

新規骨形成ペプチドの機能解析に基づく歯周組織再生創薬の挑戦 —エムドゲイン®に代わる新規分子医薬の開発—

大阪歯科大学 歯学部 嘉藤 弘仁

1. 研究の目的

(1) これまでの研究の背景、問題点（エムドゲインの問題点）

エムドゲインは歯周組織再生療法において最も臨床に応用されている製剤のひとつである。しかし、エムドゲインは動物（ブタ歯胚）由来の製剤であるため、未知の病原体やさまざまなタンパクが混在しているなどの問題がある。したがって、生物に由来しない人工合成ペプチドの研究・開発が求められている。

(2) 新規骨形成ペプチドの作製とその問題点

旧タイプのエムドゲインをラット背部皮下に注入し、骨・軟骨様組織と好酸性の円形小体が生じることを発見した。その円形小体が硬組織形成に関係していると仮説を立て、円形小体のタンパク質解析を行った。その結果、ブタのアメロジェニン前駆物質であることが判明した（J Periodontol 2005; 76: 1934-1941）。その解析を基に、人工的にエムドゲイン由来の新規骨形成ペプチドを作製し、硬組織誘導能があることを確認した。

しかし、新規骨形成ペプチドが硬組織を誘導する作用機序や分子メカニズムについての検討はほとんどされていない。この詳細な分子メカニズムを解明し、合成ペプチドの詳細な作用機序を検討する必要がある。

(3) 何をどこまで明らかにしようとするのか

歯周組織再生に重要な役割を果たすと報告されているヒト歯根膜幹細胞に新規骨形成ペプチドを応用し、硬組織形成を誘導する際の作用機序・シグナル経路を遺伝子やタンパク質の発現を検討し、明らかにすることを目的にする。

2. 研究の計画・方法

本研究では、ヒト歯根膜幹細胞に新規骨形成ペプチドを作用させ、硬組織形成を誘導する際に発現する遺伝子やタンパクを分子レベルで解明する。

(1) ヒト歯根膜幹細胞の初代培養

申請者は本研究に用いるヒト歯根膜幹細胞の初代培養の方法は確立しており、その成果は（Kato H et al. Journal of Periodontology 2013）で報告している。

(2) 新規骨形成ペプチドの作用機序・シグナル経路の解明

新規骨形成ペプチドをヒト歯根膜幹細胞に作用させ、遺伝子（mRNA）、タンパクを抽出する。得られたcDNAを用いて網羅的遺伝子解析（マイクロアレイ解析）を行い、未知の遺伝子を探索する。

また抽出されたタンパクを用いてウエスタンブロット法により、分子レベルで新規骨形成ペプチドの作用機序を明らかにする。

3. 研究の特色

(1) 高品質・安価・大量に作製することが可能であり、in vivoで骨様組織が形成される。

エムドゲインはブタ歯胚から作製される。そのため、少量しか生産できず、高価な製剤で

ある。また、ロット間により品質にもバラつきがあることが懸念されている。

これを解決できるのがこの新規骨形成ペプチドであり、**高品質・安価・大量**に生産することが可能である。

また申請者らはすでに新規骨形成ペプチドを作製して骨組織が形成されることについて特許を取得しており、産業化を予定している。

(2) 分子量が小さいため抗原として認識されない（抗体反応が起きない）。

エムドゲインは複数回投与すると抗体が産生されるという報告がある（J Periodontol 2006; 77: 1355-1361）。この事実は生体内で抗体が産生され、その効果が減弱すると考えられる。

ペプチドの分子量が大きい（5,000 Da以上）と抗原として認識される（Nature 1982; 299: 593-596）。しかし、この新規骨形成ペプチドの分子量（1,118 Da）はかなり小さいものである。

したがって、このペプチドは抗原として認識されるリスクが極めて低い。これは生体内で抗体が産生されず、複数回にわたって使用しても効果の減弱やアレルギーが生じないと考えられる。

4. 研究の成果

(1) マイクロアレイ解析

ヒト歯根膜幹細胞に新規骨形成ペプチドを作用させると、Leucine-rich repeat-containing protein (LRR)の遺伝子発現が対照群と比較して 35 倍増強された。LRR は骨芽細胞に高く発現する遺伝子であるとされている。

したがって、新規骨形成ペプチドは LRR に作用し、歯根膜幹細胞の骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された。この発見は新規骨形成ペプチドが LRR を介して作用する新しい知見を発見することができたといえる。

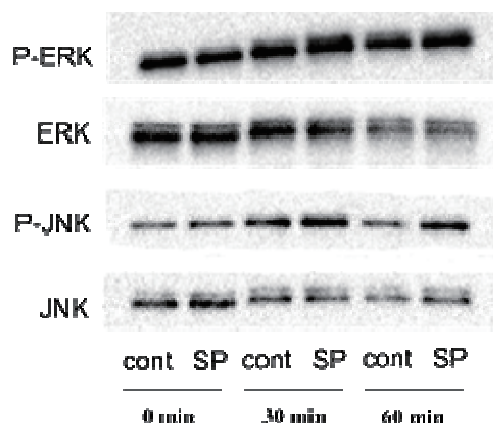
(2) ウェスタンブロット解析（作用機序の解析）

歯根膜幹細胞と同様に、硬組織再生に重要な細胞であるヒト間葉系幹細胞に合成ペプチドを作用させ、タンパクを抽出し、ウェスタンブロットを用いて、シグナル経路の解析を行った。

エムドゲインは MAPK 経路のひとつである ERK を介して生理活性を示すことが知られている。そこで、採取したタンパクを用いて、ERK の発現について検討した。その結果、合成ペプチドは ERK の発現を有意に活性化することが示唆された。

さらに、ヒト歯髄幹細胞の ERK、JNK のリン酸化に及ぼす SP の影響についてウェスタンブロット法を用いて検討を行った。SP はヒト歯髄幹細胞の ERK および JNK シグナルのリン酸化を増強することが明らかになった。

したがって、エムドゲインと同様に、新規骨形成ペプチドは MAPK 経路を介して、ヒト歯髄幹細胞の細胞増殖、硬組織分化を促進する可能性が示唆された。



(3) まとめ

本研究では、ヒト歯根膜幹細胞をはじめとする硬組織再生に重要な役割を担う細胞を用いて、現在まで解明できていなかった新規骨形成ペプチドの作用機序について検討を行った。その結果、エムドゲインと同様に、MAPK経路を介して、増殖や分化を制御することが明らかになった。しかしながら、今後の課題として、新規骨形成ペプチドについてはin vivo実験などを追加し、さらなる検討が必要であると考えられる。

サルモネラのVBNC状態に関わる分子機構の解明 ーカタラーゼによるVBNCからの復帰促進ー

大阪薬科大学 薬学部 森重 雄太

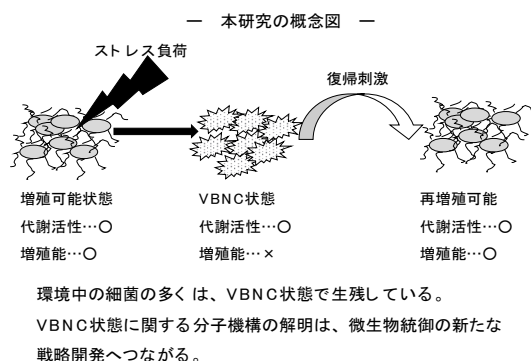
1. 研究の目的

本研究は、ストレス条件下におけるサルモネラの生残戦略の一つとして、サルモネラの「生きているが培養できない」状態(viable but non-culturable; VBNC)への移行と、そこから増殖可能な状態への復帰機構を明らかにすることを目的とする。

我が国で発生した食中毒事例のうち半数以上は「原因食品不明」であり、感染経路を特定することが困難である。近年の研究から、その理由の一つとして、細菌のVBNC化の関与が示唆されている。

VBNC化は、細菌が環境中で生残するための戦略の一つとして考えられている。1982年にColwellらがVBNC状態のコレラ菌の存在を報告して以来、関連する数多くの報告がなされて来た。しかし、VBNCに関する分子機構の詳細には未だ不明な点が多い。また、種々の研究結果から、病原細菌はVBNC状態へ移行してもなお、その病原性を維持していることが示唆されている。したがって、その分子機構を解明することは、食品衛生のみならず、感染制御の観点からも重要である。

本研究では、我が国のみならず世界各国で大規模な食中毒を起こしているサルモネラ (*Salmonella* Enteritidis; SE) を用いて、これを乾燥ストレス負荷によってVBNC状態へ移行させ、VBNC状態から増殖可能な状態への復帰に寄与する分子機構を、生化学的、分子生物学的手法を用いて明らかにする。



2. 研究の計画・方法

(1) 乾燥ストレス負荷による SE の VBNC 化

対数増殖期中期にあるSEを、 1×10^7 CFU/10 μ Lの密度になるように生理食塩水中に懸濁し、頭頂部に孔径0.22 μ mのメンブランフィルターを備えた培養チューブの底部に10 μ Lを接種し、これを自動乾燥装置内で室温にて相対湿度20%未満の条件下で一晩乾燥することにより、乾燥ストレスを負荷する。その後、グルコースを含まないM9最少培地1 mLを添加して攪拌し、氷上で1時間静置する。これにより、乾燥状態から回復させる。VBNC状態の評価は、呼吸活性及びグルコース取り込み活性に基づく生菌選択的な染色法とフローサイトメトリー(FACS)を用いた迅速検出法(Morishige *et al.* 2015)を用いて行い、定量的に解析する。

(2) VBNC 化した SE の増殖可能な状態への復帰

乾燥ストレスによりVBNC化したSEを、M9最少培地中に懸濁し、これにウシ肝臓由来カタラーゼを添加して、水浴を用いて37°Cで6時間静置する。カタラーゼ処理は、酸化ストレスによってVBNC状態へ移行したSE(Morishige *et al.* 2013)を、増殖可能な状態へ復帰させることが予備検討によって明らかになった。また、乾燥ストレスによって誘導されたVBNC菌に対しても、カタラーゼの添加によるVBNC状態からの復帰に、一部効果が表れた。本研究では、この点をさらに詳細に検討し、より大きな効果が得られる条件を確立する。

(3) (2)における VBNC 状態からの復帰前後における遺伝子発現の変動解析

カタラーゼ処理前後のSE菌体を回収する。RNAを抽出して、リアルタイムPCR法で解析し、VBNC状態からの復帰に際してどのような遺伝子の発現が変動するのかを解析し、そのキーとなる遺

伝子を同定する。カタラーゼの作用については、培地中にカタラーゼを添加することで、SEがVBNC状態から復帰する過程で、ごく微量産生される過酸化水素を分解して増殖に適した環境を作るためではないかと思われる。この菌体内外の変化に対応する遺伝子発現を検出する。特に、乾燥ストレス負荷に際して浸透圧の上昇を伴うことから、酸化ストレス及び浸透圧ストレス関連遺伝子、そしてエネルギー代謝関連遺伝子に注目して、探索する。

(4) (2)におけるVBNC状態からの復帰に寄与すると考えられる遺伝子の欠損変異株の作成

(3)の実験で同定された、VBNC状態からの復帰のキーとなる遺伝子を、Red recombinase plasmid pKD20を用いてノックアウトした変異株を作成する。カタラーゼ処理によるVBNC状態からの復帰に対する影響を解析することで、VBNC状態からの復帰における分子機構の解明ができると考えられる。

3. 研究の特色

本研究は、これまで長らく解明がなされて来なかった、「増殖可能であった細菌がどのようなメカニズムでVBNC状態へ移行し、再び増殖可能な状態へ復帰するか」を明らかにするもので、乾燥ストレスによるVBNC化については、従来には無い、極めて新しい研究である。

VBNC状態は、細菌が関与するあらゆる分野において重要な課題であり、その詳細な機構を解明することは、微生物が関係する分野に広く多大な貢献をすることが期待される。しかし、その分子機構に関する知見は乏しく、これを研究する者は国内外を問わず、非常に少ない。

本研究では、食品の保存方法として一般に用いられる「乾燥状態」を利用して細菌にストレスを負荷する。その際に、菌体内で発現変動する分子を生化学的・分子生物学的に解析して、未知の制御機構と物質を明らかにすることにより、その結果を食品衛生上の管理に応用することができると期待される。

また、本研究ではVBNC状態の測定法として、筆者が開発した評価系を用いて、細菌の代謝活性に基づく生菌選択的染色法を採用している。この方法によって、本来の意味での「生きているが培養できない」細菌を選択的に検出できる。この方法は従来、VBNC菌の検出法として広く用いられてきた死菌選択的な染色法とは異なり、VBNC状態の本質的な理解に直接結びつくことが特色である。

4. 研究の成果

- (1) 貧栄養条件下で乾燥ストレスを負荷することにより、短時間で再現性良く、SEをVBNC状態へ移行させることに成功した。栄養をほとんど含まない生理食塩水にSEを懸濁し、前述の自動乾燥装置で一晩乾燥ストレスを負荷し、グルコースを含まないM9培地を添加して乾燥状態から回復させ、FACSで個々の菌の代謝活性を測定した。その結果、増殖能を失っているにも関わらず、呼吸活性やグルコース取り込み活性を維持している菌が、多く検出された。この結果から、乾燥ストレス負荷によってSEはVBNC状態へ移行したものと考えられる。従来、長い日数を要していたVBNC状態への誘導を、本研究ではわずか1日に短縮して完了することが可能となった。これによってVBNC状態の解析及び研究が容易になり、種々の測定法の応用が可能になると期待される。
- (2) VBNC状態へ移行したSEを、カタラーゼ処理によって増殖可能な状態へ復帰させることに成功した。前述の方法でSEをVBNC状態へ移行させ、これにカタラーゼを添加して37℃で6時間インキュベートすると、未処理のものと比較して約3-30倍、増殖能を有する菌数が増加した。この際に、菌液の吸光度は増加しなかったことから、この現象はカタラーゼ処理による増菌効果ではなく、VBNC状態へ移行したSEがカタラーゼ処理によって増殖可能な状態へ復帰したものと考えられる。筆者はこれまでに、酸化ストレスによってVBNC化したSEの復帰に際して、ピルビン酸処理が有効であることを示した（Morishige *et al.* Microb. Environ. 2013）が、乾燥ストレ

スによってVBNC化したSEに対しては、ピルビン酸は無効であった。これらの結果から、乾燥ストレスによってVBNC化したSEを増殖可能な状態へ復帰させるには、カタラーゼ処理が有効であることが示唆された。

- (3) 乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行に際し、DNA結合タンパク (Dps) の関与が示唆された。乾燥ストレス負荷したSEからRNAを抽出し、リアルタイムPCR法によって遺伝子の発現変動を解析した。その結果、乾燥ストレス負荷前と比較して、乾燥ストレスによってVBNC状態へ移行したSEにおいて、Dpsをコードする遺伝子である *dps* の発現が上昇していることが明らかになった。この結果から、乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行において、Dpsが何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。
- (4) *dps* のみが乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行及び復帰に必須では無く、その他複数の因子が関与する可能性が示唆された。前述の結果を踏まえて、*dps* を欠損した変異株 (Δ *dps* 株) を作成し、乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行及び増殖可能な状態への復帰に対する影響を調べた。その結果、野生株、 Δ *dps* 株共に、乾燥ストレス負荷によりVBNC状態へ移行し、カタラーゼ処理により増殖可能な状態へ復帰することが示された。この結果から、乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行及び復帰において、*dps* のみならず、その他複数の因子の関与が示唆された。

筆者は、酸化ストレス負荷によってVBNC状態へ移行したSEに対してカタラーゼ処理をすると、増殖能の回復にカタラーゼをコードする遺伝子の一つである *katE* の発現が上昇するという結果を得ている(森重 他 第89回日本生化学会大会)。現在、*katE* 欠損変異株を作成し、乾燥ストレス負荷によるVBNC状態への移行及び復帰に対する影響を解析している。

なお、以上の成果の一部は、2016年8月29日-9月1日の間に開催された、7th ASM Conference on *Salmonella* (ドイツ)にて発表し、Journal of Food Protection誌に掲載された。(Morishige *et al.* J. Food. Protect. 80 (2) 2366-2374 (2017))

日本人英語学習者における協同 L2 ライティング活動の有効性検証 ーグループ編成の影響に焦点をあててー

関西大学 外国語学部 植木 美千子

1. 研究の目的

従来、「書く」という行為は、学習者が一人で行うものであるという認識が、教員側にも学習者側にも根強くあり、英語（L2）ライティング活動のプロセスに、他の学習者を関与させることはほとんどなかった。しかし、近年の第二言語習得研究では、L2ライティング活動に、ペアやグループ形態を導入し、協同的に1つのライティングを完成させる活動（＝協同L2ライティング活動）の重要性が指摘されつつある。また、協同L2ライティング活動には、ペアによるものと、グループによるものがあるが、（L2ネイティブ話者の関与が少ない）日本のような英語を外国語として学ぶ環境（EFL）においては、ペアよりもグループで活動を行った方が、より多くの利点があることが示唆されている（Dobao, 2014）。そこで、本研究では、日本人大学生英語（L2）学習者を対象に、グループ形態の協同L2ライティング活動を実施し、協同ライティング活動中の学習者同士のインタラクションと、L2ライティング成果物を分析することによって、協同L2ライティング活動の際の有効なグループ編成のあり方と教育的介入の方法について提言することを目的とした。協同L2ライティング活動の有用性としては、読み手の注意や関心をより意識するようになる（Leki, 1993）、文法的な正確さが向上する（Wigglesworth & Storch, 2009）、語彙の定着が促進される（Kim, 2008）、長期に渡る学習効果が認められる（Shehadeh, 2011）、などが指摘されている。しかし、それらの効果出現は、グループのメンバーとなる個々の学習者のL2運用能力に依拠するところが大きいと言われており（Storch, 2013）、その結果、どのようなL2運用能力の学習者を組み合わせてグループを編成するのかが、活動の成否を左右する大きな鍵となると指摘されている。これまでの協同L2ライティング研究では、Lesser（2004）が、ペアの形態で、どのような学習者の組み合わせがL2ライティング成果物の質や言語習得に影響するのかという研究を行っているが、グループを対象に、編成の影響を検討した研究は皆無と言わざるを得ない。そこで、今後、日本の英語教育において協同L2ライティング活動を広く普及していくために、グループ編成がL2ライティングの成果物の質や言語習得にもたらす影響を明らかにすることが本研究の目的であった。

2. 研究の計画・方法

本研究では、日本人大学生英語学習者（合計35名）を調査参加者として、グループを活用した協同L2ライティング活動を実施した。調査参加者の英語力に応じたグループ編成を行った。ライティング活動では、L2ライティングの産物を協同で1つ作成していく。この過程をマルチモーダル（映像、音声、文字）に記録し、どのようなインタラクションが行われたかを、Language Related Episode (Swain & Lapkin, 2002) という単位で切り出して、会話分析等の質的手法で分析した。また、得られたL2ライティングの成果物（つまりライティング作品）は、幾つかの評価基準を設けて統計的手法で分析し、前述した質的分析の結果と関連づけた。また、これらのデータ・分析をもとに、グループ編成の形態が、L2ライティングの成果物の質や言語習得のプロセスにもたらす影響を明らかにした。

3. 研究の特色

本研究の特色として、第一に、協同L2ライティングにおけるグループ編成の影響を、L2ライティング成果物だけでなく、活動中の学習者同士のインタラクションを考慮に入れて、質的手法できめ細かく分析を行った点があげられる。例えば、どの部分（文法、構文など）に焦点をあてながら、学習者同士のインタラクションが展開しているのか、学習者間の関係性がどのように協

同L2ライティングに影響するか、また、それらがL2ライティング成果物にどのように反映されるのかなどに関して、知見を得ることが可能となった。このような質的手法の導入によって、L2ライティング成果物のみを対象に量的分析を行うことが多かった従来の研究アプローチ方法に多様性を持たせることとなった。第二に、経験が中心であった協同L2ライティング活動に、エビデンスに基づいた具体的な提言を行うことが可能になった点があげられる。本研究によって、日本人英語学習者を対象とした研究がほぼ皆無であった分野にエビデンスを示しながら、協同L2ライティングの有効性を提示することができた。

4. 研究の成果

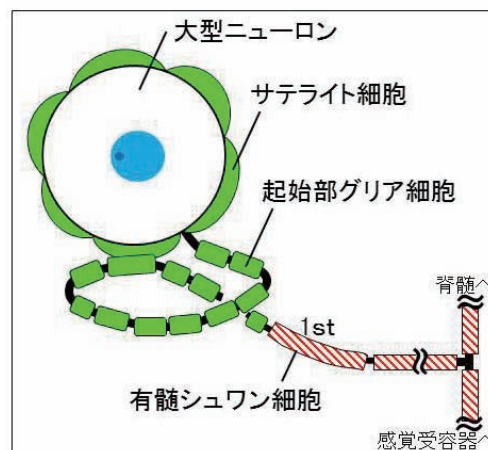
本研究の結果、L2協同ライティングの効果はペア、グループのどちらのグループ編成形態にも正の結果をもたらすことが確認された。効果の強さはグループ形態というよりも、ペアまたはグループを構成する日本人英語学習者の英語能力が影響を与える可能性が高いことが判明した。英語能力が高い（e. g., TOEIC 700-750点程度）日本人学習者の場合ペアというグループ形式の方が、協同L2ライティングの効果がより強く現れる傾向にあるが、グループ学習になると、「協同」というよりも「分担」という学習形態になってしまう可能性があることが確認された。一方英語能力が比較的低い（e. g., TOEIC 350-400点程度）日本人英語学習者の場合、ペアよりもグループ形式の方が、協同L2ライティング効果が高いことが明らかとなった。しかし、グループ形式での効果が確認された一方で、活動そのものに時間がかかってしまうというデメリットも確認された。

一次感覚ニューロンの突起起始部を被うグリア細胞の性質 —3次元的組織観察による細胞分化過程の解析—

関西医科大学 医学部 小池太郎

1. 研究の目的

脊髄神経節（DRG）には感覚を受容する一次感覚ニューロンが存在し、図に示すように、部位により異なる種類のグリア細胞に被われている。ニューロンの細胞体は扁平なサテライト細胞に被われ、大型ニューロンの突起（細胞体からT字分岐部までの部分）および軸索（分岐後の部分）は髄鞘を形成する有髄シュワン細胞に被われる。さらに、ニューロンの突起 起始部は上記とは別のグリア細胞集団（起始部グリア細胞）に被われる。このグリア細胞は、髄鞘を形成しないシュワン細胞である無髄シュワン細胞とは別もので、1960年に報告されて以降、文献的記載が全く無いため、この細胞についての



知見は皆無であった。私はこれまでの研究から、末端付近の起始部グリア細胞は分裂能を持っていること、1st有髄シュワン細胞の髄鞘が薄いこと、チミジンアナログ投与後2週間で1st有髄シュワン細胞が陽性を示すことを突き止めていた。これらのことから、末端部の起始部グリア細胞が有髄シュワン細胞の前駆細胞で、この細胞が分裂し、新生細胞が1st有髄シュワン細胞に分化、髄鞘を形成していくという仮説を立てた。本研究ではこの仮説を証明するため起始部グリアの細胞種同定および分裂細胞を、三次元的組織観察法を用いておこなった。

2. 研究の計画・方法

動物：6週齢のWistar rat、雄のDRGを用いた。

細胞種マーカーを用いた免疫組織化学による細胞同定と分布：DRG厚切りスライスを用い、各細胞種マーカーの蛍光多重染色により起始部グリア細胞の細胞種同定および同定細胞の分布パターンを解析した。末梢神経系グリアで発現するS100とglutamine synthetase、髄鞘で発現するmyelin basic protein、サテライト細胞で発現するKca2.3、髄鞘形成前から直後のシュワン細胞で発現するOct-6、大型ニューロンで発現するneurofilament200をマーカーとして用いた。

チミジンアナログの追跡による細胞分裂・分化の追跡：細胞周期のS期に細胞に取り込まれるチミジンアナログであるBrdUを腹腔投与後、経時的に固定し、BrdUと細胞種マーカーとを共染色することで、分裂細胞の細胞種同定および分布パターンを解析した。

細胞の分布解析（組織の三次元的観察）：螺旋状に蛇行するDRGニューロンの突起起始部全体が入っている個所を共焦点レーザー顕微鏡にて撮影後、目的の細胞の分布の場所をイメージングブラウザにて計測した。目的細胞が「ニューロン突起に沿いDRG細胞体から何mmの位置か、1st有髄シュワン細胞から数えて何細胞目か」を三次元的観察により解析した。

Oct-6陽性細胞の電子顕微鏡的観察：厚切り切片を用い蛍光免疫組織化学にてOct-6を可視化し、共焦点レーザー顕微鏡にて像を撮影した。その後切片をエポキシ樹脂に再包埋し、超薄切片を得た。予め共焦点レーザー顕微鏡で撮影しておいたOct-6陽性細胞を電子顕微鏡にて探し出し、観察・撮影を行った。

3. 研究の特色

一次感覚ニューロンの突起を被う起始部グリア細胞に関する記述は、細胞体型サテライト細胞やシュワン細胞のそれとは異なり、解剖学や組織学の教科書には記載されていない。また、研究論文に関しても20世紀初頭にHortegaが発見し、1960年にPannese (*Z Zellforsch Mikrosk Anat*) が記載したのを最後に、この細胞に関する研究報告は見受けられない。本研究は数十年の間着目されてこなかったグリア細胞に再び焦点をあて、現在の研究技術を用い細胞の特徴・性質の一端を明らかにした研究である。

本研究では組織の詳細な三次元的観察・解析をおこなった。これにより「蛇行するニューロン突起と周囲のグリア細胞」という複雑な組織構造を呈する組織において、細胞動態の一端が明らかとなった。

4. 研究の成果

細胞種マーカー陽性細胞の分布

起始部グリア細胞がサテライトと同様の細胞であるかを確かめるため、サテライト細胞マーカーであるKca2.3を用いて分布を解析した。その結果、ニューロン突起起始部の長さを100%（ニューロン細胞体側を0%、1st髄鞘側を100%）とした時、Kca2.3は0%から60%の位置に分布することが分かった。また、80%から100%の位置には全く存在しないことが判明した。次に髄鞘形成前から髄鞘形成直後の有髄シュワン細胞で発現するOct-6陽性細胞の分布を解析した。Oct-6陽性細胞のほとんどがニューロン突起起始部の70%から100%の位置に分布することが判明した。両マーカーに二重陽性を示す細胞はごくまれに観察することができた。神経堤幹細胞のマーカーとして知られるPAX3を免疫組織化学を用いて観察したが、陽性細胞は存在しなかった。また、Oct-6を発現するより前の幼弱なシュワン細胞で発現するAP2alphaは全てのグリア細胞で陽性となり、特徴的な分布パターンは認められなかった。

電子顕微鏡における細胞分類

Kca2.3およびOct-6陽性細胞の微細構造を電子顕微鏡にて観察した。Oct-6陽性起始部グリア細胞は細胞質が薄く、細い細胞質の突起をニューロンの突起に巻き付けるように伸ばす傾向が認められた。また、この突起間にはデスモゾーム様の接着装置がまれに認められた。Kca2.3陽性起始部グリア細胞はOct-6陽性のものと比べ、比較的細胞質に富み、細く短い細胞質の突起をランダムな方向でニューロンの突起側へ伸ばす傾向が認められた。これらの微細構造については今後定量的な解析を行う予定である。

電子顕微鏡標本作製の過程で、シリコンウェハーをクレーン状に糸で吊り下げたままナイフポートの中に沈め連続超薄切片を効率よく回収する方法を独自に開発した。この方法はarray tomographyに応用可能であり、現在論文投稿中である。

分裂起始部グリア細胞の分布と運命追跡

分裂している細胞の細胞種を同定するため、BrdU 1回投与後1時間で固定し、各主細胞マーカーと多重染色し観察をおこなったところ、BrdU陽性細胞のうち約70%がOct-6陽性細胞であった。また、BrdUはニューロン突起起始部の遠位端の起始部グリア（1st髄鞘に最も近い位置）もしくは2番目の細胞に取り込まれている場合が大半であった。

BrdU 1回投与後、24時間にBrdU陽性細胞を観察したところ、ニューロンの突起に沿って2つのBrdU陽性細胞が並んでいる様子（Twin cell）が認められた。この細胞はOct-6陽性であった。

起始部グリア細胞の付加と分化を長期的に観察するため、1日1回のBrdU投与を1か月間行なった動物を作製した。有髄シュワン細胞への分化に関しては、1stおよび2nd有髄シュワン細胞がBrdU陽性になる場合がまれに認められた。一方、1st有髄シュワン細胞にBrdUが認められないにも関わらず、BrdU陽性起始部グリアがニューロン突起起始部遠位に並んでいるケースはよく認められた。

まとめ・考察

これまでの実験で起始部グリア細胞について以下の性質を明らかにした。

1. 起始部グリアはKca2.3でニューロン細胞体側に分布するものとOct-6陽性で遠位側に分布するものの少なくとも2種類が存在した。
2. Oct-6およびKca2.3陽性細胞の間には微細構造の違いが示唆された。Oct-6陽性のものは髄鞘形成前シュワン細胞の電顕的特徴を有していた。
3. BrdU投与実験から、Oct-6陽性細胞は分裂・分化し有髄シュワン細胞に分化していることが明らかとなった。
4. 分裂細胞の長期的影響の観察から、有髄シュワン細胞は順次付け足されていることが明らかとなった。しかし、分化せずに起始部グリア細胞として付け足されるものも多数存在すると考えられた。

今後、アロディニアや慢性疼痛モデル動物を用い起始部グリア細胞の性質を追究することで、起始部グリアの痛みへの関与を追究したい。

コンドロイチン硫酸の発現異常による 統合失調症様症状の発現機序

神戸薬科大学 薬学部 内藤 裕子

1. 研究の目的

統合失調症は、思春期～青年期を中心に発症する精神疾患であり、幻覚、妄想、会話・思考力の低下、意欲の減退、認知機能障害といった多彩な精神症状を示す。遺伝的要因と様々な環境因子が絡み合って発症すると考えられており、その分子病態としてドパミン神経の活動異常等が示唆されているが、原因となる分子メカニズムはいまだ解明されていない。糖鎖関連遺伝子改変マウスで統合失調症様症状を示す例が複数あること、最近のゲノムワイドな相関解析等により、統合失調症の発症と関連する遺伝子として糖鎖の生合成を担う糖転移酵素が挙げられていることなどから、糖鎖修飾の異常が発症原因の一端を担っていると考えられる。

本研究で着目した、中枢神経系の主要な細胞外マトリックス成分であるコンドロイチン硫酸(CS)は、グルクロン酸とN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)から成る二糖単位が数十回繰り返した直鎖状の硫酸化多糖である。哺乳動物細胞に存在するCSの多くは、硫酸基転移酵素の働きにより、GalNAc残基の6位もしくは4位に硫酸化修飾を受けている。所属研究室では、CSが硫酸化パターンの違いにより、軸索伸長に対し抑制的にも促進的にも働くこと、脳の発達に伴い硫酸化パターンが変化すること、そして硫酸化パターンに依存した脳機能調節機構が存在することを世界に先駆けて明らかにしてきた。6位硫酸化CSは胎仔～幼弱マウスで多く発現しているが、その後減少し、4位硫酸化CSが増加する。最近、6位の硫酸化を担うコンドロイチン6-O-硫酸基転移酵素1(C6ST-1)の変異マウスが統合失調症様症状を呈することが示唆された。そこで、本研究では、CSの構造多様性による神経系の制御機構と、その破綻による精神疾患発症機構の解明を目的として、C6ST-1ノックアウトマウスの脳・神経系の詳細な表現型解析を行い、CS鎖硫酸化の、神経細胞およびそのネットワークの成熟への影響を検討した。

2. 研究の計画・方法

本研究では、神経系発達・成熟に対するC6ST-1欠損の影響に焦点を絞り、C6ST-1ノックアウトマウスの表現型の解析を行うことで、CSによる硫酸化パターン依存的な脳機能制御機構とその破綻による病態発生機構の解明を目指した。

(1) C6ST-1ノックアウトマウスの行動解析

統合失調症の指標として知られるプレパルス抑制を測定した他、精神疾患モデルに特徴的な行動異常に焦点を当てた行動解析として、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、明暗箱試験を行った。

(2) 神経系発達へのC6ST-1欠損の影響の検討

統合失調症患者の死後脳の解析や疾患モデルマウスを用いた研究により、統合失調症では、特定の抑制性神経細胞の周囲に形成されるペリニューロナルネット(PNN)と呼ばれる細胞外マトリックス構造や神経細胞の成熟、機能に異常が見られることが報告されている。そこで、C6ST-1ノックアウトマウスにおいてPNNの形成や神経系の発達に異常があるか調べるため、脳切片の免疫組織染色を行った。

3. 研究の特色

統合失調症の発症には、複数の遺伝的要因、環境要因が組み合わさって関与し、患者によって引き金となる因子が異なると考えられることから、その分子機構は未だ不明で、対症療法的治療が行われているのが現状である。したがって、根本的な治療法確立のため、症状をもたらす分子

メカニズムの解明が強く求められている。精神疾患の研究で主に利用されてきたヒト由来サンプルは死後脳であるが、長期にわたる服薬による影響も考えられるため、メカニズムの解明には動物モデルを用いた研究が必須である。

本研究では、疾患の原因分子として、CSの硫酸化パターンの違いに着目した。CSの機能に関する研究は、そのほとんどがコンドロイチナーゼ処理によりCSを分解するという方法で行われてきた。しかし、コンドロイチナーゼ処理では、硫酸化パターンに関わらず、全てのCSが失われてしまい、硫酸化パターンに依存した機能を明らかにすることはできない。本研究では、CSの発現は正常だが、その硫酸化パターンのみが改変された動物を用いることが特徴的であり、特定の硫酸化構造のみの発現変化という、実際の生体内で生じていると考えられる制御機構の破綻による機能異常を明らかにしていく点が、生理的に意義深い。

細胞の外側に位置し、多様かつ細胞の種類、活性化状態、疾患等に特異的な構造をとる糖鎖は、薬物等の標的となりやすい。本研究により、統合失調症の分子メカニズムの解明に迫れるだけでなく、新たな治療薬の開発につながることを期待される。

4. 研究の成果

(1) *C6ST-1*ノックアウトマウスの行動解析

プレパルス抑制試験を行ったところ、*C6ST-1*ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べてプレパルス抑制の低下が見られ、統合失調症様症状を示すことが明らかとなった。また、高架式十字迷路試験や明暗箱試験において、有意な差ではなかったものの、*C6ST-1*ノックアウトマウスが不安傾向にあることを示す結果が得られ、*C6ST-1*の欠損が神経認知機能に負の影響をもたらすことが示唆された。

(2) 神経系発達への*C6ST-1*欠損の影響の検討

行動実験において、*C6ST-1*ノックアウトマウスで統合失調症の指標とされるプレパルス抑制の低下が見られたことから、統合失調症患者で減少が報告されている抑制性神経細胞を中心に、神経細胞の数等に変化があるか、免疫組織染色により検討を行った。その結果、*C6ST-1*ノックアウトマウスの大脳皮質では、野生型マウスに比べ、PNN形成パルブアルブミン陽性細胞の数が減少していることが明らかとなり、これが統合失調症様症状をもたらす要因となっている可能性が示唆された。

セレウス食中毒の嘔吐毒素セレウリド類の合成と 培養液中の動態解析

東洋食品工業短期大学 包装食品工学科 奈賀 俊人

1. 研究の目的

セレウリド（Cereulide、図1）は、1995年磯部らにより、*Bacillus cereus*（セレウス菌）によって惹起される嘔吐型食中毒（セレウス食中毒）の原因毒素として単離・構造決定された32員環状デプシペプチドである。一方、ホモセレウリド（Homocereulide）は、上村らにより、海岸近くに生息するセレウス菌（海洋性セレウス菌）から、腫瘍細胞に対する強い細胞毒性物質として単離された類縁体であり、セレウリドのL-バリン酸がL-アロイソロイシン酸に代わった構造を有している。上村らは、海洋性セレウス菌の培養液中には、ホモセレウリドとセレウリドが共存することを報告している。

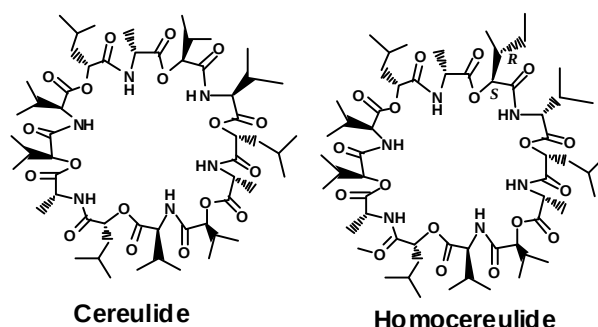


図1 セレウリド類の化学構造

セレウリドの全合成は、これまでに著者らの研究グループを含む3つの研究グループにより達成され、非天然の近縁体の合成や生物活性が報告されている。しかし、ホモセレウリドの全合成は、現在も未達成であり、ホモセレウリドの詳細な物性やセレウス食中毒への分子レベルでの関与も明らかにされていない。本研究は、多くの未解明の課題が残るセレウス食中毒の実態と全容を、ケミカルバイオロジーの手法で明らかにすることを目指して、① ホモセレウリドの全合成と毒性評価、② 培養液中セレウリド類の動態解析について研究を展開した。

2. 研究の計画・方法

(1) ホモセレウリドの合成

市販の光学活性なL-およびD-アミノ酸を原料に用いてホモセレウリドを合成した。構成分子である光学活性なヒドロキシ酸類は、対応するアミノ酸より調製し、アミド結合およびエステル結合は液相法で構築した。本合成では、ドデカ（12）デプシペプチドであるホモセレウリドを、3種のテトラ（4）デプシペプチドに逆合成的に帰結し、これらをフラグメントとして段階的に結合させて直鎖状の前駆体に導き、これを分子内環化反応に附して32員環を構築してホモセレウリドを得る合成経路を計画した。

(2) 培養液中のセレウリド類の動態解析

セレウス菌の長時間培養液のLC-QTOFMS分析では図2のようなクロマトグラムが得られる。この中で、セレウリド（ピーク a）およびホモセレウリド（ピーク b）は確定されているが、周辺に検出される微量物質の構造は未解明である。我々は、これらの分析結果から、培養液中にはセレウリド、ホモセレウリド以外に、構造未知の新規セレウリド類縁体や分解産物が存在すると想定し、各ピークの

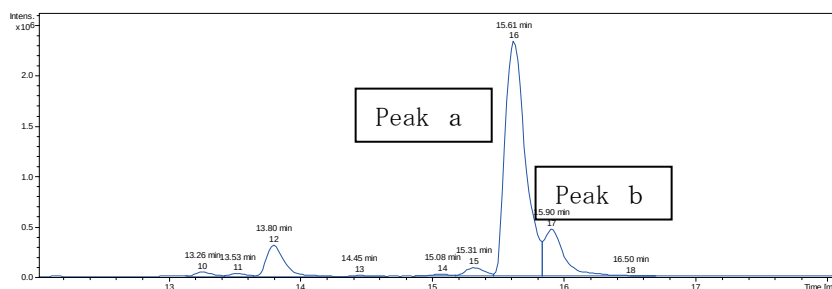


図2 セレウス菌培養液のLC-MSクロマトグラム

a：セレウリド、b：ホモセレウリド、その他にセレウリド類と考えられる微小ピークが検出された。

生成と集積量を時系列で解析し、これらの動態変動プロファイルを作成することを計画した。

3. 研究の特色

セレウス菌は好気性細菌で芽胞を形成し、産生する食中毒毒素であるセレウリドの耐熱性が高い。食品缶詰やレトルトパウチを製造する現場では、食品中のセレウリド毒素汚染の実態把握、防止法とリスク管理指針の作成等が急務である。しかし、分析の標準品となるホモセレウリドの全合成は未達成で、HPLC分析等によるリスク管理も確立されていない。本研究で合成されたセレウリド類は、セレウス毒素の検査において分析標準品として活用できるほか、未解明であったセレウス食中毒機構の有用なツール分子としての応用が期待される。また、セレウリド分解の機序を解明することができれば、これまで困難とされてきたセレウス毒素の無毒化などへの応用が期待される。

4. 研究の成果

(1) ホモセレウリドの合成

液相フラグメント縮合法によってデブシペプチドユニットを順次構築する磯部らのセレウリド合成手法を参考にして、ホモセレウリドの全合成を達成した（図3）。ホモセレウリドの構成単位である、テトラデブシペプチドA、A' および Cを、市販のアミノ酸を原料として合成した。デブシペプチドの構成単位であるα-ヒドロキシ酸は、対応する光学活性なアミノ酸のアミノ基を立体保持のままヒドロキシル化して調製した。また、合成の鍵となるL-アロイソロイシン酸はCに含まれる。テトラデブシペプチド（A、A'）からオクタデブシペプチド（B）を経て、前駆体のドデカデブシペプチド（D）へと導き、Dの分子内エステル化反応により32員環を構築して、目的とするホモセレウリドを得た。

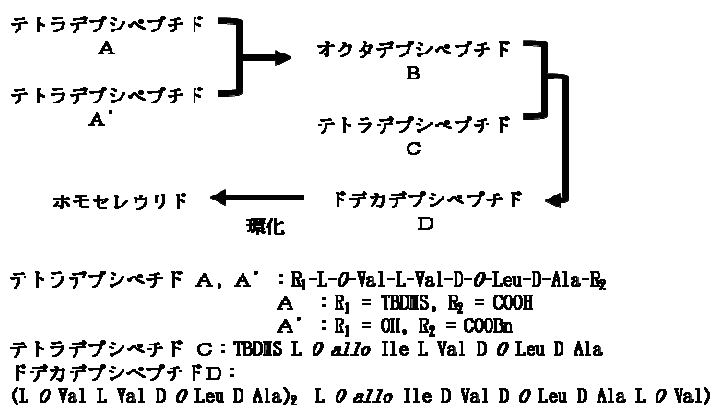


図3 フラグメント縮合法によるホモセレウリドの合成

合成したホモセレウリドの機器分析値は構造を支持し、LC-MS分析におけるリテンションタイムおよび質量スペクトルは培養液中のホモセレウリドピークに一致した。以後の動態解析には合成品を標準品として用いた。

(2) 培養液中のセレウリド類の動態解析

Bacillus cereus JCM17690株（理研JCMより入手、R. Gilbert F4810/72由来）を120時間まで培養した。LC-MSにより分析し、合成標準品を用いて作成した検量線をもとにして、セレウリド類の濃度を経時的にプロットし、産生と分解の消長を明らかにした。セレウリドは培養12時間から検出され、約40時間で最大濃度となり、その後徐々に減少した。培養液のLC-MSクロマトグラムでは、図4に示すようなセレウリド関連化合物に由来すると考えられるピークが確認され、分子量およびリテンションタイムから、セレウリドのエステル分解物と推定された。ピークcのマススペクトルおよびリテンションタイムは、合成中間体テトラデブシペプチドL-Val-L-Val-D-Val-L-Alaと一致した。また、ピークdおよびeは[L-Val-L-Val-D-Val-L-Ala] $_n$ (n=2 or 3)とは質量スペクトルが一致したものの、リテンションタイムは僅かに異なり、現在構造を特定している。テトラデブシペプチドは培養12時間から検出されるが、セレウリドが最大濃度となる40時間から徐々に増加し、57時間で最大濃度を迎えた後に減少した。セレウリドと分解物の間に化学的等量関係は見られなかった。

インクレチン関連薬（GLP-1 受容体作動薬）長期投与による 受容体発現の変化

—長期使用での薬剤効果減弱のメカニズム—

川崎医科大学 医学部 木村 友彦

1. 研究の目的

β 細胞不全が2型糖尿病病態進展の主たる原因と考えられており、早期からの積極的な薬物介入による厳格な血糖管理の継続が極めて重要である。これまでに我々は食事制限、さらにはThiazolidine薬やインクレチン薬が β 細胞保護効果を有することを報告してきた。さらに最近、これらの薬剤が病態進展期よりも病態早期においてより有効であることを報告した。この要因の1つとして、インクレチン薬の標的部位であるGLP-1受容体遺伝子発現が病態早期に比べ進展期で明らかに低下したことにより、インクレチン作用を限定的にしたことが考えられる。これらの結果から、早期からのGLP-1受容体作動薬長期間投与は病態の進展を防ぎ、最終的に「健常人と変わらぬ寿命とQOLの維持」につながると推察される。2016年にはGLP-1受容体作動薬による治療が心血管イベントを抑制することが明らかになり使用頻度は今後さらに高まると予想される。一方で、非生理的濃度のリガンドの長期暴露により受容体発現が低下することが一般的に知られているが、GLP-1受容体についての検討は現時点ではない。GLP-1受容体作動薬 Dulaglutide長期投与が、膵 β 細胞GLP-1受容体発現等に及ぼす影響について、肥満2型糖尿病モデルマウス、コントロールマウスを用い検討する。

2. 研究の計画・方法

7週齢雄性db/dbマウスをDulaglutide(D)群、Control(C)群に群別し17週間薬剤介入した(D群：Dulaglutide 0.6mg/kg $\times$ 2/week, C群：PBS1週2回皮下投与)。コントロールとしてdb/mマウスを用い同様に検討した。継時的に体重、摂餌量、生化学パラメーターを比較し介入後インスリン感受性試験を行った。介入終了後、単離isletのグルコース応答性インスリン分泌反応、insulin含量、中性脂肪含量を測定した。また、単離isletからmRNAを抽出し、Real-time RT-PCR法にて膵ラ氏島遺伝子発現を解析した。また膵切片におけるインスリン・グルカゴン染色、Ki67免疫染色、TUNEL染色を行い長期介入後の β 細胞比率、 β 細胞増殖・アポトーシスについて評価した。2群間の差の検定にはStudent's t検定を用いた。

3. 研究の特色

本研究の目的は、膵 β 保護作用を有するGLP-1受容体作動薬を長期投与し、GLP-1受容体発現に及ぼす影響を明らかにすることである。比較的病態早期の動物へのGLP-1受容体作動薬投与による β 細胞保護効果については多く報告されている。我々は早期モデルに加え病態進展モデルへの介入実験を併せて行い、早期からの介入が β 細胞保護効果により有効である事を2015年報告した。しかし、GLP-1受容体作動薬長期投与時のGLP-1受容体発現への影響について検討した報告はない。長期投与においても受容体発現に影響を与えず代謝パラメーターを改善するようであれば早期からの継続した治療が重要になる。このように本研究で得られることが期待される結果は、単に分子機構の解明だけではなく、糖尿病の実臨床においても極めて重要な情報となることが期待され、社会貢献性も高いと考えられる。

4. 研究の成果

db/dbマウスにおいてD群ではC群に比し、摂餌量の有意な低下をみた。その結果、空腹時血糖値は全週にわたりD群で有意に抑制された。体重は介入中期まではD群で有意に低値であったが、介入後期では逆転した。空腹時インスリン値はD群では摂餌量低下から介入前半は有意に低値であったが、介入後期には逆転し、これは β 細胞保護効果の影響と考えられた。インスリン感受性はdb/dbマウスではD群で有意な改善がみられた。db/dbマウスの膵ラ氏島GLP-1受容体発現はC群で、7週齢コントロールマウスに比べて有意な低下がみられたが、D群では糖毒性の軽減により、むしろ増加していた。またdb/dbにおけるその他の膵ラ氏島遺伝子発現はD群ではC群に比し、インスリン合成・分泌関連遺伝子発現を亢進させ、酸化・小胞体ストレス、炎症、線維化、アポトーシス関連遺伝子発現を抑制させた。免疫染色の結果から β 細胞比率はD群で有意に高値であった。db/mではD群で有意な摂餌量の低下がみられ、その結果わずかだが有意に体重増加が抑制された。空腹時血糖値、インスリン値は両群間に大きな差はみられなかった。膵ラ氏島GLP-1受容体発現は7週齢のコントロールマウスに比し、C群もD群も同程度の発現量であり有意な差はなかった。結果としてGLP-1受容体作動薬 Dulaglutideの超長期間投与下において、膵ラ氏島GLP-1受容体発現は低下せず、安定した血糖降下・ β 細胞保護効果を有している事が示唆された。一般的に内在化する受容体はそのリサイクリングによりDown-regulationしにくい事が報告されており、GLP-1受容体も内在化型GPCRであることから長期投与下においても発現が維持されたと考えられる。GLP-1受容体作動薬は心血管イベントを抑制することが2016年に明らかにされており、長期投与下においても安定した効果の維持から細小血管合併症だけでなく、大血管合併症抑制が期待できる。なお、本研究は2017年日本糖尿病学会、米国糖尿病学会で報告済みであり、論文投稿間近である。

消化管炎症におけるヘム分解酵素の抗炎症作用の機序解明 ー炎症性腸疾患の新規治療薬の開発を目指してー

安田女子大学 薬学部 羽鳥 勇太

1. 研究の目的

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患の報告数は近年急速に増えてきている。疾患の原因は消化管における慢性的な過剰免疫応答であると考えられているが、発症の分子機序にはまだ不明な点が多い。消化管を炎症から保護する作用を有する分子として、細胞内ヘム分解酵素（ヘムオキシゲナーゼ-1、HO-1）が知られている。近年の研究から、マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生が自食作用（オートファジー）を介して抑制的に制御されること、HO-1の発現がオートファジーを誘導することがわかっている（Waltz, P., et al., Autophagy 7(2011) 315）。このような背景のもと、申請者は、腸上皮マクロファージ内でHO-1がオートファジー誘導を介して消化管炎症を制御している可能性を考えた。そこで本研究では、*in vitro*消化管炎症モデルとしてマクロファージと腸上皮細胞の共培養系を用い、炎症による組織障害を機能学的・形態学的に分子レベルで評価すること、HO-1の発現誘導・阻害が炎症に与える影響を検討すること、同じくオートファジーに与える影響を検討することを目的とする。消化管炎症におけるHO-1の組織保護作用の分子機序を解明することにより、炎症性腸疾患に対する更なる予防・創薬への貢献が期待される。

2. 研究の計画・方法

本研究の目的は『消化管炎症におけるヘムオキシゲナーゼ-1依存的組織保護作用の機序解明』である。ストレス応答因子やオートファジーの炎症保護への関与を考え、これを検証する為に以下の実験を行う。

- (1) *in vitro*消化管炎症モデル（Caco-2細胞とTHP-1細胞の共培養系）を構築し、正常な腸上皮機能、すなわちタイトジャンクション（TJ）の形成による細胞単層の不透過性（バリア機能）が炎症により障害されることを確認する。
- (2) 炎症性バリア障害への遊離ヘムの影響を検討する。
- (3) 遊離ヘムを添加し、オートファジーへの影響を検討する。また、オートファジー誘導・阻害が炎症性バリア障害に与える影響を検討する。

3. 研究の特色

炎症性腸疾患の患者数は増加の一途をたどっており、同じく増加しつつある大腸癌のリスクを高める要因としても大きな問題となっている。手術に伴う患者への負担は大きく、内科的治療の手段を一層充実させていくことが重要である。現在、治療薬として抗炎症剤・免疫抑制剤が用いられているが、新たな作用機序を持つ治療薬の開発に向けて、本研究が着目するHO-1依存的な炎症抑制機序の解明がその足掛かりになると期待できる。例えば、HO-1もしくはヘムの生体内動態を制御する分子群（ヘムの吸着・輸送・分解・合成を制御する分子）の働きを阻害・促進するような薬剤を利用することで、炎症に伴う消化管障害を軽減できる可能性がある。実際、HO-1発現誘導を介して消化管保護作用を示す薬剤としてL-グルタミンが報告されている（Takahashi et al., J. Clin. Biochem. Nutr. 44(2009) 28）。HO-1の炎症抑制作用が最初に利根川進博士の研究室から報告されたのは1997年であるが（Poss, D. and Tonegawa, S., Proc Natl Acad Sci USA, 94(1997) 10925）、イメージング技術の進展を背景に近年になってHO-1がオートファジー制御因子として改めて注目されるようになった。本研究では、炎症性腸疾患におけるHO-1の役割について、オートファジー制御因子としての側面から初めて検討する。本研究では、この新

たな試みをイメージング技術・上皮バリア評価手法を適用して効果的に達成する為に、実験系として *in vitro* 消化管炎症モデル、すなわち培養腸上皮細胞（Caco-2）とマクロファージ（THP-1）の共培養系を選択した。

4. 研究の成果

（1）*in vitro* 消化管炎症モデルの構築

Caco-2細胞をトランスウェル上で10～14日間極性培養し、半透膜側に基底膜構造、頂端膜構造を有する細胞シートを得た。タイトジャンクションの形成を、免疫染色（ZO-1およびOccludin）と経上皮抵抗値の顕著な上昇によって確認した。一方、THP-1細胞をフォルボールエステル処理によりマクロファージに分化誘導した。Caco-2細胞シートを形成した培養チャンバーを、THP-1細胞培養プレートに移動し、共培養を行った。THP-1は、基底膜側からCaco-2細胞に作用し、経上皮抵抗値の著しい減少を特徴とするタイトジャンクションの破綻を引き起こした。一方、フォルボールエステル処理を行っていない未分化のTHP-1細胞との共培養では、経上皮抵抗値は変化しなかった。以上の結果より、マクロファージに分化したTHP-1細胞特異的にバリア障害作用が亢進することが明らかになった。また、トランスウェルを用いた培養系でCaco-2細胞とTHP-1細胞を共培養することにより、*in vitro* 消化管炎症モデルが構築された。

（2）遊離ヘムがバリア障害に与える影響の検討

細胞シートに低濃度（20 μ M）の遊離ヘムを加えることにより、THP-1によるバリア障害作用が亢進することが明らかになった。この濃度域の遊離ヘムにはバリアに対する直接障害作用がないこと、未分化THP-1との共培養系でも障害作用は見られなかったことから、遊離ヘムはマクロファージによるバリア障害作用を促進する活性を有すると考えられる。

（3）遊離ヘムがオートファジーに与える影響の検討

上記結果から、遊離ヘムはCaco-2またはマクロファージのいずれか（または双方）に作用してバリア障害を促進することがわかった。オートファジーの関与を考え、オートファゴソーム局在蛋白質であるLC3の存在量およびプロセッシングをウェスタンブロッティングによって検討した。アミノ酸飢餓条件下のCaco-2では、LC3の分解およびプロセッシングを特徴とするオートファジーの亢進が見られた。遊離ヘムを添加することにより、分解・プロセッシングは共に抑制され、オートファジーが抑制されている可能性が示された。

以上、本研究の成果から、遊離ヘム・ヘム分解酵素のバリア障害への関与が明らかになり、その分子機序の解明に向けた *in vitro* モデルが確立した。また、オートファジーの制御因子としての遊離ヘムの重要性を見出した。今後、更に炎症性サイトカイン発現量などの検討を進めることにより、炎症における遊離ヘム・ヘム分解酵素の役割を明らかにしていきたい。

神経栄養因子様物質メリラクトンAの不斉合成研究 —Pd触媒および有機触媒を用いる不斉四級炭素構築法の開発—

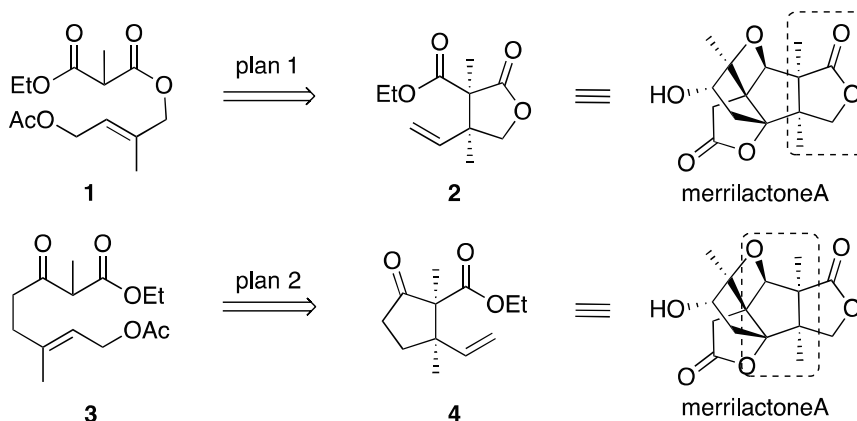
徳島文理大学 薬学部 原田 研一

1. 研究の目的

わが国における高齢化は急速な速度で進んでおり、老年人口の増加とともにアルツハイマー病型人治療患者の急増が深刻な社会問題となっている。現在、日本で使用されているアルツハイマー病治療薬には脳代謝改善薬と脳内のアセチルコリンの濃度を高める目的で開発されたAChE阻害剤がある。しかし、これらの薬物は、認知症にともなう変性神経細胞の改善には至らないことから治療効果に限界がある。また、治療薬として神経細胞の分化・成長に関与する神経栄養因子の利用も検討されているが、生体内のタンパク質分子であることから血中では分解されやすく、血液脳関門を通過できないという問題を克服しなければならない。申請者の属する研究室では、この神経栄養因子様活性に注目し、天然物由来の低分子神経栄養因子様活性物質の探索とその作用機序の解明を行ってきた。その結果、中国産シキミ科植物 *Illicium merrillianum* から単離されたセコプレジザン型セスキテルペン メリラクトンAが、ラット胎児大脳皮質由来初代培養神経に対して低濃度で強力な神経突起伸展促進活性を示すことを見いだした。本化合物は、脂肪性低分子であるため、容易に脳へ移行すると予測でき、これまでの治療薬とは根本的に異なる新しいアルツハイマー病治療薬のリード化合物として期待されている。しかし、微量成分であることから、その活性発現機構の解明には化学合成による試料の供給が必要である。そこで本研究では、活性発現機構の解明に必要な試料の量的供給を目的とし、メリラクトンAの効率的な不斉合成研究を企画した。本合成研究では、神経栄養因子様物質メリラクトンAの大量合成を目指すだけでなく、新規不斉四級炭素構築法の開発を行なうことで *Illicium* 属植物から単離された他の神経栄養因子様物質であるジアジフェニンやジアジフェノリドなどの共通骨格の合成にも応用可能な合成経路を確立する計画である。本合成が完了できれば詳細な薬理学試験を行なうために必要な試料を供給でき、神経栄養因子様活性の構造活性相関研究および薬理作用発現機構解明への展開が可能となる。

2. 研究の計画・方法

本研究では、メリラクトンAの鍵構造となる連続した四級炭素の構築法として、分子内Tsuji-Trost反応を応用する新規二連続四級炭素構築法について検討をおこなった。今回、二連続四級炭素構築法として二種類の分子内Tsuji-Trost反応を検討した。一つ目は、エステル化合物 **1** に対するラクトンの形成を伴う反応で、二つ目は化合物 **3** に対するシクロペンタノン環を構築する反応である。

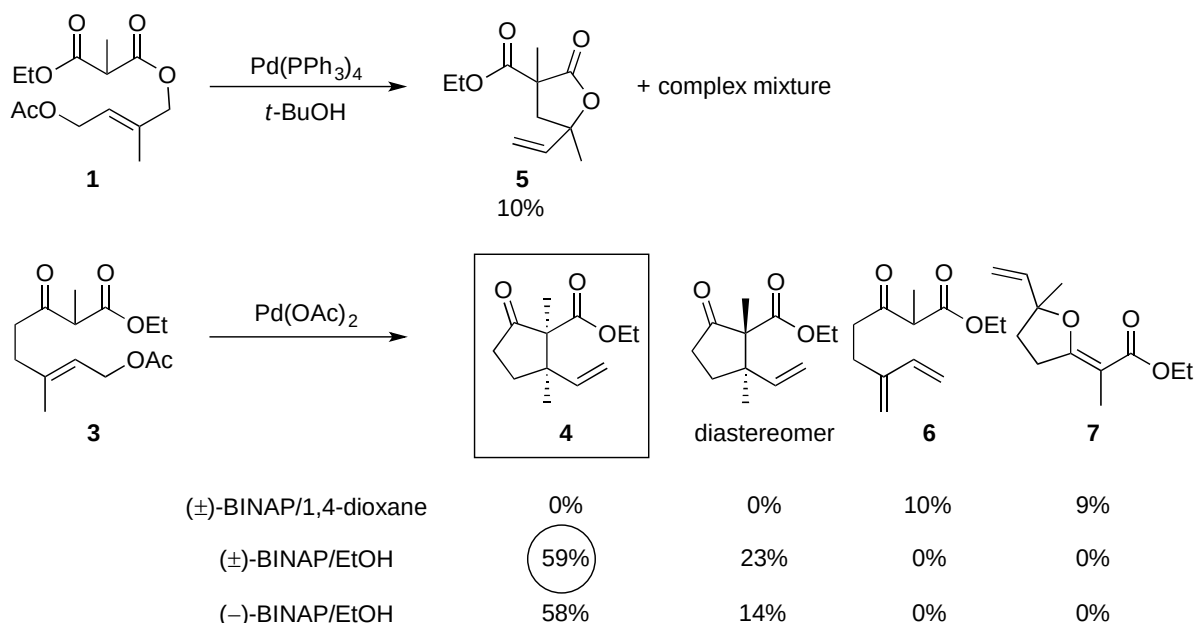


3. 研究の特色

申請者の属する研究室で見いだされたメリラクトンAは、低分子ながら高度に酸化され、三個の四級炭素を含む七個の不斉中心を有する五環性の非常に複雑で特異な構造を有する化合物である。本化合物は強力な神経突起伸展促進活性を示すことから、これまでの治療薬とは全く異なる機序でアルツハイマー病を根本的に治療する新薬になると期待できる。この特異な構造と生物活性は世界中の科学者の注目を集め、多くの研究グループがメリラクトンAの合成研究を続けており、これまでに二つのグループが不斉合成を達成している。2005年Danishefskyらのグループは、不斉エポキシ環開環反応による左右非対称化を鍵反応として、全29段階でメリラクトンAの初めての不斉合成を達成した。また、2007年井上らはキラル塩基を用いた分子内アルドール反応による左右非対称化をおこない23段階の合成経路で不斉合成を達成した。両グループはともに左右非対称化反応による不斉導入を鍵として全合成を完了したが、どちらの合成経路も合成段階が長く、未だ薬理機構解明への試料供給には至っていない。本合成研究では、これまでの合成法とは全く異なった合成戦略を企画し、遷移金属であるパラジウム触媒を使用する不斉Tsuji-Trost反応による不斉四級炭素構築反応を鍵として、これまでにない効率的で簡便なメリラクトンAの不斉合成をおこなう計画である。本合成で行う、不斉四級炭素構築法の開発は一般的に困難とされている四級炭素をエナンチオ選択的に構築するだけでなく、環状構造を同時に形成できるため、様々な天然物合成への応用が可能である。

4. 研究の成果

最初に、数段階で調製した化合物**1**に対してTsuji-Trost反応をおこなった。しかし、様々な反応条件を試みたが副生成物**5**や複雑な混合物を与えるのみで目的物**2**を得ることはできなかった。次に、化合物**3**に対するTsuji-Trost反応を検討した。1,4-ジオキサン溶液中Pd(OAc)₂-BINAP触媒下反応をおこなうとβ-水素脱離と*o*-アルキル化をおこした**6**と**7**が主生成物として得られた。詳細に反応条件を精査した結果、溶媒としてプロトン性極性溶媒であるエタノールを用いた場合にβ-水素脱離と*o*-アルキル化を抑制することができ、**4**を59%の収率で得ることに成功した。また、(-)-BINAP触媒下では**4**を58%の収率で得た。化合物**4**は、メリラクトンAの鍵構造を有し、この中間体から現在メリラクトンAへの誘導を検討中である。今回開発に成功したシクロペンタノン環の形成を伴う二連続四級炭素の構築法はこれまでに例はなく、メリラクトンAの全合成に留まらず、天然物合成における強力な方法になると考えている。



タンパク質間相互作用の制御を目指した 自己組織化分子の開発

福岡大学 理学部 草野 修平

1. 研究の目的

タンパク質は単体で機能するものも存在するが、その殆どが他のタンパク質と複合体を形成して初めてその機能を発現する（タンパク質間相互作用：PPI）。最近では、PPIと疾患の具体的な関連性に付いても解明されつつある。このような背景から、PPIを制御することの重要性がますます大きくなってきているが、その方法論は確立されていない。この原因として、PPIが平均で約800～2000Å²という広範な領域において、水素結合・疎水性相互作用・静電相互作用など複数の結合を介して行われることが挙げられる。すなわち、既存の分子設計概念では、PPI制御可能な分子の獲得は困難なのである。そこで、本研究課題では、PPI制御分子の開発を目指し、タンパク質表面を覆うだけの大きな分子表面積を持ち、かつ、タンパク質表面の結合領域に対して多点的に相互作用するタンパク質表面結合分子の開発を行う（Fig. 1）。さらに、独自のアプローチとして、タンパク質結合分子を「合成」するのではなく、自己組織化を用いて「組み立てる」方策をとる。これにより、大きな分子構造を持ちながらも、簡便な分子構築が実現される。以上の分子戦略に基づき、本研究では以下の2点を明らかにする。

- (1) 自己組織化体の構築およびタンパク質表面に対する結合能評価
- (2) 自己組織化体を用いたPPI阻害

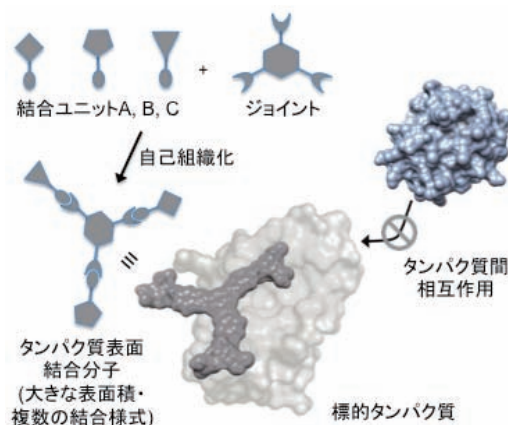


Fig. 1 本研究課題のコンセプト

2. 研究の計画・方法

- (1) 自己組織化タンパク質表面結合分子の構築法の確立

自己組織化体の形成には、中性条件・室温にて混合するだけで安定な複合体を形成し、尚かつタンパク質との副反応を引き起こさない反応が理想的である（直行性）。そこで今回、自己組織化には、オキサボロールとcis-ジオール間のボロネート形成反応を採用した（Fig 2）。自己組織化体のタンパク質表面への結合を簡便かつ定量的に検出するために、テトラフェニルエテン（TPE）を中心骨格としたオキサボロール誘導体1を設計した。TPE誘導体は水溶液中で無蛍光であるが、タンパク質表面に結合すると蛍光発光を示すようになる。また、Fig 2に示すように化合物1は4つのオキサボロールを発散型に持つため、自己組織化体は大きな分子表面積を有し、さらにタンパク質表面との相互作用ユニット4つを持つことができる。cis-ジオールは、アニオン性、カチオン性、水素結合形成官能基、疎水性官能基など様々な官能基が導入でき、簡便に合成できるものが理想的である。そこで、市販の試薬から3工程で合成可能な化合物2をcis-ジオールとして設計した。

- (2) タンパク質表面に対する自己組織化体の結合能評価

各種ジオールを用いて多様な構造を持つ自己組織化体を網羅的に形成させる。得られた自己組織化体の結合能評価には、Lysozyme、Cytochrome C、Albumin、MDM2などタンパク質表面の構造や電荷が異なる各種タンパク質を用いる。その解析は蛍光プレートリーダーを用いてハイスループットに行う。タンパク質への結合が確認された自己組織化体に関しては、質量分析を行いその構造情報の獲得を行う。その結果を分子設計にフィードバックすることで、タンパク質表面に対する特異性と高い結合能を同時に満たす自己組織化体の獲得に繋げる。

(3) 自己組織化体を用いたPPI制御への展開

自己組織化体のタンパク質表面への結合が、実際にPPIを阻害できることをin vitro系で示す。上記検討項目(B)で得られたCyt cやMDM2に結合する自己組織化体を用いて、Cyt c-Cyt c oxidaseやMDM2-p53間のPPIをモデル系とした阻害実験を行う。

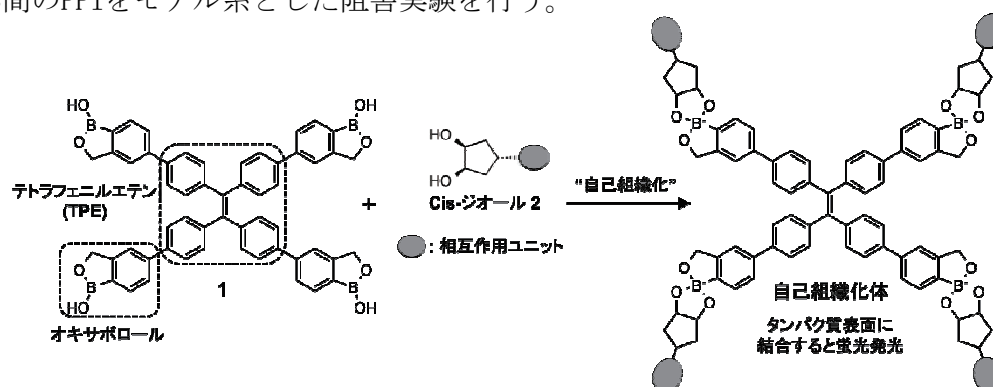


Fig. 2 自己組織化体の分子設計

3. 研究の特色

本研究の最大の特色は、自己組織化タンパク質表面結合分子の分子設計にある。すなわち、本分子の大きな分子表面積は効率的なPPI制御を可能とし、タンパク質表面に対して複数の相互作用ユニットを同一分子内に持つ点は、多点相互作用による標的タンパク質に対する高い結合能と特異的結合を実現する。さらに、本系では分子構築に自己組織化を用いているため、自己組織化体を構成するユニットの組み合わせを変換し、混合するだけで、多様な構造体を取らせることができる。この点は、一般的な有機合成による分子合成と比較し、目的分子の構築を簡便にし、標的タンパク質に対する自己組織化体の構造最適化を簡略化する。

4. 研究の成果

研究期間内に、以下の研究成果を挙げることに成功した。

(1) 化合物1およびcis-ジオール誘導体の合成

ジブロモベンゾフェノンを出発原料として、本研究の基盤となるTPE誘導体1の合成に成功した。また、タンパク質との相互作用ユニットを持つ様々なcis-ジオール誘導体2を合成することに成功した。

(2) 自己組織化反応(ボロネート形成反応)の解析

まず、タンパク質非存在化にて、(1)で合成した化合物1と2のボロネート形成反応について定量解析を行い、その適用可能な反応濃度範囲を明らかにした。その結果、タンパク質との結合解析に適した μM オーダーで反応が十分に進行することを確認した。

(3) 自己組織化反応を利用したタンパク質結合分子の獲得

化合物1と各種cis-ジオール2を混合して得られた自己組織化体をタンパク質に添加すると、タンパク質に対して結合性を示す自己組織化体の蛍光発光が確認できた。この蛍光変化からその結合親和性を解析すると、 $10^4 \sim 10^5 (\text{M}^{-1})$ オーダーの結合定数でタンパク質に結合していることが明らかになった。さらに、タンパク質の種類に応じて、高い親和性を示す自己組織化体の構造が異なることも質量分析の結果から見出した。

これらの成果について、以下の学会にて発表を行った。

①日本化学会 第96春季年会（ポスター発表）

○小西 沙英、林田 修、草野 修平

“ボロン酸エステル形成反応を利用したタンパク質表面結合分子の開発”

第53回化学関連支部合同九州大会（ポスター発表）

○小西 沙英、林田 修、草野 修平

“ボロネート形成反応を用いたタンパク質表面結合分子の開発”

第10回バイオ関連化学シンポジウム（ポスター発表）

○小西 沙英、林田 修、草野 修平

“ボロネート形成反応に基づいたタンパク質表面結合分子の開発と結合能評価”

日本化学会 第97春季年会（口頭発表）

○小西 沙英、林田 修、草野 修平

“新規ボロン酸誘導体の合成とcis-1, 2-ジオールとのボロネート形成を利用した分子認識”

多基準配分ゲームのアプローチによる日中協力の経済学的評価 —越境大気汚染問題における日中協力の便益分析—

Fukuoka Institute of Technology
Department of System Management
Jing Fu

1. Objective

While only six cities in China meeting the second tier of the National Ambient Air Quality Standards (NAAQS) in 2015, air pollution is impacting every aspect of people's daily life and has become one of the biggest challenges to sustainable economic growth. Air quality of some regions in Japan, i.e., Fukuoka, is partially affected by the transboundary air pollutants as well. Coal combustion for electricity production is one of the main industrial air pollutant sources. Although the world debates on the need to develop renewable energy and gradually abandon the use of fossil fuels, we still fully expect coal to remain as a vital part of energy production in the foreseeable future. This research is aimed to build a theoretical foundation for a potential collaboration between Japan and China in the development of clean coal technologies featuring IGCC (Integrated Gasification Combined Cycle).

2. Methodology

In this research, the air quality improvement efficiencies of 29 provinces (excluding Tibet and Hainan) in China are first evaluated and compared by clustering two-stage DEA (data envelopment analysis) with undesirable intermediate measures, then multi-criteria allocation game is utilized to analyze the potential benefit or cost split if Sino-Japan clean air collaboration might be realized.

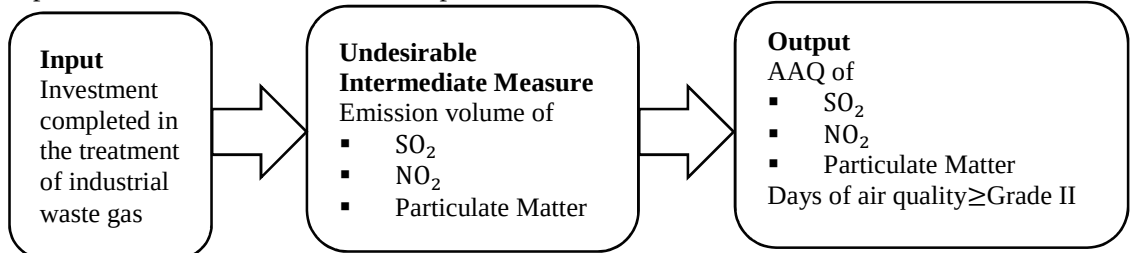
(1). Two-stage DEA with undesirable intermediate measures

① Output-oriented overall efficiency

$$\begin{aligned} & \min e_j^1 \cdot e_j^2 \\ \text{subject to:} & e_j^1 \geq 1 \\ & e_j^2 \geq 1 \end{aligned}$$

where e_j^1 and e_j^2 are output-oriented efficiencies of DMU j in the two stages.

② Input, intermediate measure, and output



(2). Clustering analysis

Taking the efficiencies and slack values by two-stage DEA as the attributes, clustering scheme of KMeans is applied to select the target regions with the highest priority to be installed with IGCC. For 3 clusters, results by EM (expectation-maximization) scheme does not differ too much with that by KMeans.

(3). Multi-criteria allocation game

Official collaborations between Japan and China in environmental fields are decreasing year by year, and IGCC might be another initiative. If Japan and China may collaborate in the development of IGCC, how should the potential benefit or cost be allocated? In this research, multi-criteria allocation game is utilized and the strategic form game is defined as

$$G := \left(N, \{W^j\}_{j \in N}, \{f^j\}_{j \in N} \right)$$

where $N = \{1, 2, \dots, n\}$ is the set of players, $W^j = \{w^j = (w_1^j, \dots, w_m^j) | w_1^j + \dots + w_m^j = 1, w_i^j \geq 0 \forall i \in M\}$ is the strategy set of player $j \in N$, and $f^j: W^1 \times \dots \times W^n \rightarrow R$ is the payoff function of player $j \in N$, which is given by

$$f^j(w^1, \dots, w^n) = \left(\sum_{i=1}^m \left(\frac{1}{n} \sum_{j=1}^n w_i^j \right) c_{ij} \right) E$$

The characteristic function form game is defined following von Neumann and Morgenstern (1944). Due to the constant-sum and essential properties, the core of the game is empty. Hence, Shapley value is selected in our analysis. Criteria include both economic (initial investment, dynamic investment, and generating unit cost) and environmental performance indices (emissions of SO_2 , NO_2 and PM). With 10% emission reduction per year, a dynamic allocation analysis is conducted between each of the three demonstration IGCC power plants in the target regions and Nakoso IGCC power plant.

3. Scientific Characteristics and Originality

Two-stage efficiency analysis is necessary to identify the target regions as industrial production is only one of the air pollutant sources. However, it is often criticized due to the inherent conflict of the intermediate measures that arises between the two stages. One solution by Liang et al. (2008) is to view the two stage process from a centralized perspective by assuming the weights of the intermediate measures to be the same. This approach is not well justified to be a two-stage model as the intermediate measures are cancelled out. In this research, we define an output-oriented overall efficiency and propose a solution by adjusting the intermediate measures to the lower target value $\min(t - \bar{h}^* \bar{z}_j - s^{+*}, z_j - \bar{s}^{-*})$. Our purpose is to “zoom in” the differences between the DMUs, even if this adjustment might sacrifice some efficiency. The comparative results show that it works better than the centralized solution in the clustering analysis.

Our TU multi-criteria allocation game provides an endogenous benefit/cost allocation mechanism. The weights are defined as the average weights over all players, and hence the consensus is reached based on their own performance indices and strategy sets. It will potentially improve players’ perceived fairness.

4. Results

(1). Air quality improvement efficiency analysis by clustering two-stage DEA with undesirable intermediate measures

The output-oriented overall efficiency in our two-stage DEA with undesirable intermediate measures is proved to be greater than the centralized efficiency in Liang et al. (2008). As shown in Fig. 1 and 2, our efficiencies range from 1 to 5, while the centralized efficiencies are vibrating at 1 and clustering results cannot be validated neither externally nor internally. However, in the presence of a single undesirable intermediate measure, these two efficiencies are identical.

Following our analysis, Hebei, Shandong, Shanxi, Inner Mongolia, Liaoning, and Henan are in cluster 0 and should be selected as the target regions with the highest priority to be installed with IGCC. There are about 20 IGCC projects in China either at the demonstration stage or in plan, but only 3 of them are located in the target regions above. Considering the huge initial investment, in-plan locations should be re-evaluated as every penny counts.

(2). Dynamic benefit/cost allocation analysis by multi-criteria allocation game

Most of the above-mentioned projects in China still stay in the primary level due to limited experience in construction and operation of the IGCC power plants. Japan is more advanced as Nakoso IGCC power plant has been commercialized since 2013. Bilateral collaboration in the development of IGCC will benefit both sides. Following our multi-criteria allocation game, with 10% emission reduction per year in the target regions of China, Japan may claim more benefit in the upcoming 6-8 years (Fig. 3).

(3). Our results have been presented in Spring National Conference of ORSJ (Okinawa, March 2017), and 15th International Conference on Data Envelopment Analysis (Prague, Czech Republic, June

2017).

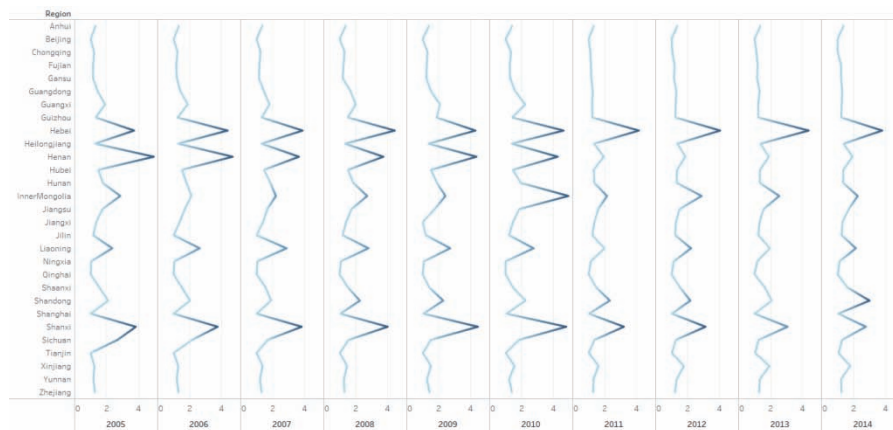


Fig. 1 Output-oriented overall efficiencies of 29 provinces in China (2005-2014)

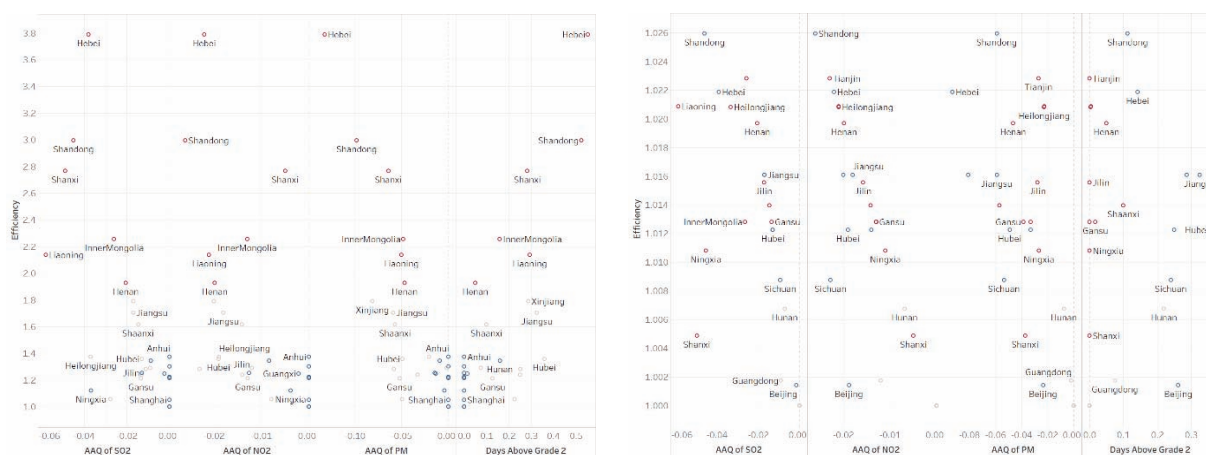


Fig. 2 Efficiency-output clustering results in 2014 (left: our solution; right: centralized solution)

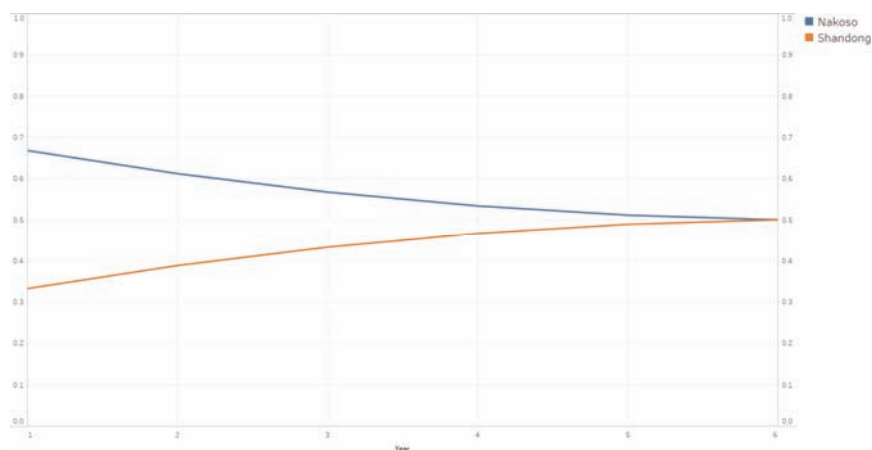


Fig. 3 Dynamic benefit allocation between IGCC power plants in Japan and China

References

- [1]. J. von Neumann and O. Morgenstern, *Theory of Games and Economic Behavior*, Princeton University Press, Princeton, NJ, USA, 1944.
- [2]. L. Liang, W. D. Cook and J. Zhu, “DEA models for two-stage processes: game approach and efficiency decomposition”, *Naval Research Logistics*, DOI 10.1002/nav.20308, 2008.

高齢者施設の終末期ケアにおける宗教的な関わりの検討

尚綱大学短期大学部 河村 諒

1. 研究の目的

2006年の介護保険制度及び2009年の介護報酬の改定により、高齢者施設における看取りや終末期ケアが期待されるようになった。政府統計（2015）では、介護老人保健施設や老人ホームで死亡する割合が2006年から2014年にかけて約2倍に増加しており、高齢者施設における看取りや終末期ケアの社会的要請が高まっている。

終末期ケアにおいて、身体的・心理的苦痛以外にもスピリチュアルペインを軽減し支えることも重視されており（鈴木・流石，2012；寺門・佐伯・稲留・原・シュライナー，2005）、特にスピリチュアルペインの軽減のためには、宗教の信仰を重要視している（寺門他，2005）。川島（2005）は、生死に何らかの意味を見出す際に宗教の影響が大きく、宗教が死後の世界の信念や死の受容、低い死の不安と関連することを示唆している。このように、終末期ケアにおけるスピリチュアルペインに対して、宗教的な関わりは重要であるといえる。

しかしながら、スピリチュアルペインに対する宗教の関わりに関して、介護現場では必要性が十分に認知されておらず、実践もあまりされていない（上前，2008）。個別的な施設における宗教的儀礼や信仰を通して利用者のスピリチュアルペインが緩和されたという事例報告や実践報告（川元，2013；岡本，2006；大和田，2015）はあるものの、複数の施設を対象にした具体的な内容や仕方等の共通点や相違点の比較調査はなされていない。スピリチュアルペインに対する宗教的な関わりの認知や実践を普及・促進するためにも、複数の施設における宗教的な関わりの経験やノウハウ等を具体的に整理する必要があるといえる。

本研究では、充実した宗教的な関わりを実践している複数の高齢者施設の経験やノウハウ、工夫点や改善点等を具体的に整理・提示し、終末期ケアの質の向上を図ることを目的とする。

2. 研究の計画・方法

宗教法人が経営母体である特別養護老人ホーム5施設の介護職員9名、宗教法人が経営母体ではない特別養護老人ホーム2施設の介護職員3名の計12名（男性7名、女性5名）対象に半構造化面接を行った。職員の平均年齢は34.6±11.5歳であった。

調査内容は、施設及び調査対象者が実践している宗教的な関わりを想起してもらい、1) 工夫点や配慮点、2) 問題点や課題点、3) 利用者の様子、4) 調査対象者の利用者に対する関わり方の変化、5) 実践に対する考え方、を尋ねた。

調査実施期間は2016年9月～2017年1月であった。

3. 研究の特色

近年、高齢者施設での看取りや終末期ケアに対する制度の充実が図られ、看取りの件数も増加している。終末期ケアにおいては、利用者のスピリチュアルペインの緩和が重視されており、その際、宗教的な関わりを行うことの有意義さが示唆されている。しかし、介護福祉の現場ではスピリチュアルペインに対する宗教的な関わりは、必要性が十分に認知されておらず、実践もあまりされていないため（上前，2008）、先行研究がほとんど見当たらない。

高齢者施設の終末期ケアにおける宗教的な関わりを普及・促進するために、本研究では、まず、充実した宗教的な関わりを実践している複数の高齢者施設を対象に面接調査を行い、各施設の経験やノウハウ、工夫点や課題点、利用者のスピリチュアルペインの変化等を具体的に整理する。同時に、宗教的な関わりをあまり行っていない複数の高齢者施設も対象にし、積極的ではない視点からの課題点や実践に対する考え方等も具体的に整理する。

本研究の結果により、終末期ケアにおける宗教的な関わりの実践について明らかにすることは、宗教的な関わりの”必要性”の認知を促すとともに “課題点”や“限界”を浮き出させることになり、今後どのように終末期ケアとしての宗教的な関わりを改善・促進したらよいかを検討するための基礎的資料となりうる。

本研究は終末期ケアにおけるスピリチュアルペインと宗教をキーワードとした事例研究である。このような視点を切り口にした実証研究はなく、十分に意義があると考ええる。

4. 研究の成果

録音された面接データから逐語録を作成した。上述の調査内容各1)～5)ごとに関連する発言内容を抽出した。発言内容に関して、前後の文脈の意味を踏まえて、各内容の類似点、相違点に基づき小カテゴリーに分類をしさらに小カテゴリーを大カテゴリーに分類した（表1）。

工夫点や配慮点における小カテゴリーの「これまで行ってきた宗教行動の把握」や「過度な死の意識化の緩和」、及び利用者の様子の大カテゴリーにおける「日常場面での精神的変化」や「宗教行動に対する希望」、「自身の死」から、高齢者施設における宗教的な関わりは終末期特有の関わりだけではなく日常場面としての関わりも有用であると考えられる。日常生活の延長線としての宗教行動が故人とのつながりを意識化させ、自身の死について考える機会になる可能性が考えられた。

また利用者の様子的小カテゴリーにおける「信頼感の形成」、関わり方の変化の大カテゴリーにおける「職員自身の意識の変化」や「介護の実践の変化」、宗教的な関わりの実践に対する考え方の大カテゴリーにおける「介護職員面」から、宗教的な関わりは利用者のスピリチュアリティだけでなく、介護職員の介護の質や意識にもポジティブな影響を与えているといえる。宗教に対する思いが利用者と介護職員との間で異なることは、職員にとって宗教を意識し大切さを感じる機会となり、死生観や宗教観の醸成につながるのではないかと考えられる。

表1 宗教的な関わりの実践に関するカテゴリー分類

大カテゴリー	小カテゴリー
1) 実践に伴う工夫点や配慮点	
個別対応	声かけ(n=6)
	任意参加(n=3)
	実践後の反応確認(n=1)
	これまで行ってきた宗教行動の把握(n=1)
	過度な死の意識化の緩和(n=1)
	障がいへの対応(n=1)
施設としての全体的対応	他宗派(宗教)の容認(n=1)
	職員個人の宗教・信仰の不明示(n=1)
	緊張しない雰囲気づくり(n=1)
	僧侶(専門家)による実践の明示(n=1)
2) 問題点や課題点	
利用者面	宗教的発言(意思表示)の不明示(n=2)
	障がいによる参加の困難さ(n=1)
介護職員面	介護職員の宗教的知識・宗教観の浅薄さ(n=2)
	若い介護職員の宗教に対する積極性(n=1)
	意義の無理解(n=1)
施設面	すべての宗教・宗派へは不対応(n=2)
3) 利用者の様子	
日常場面での精神的変化	表情や口調が変化(n=5)
	気持ちの静穏化(n=4)
	快活化(n=2)
過去や他者とのつながり	信頼感の形成(n=2)
	過去の事柄の想起(n=2)
	他者の死に共感(n=1)
自身の死	死の不安の低減(n=2)
	生きることへの前向き(n=1)
宗教行動に対する希望	家での宗教行動を希望(n=1)
4) 関わり方の変化	
職員自身の意識の変化	宗教への興味、重要性を認識(n=2)
利用者への意識の変化	利用者の宗教への思いを認識(n=1)
介護の実践の変化	話をする機会の増加(n=3)
	利用者の生活の質への配慮の強化(n=1)
	利用者との話の中身の深化(n=1)
5) 宗教的な関わりの実践に対する考え	
利用者面	利用者が大切にしてきたことへの機会・場の提供(n=4)
	利用者間の交流の場(n=1)
	利用者自身の死後の処置の具体化(n=1)
	利用者の心の安らぎ(n=1)
介護職員面	宗教観の醸成(n=2)
	利用者を思い出す機会(n=1)
	自身の介護を見直す機会(n=1)
	利用者の話を聞く機会(n=1)
	職員自身の成長(n=1)
施設面	不要(n=1)
	施設の方針として不実践(n=1)