPR水素センサの研究

創価大学 理工学部 細木 藍

1. 研究の目的

近年、太陽光や風力といった再生可能エネルギーなどを利用した、クリーンなエネルギーシステムが求められており、そのエネルギーキャリアとして水素が注目されている。今後、燃料電池システムの普及に伴い、水素の需要は大きく増加することが予想される。しかし、水素は漏洩しやすく、着火エネルギーの小さな可燃性ガスであるため、水素ガスの漏洩を、安全に素早く検知可能なセンサデバイスが求められている。光ファイバによる水素センサは、小型、軽量であるといった利点に加え、センサ部に電氣的接点を有さないため、爆発危険性の高い環境下での利用が比較的容易に実現できるという特徴を有するため、実用的なセンサとして期待されている。

研究報告者は、機械的強度に優れ、容易にエバネッセント波を生じさせることができるヘテロコア光ファイバセンサを用いて、安定したマルチモード伝送が行える近赤外光領域850nmで動作するヘテロコア光ファイバ水素SPRセンサの研究を行ってきた。本研究では、新たに金ナノ粒子（AuNP）とパラジウムナノ粒子（PdNP）を組み合わせた、局在型表面プラズモン共鳴（LSPR）水素センサの構築を目的とする。具体的には、AuNPとPdNPをセンサ部周囲に固定化し、水素吸蔵による誘電率の変化を捉えるLSPR水素センサを試作し、その応答性を評価する。

2. 研究の計画・方法

(1) AuPdPとPdNPを固定化したヘテロコア光ファイバLSPR水素センサの試作と評価

ヘテロコア光ファイバはコア径50 μ mのマルチモード光ファイバの途中に長さ15mmのシングルモード光ファイバを挿入・融着によって作製する。ヘテロコア部周囲を3-aminopropyltrimethoxysilaneを用いて処理することでアミノ基を導入し、負に帯電したAuNP懸濁液に浸すことによってAuNPを固定化する。その後、ポリアリルアミン溶液に浸し、PdNP懸濁液に浸漬してPdNPを固定化することで、ヘテロコア光ファイバLSPR水素センサの作製を行う。これらの作製したセンサにおいて、AuNPにおいてLSPRを励起し、PdNPの水素吸蔵による誘電率の変化を計測可能か吸収スペクトルから確認する。また、センサの応答特性として、水素4%に対する光損失応答を取得する。

(2) 金ナノロッドを組み合わせたLSPR水素センサの応答特性や感度の評価

(1)で作製したセンサでは、AuNPがLSPRを励起しているため、想定される吸収波長のピークは、波長540nm近傍であると考えられる。しかし、実用性を考慮した場合、安定したマルチモード伝送が行える波長850nm帯域での操作が可能なLSPR水素センサの実現を目指す必要がある。そこで、金ナノ粒子の形状をナノロッドに変更した場合の吸収スペクトルの測定を行い、LSPRの吸収波長を近赤外光領域へシフト可能か検討する。併せて、金ナノロッドを利用した場合の水素4%に対するセンサ感度の検討も行う。

3. 研究の特色

従来の光ファイバ水素センサでは、水素吸蔵材であるパラジウム(Pd)薄膜や貴金属触媒と酸化タングステンからなる複合膜を利用している。研究報告者も、金、五酸化タンタル、Pdの多層膜を利用したヘテロコア光ファイバSPRセンサを提案している。一方、Pdは水素の吸蔵放出を繰り返すことで、膜の表面膨張や、層の剥離などが生じる恐れがある。そのため、センサを長期間に渡って使用しようとする、検知性能、応答性能などの特性が劣化する恐れがある。先に述べた問題に対して、本研究では粒径の小さいPdNPに着目したヘテロコア光ファイバLSPR水素センサを提案する。PdNPは表面を占める原子量が多いため、水素の吸蔵・放出を素早く行えることが期待

できる。PdNPの水素吸蔵による誘電率の変化を、LSPRを利用して光ファイバで捉えた報告例は少なく、本研究によって新たなLSPR水素センサの実現が期待できる。さらに、製作が容易で機械的強度の強いヘテロコア光ファイバとナノ粒子を組み合わせていることから、水素に対する感度が高く実用性に富んだ光ファイバ水素センサを実現できる。

4. 研究の成果

- (1) 図1にヘテロコア光ファイバLSPR水素センサの構造を示す。この構造では、センサ部と伝送路のコア径の違いによって、伝送路を伝搬してきた光の大部分は、センサ部のクラッド層へ漏れる。この漏れた光がクラッド層と外界との境界面で全反射を起こす際に、エバネッセント波が生じる。センサ部表面にAuNPとPdNPを固定化することで、AuNPによるLSPRの励起およびPdNPの水素吸蔵によってエバネッセント波が吸収され、伝搬光強度が減少する。AuNP（粒径40nm）上にPdNP（粒径4nm、3分間浸漬）を固定化したヘテロコア光ファイバセンサの水素4%に対する吸収スペクトルを計測したところ、約540nm付近での吸収ピークが認められた。さらに、水素吸蔵時における吸収ピークの増加も確認できた。この結果から、当初の目的であったAuNPでPdNPの水素吸蔵による誘電率の変化を捉える水素センサが構築可能であることが示された。
- (2) アミノ基を導入したヘテロコア部に吸収波長のピークを808nmに持つ金ナノロッドを固定化したセンサを作製し、水中における吸収スペクトルを計測した。その結果、波長800nm付近に特徴的なLSPRの吸収ピークを観測できた。この金ナノロッド上にPdNP（粒径4nm、3分間浸漬）を固定化したセンサにおいても、水素吸蔵に伴って吸収スペクトルが変化することを確認できた。これにより、金ナノロッドといった形状や大きさの異なる粒子を用いることで、吸収波長を任意の波長に操作可能であることがわかった。
- (3) PdNPのみをヘテロコア部に固定化したセンサの感度特性も検討した。ヘテロコア部表面をポリリジン溶液に浸漬し、これをPdNP懸濁液（粒径4 nm）に30分間浸漬させることによってPdNPを固定化した。図2は、波長850nmのLED光源を用いて、水素4%に対する光損失変化を計測した結果である。図2から、水素の吸蔵・放出を鋭敏にかつ再現性よく捉えていることを確認できた。また、センサの応答時間（光損失が安定した値の10%から90%に達する時間）は約1.0秒、回復時間（光損失変化が10%から90%に達する時間）は約4.0秒を示した。これらの結果から、PdNPを利用することで応答性の早い水素センサを実現できることが示された。

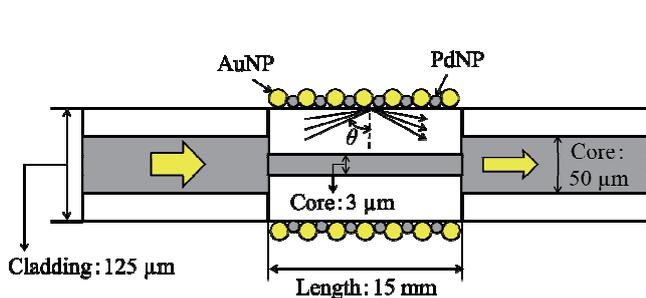


図1 AuNP/PdNPを固定化したヘテロコア光ファイバLSPR水素センサ

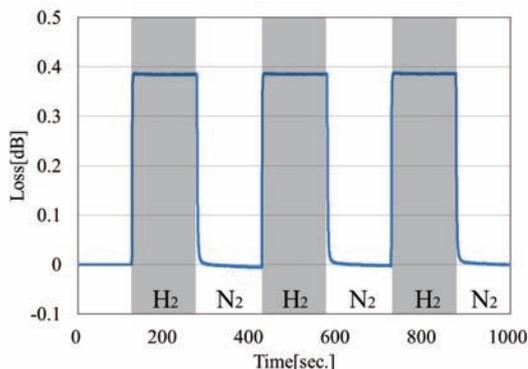


図2 PdNPを固定化したセンサの中心波長850nmLED光源による光損失応答

ヒト tRNA メチル化酵素 hTRM1 の機能および構造解析 — 遺伝病のメカニズムの解明を目指して —

中央大学 理工学部 粟井 貴子

1. 研究の目的

近年、tRNA 修飾酵素をコードする遺伝子の変異に起因する遺伝子疾患が報告されはじめた。そのため、遺伝子疾患の診断や治療を目標に見据えた、ヒト tRNA 修飾酵素の機能解析は急務となってきた。tRNA の 26 位のグアノシンのメチル化酵素である hTRM1 [human tRNA (m²G26) methyltransferase] は、変異により知的障害を引き起こすことが報告されている。しかし、hTRM1 の変異によってどのようなメカニズムで知的障害が引き起こされるのかは全くわかっていない。本申請は 1 年間という限られた期間であるので、hTRM1 の生化学的機能解析を行うことにより、hTRM1 の変異に起因する知的障害のメカニズムの解明の手がかりをつかむことを目的とした。

2. 研究の計画・方法

hTRM1 の生化学的機能解析を行ない、hTRM1 の基本的性質を理解することを目指した。

(1) hTRM1 の発現系の構築及び精製法の確立、メチル化活性の確認

hTRM1 をコードする *htrm1* 遺伝子を大腸菌のコドン使用頻度に最適化した配列に、精製のための HAT-tag、可溶化のための Nus-tag 配列をつなぎ、プラスミド pGEX-6P-1 に挿入し、組み換え hTRM1 発現プラスミドを作成した。大腸菌 Rosetta gami B 株を、作成したプラスミドで形質転換し、組み換え hTRM1 の発現を行った。発現した hTRM1 は、Ni-NTA アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。ヒト tRNA^{Tyr} は、生体内で 26 位のグアノシンにメチル基を持つことが知られているため、hTRM1 によりメチル化されることが予想される。そのため、ヒト tRNA^{Tyr} を試験管内で作成し、精製した hTRM1 のメチル化活性の確認を行った。メチル化活性の確認は、放射線標識されたメチル基供与体 (14C-S-Adenosyl-L-methionine) を用いて、メチル基の tRNA への転移量の計測によって行なった。

(2) 修飾部位の決定

hTRM1 のホモログである真正細菌 *Aquifex aeolicus* Trm1 は、26 位のグアノシンだけでなく、27位のグアノシンもメチル化することがわかっている。27 位がメチル化されている tRNA は、これまでに、*Aquifex aeolicus* tRNA^{Cys}、ウシ tRNA^{Tyr}、ヒト tRNA^{Tyr} しか報告されておらず、ウシとヒトでは、その修飾酵素は発見されていない。そのため、ヒトでも hTRM1 が 27 位をメチル化している可能性が考えられる。そのため、hTRM1 による tRNA のメチル化部位を調べた。ヒト tRNA^{Tyr} と、tRNA^{Tyr} の 26 位を A に変えた tRNA^{Tyr(G26A)} 及び、27 位を A に変えた tRNA^{Tyr(G27A)} を試験管内で作成し、(1) で精製した hTRM1 によって、メチル基受容活性の確認を行った。メチル基受容活性の確認は、(1) と同様の方法で行なった。

(3) hTRM1 の基質 tRNA 認識部位の決定

hTRM1 が、tRNA のどの部分を認識して tRNA と結合し、反応を行なっているのかを知るために、ヒト tRNA^{Tyr} と、tRNA^{Tyr} の T-arm を欠く変異体 tRNA^{Tyr(ΔT-arm)}、D-arm を欠く変異体 tRNA^{Tyr(ΔD-arm)}、variable region を欠く変異体 tRNA^{Tyr(Δv-region)} を試験管内で作成し、(1) で精製した hTRM1 によって、メチル基受容活性の確認を行った。メチル基受容活性の確認は、(1) と同様の方法で行なった。

(4) 結晶構造解析を目指した酵母発現系の構築

hTRM1 をコードする *htrm1* 遺伝子を酵母のコドン使用頻度に最適化した配列に、精製のための HAT-tagをつなぎ、プラスミド pPIC3.5K に挿入した。酵母 SMD1168 株を、作成したプラスミドを用いて形質転換し、組み換え hTRM1 の発現を行った。発現した組み換え hTRM1 のメチル化活性の確認を行った。メチル基受容活性の確認は、(1)と同様の方法で行なった。

3. 研究の特色

これまで、tRNA 修飾の研究は主に、入手が容易で取り扱いやすく複雑性が低い単細胞生物で進められてきており、ヒトの tRNA 修飾の研究は遅れている。その背景には、「まずは簡単なモデル細胞で全容を明らかにすることを目標とした」などの理由がある。1965 年に tRNA 修飾が発見されて以来半世紀に渡る研究の結果、次第に tRNA 修飾の全容が明らかになりつつある。これからの tRNA 修飾の研究は、これまでに単細胞生物での研究で培われた知識と技術を発展させ、ヒトなどの複雑な生物の高次の生命現象の理解や遺伝子疾患の理解につなげることが課題となってきた。本申請は、tRNA 修飾酵素の変異に起因する神経系疾患の解明のための第一歩として、hTRM1 の機能解析を行なうものである。

4. 研究の成果

(1) hTRM1 の発現系の構築及び精製法の確立

プラスミドの作成に成功した。配列はシーケンス解析によって確認した。組み換え hTRM1 の発現と精製に成功した。精製した組み換え hTRM1 が活性を持つことが確認できた。

(2) 修飾部位の決定

ヒト tRNA^{Tyr} と、その 26 位を A に変えた tRNA^{Tyr(G26A)} 及び、27 位を A に変えた tRNA^{Tyr(G27A)} を試験管内で作成し、(1)で精製した hTRM1 によって、メチル基受容活性の確認を行った結果、ヒト tRNA^{Tyr} と、tRNA^{Tyr(G27A)} はメチル基受容活性を示したが、tRNA^{Tyr(G26A)} はメチル基受容活性を示さなかった。つまり、hTRM1 は 26 位のみをメチルし、27 位はメチル化しない酵素であることがわかった。27 位は他の酵素によってメチル化されることが示唆された。

(3) hTRM1の基質tRNA特異性の決定

tRNA^{Tyr(ΔT-arm)}、tRNA^{Tyr(ΔD-arm)}、tRNA^{Tyr(ΔV-region)} 試験管内転写産物はいずれもメチル基需要活性を示さなかった。つまり、T-arm、D-arm、variable region はどれも、hTRM1 によって認識されている。これまでに調べられている真核生物と古細菌の Trm1 は D-stem と variable region のみを認識しており、*A. aeolicus* Trm1 は T-arm のみを認識することがわかっていた。hTrm1 は、これまで知られていたどの Trm1 とも異なり、基質の認識が非常に厳密であるという結果が得られた。

(4) 結晶構造解析を目指した酵母発現系の構築

(1)では、結晶化に十分量の hTRM1 が得られず、また、アグリゲーションが見られたため、酵母での発現を試みた。形質転換した酵母の、組み換え *htrm1* 配列は、シーケンス解析によって確認した。組み換え hTRM1 メチル化活性を持つことが確認できた。しかし、十分な発現量を達成することができず、本申請期間中には構造解析には至らなかった。結晶化に十分量の hTRM1 を得るためには、プロモーター下流に *htrm1* 配列をタンデムにつなぐ、培養槽の規模を大きくするなど改善が必要である。