

平成 25 年度研究費助成 研究成果報告書集

目 次

■ メタボリックサポーターとしての CCN2 の新機能の解明と臨床応用への展開 岡山大学 大学院 医歯薬学総合研究科 准教授 久保田 聡	1
■ 糸状菌が生産する新規グリコシダーゼ阻害剤に関する研究 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 准教授 仁戸田 照彦	7
■ スフェロイド細胞培養法による in vitro 実験モデルを用いたウシ卵管間質細胞 における発現タンパク質の解析 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 山本 ゆき	12
■ 機密情報の伝搬追跡と漏洩防止を実現する仮想化基盤ソフトウェアの研究開発 岡山大学 大学院 自然科学研究科 准教授 山内 利宏	17
■ 遷移金属触媒を用いた炭素-水素結合の直接硫黄化反応の開発 岡山大学 大学院 自然科学研究科 助教 岩崎 真之	21
■ 国内希少野生動植物種スイゲンゼニタナゴの繁殖生態解明と保全技術の開発 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 准教授 中田 和義	27
■ 岡山県における社会基盤施設の災害復旧に関する史的研究 —昭和 9 年 室戸台風の災害復旧橋梁を中心として— 岡山大学 環境管理センター 准教授 樋口 輝久	32
■ SAMS 遺伝子が引き起こす植物ゲノム全体のダイナミックな遺伝子の発現の変化と そのアルミニウム金属ストレス耐性機構との関連について 岡山大学 資源植物科学研究所 准教授 江崎 文一	38
■ 澱粉粒子の形を決める分子群の網羅的同定 岡山大学 資源植物科学研究所 テニユアトラック助教 松島 良	44
■ オオムギを用いたヒメトビウンカの越冬時防除に関する基礎的研究 岡山大学 資源植物科学研究所 准教授 園田 昌司	49
■ 岡山市中心市街地における来街者回遊行動特性に関する研究 岡山大学 廃棄物マネジメント研究センター 助教 氏原 岳人	52
■ ADMA 化タンパク質の代謝系と標的とする脳神経変性疾患関連因子の探索 岡山県立大学 保健福祉学部 教授 木本 眞順美	58
■ 岡山県西部地域での糖尿病腎症患者のための多施設共同教育モデル構築の試み 岡山県立大学 保健福祉学部 教授 住吉 和子	63
■ 緊張を緩和する身体的ビデオコミュニケーションシステムの研究開発 岡山県立大学 情報工学部 助教 石井 裕	66
■ 注視誘導のための視覚的顕著性に基づく自然な画像・映像加工技術に関する研究 岡山県立大学 情報工学部 助教 滝本 裕則	72
■ 生産性の類似度に着目したソフトウェア工数見積もりに関する研究 岡山県立大学 情報工学部 助教 天寄 聡介	79

■ 土工工事に伴う水文観測データの基づいた工事影響評価手法の開発 岡山理科大学 生物地球学部 准教授 佐藤 丈晴	 85
■ 高効率な発行を目指した有機蛍光材料の開発 岡山理科大学 理学部 講師 岩永 哲夫	 91
■ $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体を介したうつ病発症メカニズムの解明 岡山理科大学 理学部 講師 橋川 直也	 97
■ 巨大地震の被災地などで非常時に手軽に使える S E 発電の研究 津山工業高等専門学校 電子制御工学科 教授 鳥家 秀昭	102
■ 交流磁界環境を用いた植物の成長促進装置の実用化 川崎医療福祉大学 医療技術学部 講師 茅野 功	107
■ なぜ肺炎クロミジアは細胞内に留まれるのか？ 川崎医科大学 講師 築取 いずみ	112
■ 膵がん転移を抑えるための基礎的検討 川崎医科大学 准教授 山内 明	114
■ 油彩画、日本画、染色品に使用される色材の簡易分析法の開発 吉備国際大学 文化財学部 准教授 大下 浩司	116
■ 不妊症の主原因である卵胞成育不全におけるヒマワリ種子成分の活用 くらしき作陽大学 准教授 福元 隆浩	122

メタボリックサポーターとしての CCN2 の新機能の解明と臨床応用への展開

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 口腔生化学分野

久保田 聡

CCN2 は CCN ファミリーと呼ばれるタンパク質群の古典的メンバーであり、軟骨細胞などの間葉系細胞の分化、増殖の両方を促進し、組織再生を促すことで知られている。本研究では、細胞生物学的には相反する細胞活動である「分化」と「増殖」をともに促進するという、この CCN2 の特異な機能を支えるメカニズムを解明し医学的応用への道を拓くことを目指した。まず CCN2 遺伝子を破壊した CCN2 ノックアウトマウス (*Ccn2-null*) と正常マウスから軟骨細胞を分離培養し、それぞれから代謝産物を抽出し代謝産物の網羅的解析 (メタボローム解析) を行った。その結果 *Ccn2-null* 軟骨細胞内では、エネルギー代謝の中核物質であるアデノシン 3 リン酸 (ATP) が著しく減少していることが明らかとなった。続いてそのメカニズムの解明を目指し、遺伝子発現の網羅的比較解析を行った結果、嫌氣的 ATP 産生の主要代謝経路である解糖系の酵素の遺伝子発現が、*Ccn2-null* 軟骨細胞では低下していることが判明した。以上の研究成果は CCN2 が変形性関節症 (OA) で損傷を受け軟骨組織を再生に導くという現象に根拠を与え、臨床へ向けての研究の展開に大きく寄与するものである。

1. CCN2 とは

CCN2 という名は CCN ファミリー 2 番目のメンバーという意味だが、この分子は発見当初、線維芽細胞の増殖を促すという性質から結合組織成長因子 (connective tissue growth factor: CTGF) と命名された。いまだに CTGF という名が一部の研究者の間で根強く使われているのは、このためである¹⁾。しかしながらその後の研究で、CCN2 が皮膚、骨格の結合組織ばかりでなく中枢神経や脾臓などの発生に重要な役割を果たしているなど、きわめて多彩な機能を発揮することが明らかにされるにつれ、CTGF のような機能限定的な名はこの分子には相応しくない、という意識が徐々に浸透しつつある。

CCN ファミリーは哺乳類では 6 つのメンバーからなる遺伝子・タンパク質ファミリーであり、最初から順に発見された 3 つのメンバーに与えられた旧名称 (Cyr61, CTGF, NOV) の頭文字をとって、CCN と呼ばれている。各メンバーには構造的に共通点が多いが、特に際立った特徴は 4 つのモジュール (図 1) が繋がってできている点である。これらはアミノ末端から順に insulin-like growth factor-like (IGFBP)、von Willebrand factor type C repeat (VWC)、

thrombospondin 1 type 1 repeat (TSP1)、そして carboxyl-terminal cystine knot (CT)モジュールとそれぞれ呼ばれており、いずれも様々な分子と結合する性質がある (図 1)。こういった構造に基づいた CCN ファミリータンパク質の機能は当然多様で、しかも周囲にどのような分子が存在するかによって発揮する機能が大きく変わってくる。CCN2 はさまざまな悪性腫瘍で高発現しているが、その作用はある腫瘍細胞では増殖を抑制したり、また別の癌では転移を促進したりと一面的には語れない。このような分子機能の複雑さが次に述べる間葉形細胞に対して、一見矛盾する細胞生物学的効果をもたらす背景にあると考えられる。

2. 間葉系組織における役割

分化を遂げた代表的な間葉系組織としては皮下結合組織や骨、軟骨などが挙げられるが、CCN2 はそこで重要な役割を果たしている。特に骨格を形成する大部分の骨を造り、成長させる内軟骨性骨形成過程における役割は大きい。CCN2 遺伝子を欠損させたマウス (*Ccn2-null*) で重篤な骨格形成不全を来すという事実が、その役割の重さを物語っている。こういった CCN2 の機

能は単離してきた骨芽細胞、軟骨細胞などに対する細胞培養レベルの研究結果にも裏付けられている。これら細胞に CCN2 タンパク質を添加して培養すると、分化細胞形質の増強と増殖の促進が両方見られるのである。話を生体内に戻せば、内軟骨性骨形成過程では CCN2 は前肥大軟骨細胞という、後期分化段階に入った刹那の細胞で限定的に生産されて周囲に運ばれ作用する。この前肥大軟骨細胞の片側には終末分化に向かう肥大軟骨細胞がいて、CCN2 はその終末分化と細胞死を促進する。その一方で反対側には増殖軟骨細胞がいて、こちらでは同じ因子が細胞増殖を促進している、という奇妙な図式が成立している¹。こういった状況依存的な効果を CCN2 はどのようにして発揮しうのか？本研究は、こういった素朴な疑問から出発している。

3. メタボリックサポーター機能の発見

したがって本研究の着眼点は、ある意味きわめて単純である。先にも述べたように高度に組織された遺伝子発現装置の整備が必要な細胞分化と、全ゲノム複製に取り組みねばならない細胞増殖が、互いに相容れない現象であることは確

かである。しかし両者の間にも共通して必要とされるものがある。それはエネルギーである。あらゆる活動はエネルギーを要求するのであるから、エネルギー代謝は全ての生命活動に必要な細胞生物学的営みと言えよう。このエネルギー供給を活発化すれば、細胞分化であろうが増殖であろうが、活性が底上げされるのは当然の理である。CCN2 のやっていることはそういう種の仕事ではないのか？

このようにして「CCN2 は代謝、特にエネルギー代謝を賦活する機能を持つ」という仮説が生まれ、本研究が始まった。

もしこの仮説が正しければ、*Ccn2-null* マウスの細胞ではエネルギー代謝が停滞しているはずである。まずはこれを全体的に検証する目的で、野生型マウスと表現型に際立った差の現れる成長板軟骨細胞を対象として、両者の代謝プロファイルの比較検討をメタボローム解析で行った。*Ccn2-null* マウスは周産期致死のため、胎児から肋軟骨を採取せねばならない。そこから軟骨細胞を分離したあと培養系に持込み、脱分化を起こさない範囲で2回まで継代し細胞数を増やしたあと、メタノールにて代謝産物を抽出した。

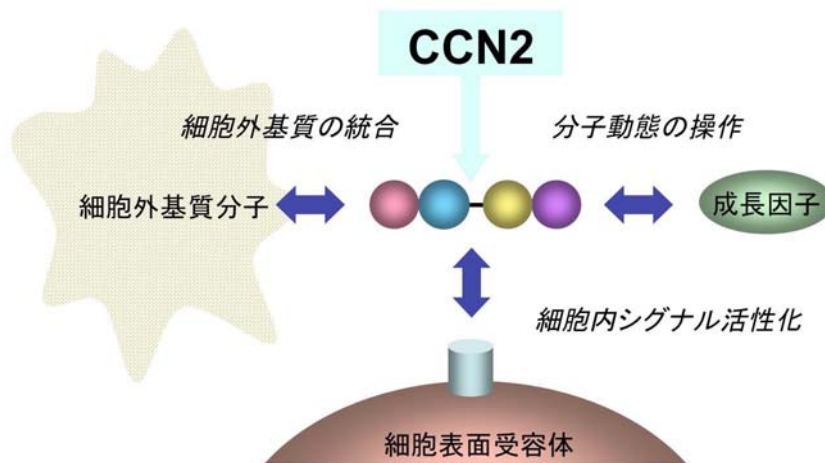


図1：CCN2 分子の作用 4つのモジュールからなる CCN2 分子を中央に示す。両方向矢印は様々な分子との結合を表している。

タンパク質などの高分子をフィルターで除去のち、それぞれの代謝産物をキャピラリー電気泳動により分離し、エレクトロスプレー法によりイオン化した。各代謝産物の質量ならびに含有量の定量は、飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) を用いて陽イオン、陰イオンにつき個々に行った。今回用いた方法では代謝産物抽出時に添加した標準分子を指標として、代謝産物の絶対定量が可能なのが特徴である。なお定量対象の代謝産物は 108 種設定してあった。

メタボローム解析はマウス個体を変えて 2 度繰り返し、それぞれの実験において、野性型マウス軟骨細胞と比して、*Ccn2-null* マウス軟骨細胞において各代謝産物がどう変動しているかを検討した。すると、やはり各代謝経路は実験条件などの培養環境因子の影響に敏感に反応するようで、1 回目と 2 回目との実験結果にかなりのバラツキが見られ、極端なものでは結果が逆転する、つまり 1 回目は *Ccn2-null* マウスが、そして 2 回目では野性型マウスの方が高い値を示す代謝産物すらあった。

ところがそんな中でも、2 回の実験で安定して *Ccn2-null* マウス軟骨細胞で低値を示す代謝産物群が存在した。そのような物質はわずか 10 種にも満たなかったが、そこに含まれるアデノシン 3 リン酸 (ATP) にはひと際目を引かれた。言うまでもなく ATP は、エネルギー通貨とも呼び做わされ、生物のエネルギー代謝の中核を担う重要な物質である。それが 2 回のメタボローム解析で、ともに *Ccn2-null* マウス軟骨細胞では野性型と比して 50% に低下しているという。絶対量を比較しても、驚くべきことに 2 回の実験間でほとんど差がみられない。さらに、通常 ATP から誘導体として合成され、一部の生化学反応のエネルギー供与体として働く類縁物質であるグアノシン 3 リン酸、ウリジン 3 リン酸、シチジン 3 リン酸も軒並み同様の変動を来している。決してメタボローム解析の結果を信用しないわけではなかったが、念のために再びマウスを準備、軟骨細胞を採取培養し、別の実験方法で現

象の確認を試みた。細胞抽出液に含まれる ATP 量を、蛍光発色を指標として生化学的方法で相対定量する古典的なやり方である。その結果、この方法で測定した場合、*Ccn2-null* マウス軟骨細胞内の ATP 量は、野性型の 20% 程度というデータが得られた。どちらの数値が正確かについては判断が難しいところであるが、いずれにせよ CCN2 遺伝子欠損により細胞内 ATP 量が半分以上になることは間違いがなさそうである。これは CCN2 が ATP 産生を支え、エネルギー代謝を活性化することを裏側から示す事実である。さて次に検証すべきことは「本当に CCN2 タンパク質がこの仕事をしているのか？」という本質的疑問である。*Ccn2-null* マウスでは CCN2 遺伝子にキズが入っているのだが、そのキズが CCN2 タンパク質産生だけにしか影響しないという保証はない。キズを入れたことにより周囲のクロマチン構造、転写因子のアクセシビリティなどが変化して、近傍の別の遺伝子に影響が出る可能性もある。なおこの問題はノックアウトマウスを用いた全ての実験で考慮すべきである。またこの *Ccn2-null* マウスはいわゆるコンベンショナルなノックアウトマウス、つまり発生初期からずっと CCN2 がない状態なので、ATP 欠乏は長期間にわたる CCN2 欠損による間接的影響の累積の結果かも知れず、そのような結果を CCN2 だけで説明するのには無理がある。こういった可能性を排除するために、次に組換え CCN2 タンパク質を上記マウス軟骨細胞に添加し、ATP 産生が亢進するかを検証した。すると、*Ccn2-null* マウス軟骨細胞に外部から CCN2 を添加すると、48 時間後には細胞内 ATP 量は野性型のそれと同じレベルまで回復する、という結果が得られた。また野性型にさらに CCN2 を加えた場合でも細胞内 ATP 量は若干上昇した。こうして CCN2 が ATP 産生を通じて軟骨細胞の活動を支える「メタボリックサポーター」としての役割を持つ事がここに明らかになったのである。

4. メタボリックサポーター機能の分子背景

それでは CCN2 分子は、どのようにして細胞内の ATP 産生を高い状態で保っているのだろうか。我々やマウスを含めて真核生物においては、大雑把に分けて2つの異なる方法で ATP は産生されている。ひとつは解糖系に代表される「基質レベル」での ATP 産生で、簡単に言えば特定の生化学反応の過程でアデノシン 2 リン酸 (ADP) のリン酸化により ATP が直接出来るシステムである。この方法は原始的 ATP 獲得法で、原核生物においても行われており酸素を必要としない。いまひとつはミトコンドリア内膜付近で行われる酸化的リン酸化反応で、呼吸鎖と呼ばれる一連の酸化反応と共役して、ADP が ATP に変換される洗練されたシステムである。ミトコンドリアには、さまざまな異化反応で生じたエネルギーの高い電子が、補酵素などに預けられて集まってくる。それを段階的にエネルギーの低い状態に受け渡し、最後に電子は酸素に託される。だから酸素が必要で、こちらは呼吸をする真核細胞だけが使える ATP 産生術なのである。電子から徐々に開放されたエネルギーは、ミトコンドリア内膜の酸化酵素が水素イオンを内膜と外膜の隙間に汲上げる仕事に使われる。このため「働くミトコンドリア」には膜電位が生じる。膜電位に変換されたエネルギーは、この汲上げられた水素イオンの力で、あたかも水力発電のように ATP シンターゼのタービンを回すことにより ATP に固定される。前置きが長くなってしまったが、問題は CCN2 が上記のどちらの ATP 産生を支えているのか？ということである。マウスや人間では、全体的にみてミトコンドリアによる ATP 供給が大部分を占めている。そこで ATP シンターゼを造り上げる遺伝子の発現が CCN2 遺伝子欠損によって影響を受けていないかを、それぞれの軟骨細胞から mRNA を抽出し検証した。方法としては DNA マイクロアレイ解析と、それに続くリアルタイム逆転写 PCR 法によって追ってみたが、この一連の実験からは安定した結果は得られなかった。そこで原点に帰り、先に述べたようにミ

トコンドリアにおける ATP 産生に伴い膜電位が生じることから、*Ccn2-null* マウス軟骨細胞と野生型のそれにつき、ミトコンドリア膜電位の比較定量を行ってみたが、この実験でも統計学的に有意な差は両者の間にみられなかった。

あとはもう 1 つの可能性であるが、この場合検証すべき標的はグルコースを分解して ATP を嫌氣的に獲得する解糖系である。ここでメタボローム解析の結果に戻ってみると、解糖系の数多くの中間産物、アセチル CoA を経て嫌氣的解糖の最終産物である乳酸に至るまで、大部分の代謝産物の絶対量が *Ccn2-null* マウスでは低下していることに改めて気付いた。この所見に基づいて、関連遺伝子の発現変化を評価したところ、エノラーゼをはじめとして、解糖系の一連の生化学反応の後半部分に位置し、反応を加速するほとんどの酵素の遺伝子発現が、*Ccn2-null* マウス軟骨細胞では軒並み低下していることが明らかになった (図 2)。すなわち軟骨細胞において CCN2 は、上記のように解糖系に含まれる複数の代謝酵素の遺伝子発現を高く保つことにより、解糖反応を活性化する。その結果細胞内 ATP 量を高めることに寄与しているであろうことが判明した。

先ほど、我々の細胞では全体的にミトコンドリアによる好氣的 ATP 産生が優位であると述べたが、実は軟骨組織ではそうとは言えない。なぜなら軟骨というものは無血管組織であり、恒常的に低酸素下におかれているからである。したがって軟骨細胞における細胞内 ATP 全量の低下の原因を嫌氣的解糖系の停滞の求めること自体、何ら不自然なことではない。しかしこれは裏を返せば、CCN2 がこのような「メタボリックサポーター」として機能できる場合は、低酸素におかれた組織に限られるという可能性も示している。また注意せねばならないのは、細胞内全 ATP 量は、必ずしも細胞が単位時間で作る ATP 総量を代表するものではないことである。おそらく本研究で測定された ATP 量は、生命維持に必要な ATP を使ったあとに残った余剰分に相当するも

のではないかと、現在は考えている²。

5. 臨床応用への道

組換え CCN2 タンパク質が動物 OA モデルにおいて、損傷を受けた関節軟骨組織の再生を加速することは、以前の報告から知られていた。今回得られた以上の研究成果は、その作用機序に「エネルギー代謝の賦活」という新たな根拠を与えることとなり、新たな OA 治療分子としての CCN2 の有用性は、さらに確固たるものとなった。さて、その先にある臨床応用に向けての研究を展開する方向性はいくつも考えられるが、我々はまず、CCN2 のモジュール - 機能連関に着目した。先にも述べたように、CCN2 は4つの

モジュールから構成されている。以前の研究で我々は、4つのモジュールをそれぞれ CCN2 断片として生産、精製し、培養細胞でその生物学的活性を評価したことがある。その結果どのモジュールも、単独である程度の CCN2 様効果を発揮しうることが判っていた。しかしその効果の程度および質、つまり CCN2 の発揮する多彩な機能を各単独モジュールがどの程度カバーできるかは未知のままであった。換言すれば、エネルギー代謝の賦活、あるいは軟骨再生医療においては必ずしも全長 CCN2 を使用する必要はなく、4つのモジュールのうちの1つあれば十分かも知れない、ということである。

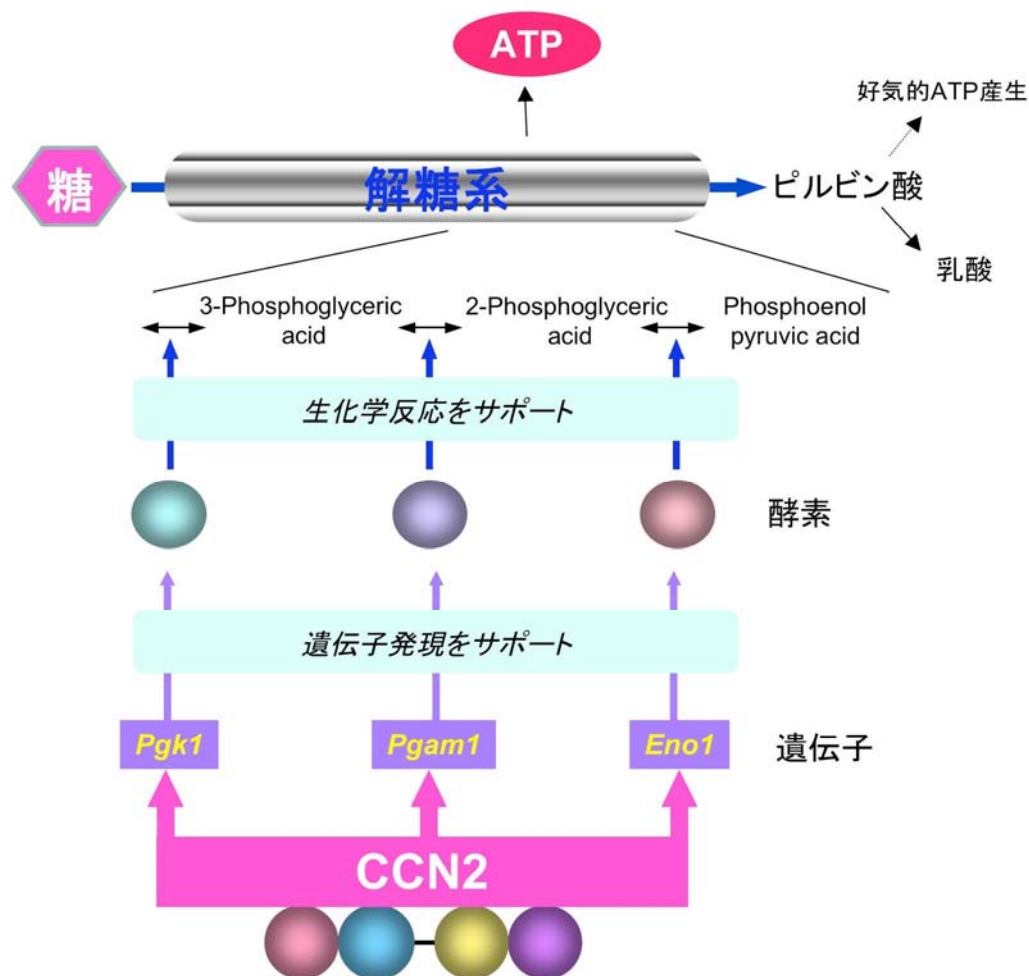


図2：CCN2 が嫌氣的 ATP 産生を支えるメカニズム

全長 CCN2 より単独モジュールを用いる利点は数多くある。第一に全長 CCN2 は精製後きわめて不安定で、安定した供給、保存が難しい一方、モジュール断片は大量生産が容易であり安定であること。第二に、ある目的のためには必要でないと判ったモジュールは、望まれない効果、つまり副作用や免疫応答を惹起してしまう要因となるので極力排除すべきであること。これらを念頭において我々は、培養細胞を用いた慎重な検討の結果、TSP1 モジュールを軟骨再生分子候補に選び、その効果をラット OA モデルにて検証した。その結果驚くべきことに、TSP1 単独モジュールは、全長 CCN2 よりさらに効果的に損傷を受けた軟骨組織の再生を促したのである³。おそらくその効果の背後には「エネルギー代謝の賦活」が存在すると考えているが、この点の検証は今後の課題として残されている。

in vivo. Bone. 59:180-188.

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご助成をいただいたウエスコ学術振興財団に深甚なる感謝の意をここに表します。

7. 文献

1. Kubota, S. and M. Takigawa. 2014. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. Clinical Science, in press.
2. Maeda-Uematsu, A., S. Kubota, H. Kawaki, K. Kawata, Y. Miyake, T. Hattori, T. Nishida, N. Moritani, K.M. Lyons, S. Iida and M. Takigawa. 2014. CCN2 as a novel molecule supporting energy metabolism of chondrocytes. J Cell Biochem. 115:854-865.
3. Abd El Kader, T., S. Kubota, T. Nishida, T. Hattori, E. Aoyama, D. Janune, E.S. Hara, M. Ono, Y. Tabata, T. Kuboki and M. Takigawa. 2014. The regenerative effects of CCN2 independent modules on chondrocytes in vitro and osteoarthritis models

糸状菌が生産する新規グリコシダーゼ阻害剤に関する研究

岡山大学大学院環境生命科学研究科

仁戸田 照彦

本研究は、糸状菌 *Pochonia suchlasporia* TAMA87 株により生産される強力な β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) 阻害物質 pochonicine の類縁体を単離し、その化学構造と活性に関する情報を得ることを目的として行った。大量培養により得られた固体培養物の MeOH 抽出物を出発材料として、各種クロマトグラフィーにより精製を行い、pochonicine とともに、その類縁体 3 種をほぼ完全に精製することができた。そのうちの一つである類縁体 B について各種機器分析を行い、化学構造の推定を行った。さらに、その GlcNAcase 阻害活性を調べて pochonicine と比較することにより、構造活性相関に関する知見を得ようと試みた。

緒論

キチン分解酵素であるキチナーゼおよび β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) は、糸状菌の細胞壁や昆虫の表皮に含まれるキチンの分解代謝に必須である。これらの酵素を阻害する物質は抗菌剤や害虫防除剤となりうることから、農薬および医薬のリード化合物として期待される^{1,2)}。我々は微生物由来の GlcNAcase 阻害物質の探索を行い、糸状菌 *Pochonia suchlasporia* TAMA87 株の培養物中から新規 GlcNAcase 阻害物質 pochonicine を見いだした³⁾。最近になって、ようやく pochonicine の化学合成が達成され、それにより pochonicine の絶対立体配置も図 1 のように決定された⁴⁾。

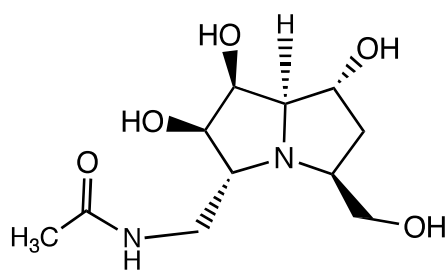


図 1 Pochonicine の化学構造

Pochonicine はこれまでに知られている GlcNAcase 阻害物質のなかでも最強クラスの活性を有していたことから、その作用機構と薬剤としての応用に関心が持たれている。Pochonicine は、*Pochonia suchlasporia* TAMA87 株を押し麦固体培地で培養することにより生産されるが、その培養物中には、pochonicine と水酸基の数が異なる 3 種類の

類縁体も含まれていることがこれまでの研究により示唆されている。Pochonicine の類縁体は水酸化レベルだけでなく、水酸基等の立体配置が pochonicine と異なる可能性もあり、それらの構造の違いにより、糖質加水分解酵素に対する選択性や阻害活性が異なると考えられ、新たな選択的グリコシダーゼ阻害剤のリード化合物となることが期待される。したがって、本菌株の培養物中に含まれる各種 pochonicine 類縁体の構造と活性を明らかにすることには大きな意義があると考えられる。しかし、これらの類縁体の生産量は pochonicine と比べてはるかに少ないことから単離が困難であり、いまだに化学構造が明らかになっていない。そこで本研究では、pochonicine 類縁体を効率的に培養生産する条件で大量培養を行って目的化合物を単離し、その化学構造と活性に関する情報を得ることを目的とした。

材料と方法

1. 固体培地の調製

Pochonicine 類縁体の培養生産のための固体培地には、予備的検討により類縁体生産に適していると考えられた「押し麦-エンバク種子混合基材固体培地」を用いた。これは押し麦 9 g にエンバク 1 g を加えたものに対して YTP 溶液 (乾燥酵母エキス 2 g/L, L-酒石酸ナトリウム 1 g/L, リン酸 2 水素カリウム 1 g/L) 10 mL を添加してオートクレーブすることにより調製したものである。培地の容器には 200 mL 容三角フラスコを用いた。

2. 糸状菌 *Pochonia suchlasporia* の培養と培養抽出物の調製

Pochonia suchlasporia を寒天平板培地で培養して得られた菌体を、寒天ごと（直径約 7 mm のディスクとして）固体培地に添加・混合することにより植菌し、22℃で 22 日間静置培養した。得られた培養物にメタノール 50 mL を添加して一晚静置することにより抽出を行った。これをろ紙を敷いたブフナー漏斗を用いて吸引ろ過し、培養抽出物を得た。

3. GlcNAcase 阻害活性の測定

Pochonicine は強力な GlcNAcase 阻害活性を有することが明らかとなっていることから、pochonicine 類縁体も GlcNAcase 阻害活性を有するという仮定にもとづき、培養抽出物や分画試料中の pochonicine および pochonicine 類縁体の含量の指標として、ハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase に対する阻害活性を用いた。この活性は、本研究室で確立したハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase 阻害試験に供することにより、評価した。試料一定容量における GlcNAcase 阻害率（%）で比較することに加え、必要に応じて容量換算での 50%阻害量（容量換算 ID_{50} ）を求めた。試料の活性を unit 単位で表し、1 unit は 50%阻害量（ ID_{50} ）相当量と定義した。

4. Pochonicine およびその類縁体の GC-MS 分析

培養抽出物等の試料を陽イオン交換カートリッジによる前処理の後、アセチル化して GC-MS 分析を行うことにより、試料中の pochonicine およびその類縁体の存在の有無を確認した。

5. Pochonicine およびその類縁体の精製

培養物には pochonicine 類縁体とともに、その 10 倍量ほどの pochonicine が含まれていると考えられることから、pochonicine 類縁体とともに、pochonicine の精製も行った。精製の手法は、すでに確立されている pochonicine の精製方法に準じて行った。まず、培養物の MeOH 抽出物から MeOH を除去することにより水溶液とし、これを酢酸エチルで

抽出することにより、不要な酢酸エチル可溶画分を除去した（EtOAc 洗浄）。これを、活性炭カラムクロマトグラフィー、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、脱塩のための活性炭カラムクロマトグラフィー、分取陽イオン交換 HPLC に順次供することにより、精製を行った。各精製過程における回収率は、前述の GlcNAcase 阻害試験により、GlcNAcase 阻害活性を指標として求めた。同時に、精製画分に目的物である pochonicine および pochonicine 類縁体が含有されることを GC-MS 分析により確認した。

6. Pochonicine 類縁体 B の構造解析

類縁体 B の精製品を質量分析および核磁気共鳴（NMR）スペクトル測定に供することにより、構造解析を行った。

結果と考察

1. 糸状菌 *Pochonia suchlasporia* の大量培養

延べ 250 本のフラスコで培養を行い、すべて MeOH 抽出を行った。その結果、GlcNAcase 阻害活性に換算して 9.6×10^8 units の抽出物を得た。

表 1 *Pochonia suchlasporia* の大量培養と培養物の MeOH 抽出物の活性

培養 lot.	フラ スコ 本数	MeOH 抽出物容 量 (mL)	容量換 算 ID_{50} (nL)	活性 (units)
1	70	1502	4.0	3.8×10^8
2	70	400	2.2	1.8×10^8
3	40	218	1.0	2.2×10^8
4	70	490	2.6	1.8×10^8
合計	250	2610	—	9.6×10^8

以前に培養抽出物から pochonicine を精製した際の回収率からの計算によれば、 9.6×10^8 units の抽出物から得られる pochonicine の量は 76.2 mg となる。予備的精製実験の結果から、培養抽出物中に含まれる pochonicine 類縁体の量は、pochonicine の 1/4 ～1/10 程度とみられている。したがって、今回得られた培養抽出物に含まれる pochonicine 類縁体の

量は 7～19 mg 程度と見積もられることから、pochonicine 類縁体の構造解析に十分な量が得られたと考えた。

2. Pochonicine およびその類縁体の精製

培養抽出物の全量の約半分、培養フラスコ 126 本分に相当する量を材料として、pochonicine およびその類縁体の精製を行った。表 2 に、今回の精製における活性回収率を示した。

表 2 培養抽出物からの pochonicine およびその類縁体の精製における活性回収率

精製段階	活性 (units)	活性回収 率 (%)
MeOH 抽出液 (培養フラスコ 126 本相当量)	5.3×10^8	100
EtOAc 洗浄後	6.1×10^8	115
活性炭カラム後	1.8×10^8	34.0
陽イオン交換カラム後	1.7×10^8	32.1
脱塩活性炭カラム後	0.74×10^8	14.0

MeOH 抽出物から脱塩活性炭カラムクロマトグラフィー後までの活性回収率が 14%であった。以前、pochonicine を精製した際の活性回収率 34%よりも低い値となった。原因として、活性炭カラムクロマトグラフィーにおける回収率が 20～30%と低かったことが大きく影響していると考えられる。これについては、カラムの断面積に対する高さの割合を小さくすることで改善できることが示唆されている。

最終精製段階である分取陽イオン交換 HPLC におけるクロマトグラムを図 2 に掲載している。合計 9 回行った結果であり、いずれのクロマトグラムにも主成分として pochonicine が検出されており、そのあとから、pochonicine の類縁体である類縁体 A、類縁体 B、類縁体 D が溶出されていることがわかった。この化合物の対応は、以前行った陽イオン交換 HPLC の結果と、GC-MS 分析の結果との比較に基づいて行

った。なお、類縁体 D よりもあとに溶出されてくるピークが観察されたことから、この画分を GC-MS 分析に供したが、そのマスペクトルにおけるフラグメンテーションパターンから、pochonicine の類縁体である可能性は低いと考えられた。

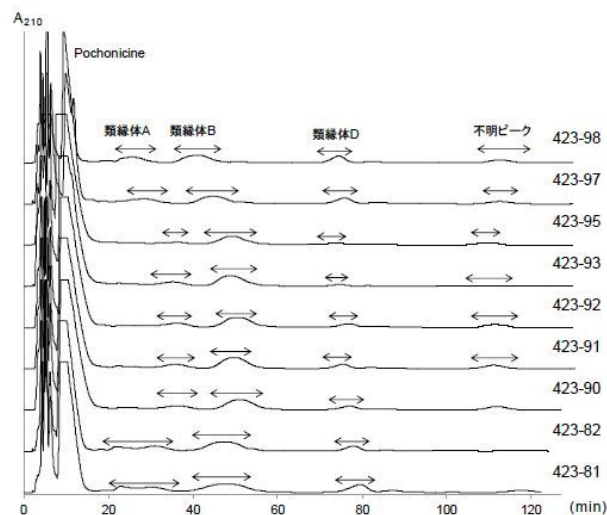


図 2 分取陽イオン交換 HPLC におけるクロマトグラム

分取陽イオン交換 HPLC において確認された各化合物のピークに相当する部分を集めて、最終精製品とした。図 3 に各化合物の最終精製品の HPLC 分析結果を示す。

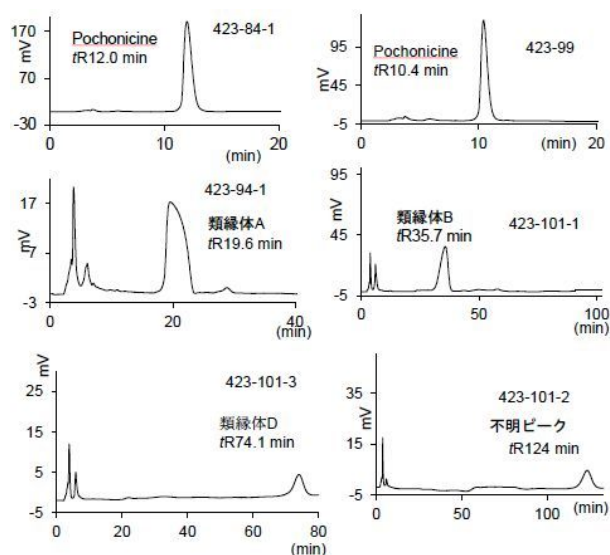


図 3 最終精製後の各化合物の HPLC 分析結果

Pochonicine、類縁体 A、類縁体 B、類縁体 D い

れにおいても、保持時間 3～7 分あたりに目的化合物以外のピークが検出されたが、溶媒のみを注入した分析においても同様のピークがみられたことから、それらのピークは夾雑物とは考えにくく、4つの化合物はほぼ完全に精製されたと考えられた。表 3 に各化合物の収量を示す。

表 3 Pochonicine およびその類縁体の収量

化合物	収量(mg)
Pochonicine	39.2
類縁体 A	2.06
類縁体 B	4.83
類縁体 D	3.97

精製に先立ち、活性から見積もった pochonicine の収量は、MeOH 抽出物全量を精製したと仮定した場合に 76.2 mg と算出された。今回の精製では MeOH 抽出物のほぼ 1/2 を用いたことから、pochonicine の収量は 38.1 mg と見積もられ、実際の収量はこれに近いものであった。類縁体の収量は pochonicine の収量の 1/4～1/10 程度と見積もられたが、実際の収量はそれより少ないものであった。その原因としては、化合物の物性によることも考えられるが、精製の主な指標として GlcNAcase 阻害活性を用いたことにより、活性の低い化合物の場合は回収率が低くなる可能性も考えられる。また、pochonicine の類縁体としては、類縁体 C という化合物の存在も示唆されていたが、今回は単離することができなかった。培養抽出物の時点で類縁体 C の存在を確認することができなかったことから、培養条件あるいは抽出条件に原因があるのではないかと考えられる。類縁体 3 種のうち、最も収量が多く、純度も高いと考えられた類縁体 B について、構造解析を行うことにした。

3. 類縁体 B の構造解析

類縁体 B の精製品を各種機器分析に供して構造解析を行った。まず、エレクトロスプレーイオン化を用いた質量分析においては、 m/z 245 に $[M + H]^+$ と考えられるイオンピークが検出された。Pochonicine は m/z 261 に $[M + H]^+$ のイオンピークを示すことか

ら、類縁体 B は pochonicine の水酸基が水素原子に置換されたものであるという従来からの推定を支持するものであった。さらに、高分解能質量分析を行った結果より、この m/z 245 のイオンピークは組成式 $C_{11}H_{21}O_2N_4$ のイオンに由来すると考えられることから、類縁体 B の分子式は $C_{11}H_{20}O_2N_4$ であると結論づけられ、前述の推定が正しいことが確認された。また、核磁気共鳴(NMR)による分析の結果から、類縁体 B は pochonicine の母核であるピロリジジン環に直結する 3つの水酸基のいずれか 1つが水素原子に置換されたものであると推定された。以前の研究において、類縁体 A も pochonicine のピロリジジン環に直結する 3つの水酸基のいずれか 1つが水素原子に置換されたものであると推定されていたことから、類縁体 A と類縁体 B は構造異性体であると考えられた。現在のところ、これ以上のことは明らかとなっていないが、さらに詳細に各種 NMR 分析を行うことにより、類縁体 B の平面構造および相対立体配置の推定は可能であると考えられる。

4. 類縁体 B の GlcNAcase 阻害活性

類縁体 B の精製品について、ハスモンヨトウ蛾 GlcNAcase 阻害活性を測定し、pochonicine と比較を行った。その結果、pochonicine の 50%阻害濃度 (IC_{50}) が 13 nM 程度であったのに対し、類縁体 B はその 100 倍以上の濃度である 1560 nM においても 50%未満の阻害活性しか示さなかった。つまり、類縁体 B のハスモンヨトウ蛾 GlcNAcase 阻害活性は pochonicine の 1/100 未満であるということが明らかとなった。類縁体 B が pochonicine のピロリジジン環に直結する 3つの水酸基のいずれか 1つが水素原子に置換されたものであり、なおかつ、類縁体 B の立体配置が pochonicine と同じであると仮定すると、1つの水酸基の有無のみによって活性が大きく変化することを意味しており、pochonicinen の阻害メカニズムにおいて、この水酸基が非常に重要な役割を果たしている可能性が高いことを示唆するものといえる。今後は、類縁体 B の構造を立体配置も含めて決定するとともに、類縁体 A についても構造と活性を明らかにすることを目指す。それが達成され

れば、pochonicine のピロリジジン環に直結する 3 つの水酸基のうち、2 つについて GlcNAcase 阻害活性に対する寄与の程度が明らかとなり、さらなる pochonicinen の阻害メカニズム解明の進展につながるものと考えられる。

結論

本研究では、糸状菌 *Pochonia suchlasporia* TAMA87 株の大量培養を行いその抽出物を精製することにより、強力な GlcNAcase 阻害物質である pochonicine の類縁体 3 種を単離した。さらにそのうちの 1 つである類縁体 B について構造解析を行い、pochonicine のピロリジジン環に直結する 3 つの水酸基のいずれか 1 つが水素原子に置換されたものであることが明らかとなった。その GlcNAcase 阻害活性は pochonicine の 1/100 未満であったことから、pochonicine と類縁体 B との唯一の違いを示す水酸基が、pochonicine の阻害メカニズムにおいて、非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。この結果は、新たな GlcNAcase 阻害剤や他のグルコシダーゼに対する阻害剤の開発に貢献すると期待される。

参考文献

- 1) Cohen, E : In “Advances in Insect Physiology”, Jerome C, Stephen JS, eds, 38 : pp5-74, Academic Press, New York (2010)
- 2) Hartl L, Zach S, Seidl-Seiboth V : Appl. Microbiol. Biotechnol., 93 : 533-543 (2012)
- 3) Usuki H, Toyo-oka M, Kanzaki H, Okuda T, Nitoda T : Bioorg. Med. Chem., 17 : 7248-7253 (2009)
- 4) Kitamura Y, Koshino H, Nakamura T, Tsuchida A, Nitoda T, Kanzaki H, Matsuoka K, Takahashi S : Tetrahedron Lett., 54 : 1456-1459 (2013)

ウシ卵管間質細胞の単層ならびに三次元培養法の確立と細胞中発現タンパク質の解析

岡山大学 大学院環境生命科学研究科

山本ゆき

哺乳動物において卵管は、受精および初期胚発生の場合であるとともに配偶子および初期胚の輸送経路である。これらの卵管の機能は、様々な因子によって調節されているが、その詳細は明らかでない。卵管細胞機能に関する報告は世界的にも少ない。特に卵管間質細胞についてはほとんど検討されておらず、その詳細な生理機能は未解明な部分が多い。本研究では、ウシ卵管を用い卵管間質細胞の純粋培養系を確立した。さらに、確立した培養系を用いて卵管で重要な生理作用を持つプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF) の分泌能力と PGF 分泌に影響を与える因子を検討した。ウシ卵管上皮細胞にて PGF 分泌を刺激することが知られている腫瘍壊死因子 (TNF) とオキシトシンの影響を調べた結果、間質細胞では TNF のみ PGF 分泌を刺激した。スフェロイド培養法において単層培養法と比較し PGF 分泌量が増加していたことから、細胞間相互作用が PGF 分泌に影響を与えていることが推察された。細胞における発現タンパク質を二次元電気泳動法にて解析したところ、単層培養法とスフェロイド培養法で違いが認められた。詳細な解析については、今後研究を継続する予定である。

<緒言>

近年、ヒトの不妊治療や体外授精、家畜の低受胎の改善、希少動物の人工繁殖技術開発といった様々な場面で、哺乳動物の生殖制御技術の発展が求められている。雌性生殖器のうち、卵管は受精 (卵管膨大部) や初期胚発生 (卵管峡部) ならびに子宮と卵巣をつなぐ配偶子および胚の輸送経路であり、妊娠の成立に非常に重要な器官である (図 1)。



図 1. 卵管の模式図

それにも関わらず、卵管の機能を制御するメカニズムは明らかではなく、卵管機能に異常が起きた場合の診断法や治療法は未だ確立されていない。

哺乳動物の卵管壁は、内腔側から上皮層、間質層、筋層で構成されている (図 2)。

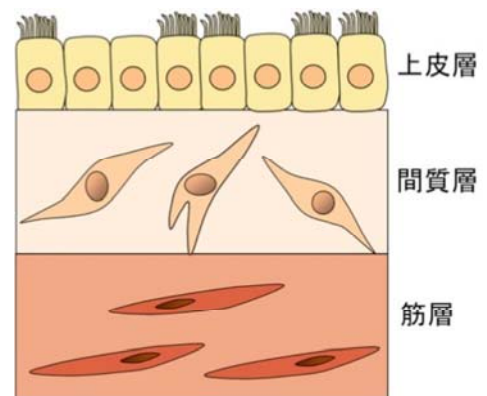


図 2. 卵管の断面模式図

上皮細胞は、卵管機能を制御するために様々な因子を分泌していることが報告されている一方で、間質細胞の機能は不明な点が多い。それは、細胞の機能を解析する上で有効な細胞の単離培養法が、卵管間質細胞においては確立されていないためと考えられ

る。間質細胞は他の組織で重要な役割を担っており、卵管機能制御機構を解明するためには卵管間質細胞の機能解析は必要不可欠である。

本研究では、まずウシ卵管間質細胞の純粋培養系を確立する。細胞培養系には、従来よく使用される単層培養法に加え、新たな細胞培養法として近年注目されている、生体の環境に近づけた3次元培養法を検討する。さらに、確立したそれぞれの培養系を用いて間質細胞の生理機能を解析し、哺乳動物の卵管機能制御における間質細胞の役割を明らかにすることで、ヒトの不妊治療や家畜の不受胎診断ならびに治療法の確立に有効な基礎知見を獲得することを目的とする。

<材料と方法>

ウシ卵管組織は、岡山市および津山市の食肉処理センターにて採取し、氷上にて保存し岡山大学農学部まで運搬した。卵巣の肉眼的所見から、排卵ステージを分類し、卵胞期から排卵後6日目までを細胞培養に用いた。

細胞におけるタンパク質局在は免疫細胞化学染色によって解析した。培養液中のプロスタグランジン濃度は酵素免疫測定法によって測定した。また、細胞中タンパク質については二次元電気泳動によって分離し、その発現変化を確認した。

<研究内容>

1) ウシ卵管上皮および間質細胞の純粋培養系の確立

卵管組織より単離し培養した間質細胞を、上皮系細胞マーカー (cytokeratin) および間質系細胞マーカー (vimentin) の特異抗体を用いた免疫細胞化学染色によって染色したところ、99%以上の細胞が間質細胞マーカー抗体によって染色されたことから、上皮細胞のコンタミネーションがなく純粋に培養されていることを確認した (図3)。

また、卵管上皮細胞や他の様々な組織の間質細胞で分泌されるプロスタグランジン (PG) F2 α (PGF) が、間質細胞においても産生されていることを確認した。以上より、本培養系は細胞機能解析に有用であると判断した。さらに、間質細胞に腫瘍壊死因子 (TNF) ならびにオキシトシンを添加し、PGFの分泌能に及ぼす影響を検討した結果、上皮および間質細胞においてTNFがPGF分泌を刺激する因子であることが明らかとなった (図4)。

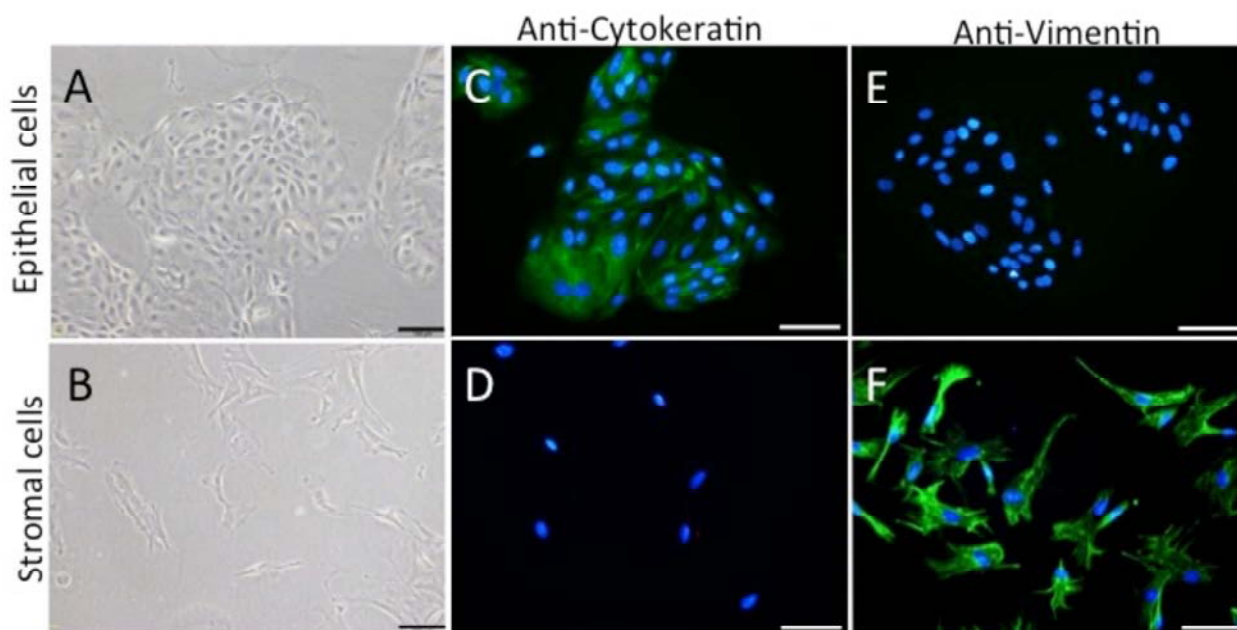


図3 培養上皮 (A) および間質 (B) 細胞と、上皮細胞マーカーで染色した上皮 (C) ならびに間質細胞 (D) および間質細胞マーカーで染色した上皮 (E) および間質 (F) 細胞

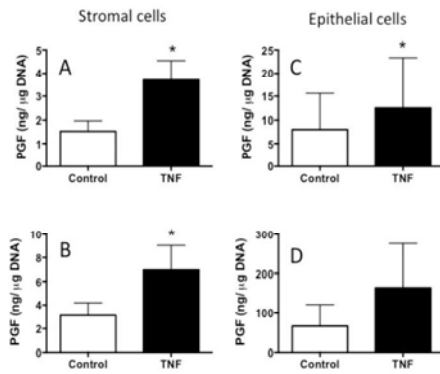


図 4. 膨大部 (A,C) および峡部 (B,D) の間質 (A,B) および上皮 (C,D) において TNF が PGF 分泌に与える影響

2) ウシ卵管間質細胞のスフェロイド培養法の確立

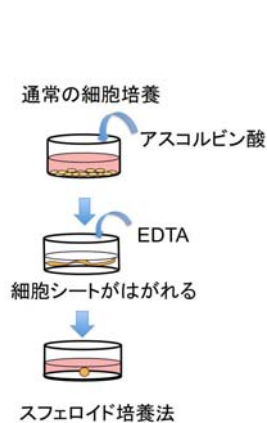


図 5. 本研究で用いたスフェロイド作成法

卵管組織における間質細胞は、コラーゲンを主成分とする豊富な細胞外マトリックスに囲まれている。生体内の環境に近づけるため図 5 の方法でスフェロイドを作成した。1) の方法によって単離したウシ卵管間質細胞について、培養液中

への 5 μ M アスコルビン酸添加によって間質細胞からのコラーゲン分泌を刺激した。細胞がコンフルエント (培養プレート底面を隙間なく覆うまでに増殖した状態) に達した後、EDTA を添加することによって、細胞がシート状になって培養プレートから脱離する。細胞シートを新たなプレートで浮遊させた状態で更に培養すると、数日以内に細胞凝集塊 (スフェロイド) を形成した。上記の方法により、*in vitro* での新たな卵管間質細胞解析の実験モデルを構築した。また、図 6 には、脱離直後の細胞シートと、スフェロイドの位相差像ならびに断面図を示した。間質細胞 (細胞核: 青紫) がコラーゲン (淡いピンク) に囲まれた状況が再現されている。

更に、PGF 分泌能を解析したところ、単層培養と比較しスフェロイド培養で有意に上昇した (図 7)。スフェロイド培養法では細胞間相互作用が回復すること、また細胞外マトリックスが細胞間相互作用に重要な役割をもつことから、間質細胞の PGF 分泌には細胞間相互作用が関与している可能性が示された。

1) および 2) の結果より、今後の細胞機能解析に有用であるウシ卵管間質細胞の純粋培養系を単層培養ならびに 3 次元培養法によって確立した。本研究内容は業績 1 および 2 において発表した。

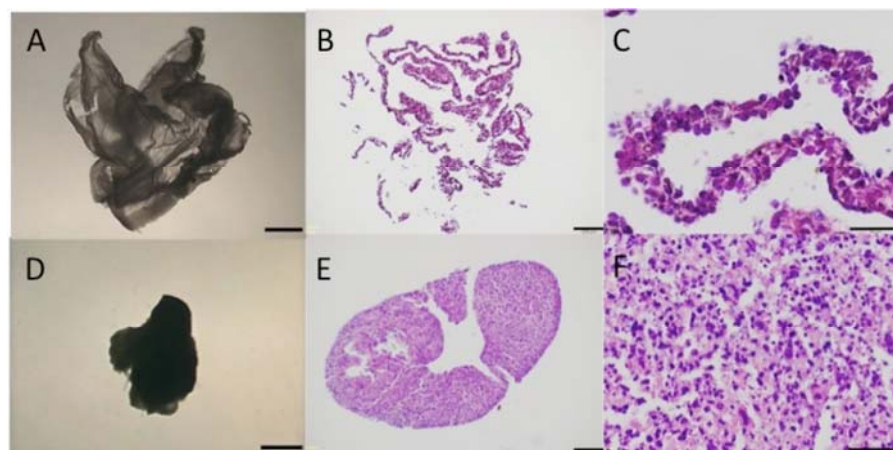


図 6. 培養ディッシュから剥離直後の単層培養卵管間質細胞 (A-C) と形成されたスフェロイド (D-F)



図 7. 単層培養とスフェロイド培養法による卵管間質細胞からの PGF 分泌量の比較

3) スフェロイド培養における間質細胞の発現タンパク質の解析

1) および 2) において確立したウシ卵管間質細胞培養法を用いて、それぞれの培養法によって得た細胞中タンパク質の発現を検討した。二次元電気泳動法によって細胞中タンパク質を分離し、銀染色法にて可視化したところ、単層培養法およびスフェロイド培養法において、発現タンパク質の違いが認められた (図 8)。変化の認められたタンパク質の種類

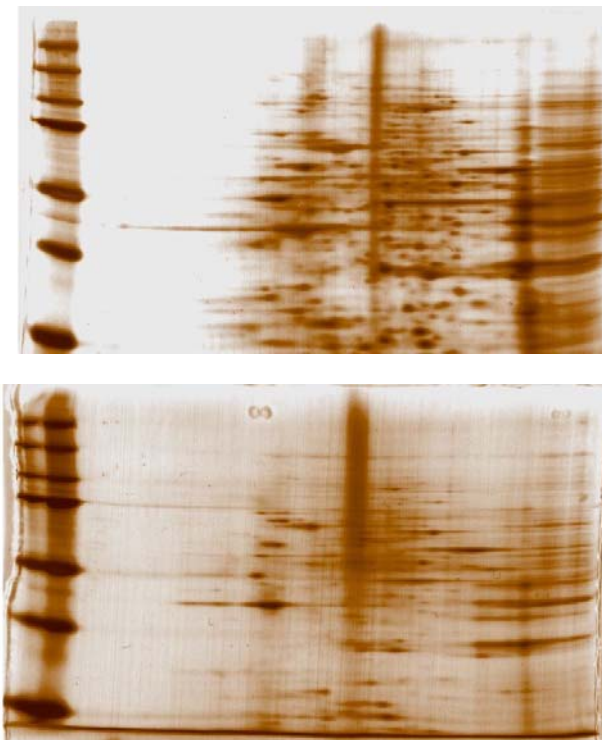


図 8. 単層培養法 (上図) およびスフェロイド培養法

が非常に多かったため、より効率的に解析を進めるために解析するタンパク質を選抜する必要がある。今後は、細胞膜、細胞質、核内タンパク質に分画したサンプルを用いてターゲットタンパク質を決定する予定である。

<まとめ>

本年度に実施した研究内容において、ウシ卵管間質細胞の単層およびスフェロイド培養法を確立し、細胞の詳細な生理機能の解析を可能にした。スフェロイド培養法では、単層培養法よりも生体内の環境に近い状態で培養が可能となり、ウシ卵管で重要な役割を持つ因子「プロスタグランジン F2α」の産生にも変化が認められた。二次元電気泳動法によって、細胞中の発現タンパク質を確認したところ、単層培養法およびスフェロイド培養法においてタンパク質の発現パターンが大きく異なることが明らかとなった。

<今後の展望>

ウシを含む哺乳動物のさらに詳細な卵管間質細胞の生理機能を明らかにするために、今後はこれら発現タンパク質の解析を進める予定である。

まずは、細胞膜、細胞質および細胞核それぞれのタンパク質画分を作成し、解析対象の候補となるタンパク質の数を絞る。卵管機能に影響を与えうる因子 (卵巣ステロイドホルモンや卵胞液中に含まれる生理活性物質) を培養細胞に添加し、それぞれにおけるタンパク質の発現変化を検討する。卵管機能を制御するタンパク質の候補を選抜し、質量分析法によって同定した後、生体における発現ならびに役割を明らかにする。

本研究によって、今後、未だ明らかなでない卵管間質細胞の詳細な生理機能を明らかにすることで、ヒトや家畜の受胎率向上のための不妊診断・治療法の確立や新薬の開発に貢献することが期待される。

< 研究成果 >

原著論文

Yamamoto Y, Kobayashi Y and Okuda K. Purified culture systems in bovine oviductal stromal cells. J Reprod Dev 60: 73-77, 2014

学会発表

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Okuda K. Analysis of prostaglandin F2 α secretion by bovine oviductal stromal cells using the newly established isolation and culture methods. 46th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (カナダ：平成 25 年 7 月 22-26 日)

機密情報の伝搬追跡と漏洩防止を実現する仮想化基盤ソフトウェアの研究開発

岡山大学大学院自然科学研究科

山内 利宏

(概要)

顧客情報などの機密性の高い情報を計算機で取り扱う機会が増加している。機密情報が漏洩すると、企業者や個人にとって、大きな損失となるため、機密情報の漏洩を防止することが重要となっている。文献[3]において、OS 内部に機密情報が計算機内に拡散する状況を追跡し、機密情報を有する資源を把握する機能（以降、機密情報の拡散追跡機能）、および機密情報が漏えいする可能性を有する処理を制御することにより、未然に情報漏えいを防止する機能を提案した。しかし、機密情報の拡散追跡機能には、Windows OS などのソースコードが公開されていない環境には導入することができない問題と、機密情報を搾取しようとする攻撃者や悪意を持った計算機の利用者に攻撃を受けて機能を無効化される可能性がある。

そこで、本研究では、OS 内部ではなく、仮想マシンモニタ内部に機密情報の拡散追跡機能を実現することで、攻撃から安全な機密情報の拡散追跡機能の実現を目指す。仮想マシンモニタは安全であるものの、仮想マシン内部のゲスト OS の情報を取得するのが困難であるという問題がある。平成 25 年度は、ゲスト OS の情報を取得する要素技術であるシステムコールのフック機構とゲスト OS 内部のプロセスとファイルの情報を取得する機構を設計し、実現した。これにより、ファイル操作について機密情報の拡散追跡を実現できることを確認した。

1. はじめに

計算機の性能の向上と普及により、様々なサービスにおいて、顧客情報などの機密性の高い情報を計算機で取り扱う機会が増加している。機密性の高い情報は、一部でも外部へ漏えいすると、企業や個人にとって大きな損失になる。個人情報漏えいのインシデントの分析結果[1]によると、管理ミスや誤操作による不注意から起こることが多いと報告されている。管理ミスと誤操作は、情報漏えい原因全体の約 57%を占めている。情報漏えいを防止するには、組織における情報持ち出しの管理を徹底するとともに、個人が利用する計算機環境においても適切なセキュリティ対策を行うことが重要である。

また、企業や研究室では、設計図や顧客の個人情報などの機密情報を複数の人間で共有することが多いと予想される。キーマンズネットの調査[2]では、約 9 割の企業が電子メールでの情報共有を行っている。また、約 6 割の企業は、グループウェアによる情報共有を行っている。これらの機密情報を有するファイルをネットワーク内のサーバへ格納し、ク

ライアントからアクセスして利用する事例が予想される。したがって、機密情報を保管している計算機から別の計算機へ持ち出される機密情報を有するファイルを監視し、持ち出した先の計算機下でも適切なセキュリティ対策を講じるための仕組みが必要である。

文献[3]において、機密情報が計算機内に拡散する状況を追跡し、機密情報を有する資源を把握する機能（以降、機密情報の拡散追跡機能）、および機密情報が漏えいする可能性を有する処理を制御することにより、未然に情報漏えいを防止する機能を提案した。これら 2 つの機能により、計算機内の機密情報の拡散追跡と漏えいの防止が可能である。

しかし、機密情報の拡散追跡機能を導入する場合、対象の OS（以降、導入対象 OS と呼ぶ）のソースコードを修正する必要があるため、Windows OS などのソースコードが公開されていない環境には導入することができない。さらに、近年、セキュリティソフトに対する攻撃が増加している。既存の機密情報の拡散追跡機能（以降、既存機能と略す）はカーネル

空間で実現されており、機密情報を搾取しようとする攻撃者や悪意を持った計算機の利用者に攻撃を受けて機能を無効化された場合、情報漏えいの防止や漏えい経路の把握が困難になる。

そこで、平成25年度は、仮想計算機モニタ (Virtual Machine Monitor, 以降、VMM と略す) による機密情報の拡散追跡機能 (以降、提案機能と略す) の設計と基本機構の実現に取り組んだ。本研究では、導入対象 OS は仮想計算機 (以降、VM と略す) 上で動作することを想定し、提案機能を VMM 内に実現する。

2. 既存手法の問題点

既存手法の問題点を調査し、明らかにした。既存機能の問題点を以下に述べる。

(問題 1) 導入する際に OS のソースコードの修正が必要

機密情報の拡散追跡機能を導入する際、導入対象 OS のソースコードを修正する必要がある。このため、Windows OS などのソースコードが公開されていない環境には導入することができない。

(問題 2) 機密情報の拡散追跡機能を無効化される危険性

既存機能はカーネル空間で実現している。このため、機密情報を搾取しようとする攻撃者や悪意を持った計算機の利用者はカーネル空間にアクセスし、機密情報の拡散追跡機能を無効化することができる。

3. 提案機構の設計

3. 1 提案機構の全体像

図 1 に提案機構の全体像を示す。提案機構は、仮想マシンモニタに機密情報の拡散追跡機能を実現し、その上で実行される仮想マシン上で保護対象の OS を実行する。このようにすることで、機密情報の拡散追跡機能が仮想マシンから隔離され、仮想マシンに不正なプログラムが導入されたとしても、機密情報の拡散追跡機能の機構自体を攻撃されることを防止できる。

また、既存の機密情報の拡散追跡機能は、OS 内部に実現され、OS 内部でシステムコールをフックし、機密情報の拡散に関する情報を取得していた。これ

を、仮想マシンモニタに機密情報の拡散追跡機能を実現し、仮想マシンモニタから機密情報の拡散に関する情報を取得するように変更する。

しかし、上記のように仮想マシン内部から機密情報の拡散追跡機能を保護できる利点があるものの、仮想マシンモニタ側から仮想マシン内部や OS の情報を取得するのが非常に難しくなるという問題がある。

3. 2 実現の課題

提案機構における課題を以下に述べる。

(課題 1) システムコールの発行の検知

機密情報は、システムコールの発行を契機として拡散する。このため、システムコールの発行を検知できる必要がある。

(課題 2) OS の情報の取得

前節で述べたように機密情報の拡散追跡機能は、仮想マシンモニタに実現されるため、機密情報を有する可能性のあるファイルや機密情報を拡散させるプロセスの情報を取得するのは難しい。

3. 3 対処

上記の課題に対処するため、以下の対処を行う機構を設計した。

(対処 1) ゲスト OS でシステムコール発行の際に、仮想マシンモニタに処理が遷移する機構を実現する。これにより、すべてのシステムコールの発行直後に、仮想マシンモニタ内の機密情報の拡散追跡機能が機

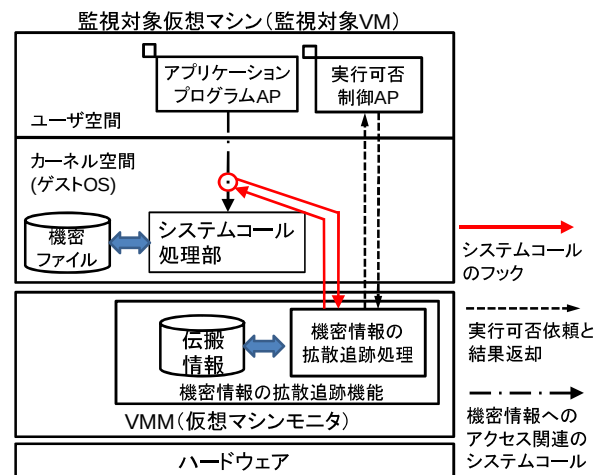


図1 提案機構の全体像

密情報の拡散に関するチェックを実施できる。具体的には、システムコールを発行するための命令である `sysenter` 発行時の遷移先アドレスが保存されているレジスタのアドレスを例外が発生するアドレスに変更し、仮想マシンから仮想マシンモニタに状態遷移させる。このとき、システムコールの処理内容を取得することで、機密情報の拡散に関する情報を取得できる。

(対処2) 実行中プロセスやファイルの情報が格納されている `task_struct` と呼ばれる構造体の情報を取得する。`task_struct` には、プロセスの情報が格納か、`task_struct` からファイルに関する情報にもたどり着くことができる。しかし、`task_struct` の位置は仮想マシンモニタから直接知ることができない。そこで、仮想マシンモニタからレジスタを参照することで得ることができるカーネルスタックのアドレス情報から、`task_struct` を特定する手法を実現した。

現在までに、上記の2つの対処を実現し、ファイル操作に関する機密情報の拡散を追跡できることを確認した。

表1 提案方式の実現環境

CPU	Intel (R) Core (TM) i5-3470
VMM	kvm-kmod-3.9
ゲスト OS	Debian 7.1.0-i386 (Linux 3.2.46)
ホスト OS	Fedora 18 (Linux 3.6.10)

4. システムコールフックの実現方式

4. 1 実現環境

実現環境を表1に示す。VMMにKVM、ゲストOSにDebianを使用する。KVMはCPUの仮想化支援機能を利用して完全仮想化によるOSの仮想環境を提供する。このため、CPUはIntel社のVT-xやAMD社のAMD-Vといった仮想化支援機能を必要とする。これらの仮想化支援機能は近年の多くのCPUに搭載されている。

また、3.5章で述べたように `sysenter` の実行を検知してシステムコールをフックするため、CPUとカーネルの両方が `sysenter` に対応している必要がある。しかし、近年の多くのCPUとカーネルは `sysenter` に対応しているため、問題にならないと考えられる。なお、表4.1に示した実現環境は上記の条件を満たしている。

4. 2 システムコールの入り口のフック手法

VMMからVMで動作するゲストOS上で発行されたシステムコールをフックする。システムコールの入り口 (`sysenter`) のフックは、文献[4]の `sysenter_eip_msr` の値を書き換える手法を用いることにより実現する。`sysenter_eip_msr` にはシステムコールのエントリポイントのアドレスが格納されており、システムコール発行時にプログラムカウンタにセットされる。このため、`sysenter_eip_msr` の値をカーネル空間の未使用な領域に書き換えることにより、システムコール発行時にページ例外が発生させ、VMM側へ処理を移行させる。また、システムコール発行時にはEAXレジスタにシステムコール番号がセットされる。このため、EAXレジスタの値から発行されたシステムコールを特定できる。さらに、ページ例外の発生時にはCR2レジスタにページ例外が発生したアドレス（ページフォルトリニアアドレス）がセットされる。このため、CR2レジスタの値が書き換えた `sysenter_eip_msr` の値と一致した場合、`sysenter` によるページ例外と判断できる。

`sysenter_eip_msr` の値を書き換えることによるシステムコールのフック機構の様子を図2に示し、以降で説明する。なお、`sysenter_eip_msr` の値はゲストOSの起動時にカーネル空間の未使用な領域に書き換える。このとき、本来の `sysenter_eip_msr` の値は退避しておく。

- (1) ゲストOSでシステムコールを発行されると、書き換えた `sysenter_eip_msr` の値によって、ページ例外が発生し、VMMへ処理が移行 (VM Exit)
- (2) CR2レジスタに格納されている、ページフォ

ルトリニアアドレスを確認し、ゲスト OS の起動時に書き換えた sysenter_eip_msr の値と一致した場合、システムコール発行による VM Exit と判断

- (3) EAX レジスタに格納されているシステムコール番号を取得
- (4) EIP レジスタを本来の sysenter_eip_msr の値に書き換え
- (5) ゲスト OS へ処理を返却 (VM Entry)
- (6) EIP レジスタは本来のシステムコールが格納されたアドレスを指しているため、本来のシステムコールから処理が再開

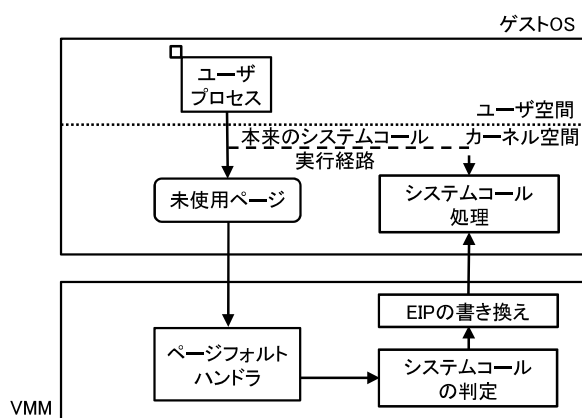


図2 システムコールフックの全体像

5. おわりに

平成 25 年度は、計画通りに仮想マシンモニタにおいて、システムコールをフックし、機密情報の拡散に関する情報をゲスト OS から取得する手法を設計し、実現した。また、ファイル操作に関して機密情報の拡散を追跡できることを確認した。

平成 26 年度の課題として、ファイル操作以外についての機密情報拡散についての情報取得機構の実現、及び情報漏洩の可能性を検知したときのシステムコール処理の可否判断機構の検討と実現がある。

参考文献

[1] 日本ネットワークセキュリティ協会, 2011 年情報セキュリティインシデントに関する調査報告書 Ver. 1. 2, "
http://www.jnsa.org/result/incident/data/2011incident_survey_ver1.2.pdf.

[2] キーマンズネット,
<http://www.keyman.or.jp/at/infosys/group/30005156/>

[3] 田端利宏, 箱守聡, 大橋慶, 植村晋一郎, 横山和俊, 谷口秀夫, 機密情報の拡散追跡機能による情報漏えいの防止機構, 情報処理学会論文誌, Vol. 50, No. 9, pp. 2088-2102, (9, 2009).

[4] Dinaburg, A., Royal, P., Sharif, M. and Lee, W.: Ether : malware analysis via hardware virtualization extensions, Proc. 15th ACM Conference on Computer and Communications Security, pp. 51-62 (2008).

遷移金属触媒を用いた炭素－水素結合の直接硫黄化反応の開発

岡山大学 大学院自然科学研究科

岩崎 真之

有機硫黄化合物は、薬理活性を有する基質や医薬上重要な天然物中によく見られ、有機化学において大変重要な化合物群である。しかしながら、その有用性に関わらず、その効率的な合成法は未だ確立されていない。近年、最も効率的な合成法として、炭素－水素結合の直接官能基化反応が注目を集めている。本研究では、パラジウム触媒を用いることで、芳香環の炭素－水素結合を直接的に硫黄化する反応を開発し、アリールスルフィドを簡便に合成することに成功した。本反応は、高い官能基許容性を有しており、様々な基質に適用可能であることがわかった。反応は、(1) 5 員環パラダサイクルの生成、(2) ジスルフィドとの反応、(3) 配位子交換を経て進行していると考えている。また、詳細な速度論的同位体効果の実験から、炭素－水素結合の切断過程は律速段階に含まれていないことを明らかにした。なお、本反応にジスルフィドの代わりにジセレニドを用いれば、芳香環の炭素－水素結合を直接的にセレノ化できることも見いだした。

1. はじめに

持続可能な社会の構築は、我々人類にとって最も重要な課題の一つである。そのために、副生成物や廃棄物が出ない効率的な有機合成反応の開発が求められている。中でも、触媒反応は、少ない量で反応を進行させることから、グリーンケミストリーの観点から理想的な合成法であるといえる。2010 年のノーベル化学賞受賞対象研究である“クロスカップリング反応”もこの触媒的合成法の一つであり、合成化学者にとって現在必要不可欠な存在となっている。例えば、米国の大手製薬企業である Merck 社では、このクロスカップリング反応を使って、血圧降下剤であるロタルタンを年間約 1 トンという規模で生産し、3 千億円強の売り上げがある。しかしながら、クロスカップリング反応では、化学量論量の有機金属反応剤を用いるため、副生成物として大量の塩が生成する。また、出発物質である有機ハロゲン化物の調製にも手間がかかる。そこで、近年、クロスカップリング反応の代替法として、炭素－水素結合の直接変換反応が注目を集めている。炭素－水素結合を直接官能基化することができれば、ハロゲン化のような前処理を必要としないため、多段階の合成プロセスを劇的に短縮することができる。また、副生成物が生じないため、環境調和型の反応であるといえる。遷移金属触媒を用いる炭素－水素結合の直接

官能基化に関する研究は、この 20 年間で飛躍的に進歩し、有機化合物の合成プロセスの単純化に大きく貢献している。しかしながら、そのほとんどの研究は炭素－炭素結合生成反応に関するものであり、炭素とハロゲン、酸素、または窒素との結合を生成するものが一部知られている程度である。本研究では、有機化学上重要な有機硫黄化合物を直接的に合成することを目的として、炭素－水素結合の直接硫黄化反応（炭素－硫黄結合生成反応）の開発をおこなった。

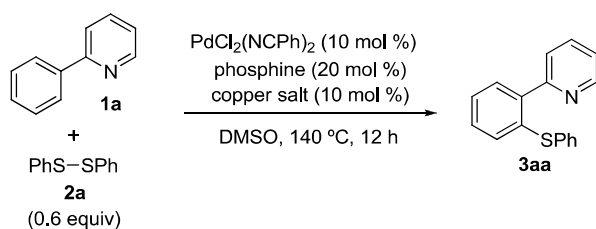
2. 結果と考察

(1) 芳香環の炭素－水素結合の直接硫黄化反応

まず、パラジウム触媒を用いて、2-フェニルピリジン (**1a**) の炭素－水素結合の直接硫黄化反応について検討することとした。反応は次のような手順でおこなった (Table 1)。アルゴン雰囲気下、触媒量の塩化パラジウム(ベンゾニトリル)錯体、リン配位子、銅塩存在下、2-フェニルピリジン (**1a**) とジフェニルジスルフィド (**2a**) の混合物を DMSO 溶媒中 140 °C で 12 時間加熱した。硫黄化剤として用いているジスルフィドは、基質に対して 0.6 倍モル量で十分である。つまり、ジスルフィド中の硫黄部位は全て反応に使われている。まず、本反応におけるリン配位子と銅塩の効果について検討した。リン配位

子を用いない場合にも反応は触媒的に進行し、硫黄化体 **3aa** を 58% の収率で得た (entry 1)。種々のトリアリーールホスフィンを検討した結果、立体的に高い配位子を使うほど、高収率で目的化合物 **3aa** が得られることがわかった (entries 2-4)。トリメチルホスフィンを用いた場合には、目的硫黄化体 **3aa** を 90% の収率で得ることができた (entry 4)。同様の傾向はトリアルキルホスフィンを用いた場合にも観察された (entries 5 and 6)。また、銅塩を用いない場合には、収率が低下した (entry 7)。

Table 1. 反応条件の最適化



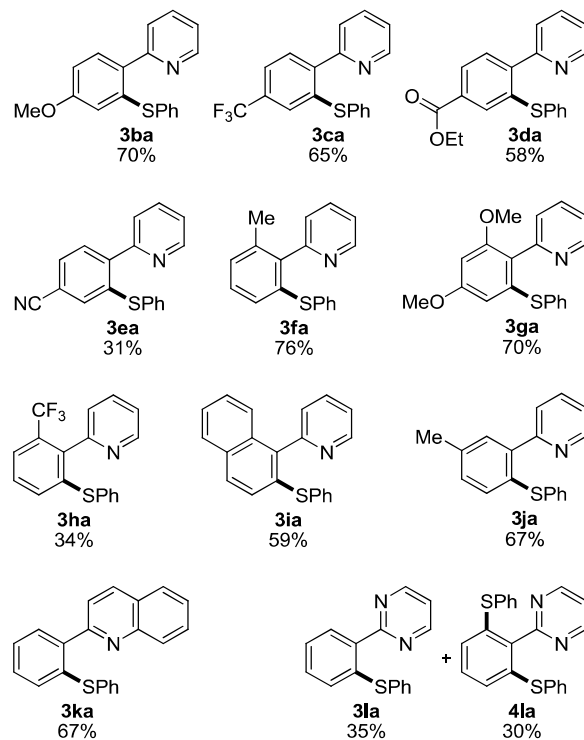
entry	phosphine	copper salt	NMR Yield (%)
1	none	CuCl ₂	58
2	PPh ₃		58
3	P(2-MeC ₆ H ₄) ₃		82
4	P(2,4,6-Me ₃ C ₆ H ₂) ₃		90
5	PEt ₃		44
6	P ^t Bu ₃		66
7	P(2,4,6-Me ₃ C ₆ H ₂) ₃	none	43

(2) 反応の一般性に関する検討

次に、本反応の一般性について検討した (Scheme 1)。その結果、本反応は高い官能基許容性を有していることがわかった。例えば、メトキシ基のような電子供与性基やトリフルオロメチル基やエトキシカルボニル基、シアノ基のような電子求引性基の置換した基質を用いた場合にも、反応は効率的に進行し、対応する硫黄化体 **3ba–3ea** を良好な収率で得た。また、オルト位に官能基を有する基質も本反応に適用可能である (**3fa–3ha**)。さらに、本反応を利用すればナフタレン環の炭素–水素結合も硫黄化することができる (**3ia**)。興味深いことに、異なる二つの反応点を有する基質では、立体的に空いている炭素–

水素結合が選択的に硫黄化されることがわかった (**3ja**)。さらに、配向基としてピリジル基の代わりにキノリル基やピリミジル基を用いることも可能である (**3ka, 3la**)。なお、ピリミジル基を用いた場合には一置換体 **3la** だけでなく、二置換体 **4la** も生成する。一方、五員環のピラゾリル基は本反応の配向基として用いることはできなかった。

Scheme 1. 基質適用範囲

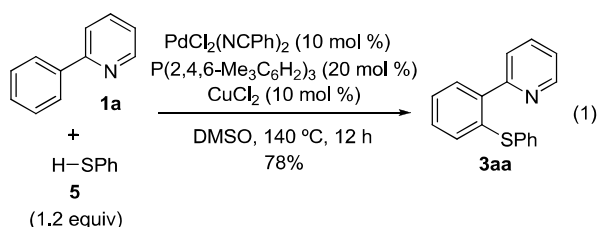


ジアリールジスルフィドに関しても、本反応は広い基質一般性を有している。電子供与性のメトキシ基や電子求引性のトリフルオロメチル基を有する基質 **2b, 2c** を用いた場合にも反応は効率的に進行する (Table 2, entries 1 and 2)。また、ブロモ基、クロロ基や無保護の水酸基の置換したジフェニルジスルフィド **2d–2f** を用いた場合にも、目的の硫黄化体 **3ad–3af** を得ることができた (entries 3–5)。さらに、チエニル基や *o*-トリル基で置換したジスルフィドも本反応に適用可能である (entries 6 and 7)。一方で、ジアリールジスルフィドの代わりにジベンジルジスルフィドを用いた場合、目的の反応は全く進行せず、2-フェニルピリジン (**1a**) が定量的に回収された。

Table 2. ジスルフィドの適用範囲

entry	2	R	Product	Isolated Yield (%)
1	2b	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	3ab	60
2	2c	<i>p</i> -CF ₃ C ₆ H ₄	3ac	53
3	2d	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	3ad	35
4	2e	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	3ae	29
5	2f	<i>p</i> -HOC ₆ H ₄	3af	56
6	2g	2-thienyl	3ag	45
7	2h	<i>o</i> -MeC ₆ H ₄	3ah	56

また、本反応には硫黄化剤としてジスルフィドだけでなくチオールを用いることも可能である。ジフェニルジスルフィド (**2a**) の代わりに 1.2 倍モル量のベンゼンチオール (**5**) を用いて反応をおこなったところ、ジスルフィドを用いた場合に比べると収率はやや低下するものの、目的の硫黄化体 **3aa** を 78% の収率で得ることができた (式 1)。

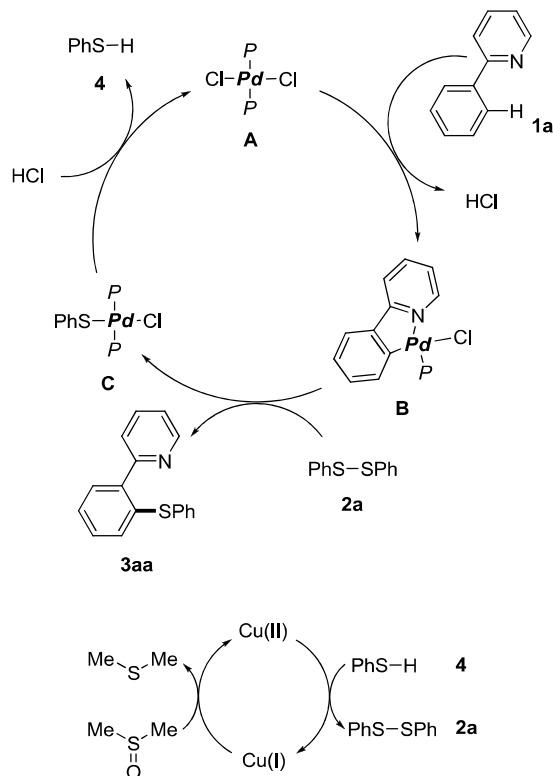


(3) 反応機構に関する検討

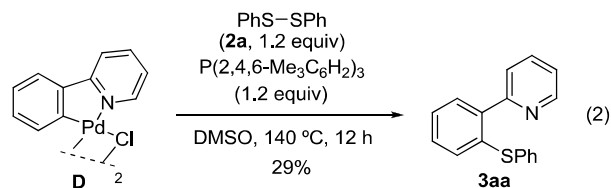
パラジウム触媒を用いた炭素－水素結合の直接硫黄化の反応機構に関しては、現在のところ明らかになっていないが、一つの可能性として、Scheme 2 に示すように反応が進行していると考えている。まず、パラジウム(II) 錯体 **A** と 2-フェニルピリジン (**1a**) から、五員環のパラダサイクル **B** が生成する。次に、ジフェニルジスルフィド (**2a**) との反応により、硫黄化体 **3aa** を与え、中間体 **C** が生じる。最後に配位子交換が起こり、触媒が再生すると同時に、ベンゼンチオール (**4**) が生成する。なお、生じたベ

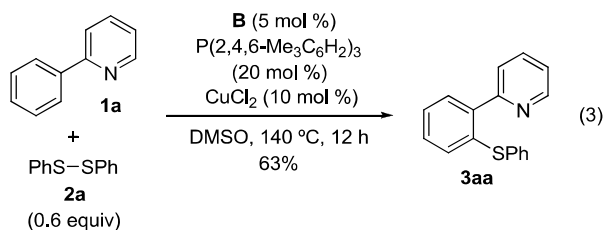
ンゼンチオール (**4**) は銅塩を触媒として DMSO から酸化を受けジスルフィド **2a** となり、触媒系に再び組み込まれる。

Scheme 2. 予想される反応機構

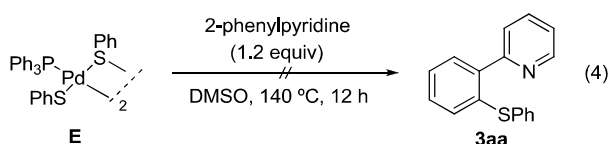


反応機構を確かめるために、次のような量論反応の検討をおこなった。既知法¹により、パラジウム/フェニルピリジン二核錯体 **D** を調製した後、ジフェニルジスルフィド (**2a**) と反応させたところ、目的の硫黄化体 **3aa** を収率 29% で得た (式 2)。また、別途調製したパラジウム/フェニルピリジン錯体 **D** を触媒として用いた場合にも反応は問題なく進行する (式 3)。以上のことから、本反応はパラジウム/フェニルピリジン錯体 **D** を経由して進行していると考えている。



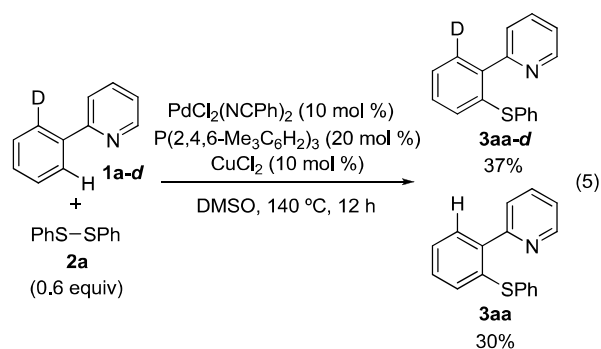


別の可能性として、Pd(0)/Pd(II) の機構が考えられる。パラジウム(0) 錯体に対してジフェニルジスルフィド (**2a**) が酸化的付加し、次に、2-フェニルピリジン (**1a**) と反応して、五員環のパラダサイクル中間体を形成する。最後に還元的脱離が起こり、目的生成物 **3aa** を得る。同様に、反応機構に関する知見を得るために、量論反応に関する検討をおこなった。ジフェニルジスルフィド (**2a**) の酸化的付加体 **E** を既知法²により調製し、2-フェニルピリジン (**1a**) との反応をおこなったところ、目的生成物である **3aa** は全く得られず、2-フェニルピリジン (**1a**) が定量的に回収された (式 4)。以上のことから、ジフェニルジスルフィド (**2a**) の酸化的付加体 **E** を経由する Pd(0)/Pd(II) の機構は考えにくい。

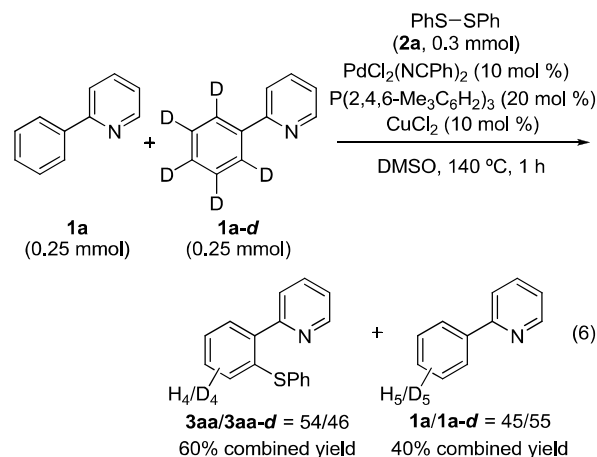


(4) 反応の律速段階に関する検討

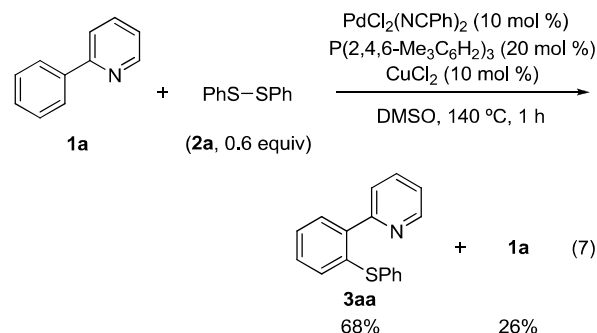
より詳細な反応機構に関する知見を得るために、重水素化された基質を用いて、速度論的同位体効果について検討した。まず、基質として **1a-d** を用いて分子内競争反応をおこなった (式 5)。その結果、速度論的同位体効果の差はほとんど観測されなかった。

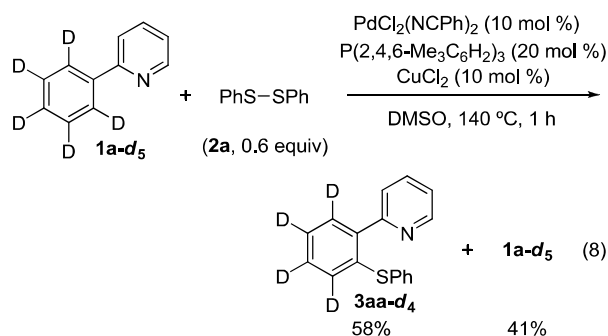


この結果を確かめるため、次に、基質として等倍モル量の **1a** と **1a-d** を用いて分子間競争反応をおこなった (式 6)。この場合にも、生成物 **3aa** と **3aa-d** の収量はほぼ等しく、同位体効果は確認できなかった。



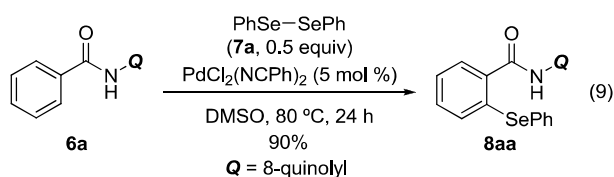
さらに、同様の実験を別々のフラスコを用いておこなった (式 7, 8)。その結果、生成速度に大きな違いは見られなかった。以上の結果から、本反応において、炭素-水素結合の活性化は、律速段階ではないということが明らかとなった。





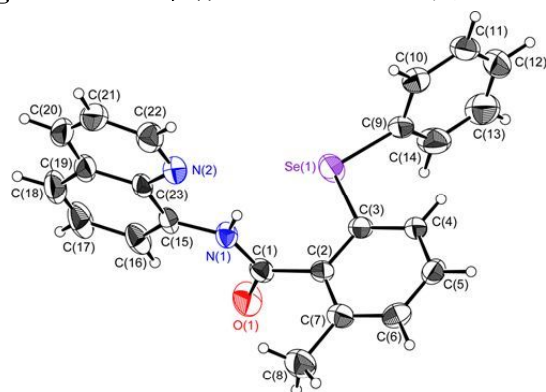
(5) 芳香環の炭素－水素結合の直接セレン化反応

カルコゲン化剤として、ジスルフィドの代わりにジセレンドを用いて反応をおこなったところ、対応する直接セレン化反応が高収率で進行することがわかった。本セレン化反応は、硫黄化反応に比べて、低い反応温度かつ少ない触媒量で進行する。ベンズアミド誘導体 **6a** に対してジフェニルジセレンド (**7a**) を用いた場合には、90% の収率で目的のセレン化体 **8aa** を得ることができた (式 9)。



生成物 **8aa** の構造は、X 線結晶構造解析をおこなうことで明らかにすることができた (Figure 1)。

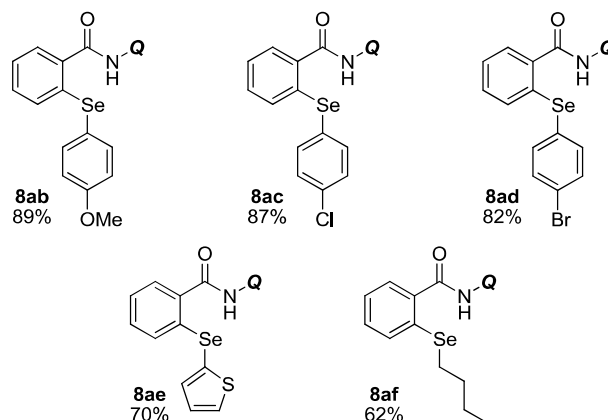
Figure 1. セレン化体 **8aa** の ORTEP 図



本反応も高い官能基許容性を有しており、メトキシ基、クロロ基、ブロモ基は直接セレン化反応に影響を与えない (Scheme 3)。また、ジチエニルジセレンド、ジブチルジセレンドを用いた場合にも、高収

率で対応するセレン化体 **8ac**, **8af** を得ることができる。

Scheme 3. ジセレンドの適用範囲



3. まとめ

本研究において、パラジウム触媒を用いることで、芳香環の炭素－水素結合を直接的に硫黄化する反応を開発することに成功した。本手法を利用すれば、有機化学において有用な骨格であるアリアルスルフィドを効率的に合成することができる。また、詳細な反応機構の検討から、炭素－水素結合の切断過程は比較的速く、律速段階に含まれていないことがわかった。さらに、本手法は、直接セレン化反応にも有効であり、対応するセレン化体を高収率で得ることができた。今後も、効率的な物質変換反応の開発を目指して研究を進め、持続可能な社会の構築に貢献したい。

4. 謝辞

本研究に多大なるご支援をいただきました公益財団法人ウエスコ学術振興財団に心より感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、岡山大学大学院自然科学研究科の西原康師教授に、終始有益な助言を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

5. 参考文献

- (a) Zanella, R.; Ros, R.; Grazian, M. *Inorg. Chem.* **1973**, *12*, 2736. (b) Ananikov, V. P.; Zaleskiy, S. S.; Kachala, V. V.; Beletskaya, I. P. *J. Organomet. Chem.* **2011**, *696*, 400.

2. (a) Craig, C. A.; Watts, R. J. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 309. (b) Joliet, P.; Gianini, M.; von Zelewsky, A.; Bernardinelli, G.; Stoeckli-Evans, H. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 4883.

6. 研究業績

1. 岩崎真之, 彌永美樹, 土家裕大, 西村悠吾, 李文娟, 李 治平, 西原康師 “Palladium-Catalyzed Direct Thiolation of Aryl C–H Bonds with Diaryl Disulfides” *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, in press; DOI: 10.1002/chem.201304717.
2. 岩崎真之 “芳香族炭素–水素結合の触媒的な直接官能基化反応” 第 7 回岡山理科大学グリーン元素科学シンポジウム, 岡山理科大学(岡山), 2012 年 3 月 10 日, 招待講演
3. 彌永美樹, 西村悠吾, 岩崎真之, 西原康師 “パラジウム触媒によるジスルフィドを用いたアレーンの直接硫黄化反応” 日本化学会第 92 春季年会, 2K8-13, 慶應義塾大学日吉・矢上キャンパス(神奈川), 2012 年 3 月 25–28 日
4. 岩崎真之 “環境負荷の少ない触媒的硫黄化反応の開発” 第 28 回若手化学者のための化学道場, 島根県立青少年の家サンレイク(島根), 2012 年 9 月 7–8 日, 師範講演
5. 岩崎真之, 彌永美樹, 土家裕大, 西村悠吾, 李文娟, 西原康師 “パラジウム触媒によるジスルフィドを用いたアレーンの直接硫黄化反応” 第 59 回有機金属化学討論会, P2B-31, 大阪大学吹田キャンパス(大阪), 2012 年 9 月 13–15 日
6. 岩崎真之, 彌永美樹, 土家裕大, 西村悠吾, 李文娟, 西原康師 “Palladium-Catalyzed C–H Thiolation of Arenes with Diaryl Disulfides” 12th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, PC-061, リーガロイヤルホテル京都(京都), 2012 年 11 月 12–16 日
7. 岩崎真之 “New Catalytic Thiolation Reactions by Palladium Complexes” 3rd Symposium in Commemoration of International Exchange Agreement between Faculty of Science, University of Copenhagen, Denmark and Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Japan, 岡山大学津島キャンパス(岡山), 2012 年 11 月 22 日, 招待講演
8. 岩崎真之 “Palladium-Catalyzed C–H Thiolation and Selenation of Arenes bearing Directing Groups” Reaxys PhD Club Meeting, 名古屋大学東山キャンパス(愛知), 2013 年 1 月 8 日, 招待講演
9. 土家裕大, 岩崎真之, 中島清彦, 西原康師 “パラジウム触媒によるジセレニドを用いたアレーンの直接セレノ化反応” 遷移金属が先導する新しい分子変換反応シンポジウム, 岡山大学津島キャンパス(岡山), 2013 年 12 月 19 日
10. 金鹿 渉, 土家裕大, 岩崎真之, 中島清彦, 西原康師 “パラジウム触媒によるジアリールジスルフィドを用いたナフチルアミン誘導体の直接硫黄化反応” 遷移金属が先導する新しい分子変換反応シンポジウム, 岡山大学津島キャンパス(岡山), 2013 年 12 月 19 日
11. 土家裕大, 岩崎真之, 中島清彦, 西原康師 “Palladium-Catalyzed Direct Selenation of Aryl C–H Bonds with Diselenides” 7th International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society, P-11, 岡山大学津島キャンパス(岡山), 2014 年 2 月 7 日
12. 土家裕大, 岩崎真之, 中島清彦, 西原康師 “パラジウム触媒によるジセレニドを用いた芳香族炭素–水素結合の直接セレノ化反応” 日本化学会第 94 春季年会, 1B4-15, 名古屋大学東山キャンパス(愛知), 2014 年 3 月 27–30 日

国内希少野生動植物種スイゲンゼニタナゴの繁殖生態解明と保全技術の開発

岡山大学大学院 環境生命科学研究科

中田 和義

河川改修や圃場整備等の影響により各地で個体群が絶滅し続けているスイゲンゼニタナゴは、環境省レッドリストの絶滅危惧 IA 類に加えて、種の保存法における国内希少野生動植物種に指定されている。本種の保全を可能とするためには、その生態をふまえた保全技術の開発が急務である。タナゴ類は、産卵母貝として二枚貝類を利用する。本研究では、スイゲンゼニタナゴの保全技術として、生きた二枚貝類を収容した人工産卵床の開発に必要となる基礎的知見を得ることを目的とし、農業水路に人工産卵床を設置する野外実験を実施した。その結果、本実験ではスイゲンゼニタナゴによる人工産卵床の利用は確認されなかったが、環境省準絶滅危惧のヤリタナゴと要注外来生物のタイリクバラタナゴが本研究の人工産卵床を産卵場所として利用することが示された。したがって、この人工産卵床は絶滅危惧タナゴ類の保全技術として有効であることが示されたとともに、応用面では外来タナゴ類の防除手法になりうる可能性が示唆された。今後の研究では、本研究で得られた知見に基づき、スイゲンゼニタナゴが利用する人工産卵床の条件を明らかにする必要がある。

1. はじめに

平野部の河川中・下流域や農業水路に生息するスイゲンゼニタナゴ *Rhodeus atremius suigensis* は、圃場整備や河川改修等の影響により、生息地数が激減している。この激減状況は深刻であり、本種は種の保存法で国内希少野生動植物種に指定されているほか、環境省の絶滅危惧 IA 類、岡山県の絶滅危惧 I 類にも選定されている。現在の本種の分布域は、岡山県と広島県東部の一部に限られているが(赤井ら, 2011)、広島県の個体群は絶滅寸前にあり、岡山県の個体群の保全は本種の存続にとって極めて重要である。しかしながら、スイゲンゼニタナゴの保全対策を実施する上で必要となる学術的知見は、十分には得られていないのが実状である。

スイゲンゼニタナゴを含むタナゴ類は、二枚貝類の鰓内に産卵するという特異的な繁殖生態を有する(川那辺・水野, 2001)。したがって、スイゲンゼニタナゴの個体群を効果的に保全するためには、産卵母貝となる二枚貝類の保全が必要不可欠となる。この場合、産卵母貝として有効な二枚貝類の特性を明らかにできれば、スイゲンゼニタナゴの産卵母貝となる二枚貝類の効率的な保全が可能となるとともに、

好適な産卵母貝を用いた人工産卵床の開発も可能となり、本種の個体群増殖にも大きく貢献すると考えられる。しかしながら、スイゲンゼニタナゴが選好する産卵母貝の特性については、学術的知見が十分には得られていない。

以上の背景をふまえて本研究では、スイゲンゼニタナゴの産卵母貝の特性として二枚貝類の種とサイズに着目し、スイゲンゼニタナゴの産卵母貝選好性を野外実験と室内実験によって明らかにすることを目指す。ここで得られる知見に基づき、スイゲンゼニタナゴの人工産卵床を開発する。この人工産卵床を圃場整備等によって個体群が衰退した水域に設置し、保全効果を検証する。最終的には、人工産卵床を用いたスイゲンゼニタナゴの保全技術を確立することを本研究の目標としている。

平成 25 年度の研究では、スイゲンゼニタナゴの保全技術として、生きた二枚貝類を収容した人工産卵床の開発に必要となる基礎的知見を得ることを目的とし、農業水路に人工産卵床を設置する野外実験を実施した。そして、タナゴ類による人工産卵床の利用状況に基づき、野外における人工産卵床の有効性について検討した。また、農業水路におけるスイゲ

ンゼニタナゴの繁殖生態に関する知見を得るため、毎月1～2回の頻度で、生息場所利用様式解明のための現地調査を実施した。本報告では主に、農業水路で実施した人工産卵床の野外実験の結果を報告する。

2. 研究の方法

2. 1. 野外実験を実施した農業水路

本研究の野外実験と野外調査は、岡山県倉敷市の高梁川水系の農業水路で実施した。なお、この農業水路の詳細な位置については、スイゲンゼニタナゴの生息地の保護のためにここでは省略する。本農業水路の水系においては、岡山大学環境理工学部環境管理工学科水生動物学研究室の調査により、スイゲンゼニタナゴを含む複数種のタナゴ類が生息していることが確認されている（宮武ら，2013）。

2. 2. 人工産卵床設置実験

農業水路に4ヵ所の実験地点（St. 1-4）を設け、人工産卵床設置実験を実施した。実験に用いた人工産卵床は、市販の長方形型トレイ（50 cm×36 cm×8 cm）に砂礫を2～3 cm 程度敷いたものとした（図1）。この人工産卵床に、同一の二枚貝種を一定個体数收容した。実験に用いた二枚貝種は、タナゴ類の産卵母貝として知られるイシガイ *Unio douglasiae*、マツカサガイ *Inversidens japonensis*、ドブガイ *Anodonta woodiana*、トンガリササノハガイ *Lanceolaria grayana* の4種のイシガイ科二枚貝類とした。実験個体は、実験を実施した農業水路と同水系の農業水路において、タナゴ類の産卵期前に採集した。

各実験地点には、同一種の二枚貝類で構成された3個の人工産卵床を同列となるように左岸側・中央・右岸側の水路底に静かに設置した（図2，3）。人工産卵床の設置期間中は、各実験地点のタナゴ類の行動について、目視および水中ビデオカメラ（ソニー，HDR-GWP88）を用いた撮影により定期的に観察をおこなった。

人工産卵床の設置期間終了後は、二枚貝類を回収して実験室に持ち帰り、各人工産卵床の二枚貝類ごとに、人工産卵床に用いたものと同じ砂礫を敷いた水槽（36 cm×21 cm×23 cm）で飼育をおこなった。



図1 実験に用いた人工産卵床.



図2 実験地点での人工産卵床の設置状況.



図3 実験地点に設置した人工産卵床.

そして、約1ヵ月間、水槽内の二枚貝類からの仔魚の浮出状況を毎日観察した。この観察期間終了後も仔魚の飼育を継続し、種の判別が可能となるサイズにまで成長した個体について種同定をおこなった。

本実験は3期に分けて実施した。各期の人工産卵床設置期間は、第1期は2013年5月18日から6月20日、第2期は6月21日から7月19日、第3期は7月20日から8月23日とした。

2. 3. 物理環境の測定

人工産卵床設置場所の物理環境として、水深、流速、水温を測定した。水深と流速の測定は、非灌漑期の5月28日と灌漑期の6月10日に1回ずつ、各実験地点の人工産卵床設置場所の上流部と下流部の左岸側・中央・右岸側の計6地点でおこなった。流速の測定では、プロペラ式流速計（KENEK 社、VR-301）を用いた。水温については、1地点に水温ロガー（Onset 社、Tidbit v2）を設置し、30分ごとに測定記録した。

3. 結果

3. 1. 人工産卵床の利用状況：浮出仔魚の個体数

本実験に用いた人工産卵床の二枚貝類からは、全実験期間を通して、合計252個体の仔魚が浮出した（第1期：121個体、第2期：127個体、第3期：4個体）。二枚貝類種別の浮出仔魚数では、イシガイからは計96個体（第1期：47個体、第2期：49個体、第3期：0個体）、マツカサガイからは計88個体（第1期：22個体、第2期：62個体、第3期：4個体）、トンガリササノハガイからは計34個体（第1期：19個体、第2期：15個体、第3期：0個体）、ドブガイからは計34個体（第1期：33個体、第2期：1個体、第3期：0個体）であった（図4）。

なお、以降の本報告では、浮出仔魚の個体数が多かった第1期と第2期の結果を中心に述べることにする。

3. 2. 浮出仔魚の種同定

種同定が可能なサイズにまで成長した稚魚189個体について、種同定をおこなった結果、人工産卵床から浮出したタナゴ類はヤリタナゴ *Tanakia lanceolata* とタイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* の2種であった（図5）。全実験期間の合計個体数では、ヤリタナゴが53個体、タイリクバラタナゴが136個体であった。本実験では、スイゲンゼニタナゴの仔魚は確認されなかった。なお、ヤリタナゴは環境省および岡山県レッドリストにおいて準絶滅危惧に選定されている。一方、タイリクバラタナゴについては、環境省により要注意外来生物に指定されている。

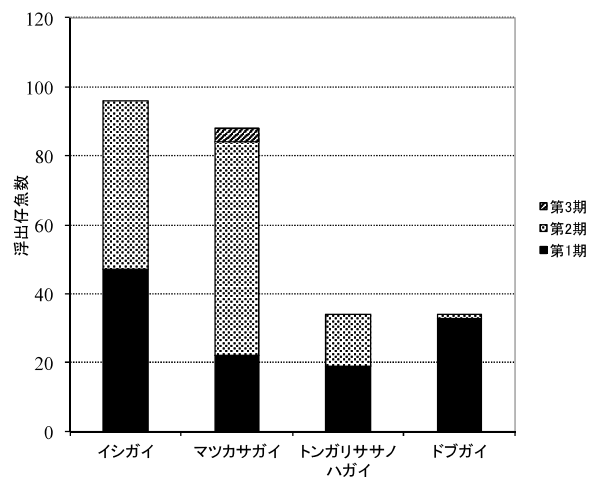


図4 二枚貝種別の浮出仔魚数.

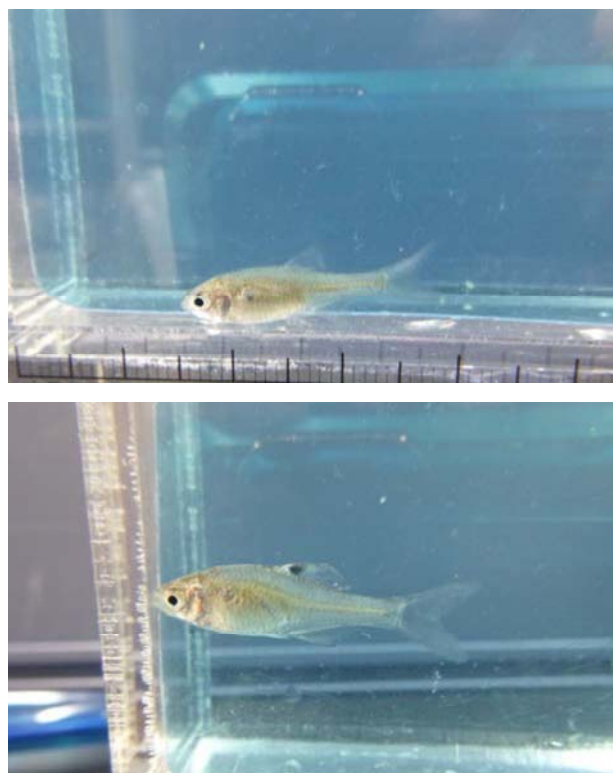


図5 人工産卵床の二枚貝類から浮出した稚魚。
写真上はヤリタナゴ、写真下はタイリクバラタナゴ。

3. 3. ヤリタナゴとタイリクバラタナゴの産卵母貝種選好性

浮出仔魚の同定結果をふまえて、浮出仔魚数の少なかった第3期は除き、第1期と第2期におけるヤリタナゴとタイリクバラタナゴによる人工産卵床の産卵母貝種選好性について検討した。第1期と第2期のヤリタナゴについては、主にマツカサガイとト

ンガリササノハガイから浮出仔魚が確認された。一方、第1期と第2期のタイリクバラタナゴについては、実験に用いた4種すべての二枚貝類から浮出仔魚が認められ、産卵母貝種に対する幅広い選好性が見られた。

3. 4. 人工産卵床におけるタナゴ類による産卵行動の観察

水中ビデオカメラでの撮影と目視観察の結果、各実験地点に複数種のタナゴ類が生息していることが確認された。定量的なデータは得られていないが、タナゴ類の縄張りの形成や、タナゴ類が人工産卵床の二枚貝類を覗き込む行動が頻繁に観察された。

また、実験地点の1地点では、タイリクバラタナゴによるイシガイへの産卵行動が映像で確認された。さらには、実験地点のうち2地点では、水中ビデオカメラの映像からスイゲンゼニタナゴが生息していることが確認された。

3. 5. 人工産卵床の物理環境と浮出仔魚数

人工産卵床を設置した地点において30分ごとに測定記録した水温を図6に示す。各実験期間における水温(平均±標準偏差)は、第1期は $24.3 \pm 2.1^{\circ}\text{C}$ 、第2期は $24.6 \pm 2.4^{\circ}\text{C}$ 、第3期は $29.4 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ であった。浮出仔魚数が大幅に減少した第3期では、第1期および第2期に比べて水温は高く、約 30°C に達するまで上昇した。

流速と水深については、実験をおこなった農業水路では実験を開始した5月18日の約1週間後には灌漑が始まり流量が増加し、実験期間中の大半が灌漑期における水路環境となっていた。このため、本報告では、灌漑期におけるデータを用いて、流速および水深と浮出仔魚数との関係について検討する。

図7, 8は、第1期の流速および水深と浮出仔魚数との関係についてそれぞれ示している。流速および水深と浮出仔魚数との間には、第1期・第2期ともに、いずれにおいても有意な相関は認められなかった(Spearmanの順位相関係数、 $P_s > 0.05$)。

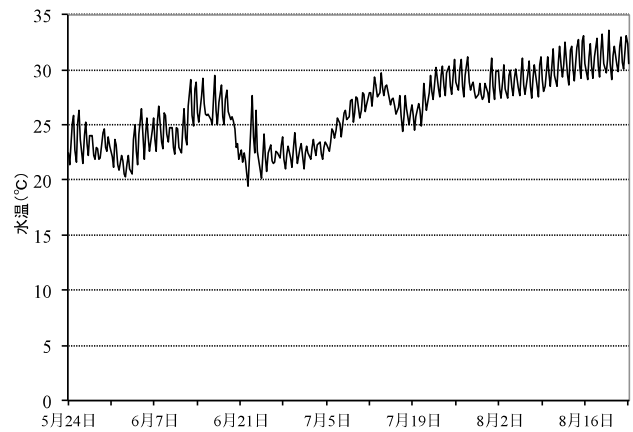


図6 実験期間中における実験地点の水温.

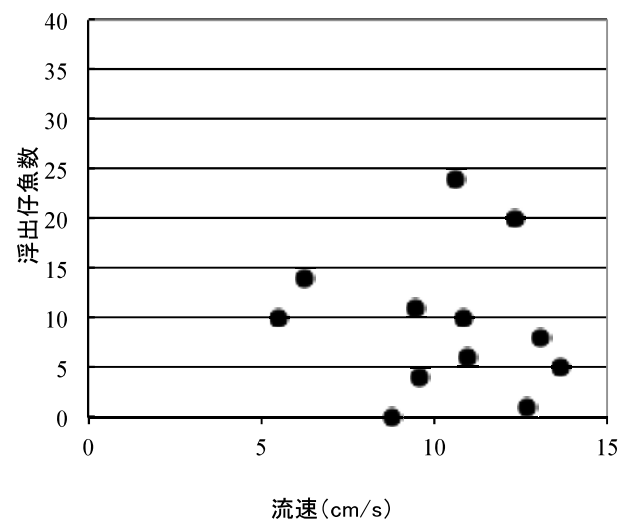


図7 人工産卵床設置地点における流速と浮出仔魚数の関係(第1期).

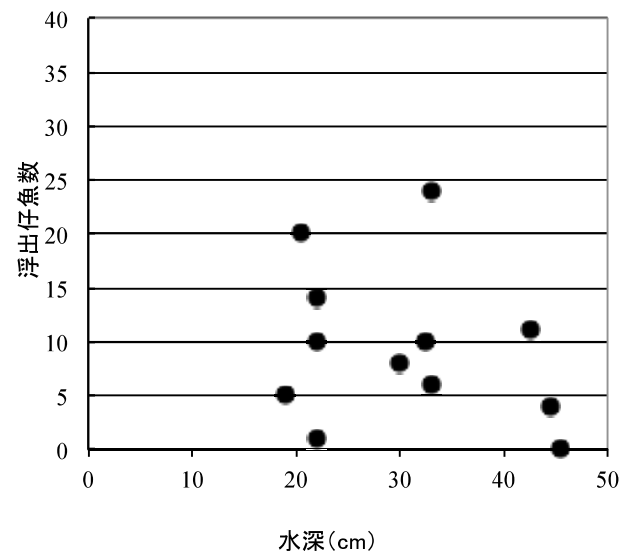


図8 人工産卵床設置地点における水深と浮出仔魚数の関係(第1期).

4. 考察

本研究の野外実験の結果、スイゲンゼニタナゴによる人工産卵床の利用は確認できなかったが、環境省および岡山県レッドリストにおいて準絶滅危惧に選定されているヤリタナゴが、野外において人工産卵床を産卵場所として利用することが示された。このことから、本研究で採用した人工産卵床は、希少タナゴ類の保全・増殖技術として有効な手法となる可能性が示唆された。

スイゲンゼニタナゴによる人工産卵床の利用が確認されなかった理由の1つとしては、実験をおこなった農業水路の水系では本種の生息個体数が他のタナゴ類に比べ少ないと考えられ(宮武ら, 2013), 人工産卵床をめぐる種間競争で排除された可能性も考えられる。また、実験を実施した農業水路においては、スイゲンゼニタナゴの産卵期が本研究の実験開始時期よりも早い可能性もあるのかもしれない。

一方で、環境省により要注意外来生物に指定されているタイリクバラタナゴが、本研究で採用した人工産卵床を産卵場所として利用することが示された。タイリクバラタナゴについては、交雑による遺伝子の浸透と攪乱や、近縁の在来種との種間競争などを通じて、在来タナゴ類に対して深刻な悪影響を与えることが知られている(加納, 2002)。本研究で採用した人工産卵床は、応用面では、上述のように在来生物に対する影響が問題となっているタイリクバラタナゴの防除手法として利用することが可能となるかもしれない。

5. 今後の課題

本研究の野外実験では、スイゲンゼニタナゴによる人工産卵床の利用が確認されなかった。今後の研究では、スイゲンゼニタナゴが利用する人工産卵床の条件を明らかにする必要がある。そのためには、他のタナゴ類との種間競争などの影響を排除した水槽実験についても併せておこない、本種の産卵母貝選好性などを解明する必要があるだろう。

また、スイゲンゼニタナゴが選好する産卵母貝の種に加えて、産卵母貝サイズについても検討することで、有効となる人工産卵床の条件をより詳細に明

らかにすることができるだろう。

謝辞

本研究は、公益財団法人ウエスコ学術振興財団の平成 25 年度学術研究費助成事業の助成を受けて実施したものである。種の保存法に係る各種手続きでは、環境省中国四国地方環境事務所に大変お世話になった。本研究の野外実験や野外調査は、岡山大学環境理工学部環境管理工学科水生動物学研究室の学生諸氏の協力を得て実施した。ここに記してお礼申し上げる。

引用文献

- 赤井 裕・秋山信彦・上野輝彌・葛島一美・鈴木信洋・増田 修・藪本美孝(2011) タナゴ大全. エムピージェー, 横浜, 191 pp.
- 加納義彦(2002) タイリクバラタナゴ: 交雑による遺伝子の浸透と攪乱. 外来種ハンドブック(日本生態学会編, 村上興正・鷺谷いづみ監修), 地人書館, 東京, p. 110.
- 川那辺浩哉・水野信彦編(2001) 日本の淡水魚. 山と溪谷社, 東京, 719 pp.
- 宮武優太・牛見悠奈・青江 洋・中田和義(2013) 農業水路における希少タナゴ類の生息場所利用様式. H25 農業農村工学会大会講演会要旨集, pp. 220-221.

本研究成果の外部発表

依頼講演

- 宮武優太・川本逸平・中田和義(2013) スイゲンゼニタナゴの生態解明と保全技術開発に関する研究: 農業水路における生息場所利用様式と人工産卵床の有効性. スイゲンゼニタナゴ勉強会, 倉敷市環境学習センター, 11月30日.

学会発表

- 宮武優太・川本逸平・青江 洋・中田和義(2014) 農業水路に用いる希少タナゴ類の人工産卵床の検討. H26 農業農村工学会大会講演会講演要旨集(印刷中).

岡山県における社会基盤施設の災害復旧に関する史的研究 — 昭和9年 室戸台風の災害復旧橋梁を中心として —

岡山大学大学院環境生命科学研究科

樋口 輝久

岡山県は災害の少ない県と言われながらも、明治から昭和初期の間だけでも、明治17年の大津波、明治25年・26年および昭和9年の大洪水、昭和21年の南海大地震などで多くの被害が出ている。中でも昭和9年の室戸台風は、県下全域に未曾有の被害をもたらしたが、特に土木関係の被害は甚大で、橋梁の破損は1932箇所 に及んだ。その橋梁復旧にあたっては、数々の新しい技術が導入され、当時、最大スパンを誇る大型橋梁が次々に架けられた。このように一時期一地域に集中して多様な型式の橋梁が架けられた他の事例としては、関東大震災による隅田川の復興橋梁群と大阪の中之島を中心とした橋梁群があるのみで全国的にもめずらしく、わが国の橋梁史上においても注目される事業であった。そこで、本研究では当時の資料を収集し、分析することによって、室戸台風による橋梁の被災状況、その復旧方針と復旧過程、復旧事業の執行組織である岡山県土木課の実態、担当技術者の意識などを明らかにした。

1. 研究の目的

室戸台風による岡山県内の橋梁被害は、『昭和九年風水害誌』によれば流失1394ヶ所、破損538ヶ所に及ぶ甚大なものであった。その復旧にあたっては、とりわけ被害の大きかった高梁川及び旭川を中心に大スパンで様々な型式の橋梁が次々に架けられた。このように一時期一地域に集中して多様な型式の橋梁が架けられた事例は、全国的にもめずらしく、わが国の橋梁史上においても注目される事業であったが、被害状況をはじめ、復旧計画の立案から竣工に至るまでの過程、予算ならびに執行組織に関しては、これまで研究されてこなかった。その要因として、戦災により岡山県庁が全焼したため、復旧事業の中心的な役割を果たした県関係の一次資料が消失してしまったことが挙げられる。そのため、例えば『岡山県政史—明治大正編・昭和前期編』の「災害道路橋梁の復旧」の項に記された内容は極めて乏しく、その情報も当時の山陽新報によるものであった。

そこで本研究では、当時から岡山県内で最も発行部数の多かった山陽新報（昭和13年からは合同新聞に改称）の新聞記事ならびに岡山県土木課の担当者が土木系の専門雑誌に発表した工事報告や論説を参考に、災害復旧事業の実態を明らかにしていく。ま

た、設計図面に関して、岡山県庁に残されている可能性はないため、当時の内務省の関係機関ならびに製作や工事を請け負ったメーカーや業者を検索することによって、その詳細を明らかにしていく。

平成23（2011）年の東日本大震災以降、帝都復興事業について再整理・再評価する研究が盛ん行われている。全国各地で自然災害が頻発している今日、当時の復旧事業の実態や技術者がめざしていた復興方針を明らかにし、整理しておくことは、今後の地域づくりやまちづくりにとっても、あるいは自然災害に対する教訓としても意義のあることである。

2. 研究の内容

本研究は、平成24年度および平成25年度の2年にわたって研究費の助成を受けて実施したものである。平成24年度の実施内容に関してはすでに報告済みであるが、平成25年度との関連性を改めて示しておく。

平成24年度は資料の収集を重点的に実施した。新聞は、災害翌日の昭和9（1934）年9月23日から6年6ヶ月分の山陽新報を検索し、岡山県職員録については、災害前の昭和6（1931）年版から昭和18（1943）年版までを収集した。当時発行された土木

系の専門雑誌については、『土木學會誌』（土木学会）1件、『土木建築工事畫報』（工事畫報社）1件、『土木』（土木協會）5件、『土木技術』（土木技術社）1件の室戸台風の災害復旧関連の記事を抽出した。また、方谷橋、南熊山橋、相生橋、下倉橋の詳細な設計図面を独立行政法人 土木研究所で収集した。なお、土木研究所が所蔵している理由は、前身の内務省土木研究所が、『本邦道路橋輯覽』を発行するにあたって、各自治体に図面の提出を求めたためである。ただし、すべての橋梁について提出したわけではなく、取捨選択して提出したため一部しか収集されていない。その他、災害記録や担当技術者が執筆した書籍として、『昭和九年風水害誌』（岡山縣，1935）、『昭和九年九月二十五日現在 風水害状況』（岡山縣，1934）、『橋梁工学』（古川一郎，森北出版，1959）を収集した。

平成25年度は、資料の追加収集と収集した資料の分析を実施した。新聞に関しては、さらに昭和17（1942）年12月までを検索し、最終的に8年3ヶ月分、約1120件の関連記事を抽出した。設計図面については、鋼橋の製作を請け負った橋梁メーカー各社、工事を請け負った建設会社を検索したが、新たな図面を発見することは出来なかった。その要因として、鋼橋の大半を請け負った桜田機械製造所（後のサクラダ）が、平成24（2012）年11月に自己破産したため、関係者をあつたものの、それ以上辿ることが出来なかった。

分析は収集した文献、図面、職員録をもとに、岡山県土木課による復旧橋梁（手がけた橋梁、設計方針等）（3. 岡山県土木課による設計 参照）、岡山県土木課の実態（組織や人事、技術者の意識等）（4. 岡山県土木課の実態 参照）を明らかにした。さらに、人事で明らかになった主要な技術者については、個々の経歴についても調査を実施した（5. 主要な技術者の経歴 参照）。

3. 岡山県土木課による設計

(1) 田中豊の顧問就任

被災橋梁の復旧にあたっては、橋梁専門技師の着任、土木課職員の増員はさることながら、岡山県は、

復興局の橋梁課長として関東大震災後の橋梁復旧において中心的な役割を果たした田中豊を顧問に迎え、3年間随時、指導を仰ぐことにした。田中は、21日に来岡して、その日は岡山県土木課の松島義雄技師の案内により、岡山市内を中心に京橋、中橋、小橋、相生橋、大原橋等を視察した。その後、22日は高梁川を北上しながら視察し、新見、勝山を経て、23日は旭川上流を視察し、津山へ。24日は南下しながら岡山に戻ってくるスケジュールで、岡山での滞在・現地視察は4日間であった。

田中は翌年の8月に再び岡山を訪問し、8～9日の2日間、井倉橋など20あまりの橋梁に関して、先の松島ならびに橋梁技師として赴任してきた古川一郎に設計指導を行った。なお、その後、田中が岡山を訪れ、指導を行ったという報道はなされていない。

災害1年後にまとめられた『昭和九年風水害誌』に収録された橋梁復旧に対する田中の意見を要約すると、(1)できるだけ橋脚を高くして幅員を広げること、(2)しかし、地形によっては橋脚を高くすると兩岸の築堤も高くなり、被害が拡大するおそれがあるため、その場合は橋脚はあまり高くせず、水中に没することを考慮すること、(3)被害が著しくない橋梁は、修理して再利用することであった。結局のところ、「金がいくらあつても、地形が適當でなければ完全な橋は必ずしも作ることは出来ないのだから、財政と地形とが一致してをることが必要である」と、ごく当たり前のコメントをしている。

(2) 復旧方針

最終的に岡山県土木課が定めた復旧方針は、スパンを大きくして、なるべく橋脚を少なくすることと、基礎の根入を深くすることであった。そして、内務省の査定方針が原型復旧であったのに対し、岡山県は安全性や今後の交通量の増大も考慮し、復興を加味した方針とした。幅員については、田中豊が拡大を促していたように、平均5.5mとされた。

(3) 型式選定と設計

国庫補助による災害復旧341橋、単独県費によるもの277橋の計618橋のうち、岡山県土木課で設計し

た橋梁は、国庫補助の中でも長大橋を中心とした52橋であった。表-1は、その52橋の昭和12（1937）年時点における型式と諸元（後に変更があったものは欄外に表示）ならびに当時の新聞等により判明した開通年月日もしくは竣工式の開催日を示している。

型式は、RC 橋が 27 橋、鋼橋が 20 橋、RC 橋と鋼橋の複合が 2 橋で、さらに RC 橋と木桁の複合が 2 橋、鋼橋と木桁の複合も 1 橋あった。RC 橋はすべてが桁橋で、そのほとんどが単純桁かゲルバー桁であった。RC 桁橋の最大スパンは、南熊山橋の 28.0m で、それより大きいものはすべて鋼橋とされた。鋼橋では側径間の鋼桁を除けば、ワーレントラス（曲弦、ポニー）が最も多く、次いでランガートラス 3 橋、ランガー桁 2 橋、ゲルバートラス、プラットトラスとアーチ（ソリッドリブ）が 1 橋ずつ採用された。当時の記録で「特に變つた橋型は採用されてゐない。設計して見たいが爲めに現場に相應しくないものを計畫したと思はれるものは一つも無いと信ずる」と述べているように、すでに全国各地で採用されている型式で、目新しいものはないが、現代からすれば実に様々な型式が採用されたものと感じられる。

(4) 鋼材不足による型式変更

日中戦争の影響による資材不足は、復旧事業にも影響を及ぼした。鋼材価格の高騰によって大原橋では当初スパン39.60m、9連だったポニートラスを同数のRCローゼ桁に、八幡橋ではスパン23.00m、3連の鋼PGをRCローゼ桁に設計変更している。なお、スパン70.00mの曲弦ワーレントラス1連（大原橋）、スパン80.00mのランガー桁1連（八幡橋）はそのまま架橋された。

RCローゼ桁は長野県の道路技師であった中島武によって考案された型式で、彼は昭和8（1933）年12月から12年まで長野県に在籍していた。一方、災害復旧のため岡山県に赴任してきた古川一郎も、昭和8（1933）年2月20日から9年12月27日まで長野県に在籍しており、少なくとも1年間は同席していたことになる。この時はまだ大手橋の設計は実施されていないが、古川は中島からローゼ桁に関する考え

を聞いていたであろうし、岡山赴任後も情報は得ていたであろう。橋梁主任という立場からしても、古川が大原橋と八幡橋の型式変更に関わっていた可能性が非常に高い。

4. 岡山県土木課の実態

復旧事業前後における岡山県土木課（昭和14年4月から土木部）の職員数を表-2に、主な担当者を表-3に示す。

(1) 組織の増強

未曾有の災害の復旧事業を遂行するには、これまでの組織では対処できないのは当然で、対応する部署の新設と大幅な人員の増強および異動が図られた。

まずは被害の大きかった旭川の中流を所轄する福渡土木出張所が設置され、20名前後の職員が配置された。ほかに、人数はそれほど多くはなかったが、旭川上流復興事務所、高梁川上流復興事務所も新たに設置された。土木課の職員数については、表-2から明らかなように、災害前は280名だったものが、翌年度には340名ほどに、そして復旧事業がピークを迎える昭和11（1936）年度には、災害前より100名程度も増員されている。

短期間に大量の橋梁を設計・施工しなければならなかったため、橋梁専門の技師も増員された。具体的には、災害前から在籍し、岡山県内の状況を周知している松島義雄に加え、東京市の橋梁課で関東大震災後の帝都復興事業に携わった経験のある古川一郎が新たに赴任し、この二人が中心となって災害橋梁の復旧が進められた。

また復旧事業に携わった土木課職員の復旧にかける使命感と過酷な勤務の状況も当時の記録から読み取ることができた。

(2) 人員整理

災害復旧事業が一段落すれば、一時的に増やした100名あまりの職員の次の配属先探しが大きな課題となる。土木課長の飯島馨之助は、一人一人の希望を聞きながら、道路主事の平野徳松とともに全国を奔走し、一人の失業者もなく、次の転職先を確保し

たことが当時の新聞には報じられている。

表-2の通り、ピーク時の昭和11（1936）年度には370人あまりの職員が在籍していたが、2年後には100名が整理され、災害前の規模に戻っている。

5. 主要な技術者の経歴

室戸台風の災害復旧に携わった主要な技術者の多くは、かつて関東大震災の復興に携わった経験ある技術者であることが明らかになった。橋梁復旧で中心的な役割を果たした古川一郎および松島義雄の経歴をまとめておく。

(1) 古川一郎

古川一郎は明治34（1901）年に新潟県に生まれ、九州帝国大学土木工学科を卒業した後、東京市橋梁課に勤務。帝都復興事業として、両国橋、稲荷橋の設計に携わったことが明らかになっている。昭和8（1933）年には長野県に、そして翌9年12月28日に橋梁主任として岡山県に赴任した。岡山県では土木部発足により初の道路課長に就任し、河港課長を経て昭和16（1941）年まで在籍した。その後、岐阜、福井、山形の各県で公職を勤め、仙台工専、東北大学、日本大学で教鞭をとった後、日本橋梁株式会社の常任顧問に就任している。最後は近畿大学で橋梁工学を教え、昭和62（1987）年に逝去した（85歳）。

後年、古川はその著書『橋梁工学』の中で、岡山県で復旧に携わった橋梁の写真を多数掲載している。「構造形式の分類」では、単純トラス橋として金川大橋、ゲルバー橋として今津屋橋と水内橋、ランガー橋として正田橋、ゲルバー式ランガー橋として方谷橋、ローゼ橋（鉄筋コンクリート橋）として大原橋、ラーメン橋（鉄筋コンクリート橋）として国司橋を、「架橋位置」の項では田井橋を、「形式の選定」においては、ゲルバー橋（鉄筋コンクリート橋）として南熊山橋を掲載している。

岡山県で災害橋梁の復旧事業に携わった当時の古川について、後輩の星山は、「全員が絶へず明朗な気分を以て仕事に従事し、幸に大過なく今其の仕事の大部分を完了し得たのは、實に主任古川技師のご指導の賜で、常に全員と共に感謝して居る」と彼の人

柄と指導力に敬意を表している。

(2) 松島義雄

松島義雄は明治33（1900）年生まれで、大正13（1924）年に京都帝国大学工学部土木工学科卒業後、内務省復興局技術雇土木部河港課勤務、昭和2（1927）年から4年までは復興局東京第四出張所工事課に在籍し、昭和7（1932）年10月7日に岡山県内務部土木課技師として赴任した。そして、昭和9（1934）年の室戸台風では橋梁復旧の中心となって従事したが、昭和11（1936）年度以降の職員録に名前が見当たらない。岡山県土木課の技師が『土木』に寄せた報告では、「當初主任技師として此の事業の準備計畫に盡瘁されながら、其の成果を見られずして逝去された、松島技師を追想し、茲に謹んで哀悼の意を表する次第である」と記していることから、復旧事業半ばで、命を落としたことが明らかとなった。

6. 研究成果

岡山県における室戸台風による災害橋梁の復旧事業に関して、当時の新聞ならびに数少ない技術者の言説や図面をもとに、明らかになった点をまとめると次のようになる。

- 1) 原型復旧ではなく、安全性・将来性を見越した復旧方針が立てられた。
- 2) 田中豊を顧問にして、古川一郎と松島義雄を中心に岡山県土木課が52橋の設計を行った。
- 3) その設計図面は、ごくわずかであるが、独立行政法人 土木研究所に所蔵されていることが明らかとなった。
- 4) 復旧事業遂行のため部署の新設（福渡土木出張所、旭川上流復興事務所、高梁川上流復興事務所）と100名あまりの増員が行われ、370名を超える体制となった。事業完了後は災害前の規模に戻され、増員された全員の転職先が確保された。
- 5) 橋梁復旧の中心となった古川一郎と松島義雄の経歴と人柄、さらに自らを犠牲にしながら復旧にかかる土木課職員の使命感と過酷な勤務実態が明らかになった。

表-1 岡山県土木課において設計した橋梁

	橋名	河川名	橋長	幅員	型式	支間長	開通年月日
吉井川水系	松川橋	加茂川	44.00	5.50	RC 桁 (単純)	14.10*3	—
	山下橋	加茂川	55.00	5.50	RC 桁 (単純) + 木桁	11.80*3+6.20*3	1938.9
	青坂橋	加茂川	30.40	5.50	RC 桁 (連続)	11.50+9.25*2	—
	津川橋	津川川	30.50	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	15.00*2	—
	水原橋	吉井川	38.60	5.50	RC 桁 (単純)	12.20*3	1937.1.31
	奥津橋	吉井川	50.60	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	20.00+15.00*2	1936.8.17
	大釣橋	吉井川	32.00	5.50	鋼ワーレントラス (ポニー)	31.20	1937.3
	落合橋	吉井川	40.10	5.50	RC 桁 (連続)	14.50+12.50*2	1936.7
	谷合橋	吉井川	50.60	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	20.00+15.00*2	1936.6.10
	錦橋	吉井川	82.00	5.50	鋼ワーレントラス (ポニー)	40.00*2	1936.12.11
	今津屋橋	吉井川	101.80	8.00	鋼桁 (ゲルバー)	39.00+31.00*2	1937.4.1
	小畑橋	梶並川	50.00	4.50	RC 桁 (連続)	12.32*4	1937
	吉田橋	八塔寺川	83.40	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	18.20*3+14.20*2	1938.2.13
旭川水系	南熊山橋	吉井川	154.60	4.50	RC 桁 (ゲルバー)	28.00*4+21.00*2	1938.2.20
	頓崎橋	湯船川	32.56	5.00	RC 桁 (単純)	10.40*3	—
	初和橋	下和川	31.00	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	15.00*2	—
	湯川大橋	旭川	52.00	4.50	RC 桁 (連続)	12.75*4	—
	加佐見橋	旭川	80.00	5.50	鋼ワーレントラス+RC 桁 (単純)	50.00+14.05*2	1939.3
	荒川橋	旭川	86.87	5.50	RC 桁 (連続)	14.37*6	1940.8
	神橋	旭川	82.60	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	18.00*3+14.00*2	—
	落合橋	旭川	176.30	4.50	鋼ワーレントラス (曲弦)	58.00*3	1939.7.11
	美川橋	備中川	53.00	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	20.00+16.22*2	1936.11.17
	旦土大橋	旭川	81.00	5.50	鋼ワーレントラス (曲弦)	80.00	1937.10
	曾保谷橋	曾保谷川	15.00	5.50	RC 桁 (単純)	14.30	—
	江与味橋	旭川	101.37	4.50	鋼ワーレントラス (曲弦)	50.00*2	1937.5.15
	鶴田橋	龍谷川	30.00	5.50	RC 桁 (単純) (カンチレバー)	17.00+6.50*2	1936.6.9
	八幡橋	旭川	152.04	4.50	鋼ランガー桁+鋼桁 ※1	80.00+23.00*3	1942.11.14
	鹿瀬橋	旭川	196.10	6.50	鋼ランガートラス+鋼桁	72.00+24.00*5	1940.10.17
	金川大橋	旭川	221.00	4.50	鋼ワーレントラス (曲弦+ポニー)	60.00+39.47*4	1937.4.15
	観波橋	宇甘川	84.50	6.50	RC 桁 (ゲルバー)	19.00+18.00*2+14.50*2	1936.6.7
	正面橋	豊岡川	15.00	5.50	RC 桁 (単純)	14.00	—
	宇甘橋	宇甘川	80.46	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	18.00+17.00*2+14.50*2	—
	常盤橋	宇甘川	72.35	5.50	RC 桁 (単純)	11.50*6	—
	箕地橋	宇甘川	96.00	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	16.50*4+14.70*2	1937
	葛城橋	旭川	173.00	4.50	鋼ワーレントラス+木桁	39.47*2+7.10*13	1938.10.1
	大原橋	旭川	432.40	5.50	鋼ワーレントラス (曲弦+ポニー) ※2	70.00+39.60*9	1942.3
高梁川水系	龍頭橋	熊谷川	32.00	4.50	RC 桁 (単純)	10.20*3	—
	正田橋	高梁川	99.14	5.50	鋼ランガートラス+鋼桁	55.20+21.00*2	1936.7.10
	川合橋	高梁川	105.08	5.50	RC 桁 (ゲルバー)	16.00*5+12.50*2	1936.7.10
	巖橋	小阪部川	77.00	5.50	RC 桁 (単純)	12.30*6	1936.7.10
	井倉橋	高梁川	88.49	5.50	鋼アーチ+鋼桁	55.20+15.64*2	1937.1.27
	広石橋	高梁川	102.31	5.50	鋼ワーレントラス (ポニー) + 鋼桁	40.00+20.00*3	1937.8.10
	中井橋	高梁川	87.40	5.50	鋼ワーレントラス (ポニー)	43.00*2	1938.3.11
	河戸橋	皆名川	35.00	5.50	RC 桁 (単純)	??*3	—
	田井橋	高梁川	89.30	5.50	鋼ランガートラス	88.20	1937.4.7
	方谷橋	高梁川	110.80	5.50	鋼ランガー桁 (カンチレバー)	56.00+27.00*2	1937.5.11
	落合橋	高梁川	139.10	5.40	鋼ワーレントラス (ポニー) + RC 桁	49.00+11.23*2+α	1936.11.9
	玉川橋	高梁川	139.04	4.57	鋼ブラットトラス (曲弦)	45.72*2+α	1936.9.5
	水内橋	高梁川	181.00	5.50	鋼ゲルバートラス	72.00+54.00*2	1938.1.17
	男川橋	宇戸川	28.73	5.50	鋼桁	26.21	1938.1.17
	馬越橋	小田川	186.36	4.50	RC 桁 (単純) + 木桁	12.00*11+6.00*9	1936.10.9
	栄橋	小田川	71.33	4.50	鋼ワーレントラス (ポニー)	35.00*2	1939.3

※1 後に、鋼桁を RC ローゼ桁に設計変更。

※2 後に、鋼ワーレントラス (ポニー) を RC ローゼ桁に設計変更。

α：流出を免れた部分はそのまま使用。

表-2 岡山県土木課及び土木部における職員数

	S9.4.1	S10.5.1	S11.5.1*	S12.5.1**	S13.5.1**	部昇格	S14.7.1	S15.7.1	S16.7.1
課長	1	1	1	1	1	部長	1	1	1
技師	6	9	7	7	7	経理課	23	21	20
主事	1	1	2	2	2	道路課	17	21	18
属	7	7	5	6	7	河港課	22	28	28
技手	24	40	43	29	27	砂防課	22	9	9
書記	17	24	27	24	22	都市計画課		13	13
工手	13	17	22	15	13				
雇	2	2	2	2	2				
岡山土木出張所	27	22	20	20	17	→	19	17	14
和気土木出張所	19	17	17	16	10	→	14	12	12
笠岡土木出張所	16	16	16	17	13	→	11	10	11
高梁土木出張所	22	25	27	21	18	→	15	13	8
新見土木出張所	19	21	22	18	16	→	11	9	8
勝山土木出張所	16	33	32	37	27	→	22	16	11
津山土木出張所	22	21	24	18	14	→	12	12	12
林野土木出張所	17	17	18	10	10	→	9	12	10
倉敷土木出張所	16	18	18	20	22	→	16	15	16
福渡土木出張所		19	24	17	13	→	14	11	11
小田川改修事務所	10	6	7	5	5	→	1	2	3
砂川改修事務所	7	6	7	3	1	→			
笹ヶ瀬川及足守川改修事務所	6	7	6	5	4	→			
里見川改修事務所	4	5	5	4		→			
旭川上流復興事務所			7	8	6	→	4	4	4
高梁川上流復興事務所			5	4	4	→	2	4	4
吉井川改修事務所						→	3	4	4
旭川河水統制事業調査事務所						→		28	28
総社砂防事務所						→		5	
成羽砂防事務所						→		4	4
湯原砂防事務所						→		4	4
片上港修築事務所	2	3	3	3	3	→	2	1	1
笠岡港修築事務所					3	→	2	3	3
玉島港修築事務所						→			4
児島湾改修事務所						→			
岡山飛行場建設事務所						→		5	4
岡山県特設臨海工業地帯造成事務所						→			12
浚渫船	6	5	5	5	5	→	6		
浚渫船第一岡山号						→		4	4
浚渫船高梁号						→		3	4
合計	280	342	372	317	272		248	291	285

※ 『岡山県職員録』による。ただし、* 『山陽年鑑』、** 『合同年鑑』。

※ 兼任の場合もカウントしている。したがって、正味の人数ではない。

表-3 岡山県土木課及び土木部における主な職員

	S9.4.1	S10.5.1	S11.5.1*	S12.5.1**	S13.5.1**	部昇格	S14.7.1	S15.7.1	S16.7.1	S17.5.1**
課長	長谷川勝伍	飯島馨之助	飯島馨之助	飯島馨之助	飯島馨之助	土木部長	鈴木健二	鈴木健二	三宅發造	三宅發造
	松島義雄	松島義雄				経理課課長	中島勇	中島勇	中島勇	中島勇
	岡田實	岡田實	岡田實	岡田實	岡田實	経理課	岡田實	高柳賢市	高柳賢市	島村敬一
		古川一郎	古川一郎	古川一郎	古川一郎	道路課課長	古川一郎	田中孝	田中孝	鬼丸忠男
	平野徳松	平野徳松	平野徳松	平野徳松	平野徳松	道路課	平野徳松	坂本増二	坂本増二	坂本増二
	堀川一太	堀川一太	堀川一太	堀川一太	堀川一太	道路課	堀川一太	小林宏	小林宏	小林宏
	園村圓次	園村圓次	園村圓次	園村圓次	園村圓次	道路課	津下修一郎	津下修一郎	津下修一郎	津下修一郎
	山口徳兵衛	山口徳兵衛	山口徳兵衛	關初彦	露口秀夫	河港課課長	露口秀夫	古川一郎	和田秀夫	和田秀夫
	中間友義	中間友義	服部久太	服部久太	服部久太	河港課	久世善一	久世善一	久世善一	久世善一
		山本勝也	山本勝也	山本勝也	山本勝也	河港課	今井虎次	今井虎次	今井虎次	今井虎次
		坂部素夫	橋本芳太郎	荒木忠義	荒木忠義	河港課	荒木忠義	關初彦	關初彦	中澤高司
						河港課		劍持力	劍持力	劍持力
						河港課			信田景	信田景
						砂防課課長	田中與六	田中與六	堀内陸郎	堀内陸郎
						砂防課	久世善一	久世善一	久世善一	
						砂防課	信田景	信田景	信田景	信田景
						砂防課		高柳賢市	高柳賢市	

※ 『岡山県職員録』による。ただし、* 『山陽年鑑』、

** 『合同年鑑』。

※ 兼任の場合も記載している。

SAMS 遺伝子に起因する植物ゲノムの遺伝子発現の変化と Al ストレス耐性との関連性

岡山大学 資源植物科学研究所 准教授

江崎 文一

1. 概要

本研究は、イネ科野生植物 *Andropogon virginicus* (メリケンカルカヤ) から単離した Al ストレス、重金属ストレス、酸化ストレスに耐性を示す遺伝子 *AvSAMS1* (S-adenosylmethionine synthetase) を用いて、その耐性のメカニズムを明らかにしようとしたものである。この酵素が産生する SAM は植物生体内でのメチル基供与体の大部分を占めることから、SAMS も DNA のメチル化、ひいてはエピジェネティックな遺伝子制御に直接的に関与することが予想された。今回、*AvSAMS1* 遺伝子を発現するシロイヌナズナ形質転換体を用いて、Al ストレス下でのゲノム DNA のメチル化修飾に変化が起きる状況(メチル化と脱メチル化)を bisulphite 処理後の DNA 塩基配列決定により、確認することができた。一般に DNA のメチル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御では、発現の抑制を起こすことが報告されているが、本研究の結果から Al ストレスによりその発現が抑制される遺伝子でも、メチル化と脱メチル化の両方が 1 つの遺伝子内で複雑に起こることが明らかとなった。

2. 緒言

近年、環境の劣悪化に伴い、Al ストレス、重金属ストレス、酸化ストレス等が植物に対して重大な生育障害を引き起こすようになった。世界規模で農作物生産に甚大な被害が拡大しており、安全な食糧確保や環境保全の面からもこれらは早急に解決すべき課題である。野生植物は一般に広範囲の環境ストレスに強い耐性を示すものが多く、これまでに江崎はイネ科野生植物 *A. virginicus* (メリケンカルカヤ) が高い Al ストレス耐性を示すことを明らかにした (1)。またこの植物は 5 つの耐性機構をストレス特異的に誘導することで高い Al ストレス耐性を示すことを報告した (2)。さらに最近、この植物から Al や酸化ストレス耐性機構に密接に関連すると推定される *AvSAMS1* (S-adenosyl methionine synthetase) 遺伝子を単離した。ところで近年、DNA メチル化などに起因するエピジェネティックスがストレス時に起こり、全ゲノム的な遺伝子群の発現制御や耐性化に関わり得ることが報告されている (3, 4, 5)。植物生体内でのメチル基供与体の多くが SAM (S-adenosyl methionine) であることから、SAMS も DNA メチル化へ直接的に関与すると予想された。

これまでに SAMS 遺伝子が、重金属ストレスへの耐性化に関与する報告例はあるが、Al 耐性化やエピジェネティックスな発現制御そのものに関連するか否かは、不明であった。

外部環境ストレスに対する植物の耐性機構や毒性機構の研究では、耐性遺伝子候補のモデル植物への導入とそれらの形質転換体の耐性評価が常道である。しかし、個々の遺伝子を単独で導入してもなかなか、高い耐性に結びつかないのが現状である。ストレス特異的に多くの耐性遺伝子の発現が上昇するような機構が望まれる。ところでエピジェネティックスというゲノム上の多くの遺伝子の発現量を変化させる制御様式が、生物には普遍的に存在する。さらにエピジェネティックスが個々の環境ストレスで起こり生物個体に耐性化をもたらし例も報告されてきた。だが、これを引き起こすメカニズムやどの様な遺伝子群の発現が実際に変化するのかなどについてはまだ十分に解明されていない。今回の (A) SAMS 遺伝子、(B) ゲノム全体のエピジェネティックな発現制御、(C) Al ストレス耐性化の 3 者の関連を解明する研究は未だ無く、その結果が期待された。

本研究では、*AvSAMS1* 遺伝子発現株を用いて、まず各種感受性試験を行った。次にゲノムワイドなエピジェネティックな発現変化が、A1 ストレス下で起こるのかを検討し、その変化をマイクロアレイ法で確認した。さらにA1 ストレスによりDNAのメチル化状況に変化が生じることも明らかにした。これらの結果より、*AvSAMS1* 遺伝子を介したDNAのメチル化修飾がエピジェネティックな遺伝子制御を引き起こし、A1 ストレス始め、多種のストレスへの耐性化付与につながった可能性が示唆された。

3. 方法

3-1 植物材料と生育条件

本研究では、*A. virginicus* とシロイヌナズナ Col-0 株、及び *A. virginicus* 由来の *AvSAMS1* 遺伝子 (cDNA) の発現株2系統を用いた。これらの植物は 25° C で明期 16 時間、暗期 8 時間の照明条件で土耕栽培または水耕栽培された。なお水耕栽培には Murashige・Skoog 培地を 6 倍希釈し、pH を 5.7 に調整したものを用いた (6)。

3-2 A1 ストレス、重金属ストレス、酸化ストレス処理方法

マイクロアレイ実験のための A1 ストレス負荷では、培養土から根を痛めないように静かに分離した土耕栽培の植物体 (発芽後約 3 週目) を用いた。これらの根を十分量の 300 μ M AlCl₃ を含む培地 (前述の水耕用培地と同じ組成で pH4.2 に調整したもの) に 6 時間、浸漬した。処理した植物体は total RNA 抽出に用いるまで、-80° C で保存した。

またストレス感受性試験を行う場合は、発芽後 10~14 日後の水耕栽培の植物体を其々のストレスサを含む培養液中に 2 日間根を浸漬した後、根長を測定した。各ストレスの負荷条件は 300 μ M AlCl₃, 100 μ M CdCl₂, 100 μ M CuSO₄, 200 μ M ZnCl₂, 1 mM H₂O₂, 1 mM diamide である。感受性は未処理区の植物体の根長と比較して、相対的根伸長度 (%) として表した。

3-3 マイクロアレイ解析

Total RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社製)を用いて抽出した。得られた RNA の純度は Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製)で確認した。この RNA sample を Cy3 または Cy5 で標識し (cRNA 標識)、DNA マイクロアレイスキャナ G2565CA#003 (Agilent Technologies 社製)で解析した。なお今回はシロイヌナズナのマイクロアレイ (Agilent Technologies 社製)を用いた。

3-4 バイサルファイト処理と CG 配列を多数含む遺伝子 DNA 断片の調製

2 日間の 300 μ M AlCl₃ 処理 (または未処理)した植物体からゲノム DNA を抽出後、OD_{260nm} 値より、DNA 含量を算出した。2 μ g 相当量のゲノム DNA を用い、MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Takara 社製)でバイサルファイト処理を行い、未メチル化状態の C を T へ変換処理した (なおメチル化状態の C は変換されず C のままである)。処理した DNA は、メチル化 DNA 用の遺伝子特異的な PCR プライマーを用いて PCR 反応により増幅した。なおプライマーの設計には Methyl Primer Express Software v1.0 (free soft supplied by Applied Biosystem)を用いた。PCR 反応条件は、最初の熱変性を 94° C で 120 秒間行った後、さらに熱変性反応を 94° C で 30 秒間行った。アニーリング反応を 50~58° C で 30 秒間、伸長反応を 68° C で 30~60 秒間行った。以上の反応を 35 サイクル行い、さらに最後の伸長反応を 68° C で 5 分間行った。増幅した DNA 断片はアガロースゲル電気泳動により他の不純物質と分離し、QIAEX II (QIAGEN 社製)により回収精製後、塩基配列の決定に供した。

3-5 塩基配列決定と DNA メチル化状況の解析

PCR 反応後の精製 DNA の塩基配列決定は外部委託で行った (Operon DNA シーケンス受託サービス)。オリジナルの配列 (バイサルファイト処理なしでの塩基配列) で C の部分に注目し、その配列部分の波形がどのようにバイサルファイト処理で変化したかを目視で解析した。植物の DNA でメチル化が起こるのは C*G、C*HH、C*HG の 3 形態の場

合である (C* ; メチル化C)。各 C についてメチル体 (CM) かフリー体 (CF) か、さらにはこれらの混合物か、その大まかな割合によって以下の5つ (A~E) にさらに細分類した (A, CM only; B, CM>CF; C, CM=CF; D, CM<CF; E, CF only)。

4. 結果と考察

4-1 *AvSAMS1* 遺伝子高発現株を用いた金属ストレス感受性試験

AvSAMS1 遺伝子の機能解析を目的として、まずコントロール株の Col-0 株と *AvSAMS1* 遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体を用いて、各種ストレスに対する感受性試験を行った。その結果、形質転換体は Al、Cu、Zn、diamide 等に幅広く耐性を示したことから、この遺伝子がこれらのストレスに広範囲に耐性を付与することが明らかになった (Fig. 1 : 今回構築した SAMS-3②と SAMS-6②の2系統に注目のこと。Col-0 はコントロール株。また ABC-t の2系統も、多種のストレスに耐性を示す別の形質転換体で、今回の感受性試験を評価するためのポジティブコントロールとして提示した)。

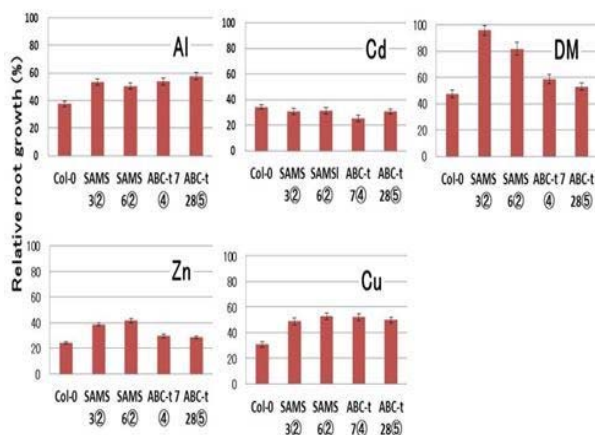


Fig. 1 *AvSAMS1* 高発現シロイヌナズナ形質転換体を用いたストレス感受性試験

SAMS3-2, SAMS6-2が*AvSAMS1*遺伝子導入2系統。Col-0やABC-t系統2つはコントロールで比較のために用いたもの。

またこの蛋白質の根と地上部での発現パターンを解析したところ、Al と Cu ストレスに対して根でのみ強く応答することが明らかとなった。(結果未提示)。根部で発現することで、

何らかの耐性機構と関連すると思われた。

4-2 *AvSAMS1* 遺伝子高発現株を用いた Al ストレス下での遺伝子発現レベルの変化

AvSAMS1 遺伝子発現シロイヌナズナ形質転換植物1系統と非形質転換株 (Col-0) を用い、Al ストレス下での SAMS を介したエピジェネティックな発現制御の有無をマイクロアレイ法 (スキャタープロットでの解析) で確認した (Fig. 2)。その結果、前者では Col-0 株に比べ、Al 処理で強く発現誘導または抑制される遺伝子数がともに2倍前後に増加した (Fig. 2 グラフの下の方の数字の比較を参照のこと)。これらの結果

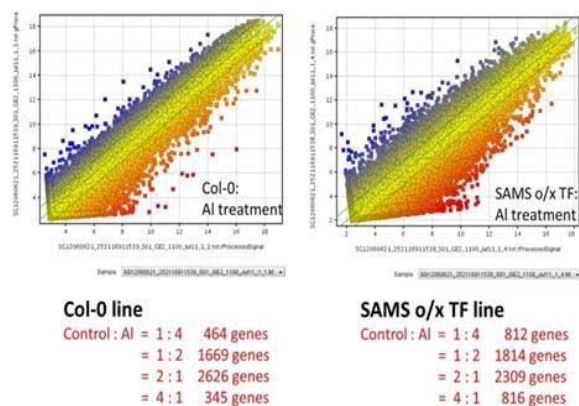


Fig. 2 *AvSAMS1* 遺伝子高発現シロイヌナズナ形質転換体と非形質転換体 (Col-0 株) を用いた Al 処理における遺伝子発現量の網羅的解析結果 (Micro array の結果)

赤、黄、青のスポット群は各々、Al ストレス特異的に誘導、変動なし、抑制された遺伝子の存在を示す。下に表した遺伝子数は、この micro array で4倍、2倍以上誘導された遺伝子や1/2倍、1/4倍以下に抑制された遺伝子数を算出し、両植物間で比較したものである。

は *AvSAMS1* がゲノム DNA のメチル化を高め (またはメチル化の状態に変化を与え)、エピジェネティック制御に関与することを示唆した。さらにこのような制御を介して、*AvSAMS1* 発現株は数多くの耐性遺伝子もしくは耐性機構をストレス特異的に誘導して、Al 耐性化した可能性も示唆された。

4-3 *AvSAMS1* 遺伝子高発現株を用いた Al ストレス下での DNA メチル化レベルの変化

前記のマイクロアレイの結果で、Al ストレス条件下で Col-0 株より *AvSAMS1* 発現株の方で特異的に発現量が大きく変化する (誘導型、抑制型) 遺

伝子群を各々6個、2個選び出した（表1）。これらの遺伝子では特にプロモーター領域やN末端領域においてC位がメチル化されてエピジェネティックな制御を受ける可能性が高いと考えられた。そこで AI 処理した形質転換株より、ゲノム DNA を抽出し、AI ストレスによって DNA のメチル化状況がどのように変化するか、バイサルファイト処理後の DNA 塩基配列で検討した。さらに

AvSAMS1 発現株の方で強く発現量が変動したこれらの個々の遺伝子についてその中に存在する CG、CHG、CHH における C 位のメチル化の状況を AI 処理下または未処理下で比較解析した。また同様の解析を *Col-0* 株でも行った (Fig. 3)。その結果、同じ DNA 領域でも *AvSAMS1* 発現形質転換株と *Col-0* 株の間で C 位毎に波形の違いとして大きな差異を検出することができた。

表1 DNAのメチル化状況の確認実験に用いた遺伝子のリスト

Gene name	Function	Expression in SAMS line	
At2G34430 (Repress type)	Chlorophyll a/b binding protein	0.422	0.222
At2G36325 (Repress type)	GDSL esterase/lipase	0.230	0.251
At3G56060 (Repress type)	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	0.142	0.244
At4G12330 (Repress type)	P450, Family 706 subfamily A, polypeptide 7	0.135	0.156
At5G07390 (Repress type)	Respiratory burst oxidase A	0.148	0.484
At5G26280 (Repress type)	TRAF-like family protein	0.206	0.090
At1G16030 (Induce type)	Heat shock protein 70B (HSP70B)	5.180	4.580
At1G80240 (Induce type)	Uncharacterized protein	7.330	41.530
At2G29950 (Constitutive type)	Tublin		

2回のマイクロアレイの結果で、コントロールの *Col-0* に比べて、Repress type では AI 処理でより抑制が起きているもの、Induce type では AI 処理でより誘導が起きているものを記載した。 *AvSAMS1* 高発現株のマイクロアレイでの発現量をそれぞれ示したが、 *Col-0* 株での発現量は省略している。また *At2G29950* の結果も省略した。

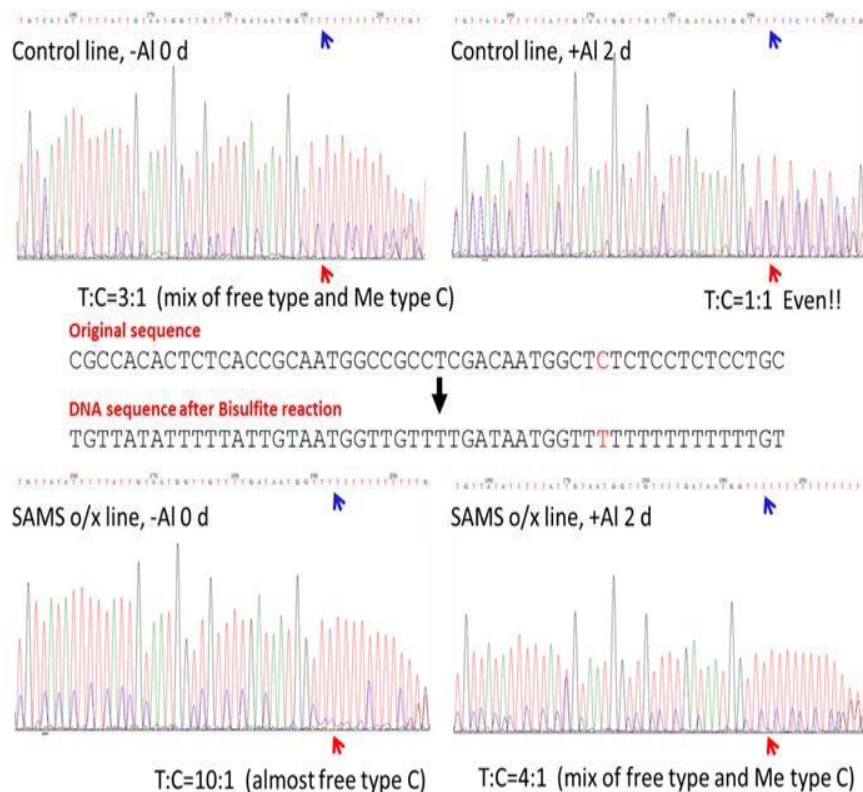


Fig. 3 *AvSAMS1* 遺伝子高発現シロイヌナズナ形質転換体と非形質転換体 (*Col-0* 株: control line) を用いた AI 処理 (300 mM 処理 2 日間) における DNA のメチル化状況の検討。シロイヌナズナの *At2g34430* 遺伝子にある CG island 配列内の一部についての配列の変化の比較である。例えば右端の T の 15 個余りの連続配列では、4 つの波形に大きな違いが見られる。これらは AI ストレスに起因する C のメチル化や脱メチル化に伴う変化である。

AI dependent difference in DNA methylation between *Col-0* & *SAMS o/x* TF (*At2g34430* gene)

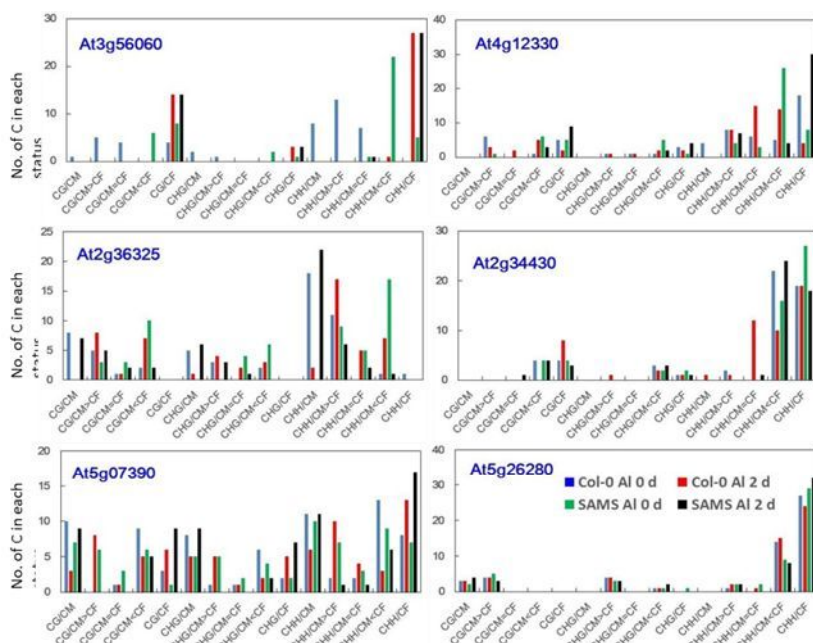


Fig. 4 AI処理後の*AvSAMS1*遺伝子高発現シロイヌナズナ形質転換体と非形質転換体(Col-0株: control line)を用いたmicro arrayで*AvSAMS1*株の方が強く発現抑制された遺伝子6個のDNAのメチル化状況の検討

DNAメチル化を起こすCG、CHG、CHH配列において以下の4つに分類して、算出した。CM;メチル体(100%)、CM>CF;メチル体の方が非メチル体よりも多いもの、CM=CF;両者が同じ程度、CM<CF;非メチル体の方がメチル体よりも多いもの、CF;非メチル体(100%)。

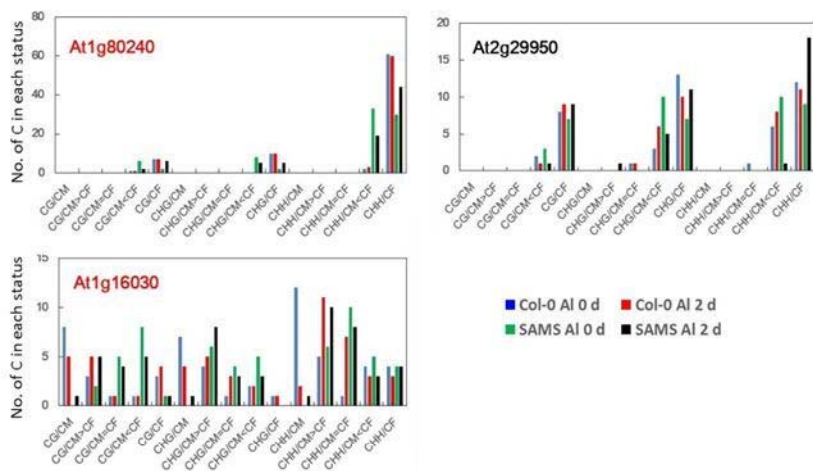


Fig. 5 AI処理後の*AvSAMS1*形質転換体とCol-0株を用いたmicro arrayで*AvSAMS1*株の方が強く発現誘導された遺伝子2個(At1g80240, At1g16030)とAI非依存性恒常発現型遺伝子1個(At2g29950)のDNAのメチル化状況の検討

DNAメチル化を起こすCG、CHG、CHH配列における比の分類や算出方法はFig. 4と同じ。

このことはバイサルファイト処理後のDNAの塩基配列決定がDNAのメチル化状態の微細な違いを検討するのに大変有効な手段であることを示している。そこでこの方法を用いてAI処理または未処理のCol-0、*AvSAMS1*両株由来の上記の8個の遺伝子について部分塩基配列を決定し、さらにその中に存在するCを5つのカテゴリーに分類した(Fig. 4, Fig. 5)。その結果、AI処理により、シロイヌナズナ(Col-0、*AvSAMS1*両株とも)では誘導型、抑制型のどの遺伝子においてもDNAのメチル化と脱メチル化の両者が起こることが明らかとなった。これらは、AIストレス下ではDNAのメチル化修飾に変化が起きることを示している。このような遺伝子発現の制御機構はAIストレスにおいては報告されておらず、初めての知

見である。

ところで当初、6個の抑制型遺伝子について、Col-0株より*AvSAMS1*発現株の方がAI処理によりDNAのメチル化が高頻度にかかるのではないかと予想したが、6つの遺伝子の中にはこの予想に反するものもあった(Fig. 4)。例えば、At4g12330遺伝子では*AvSAMS1*発現株の方で、高い脱メチル化が起きていた。また、At5g26280遺伝子のメチル化の程度は、両株でほぼ同程度であった。メチル化と脱メチル化の部位の総数やこれらの修飾の密度等が個々の遺伝子の発現制御には重要な意味を持つのかかもしれない。今後ともDNAのメチル化状況について検討を続ける必要がある。

5. 将来計画

AIストレス下でのDNAのメチル化修飾現象に関す

る検討と並行して以下の内容についても今後、検討する必要がある。

1) Al ストレスでゲノム DNA と相互作用するヒストン蛋白質にメチル化は起きるか？

エピジェネティックな制御は、DNA のメチル化だけでなく、ヒストンのメチル化でも引き起こされる。Al 処理した *AvSAMS1* 形質転換植物を用いて、ストレス特異的にメチル化されたヒストン/DNA 複合体（クロマチン）をクロマチン免疫沈降法（ChIP 法）で回収し、どの DNA 断片がメチル化ヒストンと結合しているかを検討する予定である。

2) メリケンカルカヤを用いたストレス下でのエピジェネティックな制御の確認

メリケンカルカヤの Al 耐性機構においても、メチル化を介してエピジェネティックな制御が起きているのかをこの植物から抽出したゲノム DNA を用いて、バイサルファイト処理と PCR の併用法で確認する。

6. 謝辞

本研究は平成 25 年度ウエスコ学術振興財団 学術研究費助成事業からの助成を受けて進めた。ここに山地理事長始め、財団の関係者に厚くお礼を申し上げる。またマイクロアレイでの解析では金沢大学学際科学実験センター 西内 巧 博士、岡山大学 資源植物科学研究所 西村秀希氏に協力して頂いた。さらに研究全般において稲田真利さん、内海かおりさんに研究支援して頂いた。各氏にも心からお礼、申し上げる。

7. 引用文献

- 1) Ezaki, B. et al., 2008. Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metal stresses and oxidative stresses. *Plant Cell Reports* 27, 951–961.
- 2) Ezaki B. et al., A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to a wild species of Poaceae, *Andropogon virginicus* L. *Environmental and Experimental Botany*. 2013. 93. 35-44.
- 3) Steward N. et al., Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress.

J Biol Chem 2002, 277: 37741–37746.

4) Yuguang S. et al., The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. *PLoS ONE*, 2012, 7, e41274, doi:10.1371/journal.pone.0041274

5) Xiufang O. et al., Transgenerational Inheritance of Modified DNAMethylation Patterns and Enhanced Tolerance Induced by Heavy Metal Stress in Rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS ONE* 2012, 7: e41143. doi: 10.1371/journal.pone.0041143

6) Murashige T., Skoog F., (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497

澱粉粒子の形を決める分子群の網羅的同定

(所 属) 岡山大学資源植物科学研究所

(氏 名) 松島 良

澱粉は植物が光合成産物として合成したグルコースの多量体であり、我々人のエネルギー源(主食)である。また、澱粉は主食としてだけでなく、加工澱粉(化学修飾をした澱粉)という形で食品添加剤(増粘剤、安定剤、ゲル化剤)として広く食品に利用されている。澱粉は細胞の内部では不溶性であり、細胞内部で直径1–100 μm 程度の粒子を形成する。この粒子は「澱粉粒」と呼ばれている。グルコースという構成成分は同じであるが、澱粉粒の形状や大きさは植物種によって異なる。澱粉粒の形状が異なれば、その物理化学的な性質も異なる。したがって、新しい形状の澱粉粒を創出することは、新規食品素材の開発にもつながると思われる。また、澱粉粒の大きさは、加工澱粉の製造効率ならびに機能性を限定する因子である。例えば、澱粉粒の大きさは溶液中の沈殿性と正の相関を示し、大型の澱粉粒の方がより精製歩合が大きいという現状がある。本研究では、研究代表者が独自に開発した澱粉粒の簡便観察法を駆使して、澱粉粒の形状が野生型とは異なる突然変異体(ssg; *substandard starch grain*)の単離を行なった。得られた ssg 変異体群の解析を行なうことにより、澱粉粒子の形を決める分子群の同定を試みたので報告する。

穀類の胚乳はその90%以上は澱粉から構成されており、可食部として重要な組織である。澱粉はヨウ素溶液によって紫色を呈するため、胚乳の細胞の薄切切片を作成し、ヨウ素溶液で染色すると、細胞の内部の大半が澱粉粒で専有されていることが観察できる(図1)。イネの場合は、1つの澱粉粒が複数個の澱粉小粒から構成される複粒型澱粉粒を発達させている(ちなみに、オオムギやコムギ、トウモロコシの胚乳は、1つの澱粉小粒から構成される単粒型澱粉粒を発達させる)。

研究代表者は、これまでに種子の胚乳に含まれる澱粉粒の形状を簡便に観察できる方法(以下、簡便法)を開発している(図2)。簡便法ではまず、ピペットマン用の使い捨てプラスチックチップ(200 μL 用)の先端をハサミで切断し、切断部位にイネの種子をはめ込み固定する。次に、種子を保持したチップを電子顕微鏡用のブロックトリミング台に固定した。ブロックトリミング台を実体顕微鏡の下に置くことにより、拡大観察しながら種子のトリミングならびに切片作成を行える。トリミングや切片作成はカミソリを用いて行った。トリミングするときの腕や指、

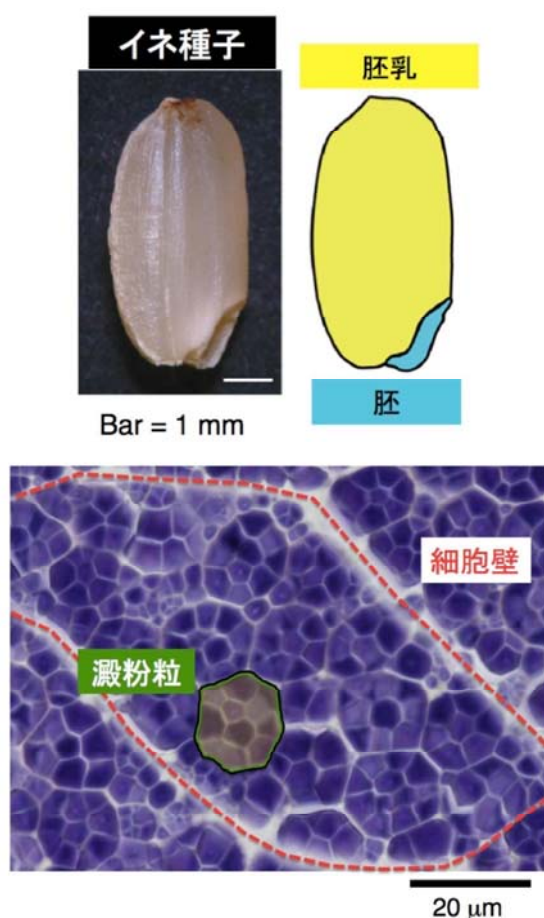


図1



図 2

カミソリの位置を図 2 (Matsushima et al. 2010 より改変) に示す。ブロックトリミング台は、左手の薬指と小指で挟んで固定し、右手の人差し指と親指でカミソリを保持する。トリミングの際には、カミソリは種子に対して水平の角度にする。切片作成時には、腕や指の位置はトリミング時と同様であるが、カミソリは 30 度くらい傾ける。トリミングで作成した表面をそぐようにして切片を作成する。胚乳表面から削り取った薄い切片は、ピンセットで回収してスライドガラス上でヨウ素溶液と反応させて顕微鏡観察を行う。簡便法の作業は簡単であり多試料の観察が可能である。また、種子をチップに固定する時に胚の部分は下にすると、切片作成後にも胚は無傷であるため、その種子から植物を育成できる。簡便法では、従来の樹脂切片法において必要な化学固定処理を必要としないため、澱粉粒を検鏡した後の種子を播種し生育させることができる。この利点は、次項で述べるデンプン粒の形状に異常を示す突然変異体の単離につながった。

研究代表者は、上記の簡便観察法を用いて、澱粉粒が野生型(Nipponbare)と異なる突然変異体のスクリーニングを行い、6 系統を単離している。変異体は規格外の澱粉粒という意味の *substandard starch grain* (*ssg*)と名付けた (図 3, Matsushima et al. 2010 より改変)。Nipponbare の胚乳では、直径 10-20 μm の複粒型澱粉粒が観察されるのに対して、*ssg1*、*ssg2*、*ssg3* 変異体では直径 10 μm 以下の単粒のような澱粉

粒が多数観察された。また、*ssg4* ならびに *ssg6* 変異体では直径 30 μm 以上の巨大な複粒型澱粉粒が観察された。*ssg5* 変異体では、澱粉粒の複粒構造に異常を示しており、様々な形状を示す澱粉粒が観察された。一部ヨウ素溶液の染色性が低下していた。

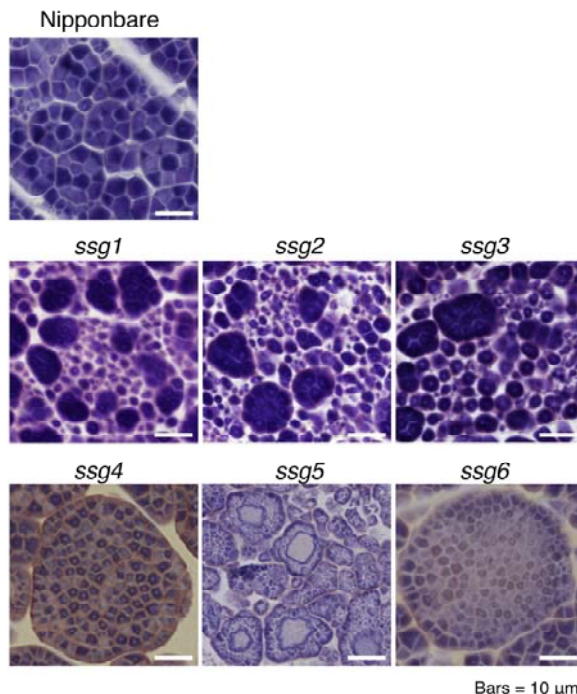


図 3

マップベースクローニングを行い、*ssg1* の原因遺伝子の同定を行った。その結果、第二染色体上の Os02g0528200 遺伝子の 12 番目のイントロンのスプライシング受容塩基に塩基置換を見出した (data not shown)。*ssg1* と澱粉粒の形状が類似している *ssg2*、*ssg3* 変異体においても、Os02g0528200 遺伝子の塩基配列を決定したところ、同遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基置換を見出した。このことから、Os02g0528200 遺伝子は澱粉粒の形状を決定する遺伝子であると決定した。Os02g0528200 遺伝子は、アミロペクチンの α 1-6 結合の合成を担う Branching enzyme IIb (BEIIb)をコードしていた。BEIIb は、アミロペクチンの分枝構造を作るために重要な酵素である。BEIIb が欠損すると、分枝構造が減るため、アミロペクチンの短鎖が減り、長鎖が増えることが予想された。そこで、*ssg1* のアミロペクチンの鎖長分布をキャピラリー電気泳動法で解析した (図 4, Matsushima et al. 2010 より改変)。その結果、*ssg1* の

アミロペクチン DP15 以下の短鎖が減り、DP15-35 くらいの長鎖が増加していることが分かった。*ssg2*、*ssg3* 変異体でも同様の結果を得ている (data not shown)。このことは、アミロペクチンの構造変化が澱粉粒の形状変化につながっている事を意味する。

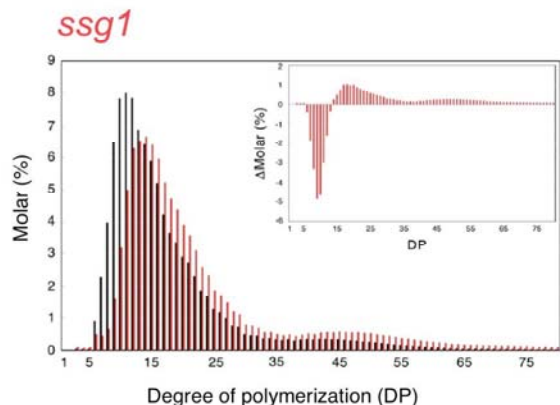


図 4

一方、アミロース合成酵素の変異によりアミロースが欠失するもち米 (*waxy* 変異体)の澱粉粒の形状は野生型(うるち米)と類似している(ヨウ素の染色性は異なる, data not shown)。つまり、アミロースの有無は澱粉粒の形状に影響しないと考えられる。

研究代表者はさらに、巨大化した澱粉粒を発達させる *ssg4* 変異体の解析を進めた。*ssg4* 変異体では種子が安定して乳白色を呈する(図 5, Matsushima et al. 2014 より改変)。*ssg4* 変異体の胚乳の澱粉粒は、日本晴と比較して直径約 6 倍に達することが分かった。

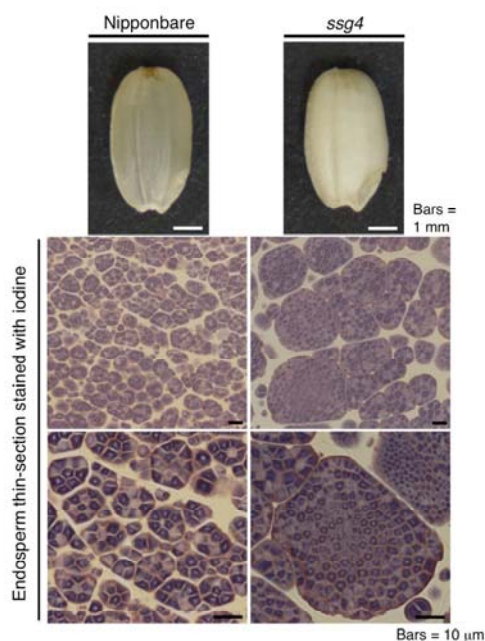


図 5

また、澱粉粒の数が野生型よりも *ssg4* 変異体では減少していた。このことから、*ssg4* 変異は、澱粉粒の数を減らし、大きさを増加させる変異であると言える。このような表現型を示す変異は、どの植物種においても報告されていない。また、玄米に含まれるスクロース(Sucrose)ならびにグルコース(D-glucose)が増加している事を発見した(図 6, Matsushima et al. 2014 より改変)。

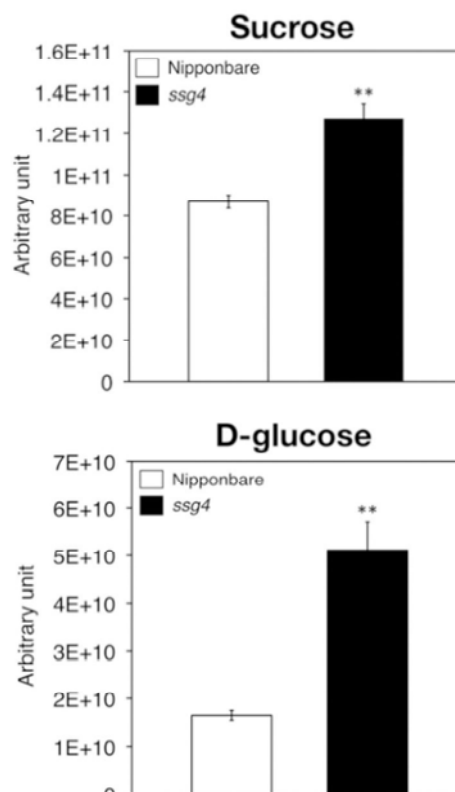


図 6

イネの種子は、約 1 ヶ月の登熟期間を経て完熟する。登熟期間には、胚乳内部に大量の澱粉粒が形成される。そこで、*ssg4* 変異体において、登熟期間のどの時期に野生型(Nipponbare)よりも巨大化した澱粉粒を形成し始めるのかを調べた。登熟初期(開花後 3~7 日目, 3-7 DAF [day after flowering])に注目し、登熟胚乳の澱粉粒の大きさと数を定量化を試みた。定量化のために、化学固定した登熟種子から薄切切片を作成しヨウ素染色により澱粉粒を可視化した。撮影した写真から画像処理法を用いて定量化を行なった。その結果、開花後 3 日目(3 DAF)の段階で既に、澱粉粒の大きさは巨大化していた。また、細胞あたりの澱粉粒の数は、登熟初

期のどの時期においても *ssg4* 変異体で減少していた (図 7, Matsushima et al. 2014 より改変)。これらの表現型は、*SSG4* 遺伝子は登熟初期に働く遺伝子であることを示唆している。

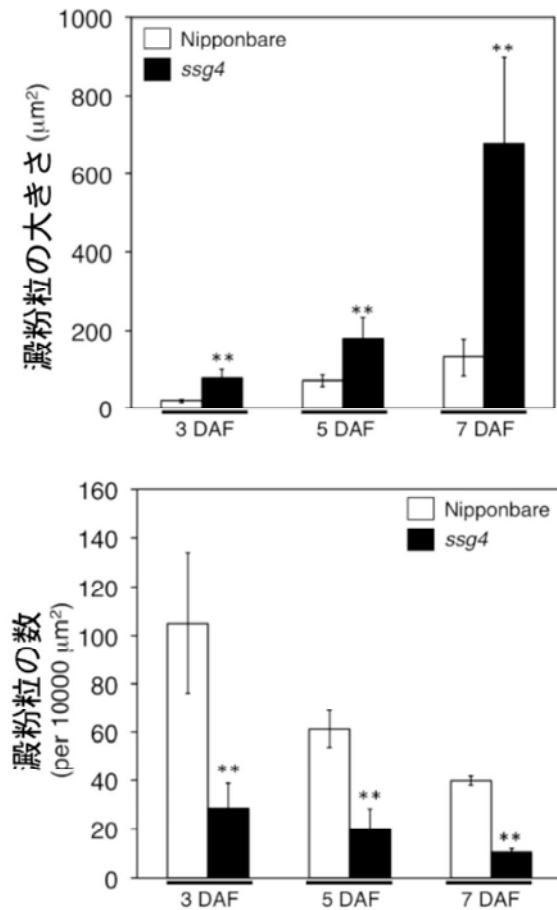


図 7

次に、マップベースクローニング法を行い、*ssg4* 変異体の原因遺伝子(*SSG4* 遺伝子)を同定した。詳細は省略するが、*ssg4* 変異体の *Os01g0179400* 遺伝子内に塩基置換を発見した。この塩基置換はアミノ酸置換を伴うものであった(data not shown)。次に、野生型の *Os01g0179400* 遺伝子を *ssg4* 変異体に形質転換したところ (コンプリメンテーション系統)、コンプリメンテーション系統 1 ならびに 2 の胚乳では巨大化した澱粉粒が見られず、大きさは野生型と同様の澱粉粒が観察された (図 8, Matsushima et al. 2014 より改変)。この事は、*Os01g0179400* 遺伝子が確かに *SSG4* 遺伝子であることを意味している。*SSG4* タンパク質は、イネにおいて 11 番目の大きさである。その大きさに関わらず、*SSG4* タンパク質内には、

DUF490 という機能が分かっていないドメインが存在する以外、機能が推定できる領域は存在しなかった。また、系統樹解析の結果、*SSG4* 遺伝子のホモログは、シアノバクテリア、緑藻類、高等植物に存在することが分かった(図 9, Matsushima et al. 2014 より改変)。しかし、機能が解析された例は皆無であった。*SSG4* 遺伝子に変異が起これば、胚乳の澱粉粒が巨大化することが分かった。つまり、*SSG4* 遺伝子は、澱粉粒の大きさを制御する遺伝子であると言える。胚乳の澱粉粒の大きさを制御する遺伝子の同定は過去に例がなく、*SSG4* 遺伝子が最初の例である。

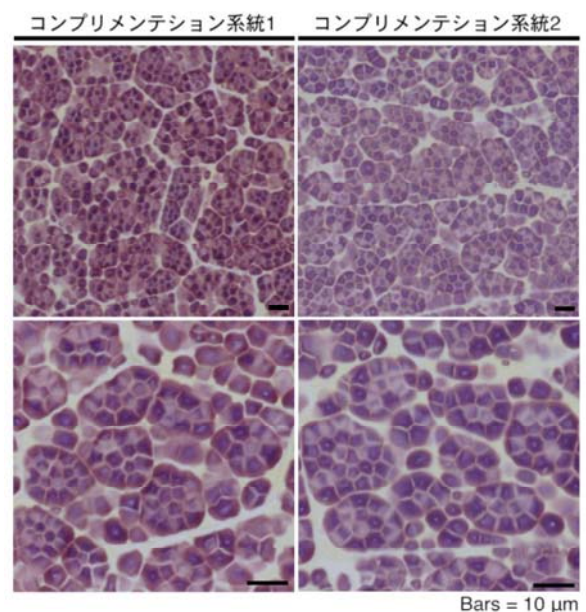


図 8

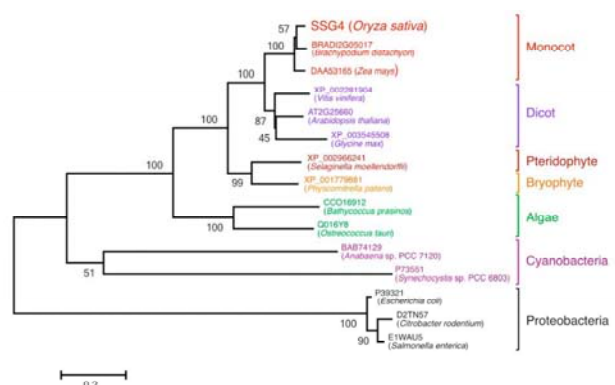


図 9

SSG4 遺伝子がどの組織において多く発現しているかを調べるために、Real time RT-PCR 法を用いて、Nipponbare における *SSG4* mRNA の蓄積量を様々な

組織で定量化した(図 10, Matsushima et al. 2014 より改変)。その結果、Nipponbare のほぼすべての組織において *SSG4* 遺伝子の発現は確認された。中でも、開花後 4 日目から 7 日目においては、強く発現が誘導されていることがわかった。*ssg4* 変異体では、登熟初期において既に澱粉粒の巨大化がおきており(図 7)、*SSG4* 遺伝子の発現部位と *ssg4* 変異体の表現型の有無とが一致することが分かった。

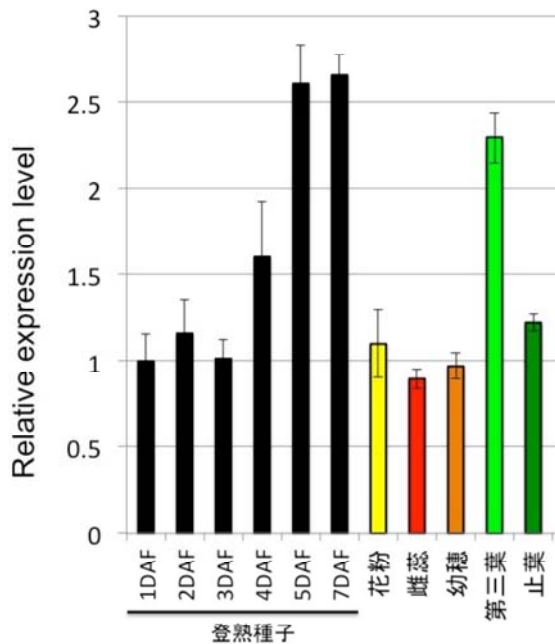


図 10

ssg4 変異体は、胚乳において澱粉粒が巨大化するイネの突然変異体である。澱粉粒の大きさが巨大化する変異体は、他の作物種においては現在まで報告されていない。*SSG4* と相同遺伝子は、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、ソルガムなど他の作物種においても存在する。この事は、他の作物種においても *SSG4* ホモログ遺伝子の働きを調節することによって、他の植物種においても澱粉粒の大きさを自由に制御できることを意味する。特に単粒型澱粉粒を発達させる作物種においては、*SSG4* 遺伝子の今後の応用可能性は高いと思われる。さらに、研究代表者は、*ssg4* 変異と同様に澱粉粒が巨大化する別に変異体 (*ssg6* 変異体)を同定し、原因遺伝子候補の単離にも成功した (Data not shown)。澱粉粒の大きさを制御する遺伝子群

の同定が今後もつづけば、澱粉粒の大きさの人為的な制御はもっと安易になると思われる。また、現在得られた変異体を交配し多重変異体の作出にも取り組んでいる。例えば、*ssg1ssg4* 二重変異体、*ssg4ssg6* 二重変異体などを作成している。これらの変異体の澱粉特性を調べる事で、新しい物性の澱粉粒の創出につながる事が期待できる。本研究で作出されたイネの系統が、基礎研究の枠を超えて、応用に結びつくことができれば、望外の喜びである。

引用論文

Matsushima R. et al. (2010); A Rapid, Direct Observation Method to Isolate Mutants with Defects in Starch Grain Morphology in Rice, *Plant Cell Physiology* 51: 728-741.

発表論文

本研究成果は、研究助成期間内に下記の国際科学雑誌に掲載された。

Matsushima R. et al. (2014); Amyloplast-localized SSG4 protein influences the size of starch grains in rice endosperm, *Plant Physiology*, 164: 623-636.

謝辞

本研究に、多大なご支援を頂いた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に心より感謝申し上げます。

オオムギを用いたヒメトビウンカの越冬時防除に関する基礎的研究

岡山大学資源植物科学研究所

園田昌司

ヒメトビウンカは水稻の害虫として知られている。本種はイネ科の植物上で冬を越す。そのため、越冬時の密度抑制は本種の防除において非常に重要である。本研究では、岡山大学資源植物科学研究所において保存されているオオムギコアコレクション 119 品種におけるヒメトビウンカ幼虫の発育を調べた。その結果、羽化率の低くなる 24 品種が選抜された。そのうち、発芽率が高く、かつ生育速度に大きな違いのない 13 品種におけるヒメトビウンカ成虫の生存期間を調べた。その結果、3 品種において雄の生存期間が、1 品種において雌の生存期間がコントロール品種(はるな 2 条)よりも有意に短くなることが明らかとなった。これらの品種はヒメトビウンカに対して何らかの抵抗性機構を備えていると考えられた。

1. 緒言

イネウンカ類(トビイロウンカ、セジロウンカ、ヒメトビウンカ)は古くから水稻の害虫として知られており、その防除のために様々な殺虫剤が開発されてきた。特に、1990 年代初頭に開発されたネオニコチノイド剤とそれに続くフェニルピラゾール剤による育苗箱施用の普及により、イネウンカ類の発生面積は大きく減少し、長い間小発生傾向が続いてきた。しかしながら、近年再びイネウンカ類の多発頻度が高まってきた。これにはネオニコチノイド剤やフェニルピラゾール剤に対して抵抗性を発達させたイネウンカ類の中国からの飛来と国内産麦の生産拡大が大きく関与していることが分かってきた。ヒメトビウンカは、トビイロウンカやセジロウンカとは異なり、オオムギを含めたイネ科植物を寄主として越冬することが可能である。そのため、越冬中のイネ科作物における密度を抑制することはヒメトビウンカ防除において非常に重要であると考えられるが、これまで具体的な研究は全く行われていない。

岡山大学資源植物科学研究所には世界中から収集されたオオムギの在来種、育成品種・系統、実験系統、野生系統など約 1 万 4 千点が保存されており、うち約 5000 点が研究に利用可能である。これらの中にはヒメトビウンカに対して抵抗性を示す系統が含まれている可能性がある。

本研究では、ヒメトビウンカをオオムギのコアコレクション(極少数の品種で遺伝的多様性をカバー

するコレクションのこと)に接種し、幼虫の発育および成虫の生存期間を調べた。

2. 材料および方法

2.1. オオムギ

実験に用いたオオムギのコアコレクション 272 品種およびコントロール品種(はるな 2 条)は岡山大学資源植物科学研究所大麦・野生植物資源研究センターより入手した。

2.2. ヒメトビウンカ

実験に用いたヒメトビウンカは農研機構九州沖縄農業研究センターより入手した。ヒメトビウンカの飼育条件は 25℃、16L8D とした。

2.3. オオムギ品種がヒメトビウンカ幼虫の発育に及ぼす影響

各オオムギ品種の種子を 4℃、暗黒下にて水道水で湿らせたろ紙上で発芽させた。発芽したオオムギ品種(119 品種)の苗を、25℃、16L8D 条件にて試験管内(内径 2cm × 高さ 20cm)で水耕栽培し、分けつ期の苗を実験に用いた。孵化後 24 時間以内の 1 齢幼虫を試験管あたり 5 頭の密度でオオムギ苗 3 本に放飼し、成虫羽化まで飼育した。これによりヒメトビウンカ幼虫の生存率の低いオオムギ系統 24 品種を選抜した。

選抜したオオムギ 24 品種とはるな 2 条については、

孵化後 24 時間以内の 1 齢幼虫を試験管あたり 1 頭の密度でオオムギ苗 1 本に放飼し、成虫羽化まで飼育し、幼虫期生存率と短翅型率を求めた。

2. 4. オオムギ品種がヒメトビウンカ成虫の生存期間に及ぼす影響

上記オオムギ系統 24 品種のうち、発芽率が高く、かつ生育速度に大きな違いのない 13 品種とはるな 2 条の種子を 4℃、暗黒下にて水道水で湿らせたろ紙上で発芽させた。発芽したオオムギ苗を、25℃、16L8D 条件にて試験管内で水耕栽培し、分けつ期の苗を実験に用いた。羽化後 24 時間以内の長翅型成虫を雌雄に分けて試験管あたり 1 頭の密度でオオムギ苗 1 本に放飼し、生存日数を調べた。

3. 結果および考察

入手したコアコレクション 272 品種のうち、発芽したものは 119 品種であった。発芽した品種の数が少なかった原因は不明である。また、発芽後の生育速度が品種間で大きく異なり、実験遂行において大きな問題となった。それでも、予備的ではあるが、発芽した 119 品種およびはるな 2 条の苗にヒメトビウンカ 1 齢幼虫を放飼し、幼虫発育を調べ、さらなる試験に用いるコアコレクション 24 品種を選抜した(未発表)。

ヒメトビウンカ孵化幼虫のコアコレクション 24 品種およびはるな 2 条の苗上における幼虫期生存率は 0%～50%と品種によって異なった(第 1 表)。

羽化率が 50%以上であったのは、はるな 2 条と 34 のみで、それ以外の品種における羽化率は低かった(第 1 表)。

ヒメトビウンカ長翅型成虫のコアコレクション 13 品種およびはるな 2 条の苗上における生存日数を第 2 表に示した。コアコレクション 13 品種の原産地の内訳はネパール 4 品種、欧州 3 品種、南西アジア 2 品種、韓国 2 品種、中国 1 品種、トルコ 1 品種である(第 2 表)。雄成虫と雌成虫の生存期間はそれぞれ、3.5 日～7.7 日、4.7 日～8.7 日であった。これら 13 品種はいずれもヒメトビウンカの幼虫発育に不適な品種として選抜されたものであるが、特

第1表 オオムギ品種におけるヒメトビウンカ幼虫の発育特性

品種名	条性	n	幼虫生存率 (%)	短翅率 (%)	死亡個体の生存期間(日)
はるな2条	2	10	50	60	6.8±5.4
32	6	2	0	-	3
34	6	10	50	0	12.4±6.3
73	6	10	10	0	8.8±3.5
99	6	1	0	-	1
109	6	11	36.4	50	13.1±5.2
138	6	3	0	-	13.3±4.9
145	6	10	20	50	9.9±3.7
157	6	8	0	-	4.8±7.1
164	6	10	10	0	3.9±4.0
172	6	10	0	-	7.2±4.8
174	6	9	11.1	0	7.5±8.8
177	6	12	16.7	50	12.4±4.1
183	6	3	0	-	2.0±1.0
187	6	4	25	0	1.7±0.6
196	6	10	10	0	10.7±2.8
207	6	10	0	-	5.7±6.2
215	6	7	28.6	50	11.0±6.8
220	2	8	0	-	2.5±4.2
222	6	4	0	-	6.8±4.3
224	6	10	30	33.3	10.6±2.4
225	2	8	25	100	11.2±3.4
233	6	4	0	-	2.3±2.5
262	2	9	22.2	50	4.6±4.0
271	2	3	0	-	1

第2表 オオムギ品種におけるヒメトビウンカ長翅型成虫の生存日数

品種名	n	雄成虫の生存日数	n	雌成虫の生存日数	原産地
はるな2条	20	7.7±4.7a	11	8.7±2.8a	日本
73	7	7.3±3.6a	11	7.6±2.7a	南西アジア
164	8	5.3±1.6a	8	4.8±1.7a	韓国
172	10	4.0±2.0b	10	4.7±1.6a	ネパール
174	12	3.8±2.0b	12	7.1±4.8a	ネパール
177	11	3.5±1.9b	8	7.1±5.4a	ネパール
196	7	5.4±2.6a	4	5.5±1.7a	トルコ
32	6	3.5±1.2a	6	8.2±7.0a	中国
157	9	4.3±2.3a	8	5.6±2.1a	韓国
183	8	4.4±1.8a	7	5.3±1.7a	ネパール
207	10	4.7±3.2a	11	5.1±2.5b	欧州
99	3	7.3±6.7a	3	6.7±3.1a	南西アジア
220	4	7.3±2.2a	-	5	欧州
233	5	5.4±1.1a	3	8.0±1.7a	欧州

異なるアルファベットは統計学的に有意に異なることを示す(Tukey-test, $p < 0.05$)。

にネパール原産の 172、174、177、欧州原産の 207 は成虫の生存日数のはるな 2 条における日数よりも有意に短くなっており、ヒメトビウンカに対して何らかの抵抗性機構を備えていると考えられた。

ヒメトビウンカは長い間、トビイロウンカやセジロウンカとは異なり、海外からの飛来はないと考えられてきた。ところが、2008 年、ヒメトビウンカの中国からの飛来が農研機構九州沖縄農業研究センターのグループによって初めて確認された。現在、イネウンカ類の防除には主にフェニルピラゾール剤とネオニコチノイド剤が使用されている。もともと日本の系統は前者に抵抗性を示し、中国の系統は後者に抵抗性を示すことが知られていた。中国からネオニコチノイド剤に抵抗性の個体群が飛来し、日本の

個体群と交配すれば、両殺虫剤に抵抗性を発達させたヒメトビウンカが生じることとなる。しかも、ヒメトビウンカは他のイネウンカ2種とは異なり、越冬する。すでに2009年以降、一部の地域で両殺虫剤に抵抗性を示す個体群の出現が報告されている。さらに、国内産麦の生産拡大に伴い、ヒメトビウンカの媒介するイネ縞葉枯病も多発傾向にある。このような状況において、越冬時のヒメトビウンカ対策は非常に重要である。オオムギは冬草の一種であり、ゲノムの解読も完了していることから、ヒメトビウンカの越冬時防除の研究を行う上で最適なイネ科作物といえる。

イネではヒメトビウンカと同じくカメムシ目ヨコバイ亜目に属するツマグロヨコバイに対して抵抗性を示す複数の品種の存在が知られている。そのような品種ではツマグロヨコバイの排泄する甘露量や吸汁行動が変化することが知られている。本研究において、ヒメトビウンカの幼虫発育、成虫の生存に不適なオオムギ品種を選抜することができた。しかしながら、配布された種子数に限りがあったこともあり、成虫の増殖に及ぼす影響を調べることが出来なかった。今後はこれらの品種に雌雄の成虫を接種し、産卵数、孵化率を調査する予定である。また、ヒメトビウンカの排泄する甘露の解析や吸汁行動を電氣的に測定し、オオムギ品種の抵抗性機構について解析を進める予定である。

岡山市中心市街地における来街者回遊行動特性に関する研究

岡山大学廃棄物マネジメント研究センター

氏原 岳人

本研究では、岡山県岡山市の中心市街地内の二つの商業エリアに着目して、来街者の回遊行動を来街者調査によって把握すると同時に、その発生要因を明らかにした。得られた結果は以下のとおりである。1) 岡山市中心部の「岡山駅エリア」あるいは「既存商店街エリア」を訪れた来街者のうち、両エリアを回遊する来街者は約 21%である。また、エリア間の回遊行動には、年齢や市街地内の交通手段、来街頻度、同伴者などが影響している。2) 最初にどちらのエリアに立ち寄るかで、エリア間回遊する来街者の特性に大きな差異が見られた。これは、エリア間回遊を促す際に、地域性に合わせた施策が効果的であることを示唆している。3) 各エリアを起点とする回遊行動には、ターゲットとする年齢層や交通利便性が影響する。一方で、エリア間回遊する層は、両エリア共通して比較的高頻度で中心部を訪れる来街者である。

1. 序論

近年、我が国の地方都市では、モータリゼーションの進展や商業機能をはじめとする諸機能の郊外部への流出による中心部の衰退が都市の成熟化に伴う問題として捉えられており、中心市街地では来街者が減少し、賑わいが失われつつある。このような背景のもと、2006 年に中心市街地活性化法が改正施行され、平成 26 年 3 月の時点で全国 119 市において「中心市街地活性化基本計画」が認定されている¹⁾。とりわけ、多くの地方自治体では、まちなかの賑わい創出の一環として、来街者の回遊性向上を重視した計画が掲げられている。例えば、鹿児島市では、新たなアーケードの拡充によって商店街と周辺の大規模商業施設をまとめて一つのショッピングモールとして捉え、回遊性の向上を図る試み²⁾などが見られる。

一方で、多くの地方都市において、古くからの既存の商店街を中心とした商業エリアを有しながらも、駅周辺の再開発によって駅ビルなどを中心とした新たな商業エリアが形成され、同一の中心市街地内に複数の商業エリアを有する都市構造の変化が発生している。加えて、これらの商業核の形成経緯からみても、商業エリアの特徴がそれぞれ異なる場合が多く見られる。この傾向は、全国各地の地方都市で確認されており、前述の鹿児島市や、富山市、高松市、西条市、下関市などの地方都市でも、それぞれが策定している中心市街地活性化基本計画の中で、再開

発の進む駅前エリアと既存商店街エリアを対象とした回遊性向上に関する目標の設定や事業の計画が行われている。言い換えれば、同一中心市街地におけるこれら商業エリアの回遊性の向上が中心市街地全域の活性化につながる重要な課題となっている。

本研究においてケーススタディとする岡山市においても、中心市街地内に複数の商業エリアを有する都市構造を有している。これまでの岡山市は、表町商店街など既存の商店街を中心とする「既存商店街エリア」と、岡山駅を中心に形成され、再開発が活発に行われている「岡山駅エリア」を商業の中心として発展してきた。岡山市では現在、岡山市中心市街地活性化基本計画策定検討委員会を設置し、検討を図ると同時に、中心市街地活性化政策パッケージを発表し、中心市街地の活性化のためにこれらのエリア間の回遊性向上について検討している³⁾。なお、「岡山駅エリア」内には、2014 年 11 月に大型ショッピングセンターの開業が控えており、近い将来、岡山市中心市街地の来街者の回遊行動には変化が生じることが懸念されている。このような状況のもと、既存の商業集積を生かし、岡山市中心市街地のさらなる賑わい創出を図るためには、両エリア間の回遊性向上が重要な視点の一つになると考えられる。

これまで中心市街地内の回遊行動に関する既存研究は数多く見られ、後述するように、街路などの空間構成と回遊行動との関係を明らかにした研究⁴⁾や、

店舗分布と回遊行動との関係を明らかにした研究⁵⁾などが実施されている。対して、複数の商業エリア間を横断的に回遊する来街者に着目した研究は存在するものの⁶⁾、その調査・研究の蓄積は十分ではなく、先に述べた地方都市の課題として挙げられる一方で、中心市街地内におけるエリア間の回遊行動の実態については不明な点が多い。

そこで、本研究では、他都市と同様の課題を抱える岡山県岡山市の中心市街地を対象として、来街者の回遊行動を緻密に把握するための来街者調査を独自に実施し、形成経緯の全く異なる二つの商業エリアに着目して、来街者のエリア間の回遊行動の実態とその発生要因を定量的に明らかにする。具体的には、まず1) 2012年に実施された第4回パーソントリップ(PT)調査及び、2013年に行った歩行量調査結果に基づき、岡山駅エリア及び既存商店街エリアの来街者特性を明確する。その上で、2) 回遊行動に関する来街者調査を用いて、回遊行動と来街者特性との関係を把握する。最後に、3) 来街者特性をパラメーターとする回遊行動要因モデルを回遊パターンごとに構築して、本研究の目的を達成する。

2. 本研究の位置づけ

(1) 既存研究レビュー

商業エリア内の回遊行動に関する研究は数多くなされており、街路などの空間構成に着目した研究として、溝上ら⁴⁾の研究では、市街地の空間構成と歩行者の回遊行動との関係を明らかにしている。また、店舗分布などの店舗構成に着目した研究として、石川⁵⁾の研究では、店舗分布と来街者の回遊行動を分析し、中心市街地の歩行量を増加させる条件を明らかにしている。これらのような回遊行動と空間構成、店舗構成との関係に関する研究は数多くなされていることが分かっている。

その一方で、市街地内の複数拠点を対象として、それらエリア間の回遊行動に着目した研究は、辰巳ら⁶⁾の来街者の回遊行動及び消費行動を分析するとともに、大型商業施設の開業による来街者の回遊行動と意識の変化を明らかにした研究や、齋藤ら⁷⁾の福岡市都心部で実施された大規模再開発前後におけ

る各エリア間の回遊行動の変化量を分析などがあるものの、その研究蓄積は十分とはいえない。

(2) 本研究の特長

- 1) 地方都市中心部の重要な課題として位置づけられているものの研究蓄積が十分ではない“市街地内のエリア間回遊行動”に着目した研究である。
- 2) 中心市街地内(約 360ha)の横断的な回遊行動を捉えるために、来街者 1,635 名を対象とした大規模かつ詳細な回遊ルート特定調査を実施している。
- 3) 上記調査結果に基づき、独自の判読フローによる回遊行動の類型化を通じて、市街地内のエリア間の回遊行動の実態を分かりやすく定量的に示している。また、特性の異なる商業エリアを対象としており、それらが起因する特徴的な回遊行動を明らかにしている。

3. 分析対象地域と来街者調査の概要

(1) 分析対象地域の概要

岡山市の中心市街地では、モータリゼーションの進展等によって事業所や大型商業施設の郊外立地化、それに伴う都心部の空洞化が進み、中心市街地の機能及び商業力の衰退などが問題となっており⁸⁾、まちなかの歩行量は減少傾向にある⁹⁾。本研究では、中心市街地を岡山市都市計画マスタープランに記載される重点整備エリア¹⁰⁾と定義した上で分析を行う。中心市街地を図-1に示す。中心市街地には「既存商店街エリア」と「岡山駅エリア」の2つの商業エリアが存在している。

「既存商店街エリア」は表町商店街を中心に形成されたエリアである。その歴史は古く、岡山城下の商人町を起源としており、岡山の商業中心地として確固とした地位を築いていたが、現在は個人商店主の高齢化などによる空き店舗の増加など商店街の活性化が課題となっており、エリア一帯の衰退も懸念されている。

「岡山駅エリア」は岡山駅を中心として再開発が活発に行われているエリアである。その歴史は比較的浅く、ここ十数年の間も駅ビルの建設など再開発が相次いで行われており、若者を中心に賑わうエリアとして形成されている。「なお、各エリアの中心で

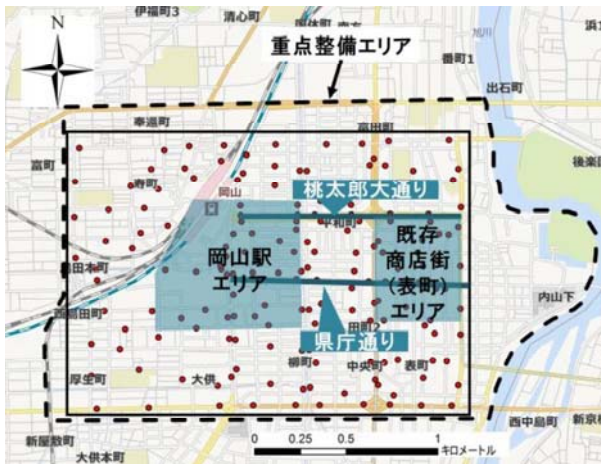


図-1 調査対象地域及び調査地点

ある岡山駅と表町商店街は約 1km の距離を置いて位置している。公共交通機関としては路線バスや路面電車などが整備されている。

(2) 各商業エリアの特性の把握

2012年に岡山市・倉敷市・総社市を対象として行われた第4回パーソントリップ調査の結果を用いて各エリアの買い物目的の来街者特性を把握する⁴⁾。なお、グラフは紙数の関係上省略する。年齢構成は、「既存商店街エリア」では60代以上の割合が23.2%と最も高く、次いで40代が17.8%となっている。これに対し「岡山駅エリア」では20代が32.8%と最も高く、次いで10代以下が18.3%となっており、「既存商店街エリア」には中高年層が、「岡山駅エリア」には若年層がそれぞれ集中しているという現状がうかがえる。代表交通手段分担率は、「既存商店街エリア」では自動車の割合が61.7%と最も高く、次いで公共交通が15.6%を占めており、「岡山駅エリア」では自動車が50.3%と最も高く、次いで公共交通が30.5%を占めていた。両エリアとも自動車での来訪が高いが、鉄道利便性の面から、「岡山駅エリア」で相対的に低くなっている。平均滞在時間に関しても、両エリアとも2時間弱であり、中心市街地の他のエリアと比較して長い傾向にあった。

次に、溝上ら⁴⁾の研究において実施された調査を参考に、移動式交通量調査(ゲートカウント調査)を行う。この調査は多くの調査地点の確保による、広範囲かつ高密度な調査が可能という点が特徴である。方法として、対象地域内に175の調査地点を設け、1エリア7地点の全25エリアに分ける。調査員1人が



図-2 歩行者分布(休日)

各1エリアを担当し、各地点5分間だけ計測し、移動しながら1時間に7地点の計測を行う。以上の調査を1日に7回(実7時間)繰り返し、各地点の時間別歩行量を推計した。

図-2によると、「既存商店街エリア」と「岡山駅エリア」への歩行量の集中が顕著に表れていることが分かる。さらに、「桃太郎大通り」と「県庁通り」の歩行量が多くなっていることから、主にこれらの通りがエリア間を結ぶ役割を果たしていると考えられる。2つの通りの位置は図-1に示した。なお、この歩行者分布の状況は時間別、年齢層別についても同様に見られた。また、各エリアで歩行量が多い上位4地点を抽出し、その合計を比較すると、「岡山駅エリア」では「子供・若者」「社会人・主婦」の歩行量が多いのに対し、「既存商店街エリア」では「高齢者」の歩行量が多いことが分かった。以上のことから、それぞれのエリアに集中する年齢層には違いがあり、中心市街地内には特性の異なる二極のエリアが存在していると言える。

(3) 来街者調査の概要と回遊行動の判読方法

岡山市の中心市街地における来街者の横断的な回遊行動を捉えるために、独自に来街者調査を実施した。その概要を表-2に示す。1,635名の来街者を対象としており、調査項目の中には中心市街地全域を対象範囲として実際の移動ルート(調査地点までの移動ルート及び、調査地点からの移動予定ルート)を書き込む項目を設けた。これにより、広範囲を対象とした来街者の移動ルートを経路レベルにて特定した。また、本研究における「エリア間の回遊行動」

を「中心市街地など特定の範囲内で、移動目的以外で複数のエリアに立ち寄る時のエリア間を往来する行動」と定義する⁽²⁾。中心市街地を「既存商店街エリア」、「岡山駅エリア」、「その他市街地エリア」と区分し、中心市街地外は「市街地外」とした。その上で作成した判断フローに従って判読を行い、エリア間の移動を最初に立ち寄ったエリアをベースに分類した。中心市街地内のエリア設定は図-1に、移動ルートの分類表を表-3に示す。なお、上記のエリア間の回遊行動の定義に基づいて移動ルートを正確に特定し、信頼性の高いサンプルのみを対象とするために、ルートが途中で途切れている場合など判断材料が欠落している（判読困難）353サンプルは除外した。

4. 回遊行動の有無と来街者特性（クロス集計）

移動ルートの分類結果（表-3）を見ると、各商業エリアから市街地外（帰宅）という移動割合が最も多く、合計すると半数以上になる。また、エリア間の回遊行動（「既存商店街エリア」から「岡山駅エリア」又は、「岡山駅エリア」から「既存商店街エリア」への回遊）を行っている来街者は、18.3%（「岡山駅エリア」あるいは「既存商店街エリア」のいずれかを訪れた来街者のうちでは、21.0%）である。本章では、既存商店街エリアまたは岡山駅エリアのいずれか一方、あるいは両方に立ち寄った来街者を分析対象として、表-3の項目番号③、⑧、及び判読困難なデータを除いた1,119サンプルに基づき分析を行う。来街者の市街地内での回遊行動の有無と来街者特性との関連性について、クロス集計を行い、どのような来街者がエリア間の回遊行動をする傾向にあるのかを明らかにする。本分析に用いた来街者特性の指標を表-4に示す。独立性の検定の結果、「性別」、「居住地」、「来街時の交通手段」については回遊行動の有無との間にそれぞれ有意な関連は見られなかった。以下では、独立性の検定及び残差分析より関連が確認された結果のみを考察する。なお紙数の関係上、グラフは省略する。

回遊行動する来街者は「20代」の割合が高くなる。また、「市街地までの所要時間」では、30分以下の

表-2 来街者調査概要

調査日	休日	平日
	2013年10月20日	2013年10月23日
調査時間	10時～18時	
回収サンプル数	844	791
調査地点	既存商店街エリア （表町エリア）	①天満屋前 ②アムスメル上之町前 ③クレド前
	岡山駅エリア	④一番街イルカの広場 ⑤駅前商店街 ⑥高島屋前 ⑦奉還町商店街
	西川エリア	⑧ホテルマイラ
調査項目	・個人属性 ・交通手段 ・来街目的 ・商業エリアの魅力 ・中心市街地での移動 など	

表-3 移動ルート分類表

移動ルート分類	サンプル数	割合
①既存商店街エリア→市街地外(帰宅)	299	23.3%
②岡山駅エリア→市街地外(帰宅)	394	30.7%
③その他市街地エリア→市街地外(帰宅)	95	7.4%
④既存商店街エリア→岡山駅エリア	112	8.7%
⑤岡山駅エリア→既存商店街エリア	123	9.6%
⑥既存商店街エリア→その他市街地エリア	64	5.0%
⑦岡山駅エリア→その他市街地エリア	127	9.9%
⑧その他市街地エリア→その他市街地エリア	68	4.2%

表-4 来街者特性項目

指標	分類	指標	分類
性別	男	来街時 交通手段	鉄道
	女		バス
年齢	10代		自家用車
	20代		自転車
	30代		徒歩
	40代		その他
	50代	市街地内 交通手段	路面電車
	60代		バス
	70代以上		自家用車
居住地	岡山市北区		自転車
	その他市内		徒歩
	市外		その他
	県外	同伴者	家族
市街地までの 所要時間	0～5分		友人
	6～10分	来街頻度	単独
	11～15分		週に5回以上
	16～20分		週に3～4回
	21～30分		週に1～2回
	31～45分		月に2～3回
	46～60分		月に1回
	61～90分		2～3ヵ月に1回
	90分以上		その他

来街者には有意差は見られないが、「61分～90分」の来街者で回遊行動する傾向が見られた。著者らは、市街地までの距離でも同様の分析を試みたが、統計的に有意な結果は見られなかった。つまり、物理的な距離よりは、むしろ時間的距離（所要時間）が、エリア間回遊を規定する要因になりやすいと言える。「市街地内の交通手段」では、いずれの場合も「徒歩」が占める割合が約半数ほどであったが、回遊行動する来街者は「バス」の占める割合が有意に高く、「路面電車」の割合も回遊しない場合と比較して相

対的に高いことから、回遊行動する際には公共交通が利用される傾向にある。他にも「来街頻度が週に1～2回」と比較的高頻度の場合や、「友人グループでの来街」の場合、回遊行動する割合が高くなる。

5. エリア間の回遊行動要因モデル

来街者のエリア間の回遊行動に影響を及ぼす要因を明らかにするために、二項ロジスティック回帰分析を行う。各変数が及ぼす影響の強さはオッズ比によって評価する。ここでのオッズ比は、他の変数を一定として、特定の変数が1単位増加した際の回遊行動を行う確率を示す指標である。

表-3に基づき、項目番号①、④、⑥に該当する既存商店街エリアベースの行動、項目番号②、⑤、⑦に該当する岡山駅エリアベースの行動を設定した。また、両サンプルを合わせた、両エリアベースの行動も設定し、3つのモデルを構築した。目的変数はエリア間の回遊行動の有無とし、説明変数は表-4に示した来街者特性とした。表-3に基づく目的変数の対象サンプルを表-5に示す。

分析結果を表-6に示す。本分析では、多重共線性

表-5 目的変数の対象サンプル（表-3 対応）

回遊行動	有	無	サンプル数
両エリアベース	④⑤	①②⑥⑦	1,091
既存商店街エリアベース	④	①⑥	460
岡山駅エリアベース	⑤	②⑦	631

表-6 回遊行動要因モデル（二項ロジスティック回帰分析）

目的変数	採択された説明変数と有意性						モデルの評価	
	説明変数		偏回帰係数	P 値	判 定	オッズ比	P 値	的中率
回遊行動の有無 (両エリアベース) (N=1091)	年齢	20代	0.521	0.0040	**	1.68	0.0000	78.8%
		50代	0.529	0.0171	*	1.70		
	市街地までの所要時間	31～45分	-0.713	0.0182	*	0.49		
	市街地内交通手段	バス	0.630	0.0034	**	1.88		
		路面電車	0.656	0.0078	**	1.93		
	同伴者	友人	0.586	0.0013	**	1.80		
	来街頻度	週に1～2回	0.499	0.0035	**	1.65		
		その他	-0.624	0.0398	*	0.54		
	定数項		-1.801	0.0000	**	0.17		
回遊行動の有無 (既存商店街エリアベース) (N=460)	年齢	20代	1.0637	0.0000	**	2.90	0.0000	77.4%
	市街地までの所要時間	31～45分	-1.8142	0.0037	**	0.16		
	同伴者	単独	-0.4842	0.0382	*	0.62		
	来街頻度	週に1～2回	0.5766	0.0235	*	1.78		
	定数項		-1.1771	0.0000	**	0.31		
回遊行動の有無 (岡山駅エリアベース) (N=631)	年齢	50代	0.582	0.0300	*	1.79	0.0000	81.1%
	市街地内交通手段	バス	0.924	0.0011	**	2.52		
	来街頻度	週に1～2回	0.656	0.0075	**	1.93		
		月に2～3回	0.608	0.0189	*	1.84		
	定数項		-1.870	0.0000	**	0.15		

※有意性 **p<0.01 *p<0.05

を考慮した上で、有意確率 5%を基準とするステップワイズ法に基づき変数選択を行った。なお、いずれのモデルも概ね良好な評価を得ている。また、以降の考察では、便宜上「エリア間の回遊」を、「既存商店街エリア」と「岡山駅エリア」の間の回遊行動を指すものとした。

両エリアベース（既存商店街エリア⇄岡山駅エリア）：中心市街地に来街する「20代」や「50代」は、エリア間回遊する確率（オッズ比）がおおよそ 1.7 倍程度高くなる。また、市街地内の移動に「バス」や「路面電車」の公共交通を利用する場合や同伴者が「友人」の場合に回遊確率が高まる。

その一方で、市街地までの所要時間が「31分～45分」の来街者は回遊確率が 0.5 倍に低下する。この所要時間は、おおむね岡山市郊外からの来街者が該当する。なお、来街時の交通手段は、いずれも有意な変数として選択されておらず、エリア間の回遊行動には明確な影響は及ぼさないことも明らかとなった。以降では、各商業エリアの特徴を抽出するために、各エリアベースにてモデルを構築した結果に基づいて考察する。

既存商店街エリアベース（既存商店街エリア→岡山駅エリア）：「既存商店街エリア」に来街した「20代」は、エリア間回遊する確率が約 2.9 倍高まり、また

「岡山駅エリア」に来街した「50代」のそれは約1.8倍高まる。前述のように、「既存商店街エリア」には中高年層が、「岡山駅エリア」には若年層が相対的に多い。つまり、双方のエリアで本来ターゲットとしない顧客層の来街は、結果として中心市街地全体の賑わいを高めることに繋がっている。さらに、「週に1～2回」の来街するリピーターはエリア間の回遊確率が高まる。一方で、市街地までの所要時間が31分～45分の来街者でエリア間回遊する確率が顕著に低下する。なお、この傾向は岡山駅エリアベースのモデルでは見られない。

岡山駅エリアベース（岡山駅エリア→既存商店街エリア）：市街地内の移動に「バス」を利用してエリア間回遊した来街者は、エリア間回遊する確率が約2.5倍高まる。岡山駅まで鉄道を利用して来街し、駅ビル周辺で買い物をし、ターミナルからバスを利用して表町まで行くという特有の流れが考えられる。また、既存商店街エリアベースのモデルと同様、比較的来街頻度の高い者の回遊確率が高まる傾向にある。

6. 結論

本研究により得られた成果は以下の通りである。

- 1) 岡山市の中心市街地には、特に歩行量が集中する「既存商店街エリア」と「岡山駅エリア」の二極のエリアが存在しており、「既存商店街エリア」には中高年層が、「岡山駅エリア」には若年層が集中するという特性の違いを明らかにした。
- 2) 岡山市中心部の「岡山駅エリア」、あるいは「既存商店街エリア」を訪れた来街者のうち、両エリアを回遊する来街者は約21%である。また、それらエリアの回遊の有無には、年齢や市街地内の交通手段、来街頻度、同伴者などが影響しているが、性別や来街時の交通手段には有意な関連性は見られなかった。
- 3) 商業エリア別の特徴をみると、まず「岡山駅エリア」に立ち寄るか、「既存商店街エリア」に立ち寄るかで、エリア間回遊する来街者の特性に大きな差異が見られた。これは、エリア間回遊を促す際に、市街地内の画一的な施策展開ではなく、地域性に合わせた施策が効果的であることを示唆して

いる。

- 4) 例えば、「岡山駅エリア」から「既存商店街エリア」へ回遊する層は、50代やバス利用者でその確率が高まるが、「既存商店街エリア」から「岡山駅エリア」へ回遊する層は20代に多く、両エリアのターゲット層や交通利便性が影響している。その一方で、エリア間回遊する層は、両エリア共通して比較的高頻度で中心部を訪れるリピーターであることも明らかとなった。

【補注】

(1) 「既存商店街エリア」と「岡山駅エリア」の特性を把握するためにPT調査の結果データを用いたが、データ制約上、PT調査の対象ゾーンは図-1に示したエリアと多少異なる箇所はあるが、各エリアの主要な商業施設等が立地する箇所は一致している。

(2) 本研究では例えば、「既存商業街エリア」から、鉄道を利用するためだけに「岡山駅エリア」に移動した場合には、エリア間の回遊行動とは定義しない。また、思いつきでふらっと立ち寄る行動も回遊行動として捉える場合もあるが、本研究では調査地点以降の移動予定ルートも聞いており、あくまで調査時点で確定している行動を対象としている。

【参考文献】

- 1) 内閣府地域活性化推進室：認定された中心市街地活性化基本計画，<http://www.kantei.go.jp/jp/singi/tiiki/chukatu/nintei.html>，2014年4月最終閲覧。
- 2) 経済産業省：コンパクトでにぎわいあふれるまちづくりをめざして～戦略補助金を活用した中心市街地活性化事例集～，平成23年1月，http://www.meti.go.jp/policy/sme_chiiki/town_planning/h23_pamphlet_senryaku.pdf，2014年4月最終閲覧。
- 3) 岡山市：平成26年度 中心市街地活性化政策パッケージ，2014年2月，<http://www.city.okayama.jp/contents/000179244.pdf>，2014年4月最終閲覧。
- 4) 溝上章志，高松誠治，吉住弥華，星野裕司：中心市街地の空間構成と分析フレームワーク，土木計画学研究・論文集，Vol.68，No.5，pp.363-374，2012。
- 5) 石川宏之：地方都市中心市街地における来街者の回遊行動と小規模賃貸店舗の展開に関する研究—青森県八戸市中心市街地を事例として—，都市計画論文集，No.44-3，pp.193-198，2009。
- 6) 辰巳浩，堤香代子：福岡市都心部における休日の回遊行動に関する研究—JR 博多シティの開業にともなう回遊行動および意識の変化—，都市計画論文集，Vol.48，No.3，pp.951-956，2013。
- 7) 斎藤参郎，中嶋貴昭，梶井昌邦：消費者回遊行動から見た大規模再開発による都心の構造変化に関する実証的研究，地域学研究，Vol.29，No.3，pp.107-130，1998。
- 8) 岡山市：中心市街地活性化基本計画の背景と目的，2001年3月，http://www.city.okayama.jp/kikaku/kikaku_00223.html，2014年1月最終閲覧。
- 9) 岡山市：岡山市商店街歩行量調査，2012年3月，http://www.city.okayama.jp/keizai/sangyou/sangyou_00075.html，2014年3月最終閲覧。
- 10) 岡山市：中心市街地活性化基本計画，中心市街地ゾーンング，2014年3月最終閲覧。

ADMA 化タンパク質の代謝系を標的とする脳神経変性疾患関連因子の探索

岡山県立大学 保健福祉学部

木本 眞順美

研究実施の概要

生体分子のメチル化修飾はアセチル化とともに翻訳後修飾の一つとして様々な生命現象に関わっていることが知られている。特に、ヒストンならびに非ヒストンタンパク質のアルギニンメチル化反応を触媒するメチル基転移酵素 (PRMTs : PRMT1-11 isoforms) が複数同定され、アルギニン残基のメチル化がシグナル伝達や、RNA プロセッシング、転写制御やDNA 修復等、多岐にわたる細胞機能に関与し、結果として癌や糖尿病さらには神経変性疾患等との関連性について論じられ始めている。一方、遊離型 N^G , N^G -dimethylarginine (asymmetric dimethylarginine : ADMA) の病態生理学的役割に関する研究は、NO 研究の発展と連動して深化し、現在では動脈硬化症を起源とする様々な病態における ADMA の病因メカニズムの解明が進んでいる。我々は、ADMA の代謝系と多様な病態の関わりを長年追究してきた研究過程において、脳神経細胞の分化制御やアルツハイマー病発症に ADMA 代謝系の関与が示唆される結果も得られているが、そのメカニズムは未解明のままである。本研究においては、脳神経系における ADMA 代謝系の全体像を明らかにし、アルギニンメチル化修飾と脳機能との新たな関連性を見いだす。

研究実施内容

1. 研究の目的

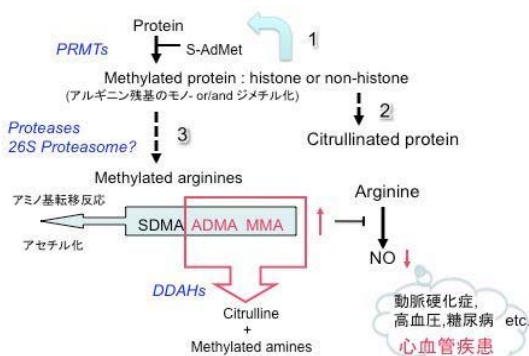


図 1. ADMAの代謝系と病態との関わり

図1に示したように、哺乳動物細胞にはADMAの他に構造的に異なる2種類のメチル化アルギニン、 N^G , N^G -dimethylarginine (symmetric dimethylarginine : SDMA) および N^G -monomethylarginine (MMA) が存在する。これらは、いずれもタンパク質の翻訳後修飾によって生成され、ついでメチル化タンパク質の代謝回転に伴って体液中に遊離される。そして、そのまま、あるいはアセチル体となって尿中に排泄される。これら構造異性体のうち、ADMAとMMAはdimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)によって加水分解され、また両者はNOSの内因性阻害剤として働く。一方、SDMAはDDAHの基質でなく、NOSの阻害剤としても働かない。すなわち、DDAHの発現や活性制御系はNO産生に大きく影響を与える結果となる。しかし、体内のADMA濃度を決定するのはDDAHの働きだけでなく、上流のタンパク質アルギニンメチル化活性、ならびにそれに続くメチル化タンパク質分解活性に因るところも無視できない。この点を明らかにするためには、図1に示した経路1、経路2、経路3の実体ならびに制御系の解析が必須課題となる。我々は先行研究において、脳組織では他の組織に比べてDDAH活性が極めて高値であること、視覚末梢神経破壊動物の脳においてDDAHの過剰発現が見られたことなどを報告した。本研究においては、脳神経系におけるADMA代謝系の全体像を明らかにし、アルギニンメチル化修飾と脳機能との新たな関連性を見いだすことを目的とする。

ase (DDAH)によって加水分解され、また両者はNOSの内因性阻害剤として働く。一方、SDMAはDDAHの基質でなく、NOSの阻害剤としても働かない。すなわち、DDAHの発現や活性制御系はNO産生に大きく影響を与える結果となる。しかし、体内のADMA濃度を決定するのはDDAHの働きだけでなく、上流のタンパク質アルギニンメチル化活性、ならびにそれに続くメチル化タンパク質分解活性に因るところも無視できない。この点を明らかにするためには、図1に示した経路1、経路2、経路3の実体ならびに制御系の解析が必須課題となる。我々は先行研究において、脳組織では他の組織に比べてDDAH活性が極めて高値であること、視覚末梢神経破壊動物の脳においてDDAHの過剰発現が見られたことなどを報告した。本研究においては、脳神経系におけるADMA代謝系の全体像を明らかにし、アルギニンメチル化修飾と脳機能との新たな関連性を見いだすことを目的とする。

2. 方法および結果

1) ラット脳組織におけるADMA代謝関連酵素の局

在性の検証

ラット脳を各領域（解剖学的に嗅球、前脳、大脳皮質、海馬 etc.）に分け、まずそれらの細胞質画分を調製し、ウェスタンブロット解析により PRMTs および DDAH1 の発現状況を精査した。さらに、各領域の組織切片を用いて、免疫組織染色法により、これら酵素の検出を行い、その局在性（細胞の種類、細胞内小器官について）を明らかにした。

ウェスタンブロットの結果から、タンパク質分子上のアルギニン残基を ADMA 化する PRMT1 と DDAH1 の局在性は類似しており、脊髄を含むすべての脳領域にほぼ均一に存在した。一方、タンパク質分子上のアルギニン残基を SDMA 化する PRMT5 は肝臓や腎臓など他の組織に比べて、脳に高発現していた。このことは、脳においては、タンパク質のアルギニンメチル化システムが豊富に備わっていることを示すものである。さらに、これらタンパク質に加えて神経型 NOS (nNOS) の組織化学的解析を行い、以下の結果を得た。

ラット脊髄切片の ABC-DAB による単染色活性は、PRMT1, PRMT5 および DDAH1 が脊髄後角第 I, 第 II, 第 IX 層の神経細胞体に強く、nNOS は神経細胞体ならびに近位樹状突起に強かった（図 2）。

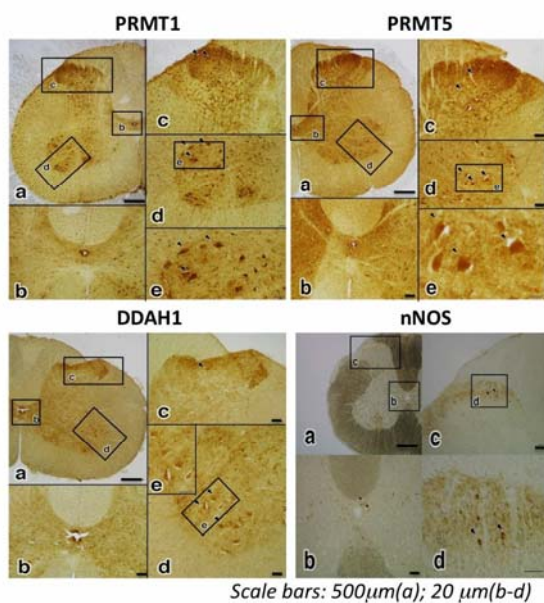


図 2 脊髄における単染色

また、神経細胞体と近位樹状突起のマーカーである MAP-2 を用いた蛍光二重染色の結果、PRMT1 と

DDAH1 は運動ニューロンと介在ニューロンを含むすべての神経細胞に共局在し、PRMT5 は介在ニューロンではなく運動ニューロンに存在した（図 3）。これらタンパク質の細胞内分布については、PRMTs が細胞質および核内に、DDAH1 は核を除く細胞体に発現していることが明らかとなった（図 3）。

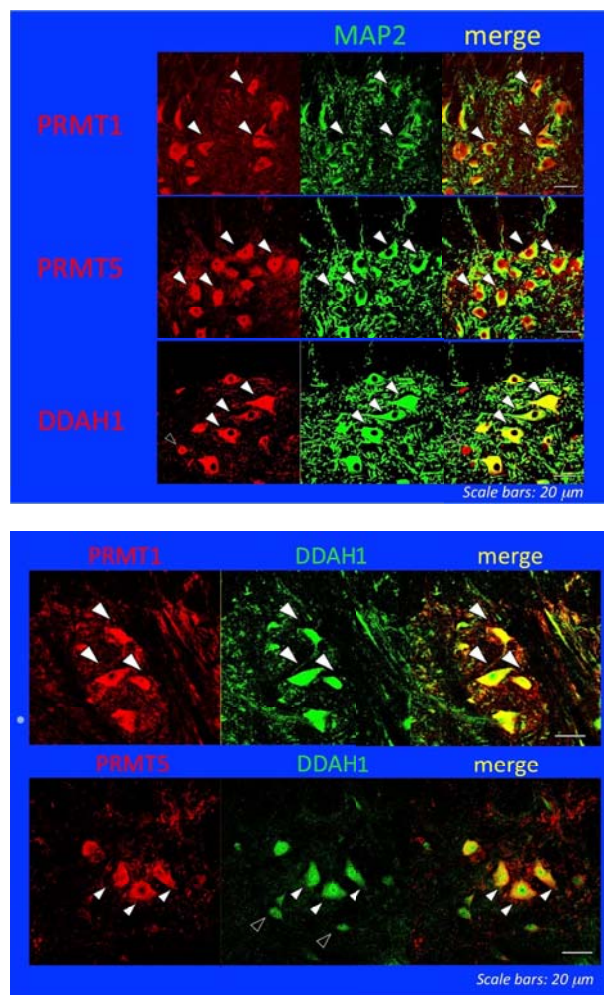


図 3 脊髄における蛍光二重染色

次いで、ラット脳の他の領域（大脳皮質、海馬、視床、視床下部）における PRMT1, DDAH1 および nNOS の局在性について、神経細胞のマーカーである Neu N との蛍光二重染色により検討した。表 1 および表 2 はその結果をまとめたものである。PRMT1 は、これら 4 領域すべてにおいて 8 割以上の Neu N 陽性神経細胞に発現がみられ、海馬においてはすべての Neu N 陽性神経細胞に発現が認められた。また、nNOS 陽性細胞における PRMT1 の発現も高い頻度で観察された（表 1）。一方、DDAH1 は Neu N 陽性神経細胞の約 7 割が大脳皮質と視床におい

て、約3割が海馬と視床下部において発現していた。このように、DDAH1は各領域による異なる発現分布を示した。nNOS陽性細胞におけるDDAH1の発現は、大脳皮質と視床においてほぼ100%の割合を示した。

表1 NeuN, nNOS陽性細胞におけるPRMT1, DDAH1の発現割合(%)

	PRMT1/NeuN	PRMT1/nNOS
大脳皮質	83.5 ± 7.8	88.8 ± 20.1
海馬	100.0 ± 0.0	80.6 ± 17.3
視床	89.8 ± 9.8	100.0 ± 0.0
視床下部	96.5 ± 2.4	87.8 ± 13.0

	DDAH1/NeuN	DDAH1/nNOS
大脳皮質	66.6 ± 10.4	94.4 ± 9.6
海馬	33.1 ± 22.2	39.3 ± 12.9
視床	70.2 ± 13.6	100.0 ± 0.0
視床下部	33.0 ± 6.6	58.8 ± 21.2

表2 PRMT1とDDAH1の共存率(%)

	DDAH1/PRMT1	PRMT1/DDAH1
大脳皮質	73.3 ± 8.1	94.4 ± 6.6
海馬	30.1 ± 9.6	86.2 ± 8.0
視床	93.8 ± 5.4	94.0 ± 5.6
視床下部	84.7 ± 5.7	88.9 ± 3.9

表2に示すように、PRMT1は、これら4領域すべてにおいてDDAH1陽性細胞の9割の高頻度で発現がみられた。一方、DDAH1は視床ならびに視床下部においてPRMT1陽性細胞の9割の高頻度で発現がみられた。このような結果は、4領域の中でも視床、視床下部におけるPRMT1とDDAH1の共局在性を明らかに示すものである。

以上の所見を含めたラット矢状断における各タンパク質の発現パターンをGeorge PaxinosとCharles WatsonのThe Rat Brainアトラス上にまとめたのが図4である。PRMT1陽性細胞は大脳皮質、海馬、視床、視床下部をはじめ、脳の各領域に広く存在した。特に大脳皮質、橋、延髄では強い陽性反応を示す細胞や密集した陽性細胞が確認された。DDAH1は大脳皮質、海馬、視床、視床下部、小脳、延髄、橋に局在した。特に大脳皮質、海馬、延髄では強い陽性反応を示す細胞や密集した陽性

細胞が確認された。nNOS陽性細胞は大脳皮質、海馬、視床、視床下部をはじめ、脳の各領域に広く存在した。特に橋では強い陽性反応を示す細胞が確認され、延髄では密集した陽性細胞が確認された。

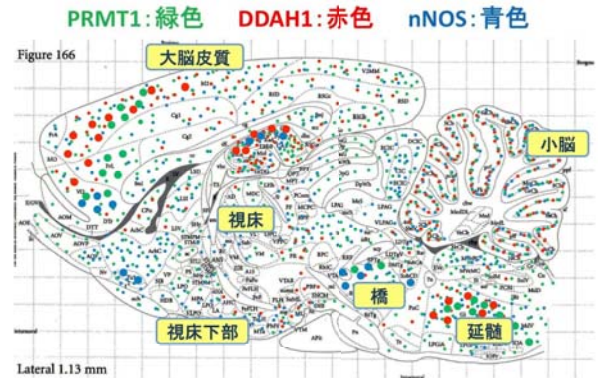


図4 ラット脳矢状断における陽性細胞分布

2) 脳組織におけるアルギニンメチル化タンパク質の同定

まず1) で用いた各脳領域サンプルをSDS-PAGEに供し、それぞれ特異抗体、ASYM24あるいはSYM10を用いてADMAを含むあるいはSDMAを含むタンパク質の検出を行った。その結果、図5に示したように多数の陽性バンドが観察された。その中でも、脳組織において、主要なバンドとして検出された矢印で示した39-kDaペプチド(ADMA結合型タンパク質)と35-kDaペプチド(SDMA結合型タンパク質)に焦点をあて、さらに解析を進めた。両者は、ともに脳組織全体に広く分布していることから全脳粗抽出液を等電電気泳動/SDS-PAGE(二次元電気泳動)に供し、ウェスタンブロットによる陽性

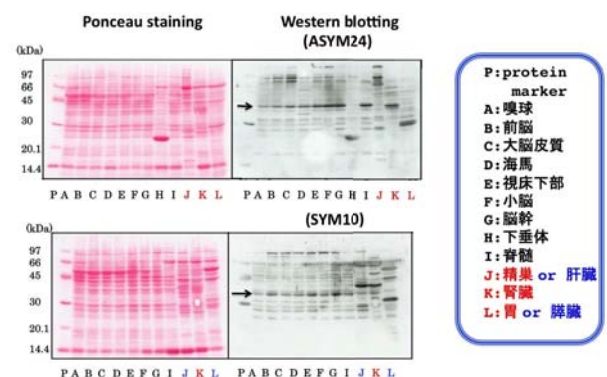


図5 アルギニンメチル化タンパク質の検索

スポットの特定を行った。図 6 のウェスタンブロットの結果から、等電点の微妙に異なる 3 個のスポットが検出され、これらが 39-kDa ペプチドに由来するものと考えられた。これらのうち真ん中のスポットをゲルから切り出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF MS 分析によりタンパク質の同定を行った。

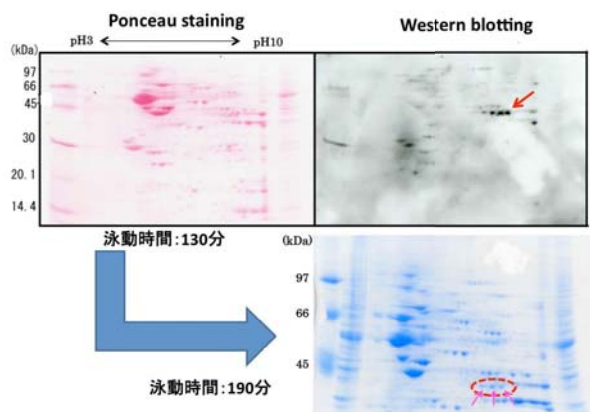


図 6 ADMA 結合型タンパク質の特定

図 7 で得られた解析結果から、39-kDa ペプチドは fructose-bisphosphate aldolase C であると同定された。本配列のどのアルギニン残基が ADMA 化されているのか未だ明らかにされていないが、データベース検索によれば、315 番目の R がメチル化される可能性は高いとされている。

Fructose-bisphosphate aldolase C

MPHSYPALSAEQKELSDIALRIVAPGKGI LADES VGSMARLSQIGVEN
TEENRRLYRQVLFSADDRVKKCIGGVIFFHETLYQKDDNGVPFVRTIQEKG
ILVGIKVDKGVVPLAGTDGETTQGLDGLLERCAQYKKGADFAKWRVCLK
ISDRTPSALAILNANVLARVASICQONGIVPIVEPEILPDGDHDLKRCQF
VTEKVLAAVYKALSDHHVYLEGTLKPNMVT PGHACPIKYSPEIAMATVT
ALRRTPVPAVPGVTFLSGGGSEEEASLNLA INRCSLPRPWALTF SYGRAL
QASALSAWRGQRDNAGAATEEFIKRAEMNGLAAQGKTEGSGDGGAAQSLY
VANHAY

赤字: MALDI-TOF MS解析により得たアミノ酸配列
Score: 191, Coverage: 60.0%

図 7 39-kDa ペプチドの同定

次いで、SDMA 結合型タンパク質の可能性のある 35-kDa ペプチドの解析を進め、以下の結果を得た (図 8 および 9)。図 8 において、抗体との反応が陽性であるスポットは複数認められたが、点線で囲んだ 44 kDa, 35 kDa, 28 kDa のペプチドが鮮明なシグナルを与えた。その中でも 35-kDa ペプチドは、CBB 染色では

確認が難しいため、銀染色を行い、独立したスポットとして確認できた真ん中のスポットをゲルから切り出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF MS 分析によりタンパク質の同定を行った。

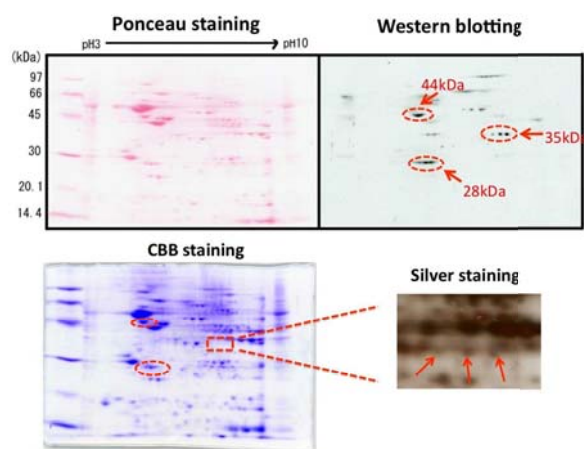


図 8 SDMA 結合型タンパク質の特定

図 9 で得られた解析結果から、35-kDa ペプチドは ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 であると同定された。

Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1

MPNIKIFSQSSHQDLSQKIDRLGLEKGVVTKKFSNQETCVEIG
ESVRGEDVYIVGSGCGEINDNLMELLIMINACKIASASRVTA
VIPCFFPYARQDKKDSRAPISAKLVANMLSVAGADHIIITMDLHA
SQIQGFDDIPVDNLYAEPVAVLKWIRENISEWRNCTIVSPDAGG
AKRVTSIADRLNVDFALIHKKERKKANEVDRMVGVDKDRVAILV
DDMADTCGTICHAADKLLSAGATRVYAILTHGIFSGPAISRIN
NACFEAVVVTNTIPQEDKMKHCSKIQVIDISMILAEAIRRTHN
GESVSYLFSHVPL 318

赤字: MALDI-TOF MS解析により得たアミノ酸配列
Score: 64, Coverage: 31.4%

図 9 35-kDa ペプチドの同定

3. 考察および今後の課題

ラット脳の各領域を用いたウェスタンブロットならびに免疫組織化学的解析の結果、ADMA の産生・分解に係る酵素類が脳の各領域に広く発現していることが確認された。また、ADMA によって制御を受ける nNOS も同様に広い分布を示した。PRMT1 は nNOS 陽性細胞中に存在する割合が各領域で異なるものの、比較的高く、特に視床では完全な共存を認めた。これらの結果は、脳の広い領域の nNOS 発現細胞において MMA あるいは ADMA を含むタンパク質の合成が行われていることを示唆する。これらメチル化タンパク質

の代謝回転にしたがって生成される遊離型 MMA および ADMA は DDAH1 により分解されるが、nNOS 陽性細胞中における DDAH1 の存在割合は脳皮質と視床において特に高く、本結果は nNOS と DDAH1 の共存を裏付けるものである。これらの脳領域においては、PRMT1 と DDAH1 の酵素連関とそれによる NO 産生調節がなされていることが示唆される。以上の結果から、PRMT/DDAH/NOS axis が脳機能の恒常性維持の一端を担っていることが考えられる。DDAH1 の発現が確認されなかった下丘や終脳、海馬の錐体細胞層では、他の調節機構によって NO 産生が調節されているのかも知れない。しかし、nNOS 陽性細胞が観察されなかった領域にも PRMT1 や DDAH1 の発現が確認されたことから、脳におけるこれらのタンパク質は NO 産生調節以外の重要な役割のあることが推察できる。その一つに、PRMTs が関係する細胞内タンパク質のアルギニン残基のメチル化が神経突起伸長に関与するとの報告もあるが、神経細胞におけるタンパク質のメチル化の生理的意義についての研究は緒に就いたところである。このような研究の遅れは、神経細胞におけるメチル化タンパク質の網羅的解析がなされていないことが上げられる。我々は本研究において、脳の各領域に広く分布するアルギニンメチル化タンパク質として fructose-bisphosphate aldolase C (ADMA を含む) および ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 (SDMA を含む) を同定した。fructose-bisphosphate aldolase C はグルコースを利用する細胞に存在する代表的な解糖系酵素であり、脳に優位に発現している aldolase アイソフォームである。本タンパク質は、解糖系酵素としての働きのほかに他の分子との相互作用によって多機能性を有することが明らかにされつつある。例えば、脳皮質に局在している fructose-bisphosphate aldolase C が light neuro-filament (NF-L) mRNA と結合し、NF-L mRNA の安定性を変化させる可能性が示唆されている。また、NF-L mRNA の不安定性が NF-L タンパク質の凝集に関係して運動ニューロンの変性を引き起こす可能性についても論じられている。脳内でメチル化を受けているタンパク質の多くが RNA 結合タンパク質であるとする

報告を信じるならば、本研究で得た結果は、これに矛盾することなく、fructose-bisphosphate aldolase C のような RNA 結合タンパク質のアルギニンメチル化が脳機能と密接に関係するのではないかと仮説を提示するものである。これにより、今後の研究の方向性を明確に示すことができた。すなわち、fructose-bisphosphate aldolase C のアルギニンメチル化のメカニズムを解明し、脳機能との関連性を見いだすことである。

岡山県西部地域での糖尿病腎症患者のための多施設共同教育モデル構築の試み

岡山県立大学保健福祉学部看護学科

住吉和子, 四方賢一, 川田智恵子, 金 外淑, 山下真宏

そこで我々は、200 床以上の医療施設がなく糖尿病専門医は 1 名の岡山県西部の A 市で、複数の医療機関と共同して、糖尿病性腎症患者を対象とした腎症教室と個別相談を実施し、医療施設と市と大学が協力した教育モデルの構築を目的とした。最初に、B 病院の糖尿病外来に通院中の患者 102 名を対象に自記式の調査用紙を用いた調査を実施した。ライフスタイルと健康状態の明らかな因果関係は認められなかったが、糖尿病患者の健康状態に関しては ICF の糖尿病 core sets を参考に 5 因子から成る二次因子モデルを開発することができた。次に、A 市の医師会で説明を依頼し、個別に A 市内の内科を標榜している医療施設と市の協力を得て、糖尿病相談室は 8 回、糖尿病腎症教室を実施した。糖尿病相談室の参加者は 16 名（述べ 24 名）、腎症教室の参加者 6 名であった。今回試みた多施設共同教育モデルは、参加者は数名と効果を統計的に検証できなかったが、参加者にとって、糖尿病の付き合い方、具体的な目標と方法を考える時間となり、主治医にとっては、患者の目指す目標と実施している健康行動を理解する機会となり、医療者と参加者である患者双方にとって有意義な方法であることが示唆された。

《目的》

平成 20 に糖尿病腎症により透析療法が導入され
 多人数は 16,061 人で、医療者の対策にもかかわらず
 糖尿病合併症の一つである腎症患者は増加傾向にある。
 これまでも糖尿病腎症を早期に診断するための
 基準や検査方法の開発、降圧薬の効果について研究
 が報告されている。平成 19 年には糖尿病性腎症患者
 の治療方法について多施設での共同研究が報告され
 1)、平成 25 年には、糖尿病の合併症などの地域連携
 の多角的評について報告されている 2)。平成 24 年 4
 月には 200 床以上の施設を対象として、透析予防管
 理料が導入された。多くの施設で医師、看護師、栄
 養士による糖尿病腎症患者への教育がより積極的に
 導入されるようになり、腎症の重症化予防への期待
 が高まっている。また森山らは、市町村と契約を結
 び、透析予防を目的に訪問指導を行うことで、腎機
 能の改善が見られたことを報告している。しかし、
 管理栄養士のいない医療機関、糖尿病教育プログラ
 ムを持たない医療機関に通院する糖尿病患者につい
 ては、具体的な対策は示されていない現状である。

そこで我々は、200 床以上の医療施設がなく糖尿
 病専門医は 1 名の岡山県西部の A 市で、複数の医療
 機関と共同して、糖尿病性腎症患者を対象とした腎

症教室と個別相談を実施し、腎症の進展予防、透析
 導入患者の減少および糖尿病患者の健康寿命の延伸
 に寄与することを目的にする。最終的に、医療施設
 と市と大学が協力した教育モデルの構築を目的とす
 る。

《方法及び結果》

1. 糖尿病患者のライフスタイルと健康状態

大学の倫理委員会承認後、B 病院の糖尿病外来に
 通院中の患者 102 名を対象に自記式の調査用紙を用
 いた調査を実施した。ライフスタイルと健康状態の
 明らかな因果関係は認められなかった。しかし糖尿
 病患者の健康状態に関しては ICF の糖尿病 core
 sets を参考に 5 因子から成る二次因子モデルを開発
 することができた。第 1 因子「網膜症」4 項目、第 2
 因子「神経症」6 項目、第 3 因子「循環」4 項目、第
 4 因子「代謝」3 項目、第 5 因子「心理」4 項目、合
 計 21 項目で交際されている) $n=102$ CFI=0.940,
 TLI=0.960, RMSEA=0.053)。糖尿病患者のコントロ
 ール状態は HbA1c で測定できるが、健康状態が HbA1c
 で表せるとは限らない。今回作成した機能的・構造的
 統合尺度は患者の健康状態を反映しており、介入
 のアウトカム評価として使用できると考える。

2. 糖尿病性腎症患者を対象とした腎症教室の実施

A市の医師会で説明を依頼し、個別にA市内の内科を標榜している医療施設を訪問し、研究の趣旨を説明し協力を依頼した。具体的には、糖尿病の自己管理ができていないと思われる患者に糖尿病相談室、腎症2期から4期にある患者に腎症教室のリーフレットを渡していただくよう依頼した。患者が糖尿病教室および腎症教室への参加を希望した際には、検査データなど記入した書類を依頼し、糖尿病相談室および腎症教室参加後は、こちらでの話の内容と患者と立案した目標を参加者に許可を得たうえで主治医に書面で報告することも説明した。糖尿病相談室および腎症教室のリーフレットは協力が得られた10か所の医療施設の窓口に置かせていただき、市の健康診断結果を送付する際に同封していただいた。平成25年度の糖尿病相談室は8回、糖尿病腎症教室は3回を1クールとし、2クール実施した。

糖尿病相談室の参加者は16名（述べ24名）、腎症教室の参加者6名であった（表1）。主治医から紹介された者5名、リーフレットを見て参加した者8名、市の保健師の勧めで参加した者5名であった。

表1 糖尿病相談室、腎症教室の参加者

No	氏名	性別	紹介など
1	相談室	M	市役所
2	相談室	F	市役所
3	相談室	M	M 医院
4	相談室・腎症教室	F	H 医院
5	相談室	F	市役所
6	相談室	M	
7	相談室	M	
8	相談室	F	
9	相談室	F	
10	相談室	M	市役所
11	相談室・腎症教室	F	S 医院
12	相談室	F	
13	相談室	F	
14	相談室・腎症教室	F	
15	相談室・腎症教室	M	S 医院
16	相談室	M	家族のすすめ

17	腎症教室	M	P 医院
18	腎症教室	F	市役所
	腎症教室	欠	市役所
	腎症教室	欠	P 医院

1) 相談方法

- (1) 利用者の目的を確認し、目的を達成できるように時間を配分した。
- (2) 糖尿病を管理する上で必要な知識を提供した。
- (3) 健康状態を視覚化して伝えるために抹消の血流量を確認した。

2) 栄養相談の実施

療養指導の患者で栄養指導を希望する者を対象に、栄養学科の教員が個別に栄養指導を実施した。希望者には食事記録を記載してもらい、栄養計算をしてエネルギー、バランス、塩分摂取量を伝えた。

3) 腎症教室のプログラムの検討

腎症教室については独自にテキストを作成し、最新の情報を提供できるように工夫した。

《1回目》【糖尿病についての知識と情報の提供】

- ・どのような病気か、・どう付き合っているか、・困っていること、・世界の糖尿病の動向、・糖尿病の種類について、・糖尿病の成因、・糖尿病の治療について、・高血糖値が体に及ぼす影響、・合併症について、・体調を整える方法、・爪モミを紹介

《2回目》【糖尿病腎症についての情報提供】

- ・なぜ腎臓が悪くなるか、・腎臓のはたらき、・皆さんの腎臓の状態、・回復する方法

《3回目》【外レスとの付き合い方、食事の工夫】

- ・食事療法のコツ、・血圧をコントロールする方法
- ・ストレスと上手につき合う方法

参加者と家族の満足度は高かったが、3回連続で参加できる人がなかったこと、参加員数が数名であり統計的に効果を検証できないこと、行動変容の効果は長期的に検証が必要であることから、腎症教室の効果の検証は行えていない。

3. 医療従事者およびA市との情報共有

糖尿病を対象とした調査結果と糖尿病性腎症患者を対象とした教室プログラムや開催場所などにおいて、協力病院およびA市の健康づくり課に情報を提

供し、腎症教室の運営について、情報交換を行い、健康診断のデータから早期にスクリーニングを行う方法について検討することを目的に協力を依頼した。

平成25年度は、健康診断の結果送付の際に、糖尿病相談室、腎症教室のリーフレットを入れて送付していただき、予備軍の人には保健師が直接結果を届けて糖尿病相談室を案内する、腎症教室の開催場所を提供していただき、健康づくり課の栄養士2名が腎症教室に参加するなど多方面にわたって協力を得ることができた。平成26年度には、健康診断のデータからアプローチを行うことは難しいが、健康診断の結果説明の日に同席し、糖尿病の相談を受けることが認められた。市と情報を共有しながら進めることで、市民の健康に寄与できる糖尿病相談室、腎症教室になることが期待できる。保健師の勧めで糖尿病の診断がされていない参加者が糖尿病相談室に来られたため、自宅近くの医院を紹介し、糖尿病の診断と治療方針を確定してもらうことが可能となった。

4. 多施設共同教育モデル構築の試み

今回我々は、教育施設を持たない医療機関に通院する糖尿病患者の教育について、市、医療機関、大学が協力して患者教育を担当し、糖尿病患者の健康を維持するための多施設共同教育モデルの構築について検討した。その結果、4名の医師から糖尿病相談室、腎症教室に患者の紹介があった。市の保健師も健診で予備軍と診断された人に糖尿病相談室への参加を積極的に紹介していた。患者を紹介していただいた医療機関には、糖尿病相談室、腎症教室で実施した内容を書面で報告した。また参加者には立案した目標を主治医に報告することを勧めている。主治医と患者の目標を共有することで、主治医の声かけで患者が自己管理をしようという意欲が高まり、自己管理行動の改善に繋がることが期待できる。

今回試みた多施設共同教育モデルは、参加者は数名であったが、参加者にとって、糖尿病の付き合い方、具体的な目標と方法を考える時間となり、主治医にとっては、患者の目指す目標と実施している健康行動を理解する機会となり、医療者と参加者である患者双方にとって有意義な方法であることが示唆された。診察日とは別の日程を確保しなければなら

ないこと、糖尿相談室の場所が市役所又は大学であったため、車がない人は通いにくいという問題もあり、今後も対策を考えていきたい。

《今後の課題》

1. 総社市民の健康をサポートするためには、総社市役所健康づくり課と役割分担を明確にしていく必要がある。
2. 「糖尿病相談室・腎症教室」がどの程度役立っているのか、効果を評価する必要がある。
3. 岡山県が実施している地域医療再生計画のなかで、開業医を対象として総合管理医の研修や医療スタッフを対象とした糖尿病に関する教育計画が進行している。開業医が多いA市の医療機関に働きかけて、研修会への参加を促し、糖尿病性腎症の知識提供の機会をつくりたいと考えている。

《参考文献》

- 1) 槇野博史：厚生労働省科学研究費補助金循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業「糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療」に関する研究，平成19年4月．
- 2) 春日正人：槇野博史：厚生労働省科学研究費補助金循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業 糖尿病の重症化・合併症予防に資する地域連携の多角的評価の研究，平成25年3月．

緊張を緩和する身体的ビデオコミュニケーションシステムの研究開発

岡山県立大学 情報工学部 情報システム工学科

石井 裕

(概要) 本研究では、デバイスを装着することなく画像処理により対話者の頭部動作を計測し、相手映像に重畳合成した自己アバタに反映させることで緊張を緩和する身体的ビデオコミュニケーションシステムを開発した。開発したシステムを用いて自由対話によるコミュニケーション実験を行い、システム評価を行った。また、画像処理によって取得した情報から対話相手の顔の向きを推定することで、対話相手の視線の先に自己の代役となるCGキャラクタを配置する手法を提案し、有効性を確認した。本研究で非接触計測によるシステムを新たに開発したことで、センサの着脱等の影響なく従来研究における音声のみに基づいて身体動作を自動生成するシステムとの比較検証することが可能となり、対話者動作を反映した効果を明確に示した。

1. はじめに

遠隔での実時間コミュニケーション手段として、情報インフラの向上とともにビデオカメラで撮影された実映像通信が利用される機会が増えている。現在の対話用途としては遠隔会議、家族間対話、友人とのビデオチャットなどが挙げられる。実映像は対話相手の振る舞いや状況を瞬時に把握できるだけでなく、映像を用いることで会議資料や製作物、購入対象の提示や共同確認などの目的にも有効である。ここで実映像を介した場合の対話性に着目すると、確かに対話相手や提示対象の情報を得ることは容易に行うことができるものの、対話相手との身体的なかわりを実感することは難しい。これは対話相手との視線の不一致や背景による分離感などの空間的な問題、また解像度や描画フレームレートなどの映像品質、遅延などの通話品質といった実時間性に関する問題が影響していると考えられる。

本研究では、これらのうち空間的な問題に着目し、対話相手の実映像に対して自己アバタとしてのCGキャラクタを重畳合成することで、対話者すなわち相手と自己の対面対話感を仮想的に実現するシステムとして、画像処理によりデバイスを装着することなく対話者の頭部動作を計測して自己アバタに反映させる実映像対話システムを開発した。また開発したシステムを、音声から自動生成した身体動作に基づくキャラクタ、対話者の頭部動作のみ反映させた

キャラクタ、さらにそれぞれを組み合わせたキャラクタを用いたシステムを評価した。友人同士を対象とした遠隔での自由対話によるコミュニケーション実験を行い、システム評価を行った。

また実際のビデオチャット利用場面では、対話相手が自己を斜めや横方向から撮影している場面も多く、自己アバタを固定した配置では対応できない。そのため対話相手の撮影方向を検出し、自己アバタを相手の顔が向いている先へ対面合成する必要がある。さらに仮想空間において身体的エージェントの身体方向・登場位置が印象に影響を与える指摘がなされており、自己アバタの配置によりシステム評価が異なる可能性がある。よって画面上の対話相手と自己アバタの向きが印象に与える影響を検討するため、画像処理計測による対面合成手法を提案し、斜め前方から撮影された相手映像に対してアバタを対面合成した配置と、相手の向きにかかわらずアバタを画面下方中央に固定した配置による比較評価を行った。システムを用いた自由対話における一対比較により、提案手法の有効性を確認した。

2. E-VChat: 自己アバタ対面合成型実映像対話システム

2.1 コンセプト

人は対話相手の発話に対してうなずきや身振りなどの身体動作で応答反応を示し、また自己の思いを

円滑に、効果的に伝えるために身体全体で表現しながら発話を行っており、互いの発話音声と身体動作は密接にかかわり合っている。対面対話では直接的に対話相手と情報共有できるため、互いの身体リズムや距離感などの関係をとらえながらコミュニケーションを行うことができる。遠隔においてもこのような対面対話状態を実現する手法として、対話相手のビデオ映像と自己のアバタを利用して仮想的に対面合成することが本システムの大きな特徴である。相手のビデオ映像に対して対面している感覚を実現するためには、相手映像に対して提示するアバタの大きさ、配置、方向などに加え、自分自身の身体とのかかわりなど表現される身体的関係が重要となる。

E-VChat システムでは、センサ装着による拘束感や画面上の違和感、可搬性に対する問題を解決するために、代役のCG キャラクタ動作の半自動化により身体動作を補完的に表現し、相手映像に重畳合成する。つまり対話者自身の頭部動作を忠実に再現するとともに、マイクから入力された音声に基づいて生成されたコミュニケーション動作を行うキャラクタを用いて、対話リズムをよりインタラクティブに支援するシステム構成とする。交渉や協議など細心の注意が必要な即応性の高い対話や、内容の信頼性が重視されるキャラクタを介した情報発信などの用途においては、自動生成されたコミュニケーション動作だけでなく、対話者の意思を直接的に示す必要がある場合がある。そのためコミュニケーションに重要な役割を果たす頭部動作をキャラクタに連動させ、肯定・否定の意思表現を反映可能にすることで、よりキャラクタを介したコミュニケーション特性を生かしたシステム構築を行うことができる。また頭部のみ計測する理由として、計測のキャリブレーションを不要とし、かつ将来的な携帯デバイス利用時の近距離撮影範囲の想定も挙げられる。

ここでキャラクタ重畳合成の構成として、図1に示すようにカメラをモニタ上部に置くことで、カメラは自然とモニタを見る対話者を見下ろす角度となる。従来は大きな問題となっていた対話相手の視線のずれを利用し、画面の下部中央に配置することで、正面から撮影される対話相手が自己のキャラクタと

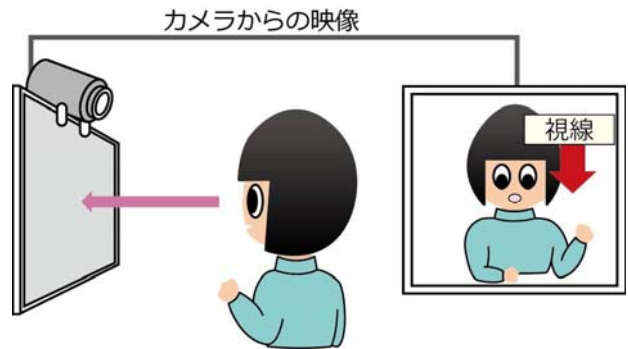


図1 カメラ位置による対話者視線

対話しているように見える。本システムの特徴は、キャラクタを観察するのはあくまで対話者自身だけであることにある。画面上対話相手が自己の代役キャラクタを観察しているように見えるが、実際には対話相手も対話相手自身の代役キャラクタを観察しており、キャラクタの振る舞いは対話相手に伝達されない。そのためキャラクタによる効果は直接的には対話者自身にのみ起こりうるが、結果的にその効果は対話者相互のインタラクションに影響を与えると考えられる。本システムは対話者自身に対して効果的な映像表現を提示することにより、その特徴的な効果を利用してコミュニケーションを支援する。

2.2 音声に基づく自動生成によるキャラクタ動作モデル

音声に基づくキャラクタのコミュニケーション動作の自動生成モデルは、これまでに著者らが提案してきた音声の ON-OFF の時系列からうなずき、瞬き、身体動作のタイミングを推定する MA モデルを使用する。音声データは 16bit 22.050kHz でサンプリングし、閾値で二値化するとともに、音節間の短時間の無音区間による発話の断片化を除去するために 133msec でハングオーバー処理を施している。

この音声に基づくコミュニケーション動作は「話し手」及び「聞き手」の動作モデルによって生成される。まず「聞き手」のインタラクションモデルとして音声の ON-OFF パターンに基づく身体的引き込みモデルを導入している。身体動作についてもこの予測値に基づき、うなずきよりも低い閾値で各部位（頭部、胴部、右肘、左肘）のうちいずれかを選択して動作させることでうなずきと関連付けている。

また「話し手」は、対面での自由対話を計測して対話者自身の発話音声の ON-OFF パターンに基づい

て、入力音声に対する頭部動作および腕や胴体などを動作させることで発話音声と関連付けた。

3. 非接触計測によるシステム

上述の通り、従来の自己アバタは対話者自身の上半身の動作を忠実に再現した CG キャラクター VirtualActor, および対話者の頭部のみ動作を再現し、両腕や胴体を含む動作は対話者の音声から動作を自動生成することで補完的に表現したキャラクターを用いてシステムを構築してきた。一方でジャイロセンサや加速度センサを用いた独自のセンサデバイスを装着して使用させていたため、特定のデバイス使用や、デバイスを装着することによる拘束感など、システム評価や実用性の面で様々な問題があった。そこで本研究では画像処理による非接触計測によるシステムを開発した。構築したシステム構成において対話者間は 1Gbps のイーサネット接続している。映像は Kinect for Windows (L6M-00005) で撮影し、パソコンに USB 接続する。Kinect センサを用いて、対話者の顔の 6 軸情報 (3 軸角度情報, 3 軸位置情報) を 33ms 毎に取得し、位置情報の前後方向については赤外線センサにより計測した深度情報を取得する。取得した対話者の 3 軸顔角度情報から自己アバタへ



図 3 E-VChat を用いた対話場面例

の反映量を算出し、自己の頭部動作がアバタ頭部に直接反映されるように動作させる。

図 2 に上下左右の顔画像検出範囲を示す。両目・鼻・口などの特徴点を追跡するため、その特徴点が Kinect の撮影範囲に収まっている必要がある。本システムでは、Pitch 角が上約 60° 、下約 20° 、Yaw 角が左右約 42° となっている。構築したシステムのプロトタイプを用いた対話場面例を図 3 に示す。

4. 自己アバタ動作比較

4.1 コミュニケーション実験概要

開発したシステム評価を目的として、遠隔での日常対話による評価実験を行った。比較対象とした動作モードは、A:対話者の頭部動作のみ反映、B:頭部動作を反映させず、音声から動作を自動生成、C:頭部動作反映に加え、音声から動作を自動生成して重畳、の 3 モードとした。今回非接触による頭部動作計測を実現したことで、被験者がデバイスの着脱無く各システムを評価することが可能となったため、従来検討されていなかった音声に基づく自動生成モデルとの直接比較を行っている。被験者は 20～23 歳の男女学生で、同性の友人関係である者を 2 人 1 組とし 12 組 24 名に実験を行った。対話内容は自由対話とした。実験前に、実験者が各モードの違いと操作方法を説明した後、被験者に実際にシステムを 30 秒程度使用してシステムを試させた上で実験を行った。モードの切り替えや操作は実験者が室外からスピーカ経由で指示した。被験者にはアンケート用紙をあらかじめ配布し、評価項目ごとに記入させた。ただし、各モードを使って対話している途中は、対話に集中させるためアンケート用紙に触らないよう指示した。

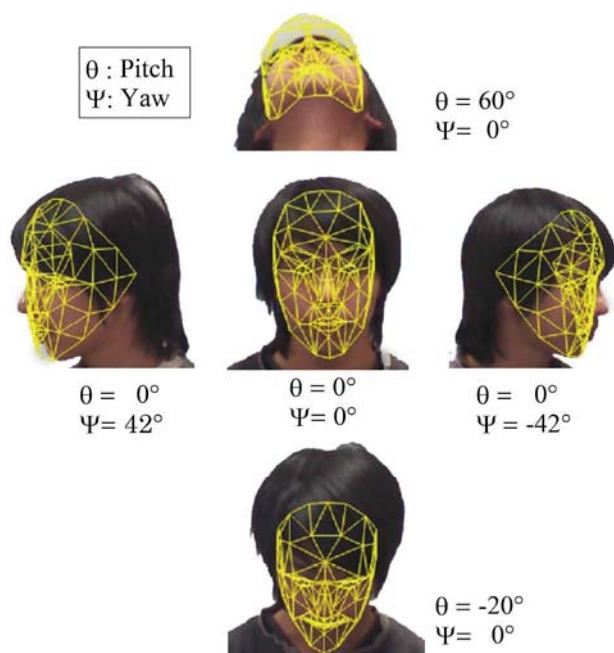


図 2 顔画像検出範囲



図4 顔画像検出範囲

実験はまず、A～Cのモードのうち2つのモードを用いて、各モード2分間ずつ使用させた後、一対比較によって総合的な判断で良かった方を選択させた。モードの提示順序はカウンターバランスを取り、3モードの比較で3 ($=_3C_2$) 回の試行を行った。次に、各モードに対し身体的コミュニケーション支援の観点から定めた6項目について7段階評価（中立0）を行った。6項目は「楽しさ」、「一体感」、「対話しやすさ」、「安心感」、「好み」、「システムを使用したいか」とした。

また、自己アバタとして実験で使用するキャラクターは図4の選択画面を用いて被験者自身に選ばせ、キャラクターが自己の代役であることを対話者に認識させた。

4.2 実験結果

一対比較評価の結果を表1に示す。この結果を定量的に評価するためにBradley-Terryモデルを想定し、強さ π を最尤推定した結果を図5に示す。Cの頭部動作反映に加え音声に基づく動作を行うモードが最も高く評価されていることが分かる。また、Aの頭部動作のみを行うモードとBの音声に基づく動作のみを行うモードは同等の評価となった。

Bradley-Terry モデルに基づく好ましき次に、7

表1 一対比較結果

	A	B	C	計
A		11	3	14
B	13		1	14
C	21	23		44

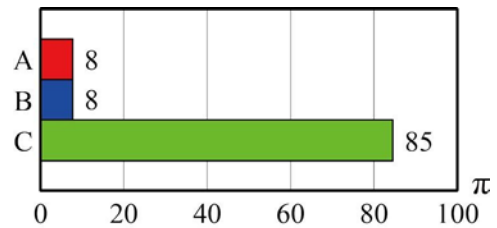
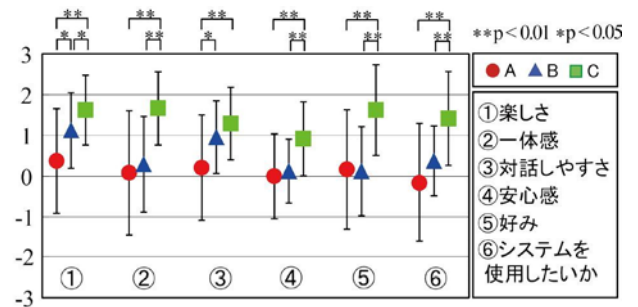
図5 Bradley-Terry モデルに基づく好ましき π 

図6 7段階評価

段階評価の結果を図6に示す。全ての項目でCが肯定的に評価されていることが分かる。Wilcoxonの符号順位検定を行った結果、AとCの間では全ての項目において有意水準1%で有意差が認められた。また、BとCの間では「一体感」「安心感」「好み」「システムを使用したいか」の項目において有意水準1%で有意差が認められ、「楽しさ」の項目においては有意水準5%で有意差が認められた。AとBの間では「楽しさ」「対話しやすさ」の項目において有意水準5%で有意差が認められた。

4.3 考察

実験において、Cの「頭部動作反映に加えて音声に基づく身体動作」を行う手法が全ての項目において高く評価された。このことから、頭部動作反映と音声に基づく動作の両方が対話者に対して肯定的に働いていると考えられる。ここで既述の通り、従来研究では対話者の動作計測に接触型のセンサを用いたシステム開発が行われており、Bの音声のみに基づいて身体動作を自動生成するシステムとの比較検討を行うことができなかった。しかし本研究で非接触計測によるシステムを新たに開発したことで比較検証することが可能となり、コミュニケーション実験によって対話者動作を反映した効果を明確に示した。

また、Aの「頭部動作反映」とBの「音声に基づく身体動作」の比較から、自己アバタのうなずきや身振り・手振りといった対話音声から自動生成された身体動作が対話者に楽しさを与え、対話を促進させていることが再確認された。被験者の自由記述においても「音声に基づく身振り手振りの動作があると話しやすかった」などの意見が複数見られており、上記を裏付けるコメントが得られている。

キャラクタに関する自由記述では「自己キャラクタの表情が見たかった」というコメントが多く見られた。また、「自分のキャラクタが相手にどう見えているか気になる」などのコメントもあった。本システムでは相手側の画面には自分のキャラクタは表示されていないにも拘わらずこのようなコメントが見られたことから、対話者は自己キャラクタと対話相手の関係性を意識していると考えられる。

また、「人の顔を見るとキャラクタが視界に入っていない」「キャラクタにあまり目が行かなかった」などの意見も複数得られた。その一方で、「キャラクタがいることで話しやすかった」という反対の意見も多く得られた。これらの差については、対話相手が実映像であることにより、映像の情報量の多さや抽象度の高いキャラクタとの組み合わせによる整合性等により生じた可能性があり、自己アバタに対する運動主体感やエンパシー性なども含めてさらに詳細に分析評価する必要がある。

5.対話者顔方向検出に基づく自己アバタ提示応用

E-VChat システムにおいて、対話相手がモニタの上にカメラを設置して自己を正面から撮影する場合を想定し、自己アバタを画面下部中央に固定して表示していた。しかし、実際のビデオチャット利用場面では、対話者が自己を斜めや横方向から撮影する場面も少なくない。画像処理による動作計測手法を用いることで対話者の撮影方向を検出することが可能となり、自己アバタを相手の顔が向いている先へ対面合成することで、互いのインタラクションが捉えやすい状態を作ることができると考えられる。

5.1 アバタ配置手法の検討

前章で開発した対話者顔方向検出に基づくE-VChat システムでは対話者の顔の位置や向きを計

測することを可能としており、これらの情報を用いることで対話相手の視線の先を推定することが可能である。そこで、対話相手が自己を不特定の方向から撮影している場合においても自己アバタを相手の顔向きの先に対面合成する手法を検討する。Kinect センサを用いて対話者の顔の位置や向きを計測して対話相手の視線の先を推定し、推定位置に自己アバタを移動させ、画面上の対話相手と対面するように配置する。これにより、対話相手が正面を向いていない場合においてもアバタを介して自己と相手とのインタラクションを把握しやすい状況をつくることができる。自己アバタの移動には、対話相手の顔の3軸角度情報と位置情報を用いる。対話相手の顔の3軸角度情報の内、Yaw 角に対応して自己アバタを y 軸回転させ、同時に x 軸移動を行う。また、顔の位置情報から対話相手と対面するために適切な位置を算出しアバタを移動させる。移動は一定の範囲で画面下部を平行移動し、その範囲外は対話相手を基準に楕円軌道を描くよう移動させる。相手視線の先へ自己アバタを移動させる手法については、次の3つのモードが選択可能である。

A：アバタを常に適切な場所へ移動

B：対話者がキー入力した際に移動

C：一定時間同一方向を向いている場合に移動

Aの手法は自己アバタを常に相手視線の先に配置することができ、首振りなどの瞬間的な動作にも反応する。常に相手映像にアバタを対面合成することができるが、アバタが常に動き回ることになるため、その動作が対話を阻害することも考えられる。Bの手法では対話者が好きなときにアバタを移動させることができるが、操作自体が対話の妨げとなることが考えられる。よって対話相手が一定時間同一方向を向いている場合のみアバタを移動させるCの手法が、対話相手が主に向いている先へ自然にアバタを移動させることができると考える。

5.2 アバタ配置評価

E-VChat システムを用いた実映像対話において、正面以外を向いている対話相手映像に自己アバタを対面合成することは互いのインタラクション把握を助けるのに有用であると考えられる。しかし、自己



図7 アバタ配置例

アバタを画面の中央から移動させることは、キャラクターが自己の代役であるという認識を薄れさせてしまい対話者に好まれない可能性も考えられる。

そこで、対話相手の映像に自己アバタを対面合成することの有効性を確認するために、前章の被験者を対象に、自己アバタの配置手法について評価実験を行った。対話内容は前章同様に自由対話とした。実験では次の2つの自己アバタ配置モードを用意した。

α：自己アバタを相手の視線の先に配置

β：自己アバタを画面下方中央に配置

各配置の提示例を図7に示す。実験では、2つのモードに対して2分間ずつ使用させた後、総合的に良かった方を選択させた。一対比較評価の結果を図8に示す。αの「自己アバタを相手の視線の先に配置する手法」が96%（24人中23人）の被験者に選択された。



図8 アバタ配置方法の一対比較

5.3 考察

評価実験では、非接触計測による特性を活かして対話相手の顔方向を推定することで、撮影角度に因らず自己アバタを相手の視線の先に配置する手法が高く評価された。自由記述においても「キャラクターが相手の視線の先にいる方が一体感があつた」など、肯定的な意見が多く見られた。このことから、E-VChat を用いた実映像対話においては、本研究で提案している相手映像に自己アバタを対面合成する手法が有効であると考えられる。

6. おわりに

本研究では、デバイスを装着することなく画像処理により対話者の頭部動作を計測し、相手映像に重畳合成した自己アバタに反映させることで緊張を緩和する E-VChat システムを開発した。このシステムを用いてコミュニケーション実験を行い、頭部動作反映に加えて対話音声から動作を自動生成して補完的に表現するモードが、身体的コミュニケーション支援の観点から定めた6項目「楽しさ」、「一体感」、「対話しやすさ」、「安心感」、「好み」、「システムを使用したいか」の全てにおいて高く評価された。

また、E-VChat において対話相手が不特定の方向から自己を撮影している場合においても、自己アバタを相手の視線の先に自動で配置することでインタラクション把握を支援する手法を提案した。さらに自己アバタ配置位置について比較検討するために評価実験を行い、提案した相手視線の先に自己アバタを対面合成する手法が有効であることを示した。

近年では画像処理による身体動作計測デバイスが一般的に利用可能となりつつあり、カメラによる動画撮影機能を搭載した携帯端末などを用いた本システムの応用展開が期待できる。

注視誘導のための視覚的顕著性に基づく自然な画像・映像加工技術に関する研究

岡山県立大学 情報工学部 情報通信工学科

滝本 裕則

人の注視を遮ることなく自然に視線を誘導するため、視覚的顕著性に基づく画像修正法を提案した。提案手法では、画像中で指定した領域の視覚的顕著性が最も高くなるように輝度と色相を画素ごとに調整する。提案手法の有効性を検証するため、視線計測装置を用いて意図した領域に視線を誘導できているか検証した。また、提案手法を用いて修正した画像が、従来法よりも被験者に違和感を与えないことを確かめるため、主観実験を行った。

1. はじめに

Natural User Interface (NUI) は人間の自然な動作により、コンピュータを操作するシステムである。NUI の入力としては、視線や音声、ジェスチャなどを利用したものがある。とりわけ、視線はユーザの意図や注意、興味などの情報を含み、ユーザへの負担も軽いため注目されている¹⁾²⁾。

一方、我々は普段、周辺視からの視覚情報をもとに見ようとする物体を決め、そこに視線を向けている。視線を利用したインタフェースでは、状況によって特定の領域に注視を誘導する必要があり、その際、より自然に注視を誘導する技術が望まれている。そこで、周辺視野内に矢印などの視覚刺激を提示して注視を誘導する手法がある³⁾⁴⁾。しかし、この手法はユーザの現在の注視行動を阻害するものであり、自然な誘導であるとはいえない。近年では、自然に注視を誘導するため、視覚的顕著性を利用した画像の加工法が提案されている⁵⁾⁶⁾。しかし、文献 5) で提案されている手法では、加工後の画像において、物体内に本来あるはずのない色の境界が発生することや、処理コストなどが課題として挙げられる。また、文献 6) で提案されている手法では、対象領域への注視の発生確率が低いことが課題として挙げられる。

そこで研究では、人の注視を遮ることなく、より自然に誘導するために、視覚的顕著性に基づく違和感のない画像加工法を提案する。見る対象の様子によって注視のしやすさは変わるという発想に基づき、注視の引き込みやすさを示す指標として、 $L^*a^*b^*$

表色系に基づく視覚的顕著性マップの計算モデルを提案する。そして、注視を誘導したい領域の視覚的顕著性が最も高くなるように $L^*a^*b^*$ 表色系の各成分を画素ごとに調整する。提案手法の有効性を検証するため、視線計測装置を用いて意図した領域に注視を誘導できているか検証した。また、提案手法を用いて加工した画像が、既存手法よりもユーザに違和感を与えないことを確かめるため、主観評価実験を行った。結果として、提案手法によって画像を加工することで、違和感なく自然に注視を誘導できることを確認した。

2. 視覚的顕著性と注視誘導技術

2.1. 視覚的顕著性

人は、役割が異なる中心視と周辺視を用いることによって効率よく視覚情報を獲得している⁷⁾。中心視とは、視線を向けることで視野の中で解像度が高い網膜中心部（視角 1~2 deg.）で見ることを意味する。一方、周辺視とは、網膜の周辺部で見ることを意味する。周辺視は、次に注視すべき対象箇所を検出する役割として用いられ、その後サッカードと呼ばれる高速な眼球運動で視線を移動し、その注視すべき対象箇所の詳細は中心視によって確認される⁸⁾。人の注視を誘導する技術は様々な分野で効果的に用いられており、自然に注視を誘導するため、視覚的顕著性を利用した画像の加工法が提案されている⁵⁾⁶⁾。ここで、視覚的顕著性とは、人の注視の引きつけやすさを示す指標であり、視覚的顕著性の計算

モデルは多数提案されている⁹⁾。なかでも、Itti らの計算モデル¹⁰⁾は幅広く用いられている。図 1 に、Itti らの顕著性マップモデルの概要図を示す。Itti らの顕著性マップモデルでは、まず、ガウシアンピラミッドにより輝度、色相、方向成分のスケール画像を入力画像から生成する。次に、各成分の複数の解像度において、center-surround difference 処理を行い Feature map を生成する。ここで、center-surround difference とは対象領域の中央と周辺の差分を計算する処理であり、中心周辺型の受容野の働きをモデルにしている。次に、異なる解像度の Feature map を正規化・統合して各特徴の Conspicuity map を生成する。最後に、各 Conspicuity map を線形結合し、Saliency map を生成する。Saliency map は人の注視の引きつけやすさを空間分布として可視化したものであり、顕著度の高い領域から順に視線が移動する。この時、視線を向けた領域には一時的に復帰抑制が働き、同じ場所に繰り返し視線が向けられるのを防いでいる。

2.2. 注視誘導に関する従来手法

Hagiwara らが提案した視覚的顕著性に基づく画像加工法⁵⁾について述べる。Itti らによって提案された視覚的顕著性モデルは輝度、色相、方向の3つの特徴量から定義されているが、この画像加工法では輝度と色相のみを用いて視覚的顕著度を求めている。前述したように、顕著性マップにおいて、顕著度が高い領域は注目を引き付けやすい。よって、この手法では、注視を誘導したい領域の顕著度を高く、それ以外の領域の顕著度を低くなるよう輝度と色相の調整を繰り返している。点 (i, j) における更新前の画素値を α_{ij} ($\alpha = R, G, B$)、更新後の画素値を α'_{ij} とし、画素値の更新式は次のように定義されている。

$$\alpha'_{ij} = \alpha_{ij} + P_{ij} Q_{\alpha_{ij}} \quad (\alpha = R, G, B) \quad (1)$$

ここで、 $Q_{\alpha_{ij}}$ ($\alpha = R, G, B$)は輝度と色相それぞれの特徴が顕著度にどの程度影響しているかを反映した画素ごとの基本修正量である。また、 P_{ij} は Saliency map の値によって定義される各画素の変化の度合いを決める強度係数である。

しかし、従来法の問題点として、指定領域とし

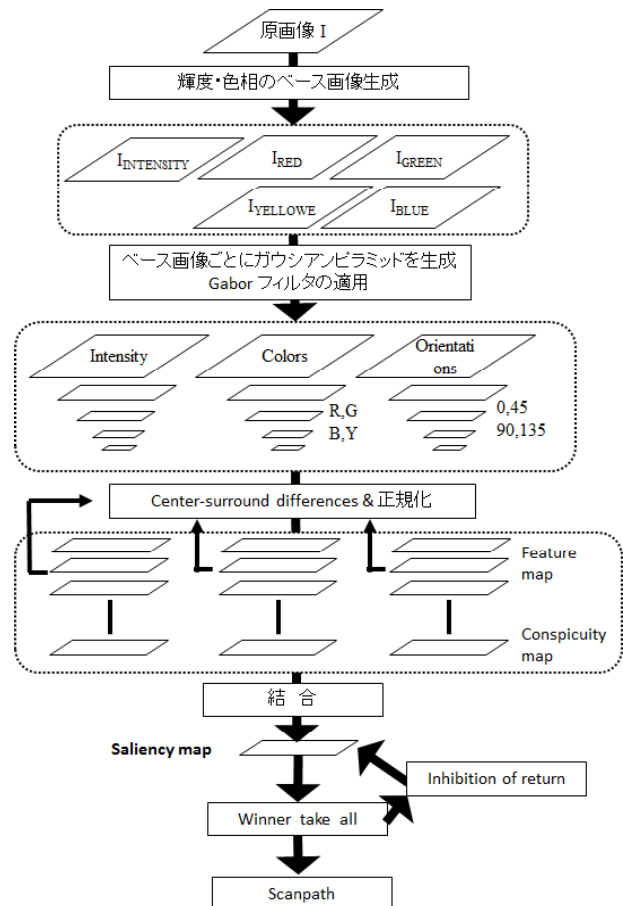


図 1 Itti らの顕著性マップモデル¹⁰⁾

た物体の内側や物体の輪郭部分に本来存在するはずのない色の境界が発生することが挙げられる。また、式(1)に基づいて徐々に各画素値を更新し、更新毎に顕著度の再計算を行っているため、計算コストが課題として挙げられる。

一方、Mendez らによって提案された手法⁶⁾は $L^*a^*b^*$ 表色系に基づいて Saliency map の計算と画像加工をリアルタイムで行っている。Saliency map の計算モデルは、Itti らの計算モデルと異なっており、ガウシアンピラミッドの代わりに mip-mapping を利用しており、また、正規化の簡略化を行っている。また、画像加工における各成分の修正量は、画像全体における各成分の顕著度 (conspicuity value) の平均値を閾値とし、各成分の顕著度と求めた閾値の差によって定義される。しかし、対象領域への注視の発生確率が低いことが課題として挙げられる。

3. 注視誘導のための視覚的顕著性に基づく自然な画像・映像加工技術

我々は、効果的にユーザの注視を誘導するための、違和感を生じさせない高速な画像加工法を提案する。本研究では、対象領域に注視を自然に誘導するため $L^*a^*b^*$ 表色系に基づく Visual saliency map を利用する。提案手法は Saliency map の計算と画像加工の 2 つの段階からなり、対象領域の顕著度が画像中で最大となるまで 2 つの処理を繰り返す。ここでは、それぞれの処理について詳細に述べる。

3.1. $L^*a^*b^*$ 表色系に基づくSaliency map

Itti らの提案している Saliency map モデル¹⁰⁾ は RGB 色空間から輝度、色相、方向の 3 つの特徴量を抽出し、それぞれに対して処理を行う。一方、Mendez らの提案している画像加工法で用いられている Saliency map モデルは $L^*a^*b^*$ 表色系を採用しており、また、正規化の簡略化などを行っている。我々は、高速かつより正確な Saliency map を求めるため、2 つの手法を組み合わせた Saliency map を提案する。

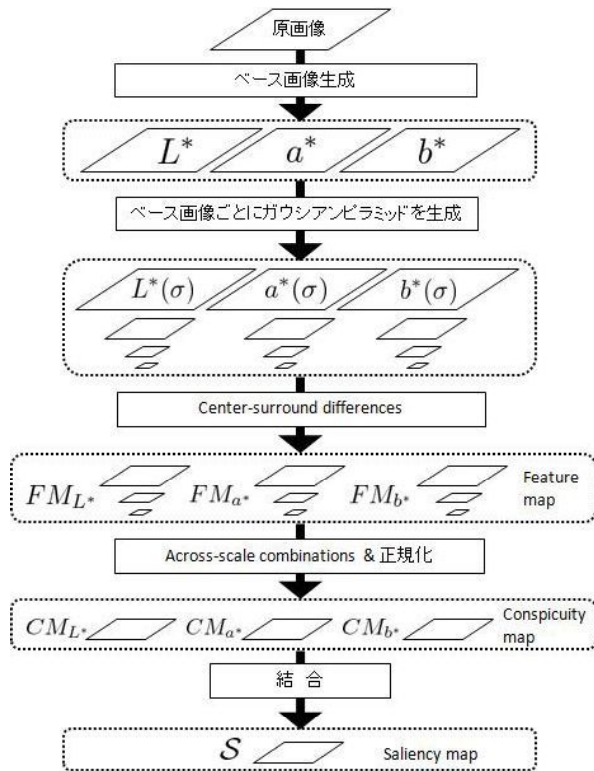


図4 $L^*a^*b^*$ 表色系に基づく顕著性マップモデル



(a) 原画像



(b) Itti らの計算モデル (c) 提案する計算モデル

図3 Saliency map の例

提案する Saliency map 計算モデルの概要を図2に示す。はじめに、入力画像を RGB 表色系から $L^*a^*b^*$ 表色系に変換し、 L^* 、 a^* 、 b^* の 3 つの成分に分離する。各成分に対してガウシアンピラミッドに基づいてダウンサンプリングしたスケール $\sigma \in [0, 1, \dots, 8]$ の 9 段階のスケール画像を作成する。原画像はスケール $\sigma = 0$ であり、 $\sigma = 8$ の画像は原画像の $1/256$ の大きさである。次に、各成分の複数の解像度において、center-surround difference 処理を行い Feature map を生成する。center-surround difference はガウシアンピラミッドの画素の細かいスケール(center)と画素の粗いスケール(surround)の差分計算モデルである。center のスケールは $c \in [2, 3, 4]$ であり、surround のスケールは $s = c + \delta$ 、 $\delta \in [5, 6, 7, 8]$ である。ここで、各特徴の Feature map $FM_k (k = L^*, a^*, b^*)$ は、次のように定義される。

$$FM_k(c, s) = |k(c) \ominus k(s)| \quad (k = L^*, a^*, b^*) \quad (2)$$

次に、異なる解像度の Feature map を統合して各特徴の Conspicuity map を生成する。ただし、ここでの処理は Itti らのモデルと異なり正規化を含まない。各特徴の Conspicuity map $CM_k (k = L^*, a^*, b^*)$ は、次のように定義される。

$$CM_k = \sum_{c=2}^4 \sum_{s=c+3}^{c+4} FM_k \quad (k = L^*, a^*, b^*) \quad (3)$$

最後に、各特徴の Conspicuity map を正規化したのち線形結合し、Saliency map を生成する。なお、Saliency map S は、次のように定義される。

$$S = \frac{1}{3}(\mathcal{N}(CM_{L^*}) + \mathcal{N}(CM_{a^*}) + \mathcal{N}(CM_{b^*})) \quad (4)$$

ここで、 $\mathcal{N}(\cdot)$ は正規化処理を意味している。

図 3 に Itti らの計算モデルと提案手法モデルそれぞれによって求めた Saliency map の例を示す。

3.2. Saliency mapに基づく画像加工

ここでは、Saliency map に基づく画素値の修正について述べる。

まず、ユーザが原画像に対して注視を誘導したい領域 D を決定する。そして、 $L^*a^*b^*$ 空間上で画像の加工を行うため、点 (i, j) における更新前の画素値を k_{ij} ($k = L^*, a^*, b^*$)、更新後の画素値を k'_{ij} とし、画素値の更新式(1)を次のように変更した。

$$k'_{ij} = k_{ij} + WP_{ij}Q_{k_{ij}} \quad (k = L^*, a^*, b^*) \quad (5)$$

ここで、 W は 1 回の更新に係る重みであり、この値が大きくなるほど処理の高速化が期待できる。

Hagiwara らが提案した画像加工法⁽⁵⁾では各特徴量が顕著度に及ぼす影響度を画素ごとの基本修正量 $Q_{k_{ij}}$ ($k = L^*, a^*, b^*$)に反映している。提案手法では特徴量 L^*, a^*, b^* が顕著度に及ぼす影響度 $\varphi(k)$ ($k = L^*, a^*, b^*$)を次のように定義する。

$$\varphi(k) = \frac{\mathcal{N}(CM_k)}{\mathcal{N}(CM_{L^*}) + \mathcal{N}(CM_{a^*}) + \mathcal{N}(CM_{b^*})} \quad (6)$$

$$(k = L^*, a^*, b^*)$$

この影響度を用いて画素ごとの基本修正量 $Q_{k_{ij}}$ ($k = L^*, a^*, b^*$)を次のように定義する。

$$Q_{k_{ij}} = \text{sgn}(k, i, j)\varphi(k) \quad (k = L^*, a^*, b^*) \quad (7)$$

ここで、 $\text{sgn}(k, i, j)\varphi(k)$ ($k = L^*, a^*, b^*$)はそれぞれの特徴について周囲との大小の比較で異なる符号を持つ符号関数であり、次のように定義される。

$$\text{sgn}(k, i, j) = \begin{cases} 1 & k(i, j) > k_{ave} \\ -1 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (8)$$

ここで、 $k(i, j)$ は画素 (i, j) におけるベース画像 k の値であり、 k_{ave} はベース画像全体の平均値を意味

している。

次に、強度係数 P_{ij} は次のように定義される。

$$P_{ij} = \begin{cases} S_{ave} & ((i, j) \in D) \\ -S_{ij} & \text{otherwise} \end{cases} \quad (9)$$

$$S_{ave} = \frac{1}{n} \sum_{(i, j) \in D} S_{ij} \quad (10)$$

ここで、 n は注視を誘導したい領域 D 内に存在する画素数である。提案手法では強度係数を領域 D 内の顕著度の平均とすることで、従来手法⁽⁵⁾の「領域 D 内に本来あるはずのない色の境界の発生する」課題を解決可能である。

4. 評価実験

提案手法の有効性を検証するため、視線計測実験と主観評価実験を行った。

4.1. 実験条件

実験には、素材辞典フォトバイブルなどから選んだ画像 10 枚を用いた。画像のサイズは $640 \times 480[\text{pix}]$ である。なお、それぞれの実験に協力頂いた被験者は、20 代の正常色覚を有する男性 5 名、女性 1 名である。

視線計測実験は、加工後の画像が被験者の注視を対象領域に誘導できることを確認するために行う。視線計測にはディテクト社の視線計測システム QG-PLUS を用いた。被験者の頭部は顎台で固定し、前方 60cm の位置に液晶ディスプレイを設置した。加工画像呈示前は画面中央に位置する固視点を注視させ、その後、加工画像に切り替え注視が誘導されるか確認した。

主観評価実験は、提案手法が違和感のない自然な画像加工であることを確認するために行う。実験は ITU-R で提案されている DSCQS 法(The Double Stimulus Continuous Quality Scale method)に基づき行う。この評価方法の特徴は、基準画像と比べた評価画像の画質差を精度良く評価できる点にある。実験手順として、原画像に対し、従来手法⁽⁵⁾、提案手法をそれぞれ適用し、加工後の画像を 2 枚得る。次に、原画像と 2 枚の加工後の 3 枚の画像をディスプレイ上で同時に提示する。評価者は、3 枚の画像それぞ

れについて5段階品質尺度の主観的な数値で評価する。評価尺度を0～100に正規化し、原画像とそれぞれの加工画像の評価の差を計算する。この画質差を評価者で平均したものがDSCQS値となり、この値が小さいほど評価画像の評価はよい。なお、提案手法におけるパラメータ W は経験的に10.0とした。

4.2. 実験結果

従来手法⁵⁾と提案手法それぞれを用いて画像を加工した例を図4と図5に示す。なお、それぞれの図において、(a)は原画像、(c)と(e)は原画像に対して提案手法と従来手法によって画像を加工したものを示している。また、それぞれの顕著性マップを(b)と(d)と(f)に示している。さらに、図4(a)に対する提案手法・従来手法それぞれに関して、画像の更新に伴う顕著度の変化のグラフを図4(g)と(h)に示す。なお、それぞれのグラフにおいて横軸は更新回数 k 、縦軸は顕著度 S である。また、 D_{avg} 、 D_{max} 、 $(x1,y1) \sim (x3,y3)$ はそれぞれ領域 D 内の顕著度の平均、領域 D 内の最大の顕著度、原画像において顕著度が最も高かった3点の変化を表す。なお、図4では、上段左から2番目の物体全体を注視誘導の対象領域 D として指定した。一方、図5では、左下物体全体を注視誘導の対象領域 D として指定した。結果より、従来法では指定領域の一部のみしか顕著度が上がっていないのに対し、提案手法では指定領域全体の顕著度が上がっている。よって、提案手法の注視を誘導する効果は高いと考えられる。

次に、ある被験者に対する視線計測実験の結果例を図6に示す。なお、図6(a)は原画像図4(a)に対するスキャンパス、図6(b)は提案手法を用いて加工した画像図4(c)に対するスキャンパスである。結果より、提案手法は効果的にユーザの注視を特定の領域に誘導できることが確認できた。

また、主観評価実験の結果として従来手法と提案手法のDSCQS値の平均を表1に示す。従来手法で加工した画像に比べて、提案手法で加工した画像のほうがDSCQS値が小さくなった。したがって、提案手法は従来手法と比べ違和感の少ない加工が可能であることを確認した。

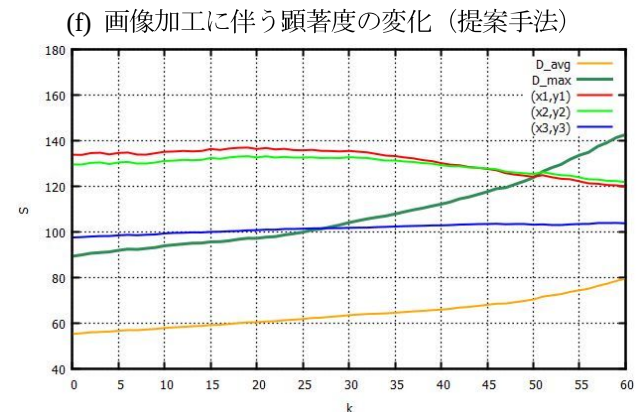
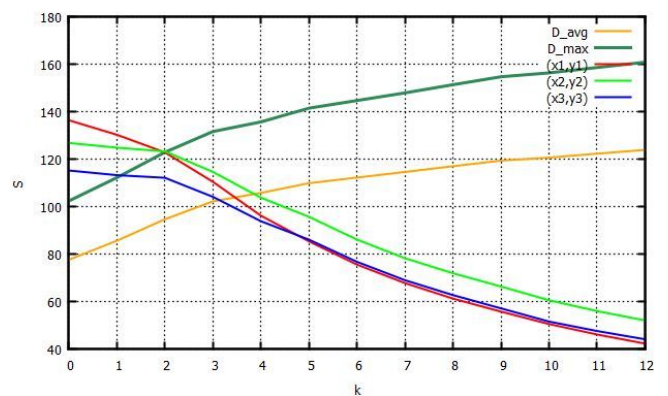
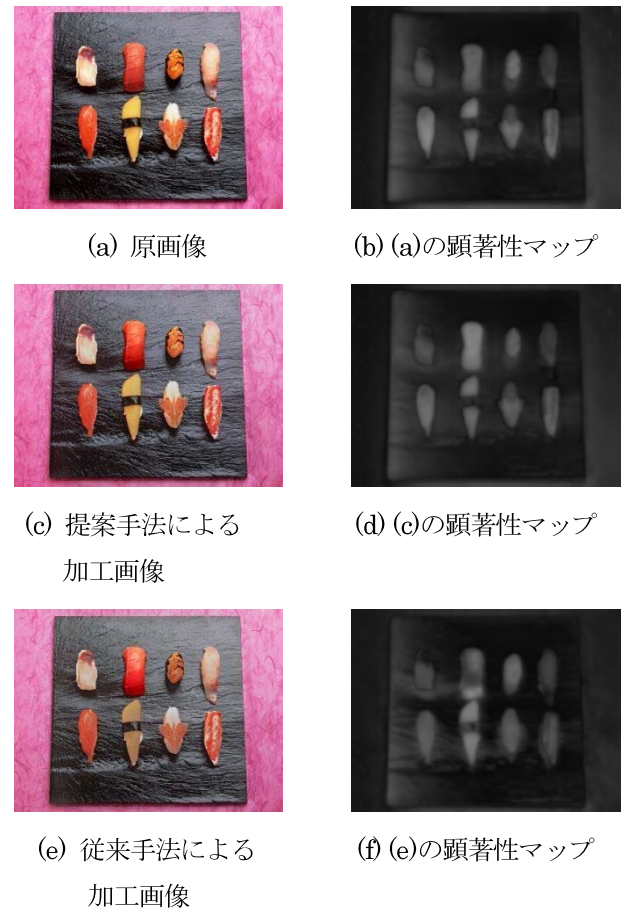
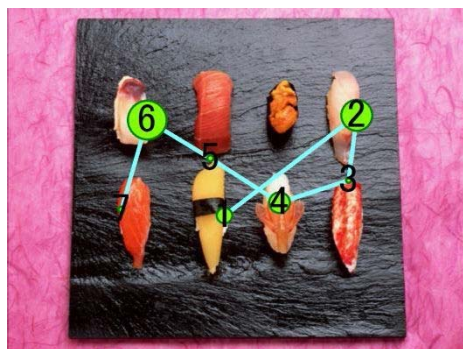


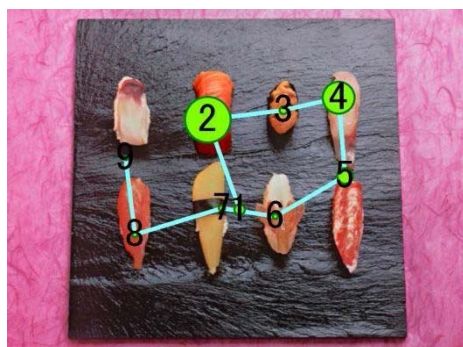
図4 画像加工例1



図5 画像加工例2



(a) 原画像



(b) 提案手法による加工画像

図6 スキャンパスの例

表1. 主観評価(DSCQS)の結果

	画像 A	画像 B	画像 C	画像 D	画像 E
従来 手法 ⁵⁾	39.2	56.2	37.0	62.8	40.8
提案 手法	49.5	25.2	32.3	38.3	23.8

最後に、従来手法と提案手法の処理時間について評価を行った。実験に用いた計算機は Pentium(R) Dual-Core E5200, CPU 2.5GHz, 2.00GB RAM である。結果として、画像加工にかかる処理時間は従来手法は 25.63 秒（更新回数 50 回）であり、提案手法は 0.81 秒（更新回数 5 回）であった。また、更新 1 回当たりにかかる処理時間は従来手法⁵⁾は 0.51 秒であり、提案手法は 0.16 秒であった。

これらの結果より、提案手法を用いることで、従来手法に比べて原画像の自然性を損なわずに高速な注視誘導のための画像加工が可能であることを確認した。

5. まとめと今後の課題

我々は、人の注視を遮ることなく自然に注視を誘導するため、視覚的顕著性に基づく画像加工法を提案した。提案手法では、画像中で指定した領域の視覚的顕著性が最も高くなるように $L^*a^*b^*$ 表色系の各成分を画素ごとに調整した。評価実験として視線計測実験と主観評価実験を行い、提案手法の有効性を確認した。

参考文献

- 1) 矢野本幸拓, 疋田真一, 小林康秀, 小野貴彦, 斉藤充行：視線情報を用いた PC 入力インタフェースの開発, 電子情報通信学会技術報告, 巻 107-4, 591/598 (2007)
- 2) 叶世智士, 阿部清彦, 大山実, 大井尚一：視線入力制御によるパソコンテレビ観賞システム, 電子情報通信学会技術報告, 巻 4-59, 37/42 (2005)
- 3) M. Posner : Orienting of Attention,

Quarterly Journal of Experimental Psychology, 巻 32, 3/25 (1980)

- 4) 猪目博也, 饗庭絵里子, 下斗米貴之, 藤澤隆史, 長田典子 : LED警告灯の視認性向上 : 目立ちやすさの感性指標に基づく点滅パターン評価法, 映像情報メディア学会技術報告, 巻 34-10, 89/92 (2010)
- 5) A. Hagiwara, A. Sugimoto, and K. Kawamoto : Saliency-based image editing for guiding visual attention, PETMEI'11 Proceedings of the 1st international workshop on pervasive eye tracking & mobile eye-based interaction, 43/48 (2011)
- 6) E. Mendez, S. Feiner, and D. Schmalstieg : Focus and Context in Mixed Reality by Modulating First Order Salient Features, Int. Symp. On Smart Graphics, 232/243 (2010)
- 7) 原口健, 岡嶋克典 : 視覚探索における誘目性の定量化, 日本視覚学会誌 VISION, 巻 23-1, 1/18 (2011)
- 8) J. Shen, E. M. Reingold and M. Pomplun : Distractor ratio influences patterns of eye movements during visual search, Perception, 巻 29, 241/250 (2000)
- 9) 根来美貴, 曾我真人, 瀧寛和 : 読者の視線移動を考慮した初心者向けマンガ作成支援システムの設計, 情報処理学会シンポジウム (CD-ROM), 巻 2013-1, ROMBUNNO.2EXB-40
- 10) 木村昭悟, 米谷竜, 平山高嗣 : 人間の視覚的注意の計算モデル, 電子情報通信学会技術報告, 巻 111-499, 89/100 (2012)
- 11) L. Itti, C. Koch, and E. Niebur : A model of saliency-based visual attention for rapid scene analysis, IEEE Trans. on PAMI, 巻 20-11, 1254/1259 (1998)

Kishihara, and K. Okubo: "Color Image Modification Based on Visual Saliency for Guiding Visual Attention", Proc. of 22th IEEE International Symposium in RO-MAN2013, pp. 467-472, (2013.8)

2. T. Kokui, H. Takimoto, H. Yamauchi, M. Kishihara, and K. Okubo: "Image Modification based on Bottom-up Saliency Map for Directing User's Gaze", Proc. of RISP International Workshop on NCSP, pp. 637-640, (2014.3)
3. 国井 達彦, 滝本 裕則, 満倉 靖恵, 岸原 充佳, 大久保 賢祐: "注視誘導のための Saliency Map に基づく画像加工", 平成 25 年 電気学会 電子・情報・システム部門大会 講演論文集, OS10-4, pp. 933-937, (2013.9)
4. 国井 達彦, 滝本 裕則, 山内 仁, 岸原 充佳, 大久保 賢祐: "自然な注視誘導のための画像加工に関する研究", 第 15 回 IEEE 広島支部 学生シンポジウム 論文集, B-75, (2013.11)

成果の発表, 論文等

1. T. Kokui, H. Takimoto, Y. Mitsukura, M.

生産性に着目した類推法による工数見積もりについて

岡山県立大学 情報工学部

天寄 聡介

ソフトウェアの規模・複雑度が増大する現在の状況において、ソフトウェア開発に要する工数を適切に見積もることの重要性はいよいよ高まっている。工数見積り手法のひとつに類推法と呼ばれる手法がある。この手法ではプロジェクト特性間の距離に基づいて類似プロジェクトが選択される。一方で、プロジェクト開始時には特定できない生産性などの類似性については考慮されていない。本研究はこの点に着目し、過去のプロジェクトデータを用いて生産性の類似性に基づいて類似プロジェクトを提示する手法(ABE-P)を構築し、このアイデアの有効性について検証した。その結果、従来法と同程度の予測精度が実現できることを確認できた。

1. はじめに

ソフトウェア開発において、工数見積もりは最も重要な活動のひとつである。精度が高い工数見積もりは、納期の遅延やコスト超過に関するリスクを評価する際に役立つ。したがって、その精度はプロジェクトの成否に大きく影響する。

類推法 (Analogy-based estimation, ABE)[1] はモデルに基づいた工数見積もり手法の一つであり、最もよく研究が進められている手法の一つである。類推法は以下の手順で工数を見積もる。

- 1 見積もり対象プロジェクトと過去プロジェクトの類似性を計測する
- 2 見積もり対象プロジェクトとよく類似した過去プロジェクトを選択する
- 3 選択されたプロジェクトから工数を見積もる

類推法にはプロジェクトの特徴に対する重み付けの有無など多くのパラメータが存在する。類推法の構成には 17,000 以上のパラメータが存在することが Kocaguneli らによって示されている[2]。

類推法は過去プロジェクトのデータを用いてパラメータを最適化することで高い精度を実現している。

多くのパラメータが存在する一方で、類似プロジェクトの選択はプロジェクトの特徴ベクトル間の(重み付き)距離によって行われている。しかしながら、表層的な特徴の類似性が必ずしもプロジェクトのパフォーマンスの類似性を表すわけではない。

本研究では、プロジェクトのパフォーマンスの類

似性に基づいてプロジェクトを選択する方法について検討した。この目的のため、生産性の定義のひとつである、project delivery rate (PDR) の類似性を利用した類推法 ABE-P を構築し、その性能を従来法と比較した。本研究における Research Question は以下の通りである。

- RQ1. パフォーマンスの類似性によって過去プロジェクトデータを順序付けできるか？
- RQ2. ABE-P の性能は従来法と比較してどのぐらいか？

実際のプロジェクトで収集されたデータを用いた実験により、従来法と同程度の予測精度で工数見積もりが行えることを確認できた。

2. PDR の類似性に基づいた類推法 ABE-P

2.1.概要

ABE-P は PDR の類似性に基づいて過去プロジェクトを選択する。ここで PDR は以下のように定義される。

$$\text{PDR} = \frac{\text{工数}}{\text{ソフトウェア規模}}$$

ただし、見積もり対象プロジェクトの工数は未知の値となるので、ABE-P では PDR の類似性を計測するのではなく、予測システムを用いて予測する。

予測システムは 2 つのプロジェクトデータを入力として受け取り、それらの類似性を予測する。ABE-P は予測された類似性に基づいて過去プロジェクトを

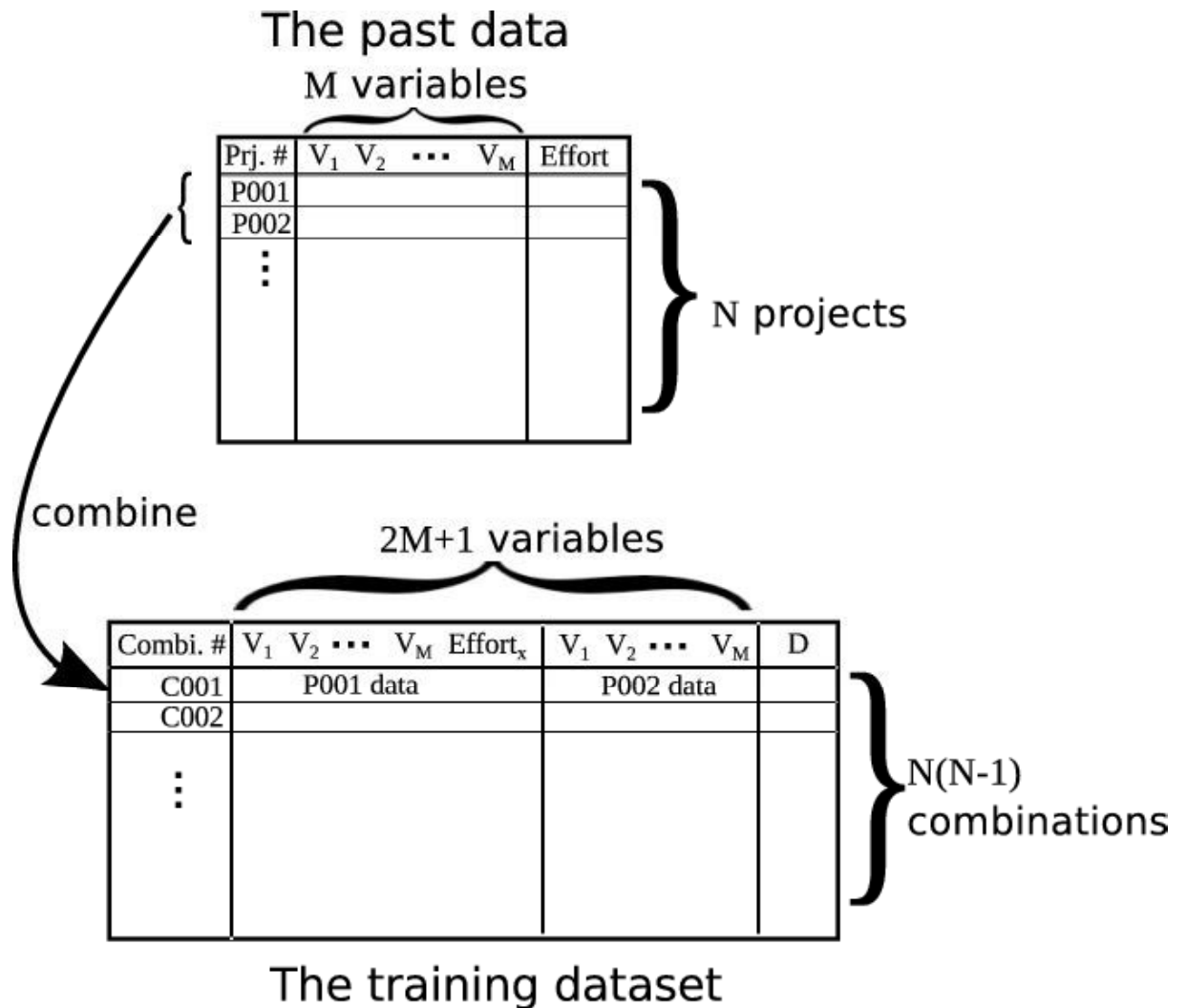


図 1 訓練データ生成の例

選択する。

2.2.PDR の類似性の定義

ある 2 つのプロジェクト x, y の類似性は以下の定義で定量化する。

$$D = \text{PDR}_y - \text{PDR}_x \quad (1)$$

2 つのプロジェクトの PDR が同じであれば $D = 0$ となる。プロジェクト y の PDR よりプロジェクト x の PDR 方が高い値である場合、 $D > 0$ となる。詳細は後述するが、 D の予測値とプロジェクト y の規模から、プロジェクト y の工数を予測できる。

2.3.予測システムの訓練データ生成

図 1 に予測システムの訓練データの生成法を示す。ここで過去プロジェクトは N 件が収集されている

とする。各プロジェクトでは M 種類のプロジェクト特性が記録されている。過去プロジェクト全ての組み合わせで訓練データを構成する。図 1 では、訓練データ C001 は過去プロジェクト P001 と P002 から構成されている。最終的に $N(N-1)$ 通りの組み合わせで訓練データが生成される。

図 1 において、左側の部分が予測時に過去プロジェクトのデータ、右部分が見積もり対象プロジェクトのデータを入力する部分である。過去プロジェクトについては工数が既知であるため説明変数として $Effort_x$ が含まれている。また、 D の値が被説明変数として定義されている。

2.4.工数見積もり用データ生成

工数見積もりは選択されたプロジェクトに基づい

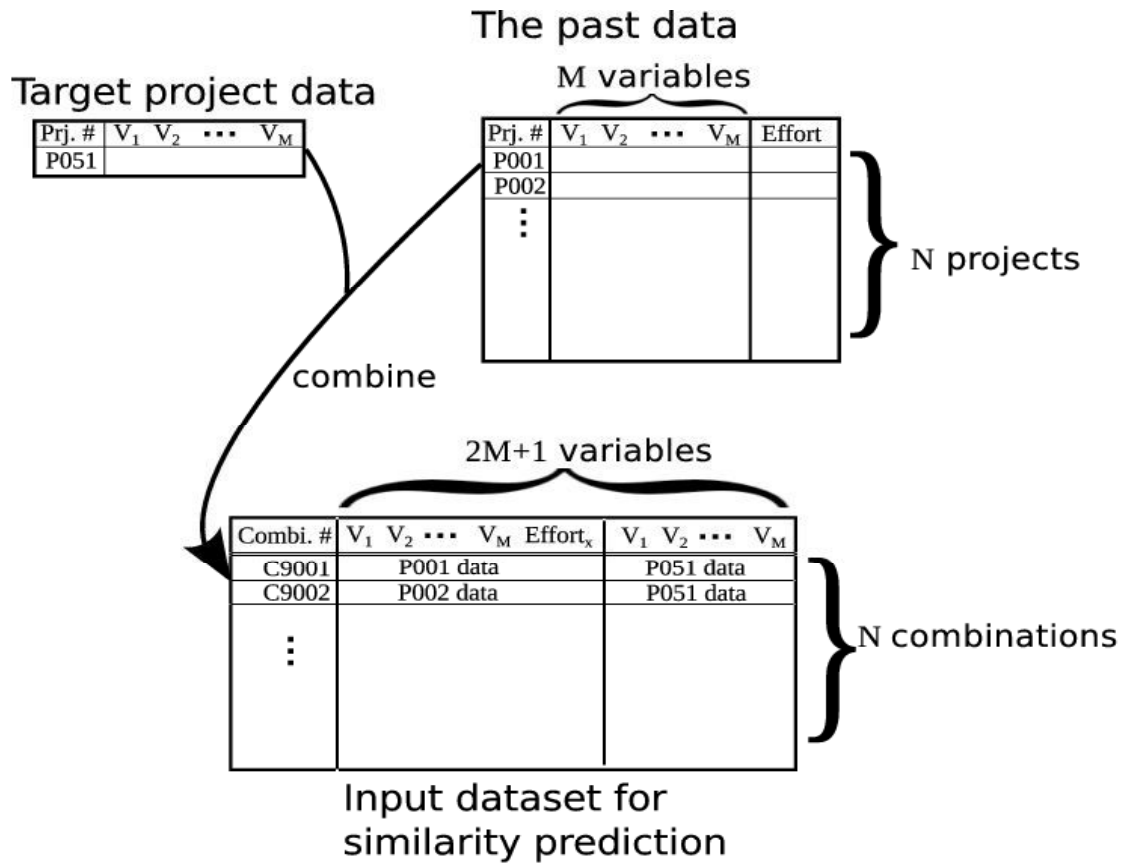


図 2 見積もり用データ生成の例

て行われる。まず、見積もり対象プロジェクトと過去プロジェクトのデータ全ての組み合わせを生成する。前節の訓練データで学習した予測システムに生成したデータを入力することで、各組み合わせにおける D が予測できる。この予測値の絶対値 $\|D\|$ に基づいて過去プロジェクトをソートし、上位 K 件の過去プロジェクトを選択する。

図 2 は予測システムへの入力値の生成例である。 N 件の過去プロジェクトと見積もり対象プロジェクトを組み合わせ、合計 N 件の組み合わせデータが生成される。図 2 の組み合わせデータ C9001 は見積もり対象プロジェクト P051 と過去プロジェクト P001 の組み合わせたものである。P001 は過去プロジェクトなので工数は既知である。

2.5. 工数見積もり

最も簡単な工数見積もりは、 K 件の過去プロジェクトの PDR の平均値を用いる方法である。

$$Effort_t = Size_t \cdot \overline{PDR} \quad (2)$$

ここで、 $Size_t$ は見積もり対象プロジェクトの規模である。

もう一つの方法は、 D の予測値を用いて、 PDR の値を補正する方法である。まず、以下の式で PDR の補正する。

$$PDR'_k = \check{D} \cdot PDR_k \quad (3)$$

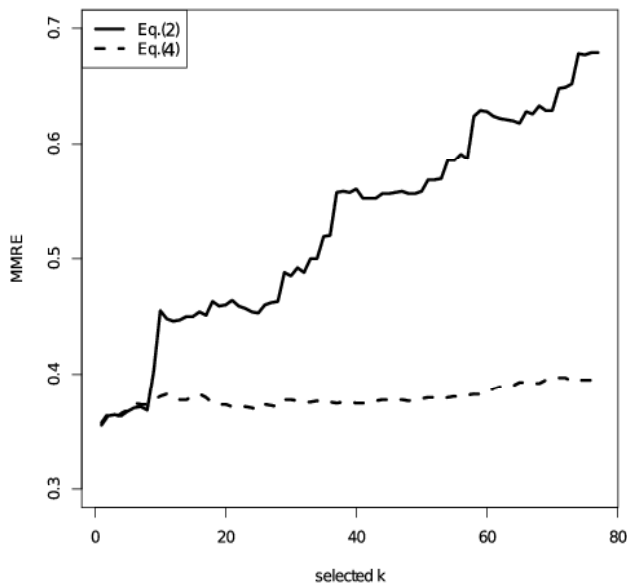
ここで $\check{D}$ は見積もり対象プロジェクト t と過去プロジェクト k の類似性の予測値である。補正済み PDR を用いて、工数を以下のように見積もる。

$$Effort_t = Size_t \cdot \overline{PDR'} \quad (4)$$

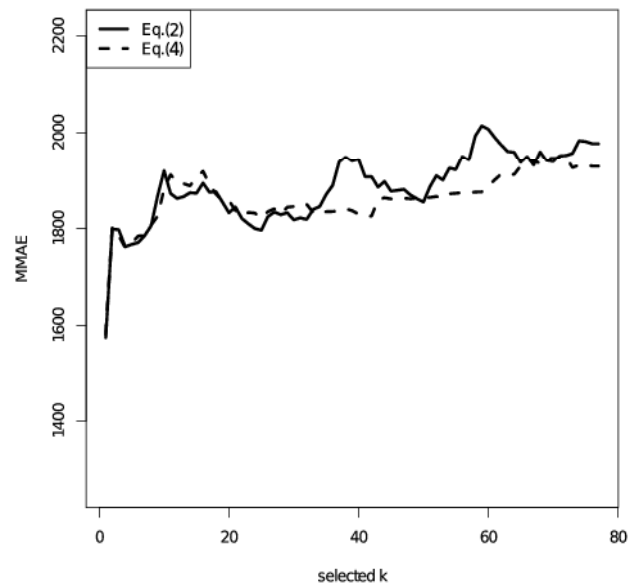
3. 準備

3.1. 実験方法

本研究では *leave-one-out cross-validation* を用いて評価実験を行った。プロジェクトデータは PROMISE Repository の Desharnais データセットを用いた。Desharnais データセットは既存研究において広く用いられており、従来法との比較を行う場合に適している。類似性の予測システムには回



(a) MMRE



(b) MMAE

図 3 選択プロジェクト数 k と評価指標の関係

帰木(CART)を採用した。帰帰木は適用の前提となる仮定が少なく、また変数選択手法が自動で行われることから、今回のように説明変数が多い場合に適している。

帰帰木には性能向上に寄与するパラメータがある。本研究では minimum split size s を ($10 \leq s \leq 200$) の範囲で 10 刻みにして探索した。また、complexity parameter を 0.005, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1 の範囲で探索した。帰帰木は統計用ソフトウェア R の rpart パッケージを利用した。また、最適化については、e1071 パッケージの best.rpart 関数を用いた。

3.2. 評価指標

本研究では工数見積もり手法の評価によく用いられる評価指標、MMRE, MdMRE, PRED(25), MBRE, MMAE, MdMAE を用いた。MMRE と MdMRE は Magnitude of Relative Error(MRE)の平均値と中央値である。PRED(25)は MRE の値が 0.25 未満である割合を示す。MBRE は Balanced Relative Error (BRE) の平均値である。BRE は MRE で生じるバイアスを補正した指標である。MMAE と MdMAE は Magnitude of Absolute Error (MAE)の平均値と中

央値である。

4. 実験結果

Desharnais データセットには 77 件のプロジェクトデータが含まれている。工数と開発期間の 2 つを除いた 9 つの変数が説明変数となりうる。そのうち 1 つはプロジェクト完了年である。

見積もり対象プロジェクトに関して、予測システムに入力するのは、TeamExp, ManagerExp, Transactions, Entities, PointsNonAdjust, Adjustment, PointsAdjust, Language の 8 種類である。Language はカテゴリカル変数であるので二値変数に変換した。過去プロジェクトに関して、予測システムに入力するのは、先ほどの 8 変数と YearEnd, Length, Effort の 3 変数である。これら 3 変数は過去プロジェクトに関しては既知である。

図 3 に選択プロジェクト数と評価指標の関係を示す。ここでは MBRE と MMAE の結果のみ示す。他の評価指標も同様の傾向を示した。式(2)を用いた見積もり(図 3 の実線)では選択プロジェクト数 k が増加するにつれて評価指標が悪化している。従って、D の予測値による順序付けに一貫性があると言える。Desharnais データセットでは、最も良い性能を示し

表 1 実験結果($k = 1$)

Models	MMRE	MdMRE	PRED(25)	MBRE	MMAE	MdMAE
Eq.(2)	0.36	0.27	0.46	0.42	1575	837
Eq.(4)	0.36	0.26	0.46	0.42	1582	816

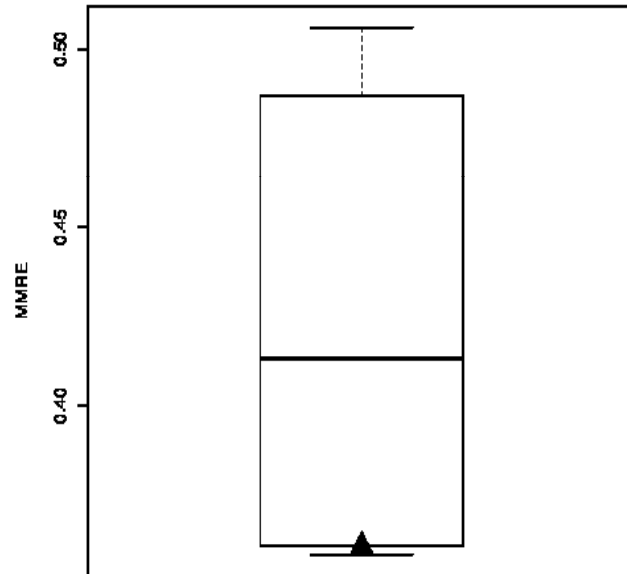


図 4 文献[2]との性能比較

たのは $k = 1$ の時であった。

式(4)を用いた見積もり(図 3 の破線)では MMAE は徐々に悪化した。一方, MMRE は k に関わらずほぼ一定の性能を示した。これは PDR の補正による改善であると考えられる。式(4)を用いた見積もりでも $k = 1$ が最適な値であった。

表 1 に $k = 1$ の時の性能指標の値を示す。式(4)による見積もりは PDR の補正を行ったにも関わらず, 式(2)に比べて有意な改善はみられなかった。これは, $k = 1$ の時に D の予測値が十分に小さかったためであると考えられる。

5. 考察

RQ1 に関して, もし ABE-P が過去プロジェクトを適切に順序付けできるのであれば, 式(2)による見積もり結果の性能指標は k が増加するに従い悪化

すると考えられる。図 3 からこの予想と同等の傾向が読み取れる。すなわち, 最適な k は $k = 1$ の時であり, k の増加に従って性能は悪化する。以上のことから, PDR の類似性によって過去プロジェクトを順序付けすることができると言える。

RQ2 に関して, 類推法は多くのバリエーションがあるため, その全てと比較することは難しい。そこで, 本研究と同じデータセットおよび leave-one-out cross-validation を使用している文献[3]の類推法と性能を比較した。文献[3]では 16 種類の類推法を比較評価している。これらは 8 つの adaptation technique と変数選択の有無を組み合わせたものである。性能評価は MMRE で行われており, $k = 1, 2, 3$ の場合について性能が報告されている。本研究では, これらのうちで最も性能が良い類推法の結果と性能を比較した。複数の類推法と比較することによって,

ABE-P の性能を相対的に示すことが可能である。

図 4 に比較結果を示す。図中の三角が ABE-P の性能を示す。図から明らかなように ABE-P の性能は十分に高いと言える。

相対的な性能について、文献[4]とも比較を行った。

文献[4]では 3 つの類推法を SA と呼ばれる指標に基づいて比較評価を行っている。3 つの中で最も性能が良かったのは、ヒューリスティックによる変数選択、過去プロジェクトのサブセット選択、および inverse distance weighting を行った類推法であった。

ABE-P との比較評価は効果量 Δ を用いて行った。効果量 Δ は文献[4]で以下のように定義されている。

$$\Delta = \frac{MMAE_{P_i} - MMAE_{P_j}}{S_{P_j}} \quad (5)$$

ここで、 S_{P_j} は予測システム j の標本標準偏差である。効果量の値は次のように読み取ることができる：効果小($\Delta \approx 0.2$)、効果中($\Delta \approx 0.5$)、効果大($\Delta \approx 0.8$)。効果小の時、予測システム i と j の間の性能差は実際的には意味がないということになる。

文献[4]にある最良の手法について、MMAE および MMAE の標本標準偏差はそれぞれ 1346 と 2097 であった。よって、式(5)による見積もりとの間の効果量は $\Delta = \frac{1582-1346}{2097} = 0.11$ となる。よって、ABE-P は十分に精度が高い手法であると言える。

6. おわりに

本研究では PDR の類似性に基づいた類推法による工数見積もり手法 ABE-P について調査を行った。そして、その性能について従来法と性能比較を行った。実験結果は ABE-P が有効な手法である可能性を示した。具体的には、変数選択、adaptation technique、およびプロジェクトに対する重み付けを行う類推法とほぼ同等の工数見積もり精度を示した。このことから、PDR に基づく類似プロジェクト選択に一定の効果があることが明らかとなった。

本研究の結果は Desharnais データセットのみに基づくものであり、他のプロジェクトデータを用いた一般性の議論が不可欠である。また、従来法と比べて選択されるプロジェクトに違いが生じているのかといった点についても調査を行う必要がある。この違いを明らかにすることで、ABE-P による選択

プロジェクトが実務者に従来法とは異なる視点を提供できると考えられる。

参考文献

- [1] M. Shepperd and C. Schofield, “Estimating Software Project Effort Using Analogies,” *Software Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 23, no.11, pp. 736–743, Nov. 1997.
- [2] E. Kocaguneli, T. Menzies, A. Bener, and J. W. Keung, “Exploiting the Essential Assumptions of Analogy-Based Effort Estimation,” *Software Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 38, no.2, pp. 425–438, 2012.
- [3] M. Azzeh, “A replicated assessment and comparison of adaptation techniques for analogy-based effort estimation,” *Empirical Software Engineering*, vol. 17, no. 1-2, pp. 90–127, Sep. 2011.
- [4] M. Shepperd and S. MacDonell, “Evaluating prediction systems in software project estimation,” *Information and Software Technology*, vol.54, no.8, pp. 820–827, Aug. 2012.

土工工事に伴う水文観測データに基づいた工事影響評価手法の開発

岡山理科大学 生物地球学部 生物地球学科

佐藤丈晴

土木工事に伴う地下水位観測は、工事の影響評価のために実施する。しかしながら、その評価は技術者の主観に頼るところであった。本研究は、工事影響評価の客観的な基準の設定方法について提案する。

本研究で提案する工事影響評価手法は、観測された降雨量と地下水位から予測モデルを算定する。そして、区間推定法によって構築した工事影響評価モデルに基づいて定量的に評価するものである。さらに、実際の地下水観測業務に適用し、分析結果に基づく工事影響評価の基礎資料として活用した事例についても示すものとする。

1. はじめに

山岳トンネル等の土工工事は、周辺の地下水位への影響が大きい¹⁾。このため、工事の影響を評価することを目的とした地下水位観測業務は、数多く実施されている。これらの業務は、地下水位を工事前から工事中及び工事後の一定期間にわたって連続あるいは一定期間ごとに観測を行い、工事前期間と工事開始後の観測データの比較・分析から、工事の影響を評価する。

地下水位の予測や推定は、様々な視点から多くの手法が提案されている。例えば、貯留関数法やタンクモデル¹⁾、人工知能を用いた事例^{2),3)}、や新たな手法^{4),5)}の研究がある。筆者らも、既往の地下水位データから地下水位予測モデルを算定する技術を開発し、降雨量に基づいた地下水位の予測を行ってき

た⁶⁾。しかしながら、これらの手法は、将来の地下水位の予測を行う手法であって、工事の影響を評価するという目的とは異なる。工事前後で明らかに地下水位が異なった傾向を示せば判断は容易であるが、あいまいなケースもある。一例を図-1に示した。

この事例は、ほぼ月一度の定期観測結果を時系列にプロットしたものである。観測開始後一年数か月後に工事が始まった。工事後に観測された地下水位は、工事前の最小値を何度か下回った。工事前の地下水位の最小値を下回るケースが出た場合、すぐに工事の影響と評価するのは、降雨の影響を全く考慮しておらず、現実的な評価とはいえない。だからといって、では、「どこまで」地下水位が低下したら、工事の影響であるのかを判断する基準を設定する方法がなかった。

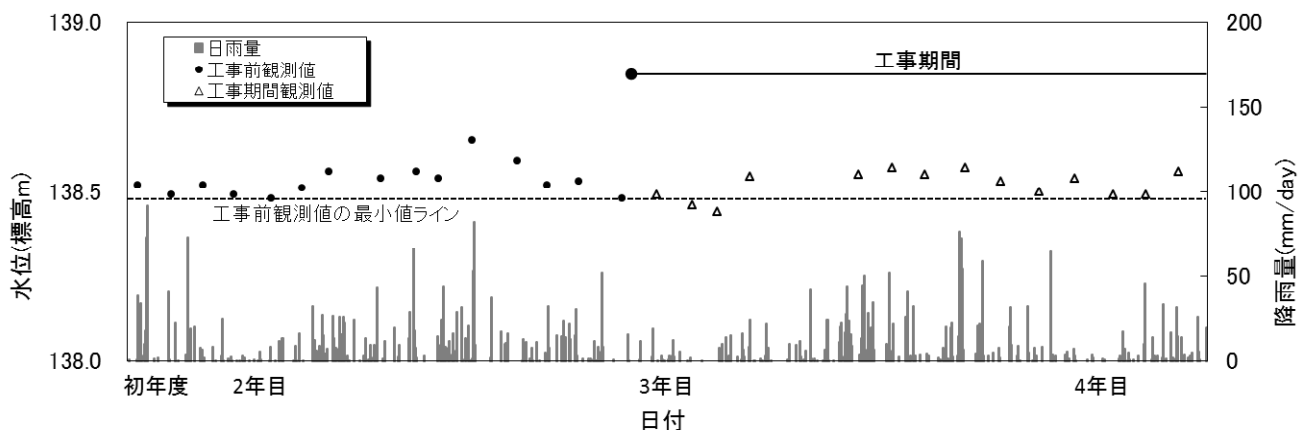


図-1 工事の影響かどうかの評価が難しい事例

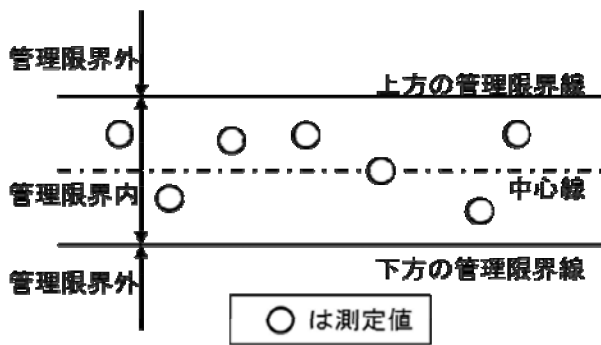


図-2 管理図

地下水位観測業務における工事影響の有無は、技術者の主観に頼られてきた。この判断の際、定量的な指標があれば、より客観的となる。また、工事開始後における周辺地区の地下水位の管理において、定量的な基準を定めておけば、今後の判断・評価を助けることも可能となる。

本研究は、地下水位に基づいた工事影響評価手法を提案することを目的とする。

2. 工事影響評価方針

本研究で対象とする地下水位とは、工事の影響のおそれのある範囲に含まれるとして、工事前から観測している井戸等の水位を主対象とする。水位の変動は、降雨量の影響を強く受けることから、このような地下水位観測業務では、地下水位とともに降雨量の観測を行うものや、近傍の雨量観測所の雨量データの収集整理を行い、降雨量と地下水位との関係を確認する。本研究も、降雨量と地下水位が観測されている条件で検討する。また、地下水位観測の方法は、自記水位計などを採用した連続観測あるいは

観測者が一定期間ごとに計測する定期観測などがあるが、その方法は問わない。

ところで、工場の製造工程における品質管理の分野では、管理図を作成して管理限界線を設定する(図-2)⁷⁾。管理図は、結果に対して、その原因(要因)がはっきりとわかっているものについて管理するものである。プロットが管理限界内にあれば、工程は管理状態にあり、管理限界外に点が出たならば、その工程に何か異常な原因があることを示す⁷⁾。この管理図には、区間推定の理論が用いられている⁸⁾。

この理論を地下水位観測に応用し、降雨によって変化する地下水位の管理図(以後工事影響評価モデルと記述する)を設定する方針とした。例えば、図-1の地下水位を用いて工事影響評価モデルを構築したものを図-3に示した。工事前と工事後の地下水位の分布に変化がなければ、工事後の地下水位は信頼区間(管理限界内)に含まれ、もし工事後に信頼区間から外れたら(管理限界外)、地下水位に何らかの変化があったことを示す。

予測モデルの算出に当たって、重回帰分析や人工知能⁹⁾や最適化手法など様々な手法で検討することも可能である。本研究では最も単純な単回帰分析を提案した。それは以下の理由による。

- ・図示してわかりやすい説明が可能

横軸に降雨、縦軸に観測値を用いた散布図によって、紙上に予測モデル図を作成することができる。説明時に、この図を用いることでわかりやすい説明が可能となる。

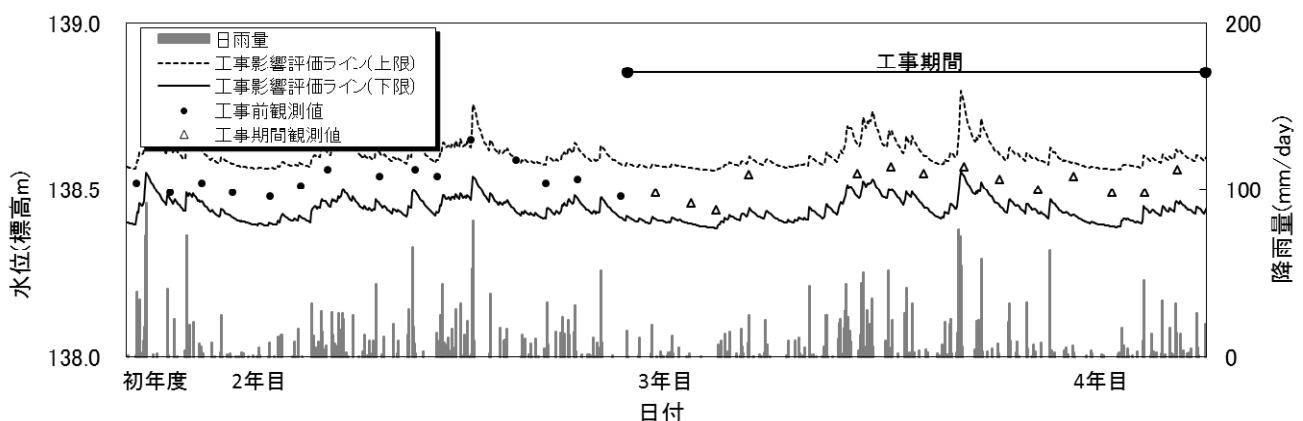


図-3 トンネル工事における時系列図

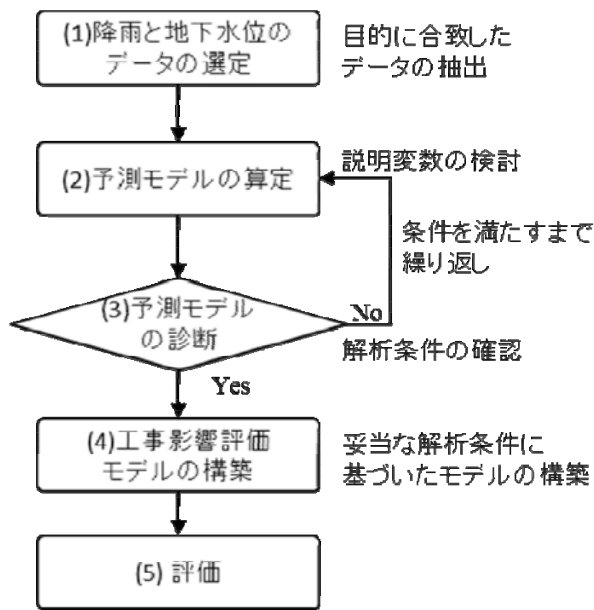


図-4 提案手法の検討フロー

・簡便かつ実用性を重視した

単純な統計分析を理解すれば誰でも応用可能な手法を選択した。統計ソフトを用いずとも、表計算ソフトのシートに該当する数式を適切に与えれば、作成可能な方法とした。

3. 提案する工事影響評価手法

提案する解析の手順を図-4にフローとして整理した。降雨量と地下水位の関係に基づいて予測モデルを算定し、予測モデルを区間推定することで工事影響評価モデルを構築した。以下に具体的な内容について詳述する。

3.1 降雨と地下水位のデータの選定

工事前の降雨量と地下水位のデータセットを採用して工事影響評価モデルを構築するが、このとき問題となるのが、目的に応じたデータの選定であり、すべてのデータセットについて個々に精査する。統計の有用性を保証するものは統計的方法自体ではなく、それぞれの問題の所属する専門分野の知識や経験でなければならない。このことをはっきりと理解しておくことは極めて重要である¹⁰⁾。観測期間内で、何らかのイベントによってデータの傾向が異なる等一定の地下水環境が維持できていない場合は、その背景やデータ収集状況等の確認を行う。

3.2 予測モデルの算定

降雨量と地下水位の回帰分析を行い、予測モデルを算定する。まず、順序として採用する降雨指標を算定する。

地下水位は、現在の降雨よりも若干遅れて反応する¹¹⁾。これは、流下、浸透速度等様々な影響が考えられる。この若干の遅れを表現するために、降雨データを加工して地下水位と相関分析を行うことが多い。海野ら（2008）は、降雨量と地下水位の関係について、実効雨量を採用することが有効であると指摘しており、本研究も実効雨量を採用した¹¹⁾。今回用いた数式¹²⁾を式（1）に示す。

$$Rw = \sum \alpha_{li} \times R_{li} \cdots (1)$$

Rw : 実効雨量

α_{li} : i 時間前の減少係数

R_{li} : i 時間前の1時間雨量

$\alpha_{li} = 0.5^{i/T}$ T は半減期

実効雨量とは、指数関数を用いて降雨の浸透・貯留過程を表現しようとする降雨指標である。式(1)では、半減期 α の値によって、様々な実効雨量を算定することができる¹²⁾。この実効雨量は、1つの流出孔を持つ1段タンクモデルと言い換えられる。(1)式を応用して遅延を考慮する場合もある。半減期の設定は、現地の地形地質の状況、地下水位の変動状況、時系列的な降雨との反応を整理し、当該箇所想定される降雨指標を複数算定する。もちろんタンクモデルの貯留高¹⁾や、気象庁で採用されている土壌雨量指数¹³⁾を採用してもよい。さらに累積雨量¹⁴⁾や移動平均雨量¹⁵⁾等もよく用いられる。今回は、これらの指標を多数算定し、後述する変数選択時の寄与率や予測モデルの診断によって、採用する降雨指標を選択した。

続いて、算定した降雨指標と地下水位を用いて単回帰分析による予測モデル($y=ax+b$)の構築を行う。まず、回帰係数 a が0であるかどうかを確認する。回帰係数 a が0となると、予測モデルは $y=b$ となり、地下水位は降雨量に全く関係しないことになる。例え

ば、観測された地下水位が被圧地下水等である場合が該当する。回帰係数 a は、データ数がある程度大きければ、標準正規分布に従う。よって回帰係数 a は、 t 分布に従うことから、検定統計量（ t 値）を算出して t 分布との比較を行う。このとき、信頼率は既往の研究¹⁶⁾を参考に95%を採用した。

地下水位と降雨量の相関があると判断された地下水位を説明変数である降雨指標を選択する。説明変数の選択は、変数ごとに寄与率（相関係数）より決定する。データ数にもよるが寄与率であればかなり相関があると表現される0.4以上¹⁷⁾を目安とし、それ以下であれば単回帰分析からより高度な手法を採用する。

3.3 予測モデルの診断

予測モデルに適用するデータは、予測モデルに従う母集団からランダムに選ばれたものであることが前提とされるから、予測モデルにおける地下水位の残差 e_i はランダムであることが要求される。 i 番目のデータの残差 e_i は実測値 y_i から推定し、

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \cdots (2)$$

e_i : i 番目の残差

y_i : i 番目の実測値

$\hat{y}_i$: i 番目の推定値

となる。この残差の分布は、解析条件及び説明変数の選択において重要である。

また、残差が特に大きいサンプルである外れ値についても注意を要する。残差が大きいかどうかの判断は、残差が残差の標準偏差の何倍であるかによって決める。残差 e_i の標準偏差は e_i ごとに異なるから、 i 番目の残差の t 分布である t_i は、

$$t_i = \frac{e_i}{s(e_i)} \cdots (3)$$

$s(e_i)$: i 番目の標準偏差

で求められ、 t_i に基づいて外れ値かどうかを判定する。

外れ値と判断された場合には、その原因などを追究し、水文学的に妥当かどうかの判断が必要となる。具体的な例として、観測日に井戸水を多量に利用し、

水位が著しく低下する場合や局地的豪雨が観測箇所のみであり雨量観測所には降雨がなかった場合等が挙げられる。

その結果、予測モデル構築に不適切と評価されたデータは、モデル構築データから除いて再び予測モデルを算定する。

3.4 工事影響評価モデルの構築

続いて得られた予測モデルの区間推定^{16), 18)}によって、工事影響評価モデルを構築する。ある降雨量 x_0 における地下水位の推定値（ y_0 ）の標準誤差 $s(y_0)$ は下式で表される。

$$s(y_0) = \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{u_0^2}{n-1}} \cdot s_e \cdots (4)$$

$$u_0 = \frac{x_0 - \bar{x}}{s_x}$$

s_x : 標準偏差

s_e : 残差標準偏差

これより、 y の値の信頼率95%の区間推定は、下式で与えられる。

$$y_0 - t(n-2; 0.05) \cdot s(y_0) \leq y_0 \leq y_0 + t(n-2; 0.05) \cdot s(y_0) \cdots (5)$$

式(5)よりすべての降雨量 x_0 に対して、地下水位の推定値 y_0 の予測区間の上限値と下限値が設定できる。

3.5 評価方法

工事影響評価モデルの評価方法は、管理図の評価方法に準じる。管理限界を超過する、中心線を基準にデータが偏る等様々なパターンがある⁸⁾。ただし、地下水位を連続観測する場合は、前時刻の影響を大きく受けるため、降雨イベントを経験する等長い期間のデータを用いて工事の影響評価を行う。

4. トンネル工事に伴う評価事例

本事例は、トンネル施工に伴う工事の影響を評価し、今後の管理基準値を設定することを目的とした

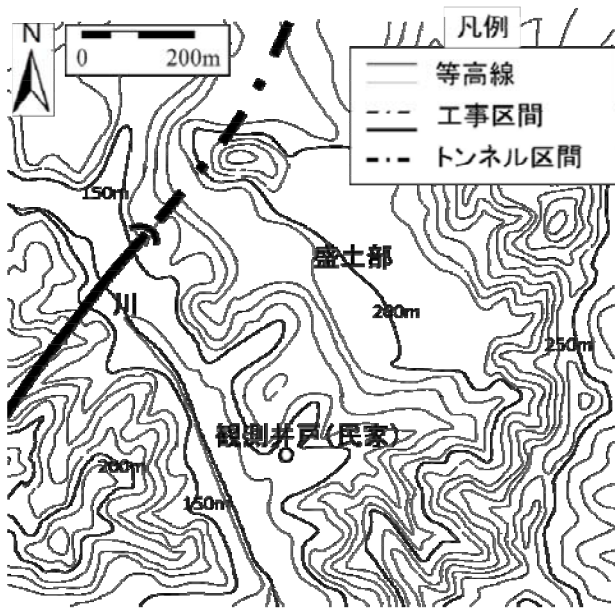


図-5 トンネル工事事例の周辺地形状況

地下水位観測事例（図-5）である。本稿の図-1で示したデータの箇所である。

今回対象とした井戸は、地元住民の井戸を用いた。対象となる井戸の上流には谷が形成しており、谷の上部は標高200m程度の盛土が造成されている。盛土の末端部に湧水があり、谷を流下している。井戸の深さは1.7mであり、月一度の定期観測を実施した。地質調査は実施していないが、地形から崖錐堆積物で構成され、透水性は高いと考えられた。

降雨データは、近傍のアメダスデータを活用した。本観測孔の予測モデルの寄与率は0.46であった。図-6に予測モデルと工事開始後の地下水位データを示した。図-3中には、工事期間を図中に示した。

図-6によると、工事前の観測値よりも水位が低い観測値は、いずれも降雨量が小さい領域にプロットされており、予測区間に含まれている。このグラフからも渇水時期にあった観測にて低い水位が得られており、この程度の降雨であれば、水位低下が想定されていたことを示している。

図-1において、工事開始直後、工事前観測値の最小値を下回る観測が数回記録したが、図-3より渇水による水位低下であり、事前の想定範囲内の水位変動であることが示された。観測開始から一年半程しか経過していないため、その中での最小値を下回ったこのような事例は往々にして発現する。データの

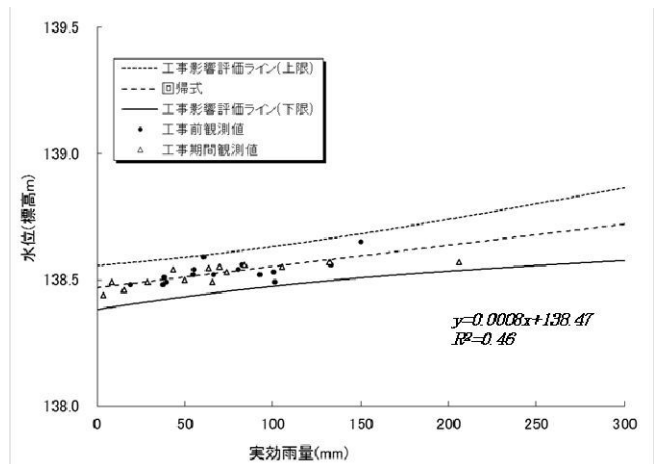


図-6 算定された工事影響評価モデル

集積を待つ以外にないが、提案手法を採用すれば最小値以下になったとしても、工事影響評価モデルからこの水位低下が想定されていたことを定量的に説明することができる。その後はほぼ予測モデル内の中央付近を推移しており、すべての観測で上限値、下限値内に収まった。

図-3は、地下水位観測を今後継続しても同様に予測区間を延長することができるため、地下水位の変化の有無について評価する一つの基準とした。今後工事影響評価モデルを基に管理し、基準を超過した場合詳細調査を行うこととした。

5. まとめ

本研究は、工事前から観測された地下水位に基づいた工事影響評価手法を提案することを目的とした。本研究は、簡易な予測手法の一つである単回帰分析と区間推定法を応用して工事影響評価モデルの構築方法を提案し、実際の事例を用いてその有効性を示すことができた。

飲料水として地下水を活用している地域住民においては、井戸水の水位低下は生活にかかわる問題である。本提案手法が、地下水位に基づき早期に影響のある箇所を評価し、また管理基準値として用いられ、基準超過時には迅速に詳細調査を行うステップになればと考えている。

謝辞：

公益法人ウエスコ学術振興財団の研究助成支援を受けて実施したものである。ここに記して感謝申し上げます。

また、本研究は予算の関係上、新たな手法開発までいかず、既往の成果の検証及びとりまとめに留まりましたことをここにお詫び申し上げます。

引用文献：

- 1) 高橋健二, 大津宏康, 大西有三 (2003) : タンクモデル法による斜面の降雨時リスク評価法の研究, 建設マネジメント研究論文集, vol. 10, pp. 341-348.
- 2) 阿部清明, 菊池英明, 古川浩平, 塩月善晴 (2000) : ニューラルネットワークによる流出解析手法(日雨量)に関する研究, 土木学会論文集, No. 656/II-52, pp1-13.
- 3) 春原常男, 内海博, 井上勝矢, 眞間修一, 吉田武司, 武村仁志 (2006) : ニューラルネットワークモデルによるダム諸量予測と相模川洪水予測システムの検討, 河川技術論文集, 第 12 巻, pp. 229-234.
- 4) 菊森佳幹, 飯田進史, 荒木千博, 米勢嘉智, 川戸渉 (2012) : リアルタイム洪水予報への対応のための CommonMP の機能改良, 土木学会第 67 回年次学術講演会, II-145, pp. 289-290.
- 5) 早川信光 (2012) : 新流出予測モデルの開発, 土木学会第 67 回年次学術講演会, II-147, pp. 293-294.
- 6) 古川浩平, 中山弘隆, 竹本大昭, 服部篤史, 荒木義則, 佐藤丈晴, 菊池英明, 大石博之 (2005) : 特許第 3646726 号 防災事業支援システム
- 7) 稲本稔 (2005) : わかりやすい品質管理, 理工学社, pp199.
- 8) 情報処理推進機構ソフトウェアエンジニアリングセンター (2008) : 定量的品質予測のススメ—IT システム開発における品質予測の実践的アプローチ, SEC BOOKS, p101.
- 9) 佐藤丈晴 (2009) : 現時点の冬期道路管理方法を踏襲した定量的な路面凍結予測手法の提案, 寒地技術論文・報告集, Vol25, pp. 1-6.
- 10) 実務教育研究所 : 現代統計実務講座 テキスト I, 2003.
- 11) 海野寿康, 中里裕臣, 井上敬資, 高木圭介 (2008) : 破碎帯地すべり地区における地下水計測と実効雨量に基づく地下水位の降雨応答特性, vol. 45, no. 3, pp. 219-226.
- 12) 国土技術政策総合研究所 (2001) : 土砂災害警戒避難基準雨量の設定手法, 国土技術政策総合研究所資料, 第 5 号,
- 13) 岡田憲治 (2002) : 土壌雨量指数, 測候時報 vol169, no. 5, pp67-97.
- 14) 國分邦紀, 石原成幸, 川合将文 (2010) : 野上川流域における主な湧水と地下水の水循環解析, 都土木技術支援・人材育成センター年報, pp143-148.
- 15) 片山直樹, 星清, 橋本識秀 (2004) : 2003 年台風 10 号による沙流川二風谷ダム流入量予測, 土木学会年次学術講演会, vol. 59, pp81-82.
- 16) 下津昌司, 石崎勝義, 北川明 (1979) : 広域水収支における地下水流動量の算定 阿蘇火山西麓部を例として, 日本地下水学会誌, vol121, no3, pp10-20.
- 17) 石村貞夫 (2000) : 統計解析のはなし, 東京図書, pp. 53.
- 18) 伊藤成輝, 丸井敦尚 (2010) : 日本列島における海底地下水湧水量の分布, 日本水文科学会誌, vol. 40, No. 1., pp. 1-18.

高効率な発光を目指した有機蛍光材料の開発

岡山理科大学 理学部 化学科

岩永 哲夫

光や熱に安定であることが知られているペリレンビスイミド (PBI) を基本ユニットに用いた、高効率な発光を目指した有機蛍光材料の開発を目指した。これら化合物は、様々な位置に置換基を簡単に導入でき、分子の電子状態をチューニングしやすい。ジブロモペリレンビスイミドを出発原料に用いて、芳香族ドナーを有するボロン酸エステル誘導体との鈴木-宮浦カップリングを用いて効率的に導入し、置換位置の異なるドナー/アクセプター型分子を得た。得られた化合物の分光学的性質を明らかにするために、UV-Vis スペクトルと蛍光スペクトルをクロロホルム中で測定した。UV-Vis スペクトルにおいて、長波長側に電荷移動相互作用に伴う新たな吸収が確認された。また興味深いことに、アントラセンドナーを導入した誘導体は、ペリレンビスイミド部位を励起させた時の蛍光強度がフェニレンドナーを有する誘導体に比べ、大きくクエンチしていた。このことは、分子内または分子間で光誘起電子移動が起こっていることを示唆している。分子軌道計算を用いて、この現象について詳細に調査し、発光効率を高める手法の開発・検討を行った。

【序論】

現在、有望な蛍光性材料の基本ユニットとしてアントラセンやペンタセンなどのアセン系芳香族化合物が使われている。アセン系芳香族化合物は電子豊富な化合物として知られており、様々な置換基と組み合わせることで色調を変化させることができ、同じ骨格をもった複数の誘導体を用いて RGB を達成しようとする研究がなされている。ところがアセン系芳香族化合物は光や空気中の酸素などに不安定な側面をもち、多くの誘導体において取り扱いを注意しなければならない問題点を抱えている。

本研究では、そのようなアセン系芳香族化合物が持つ問題点を解決できるような蛍光性色素の開発を目指す。今回、基本ユニットとして利用するペリレンビスイミド (PBI) は、縮合系芳香族化合物であるペリレン骨格を有しており、光や熱に安定であることが知られている。また様々な位置に置換基を簡単に導入でき、分子の電子状態をチューニングしやすい。具体的な手法は、PBI の芳香族部位に様々なドナー置換基を導入することで、コア部分の電子的特性が異なる誘導体を合成する。またビスイミドの N-位に自己集積能を持つ長鎖アルキルを複数導入す

ることで分子間の相互作用を強めたり、逆に高い置換基を導入することで分子間の相互作用を抑制するなど、PBI ユニット同士の相互作用をたくみに操作して、ドナーとアクセプターユニット間を電子移動しやすい環境を持つ分子集合体を形成することを目指す(Chart 1)。

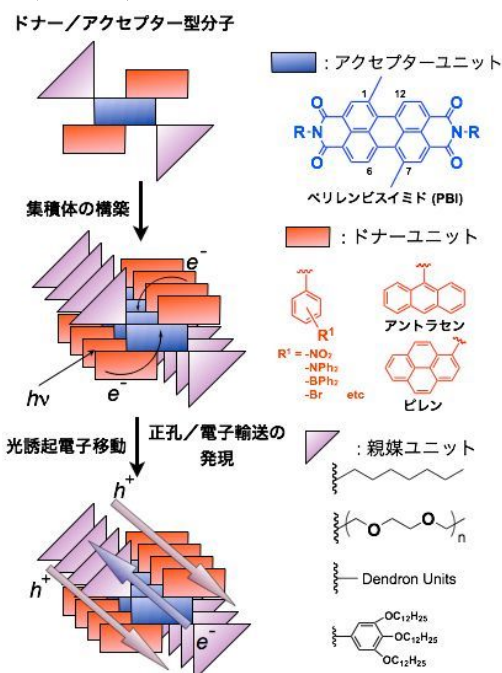


Chart 1. (左) 蛍光性ビスイミドの集積と電子移動プロセス。(右) アクセプター・ドナー・親媒ユニットの候補。

規則的にユニットを配置する手法が確立できれば、光誘起電子移動を妨げない集積体を構築することが可能となる。今回、構成ユニットの合成とその分光学的性質を明らかにしたので、以下に報告する。

【結果と考察】

今年度は、高い吸収能と蛍光性をもつペリレンビスイミド骨格に注目し、これをコア骨格としたドナー／アクセプター型誘導体の開発を目指した。まずは、これまでに我々が開発したアントラセンドナーを組み込んだペリレンビスイミド誘導体の溶解度と安定性の向上をねらって、イミドのN位にオクチル基と2,6-ジイソプロピルフェニル基を持つ化合物の合成に取り組んだ (Figure 1)。これらの分光学的性質や構造に関する知見を得るために電子スペクトルの測定や構造計算などを行った。

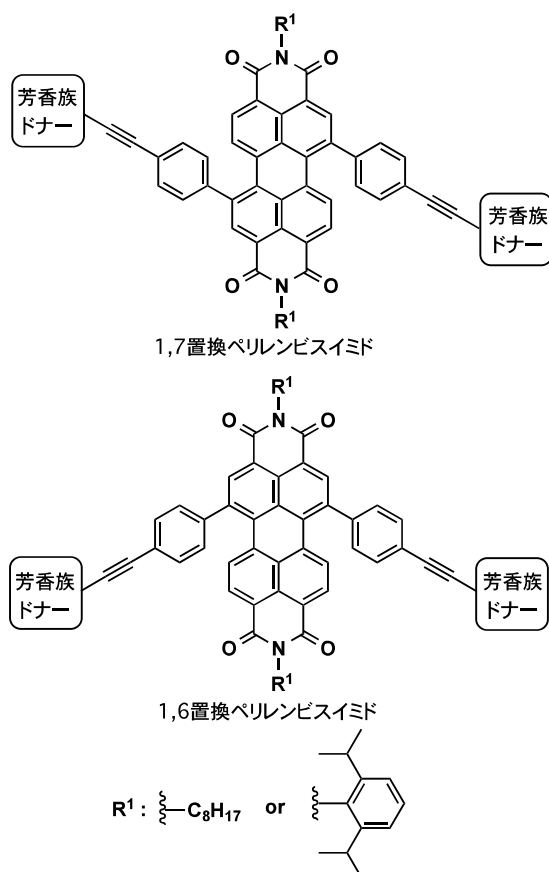
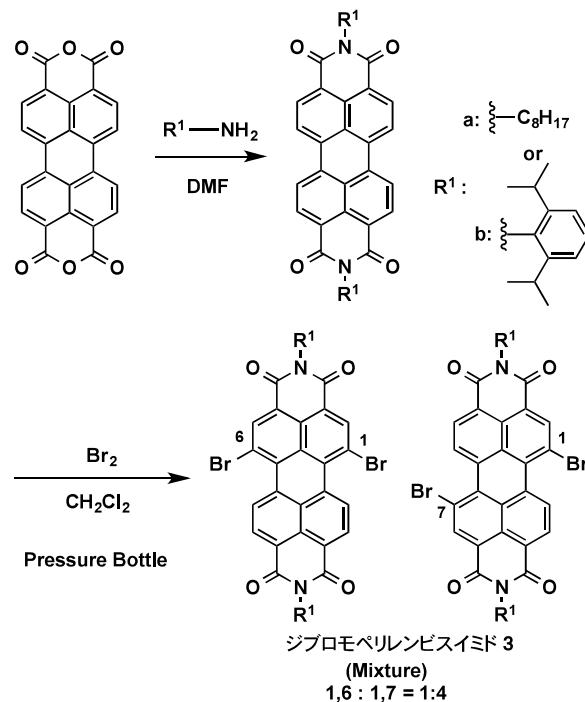


Figure 1. 蛍光性ビスイミド分子設計.

原料となるジブロモペリレンビスイミドは、市販されているペリレン-3,4,9,10-テトラカルボン酸無水物を臭素化し、続けてアミン誘導体とのイミド化を

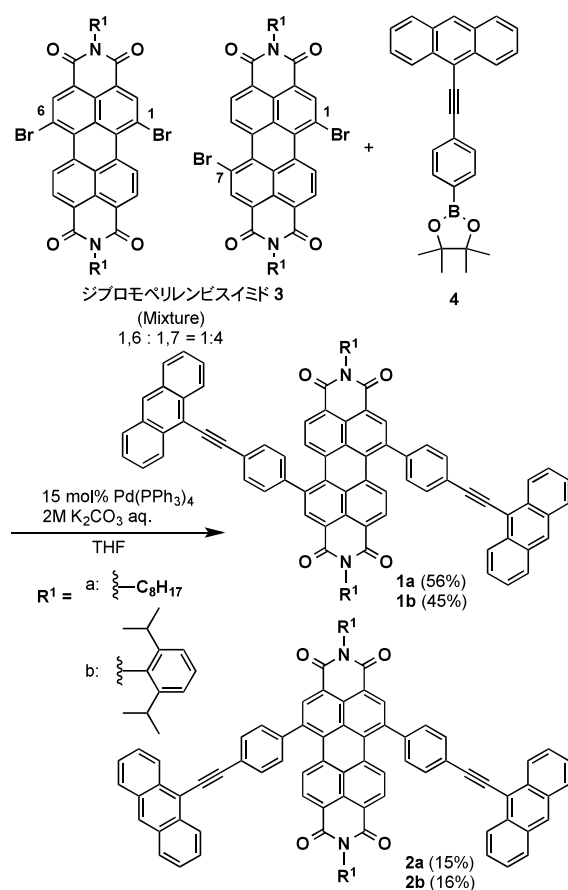
経て合成できた。しかしながらオクチルアミンを用いた時のイミド化の収率が低かったため、収率向上を図るために、密閉系容器中で対応するイミドと臭素を直接反応させたところ、ジブロモ体の収率が57%まで向上させることができた(Scheme 1)。原料となるジブロモ体 **3** には、置換位置の異なるものが混合比 1,6-位 : 1,7-位 = 1:4 で含まれていた。これら位置異性体はこの段階での分離が困難であったため、次のカップリング反応後に精製することにした。



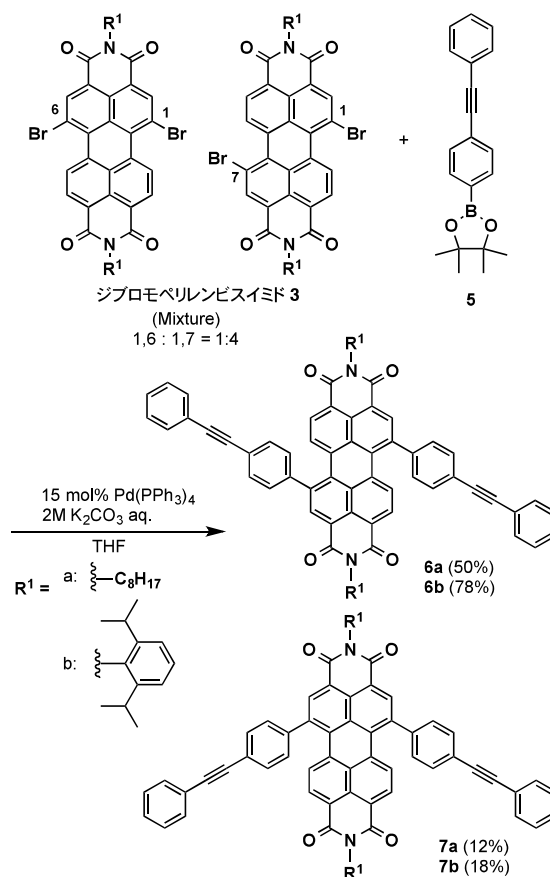
Scheme 1. ジブロモペリレンビスイミド **3** の合成

ジブロモ体 **3a** と別途合成したボロン酸エステル **4** を Pd 触媒を用いた鈴木－宮浦カップリングにて反応させることで、アントラセンドナーを導入した化合物 **1a** と **2a** を収率 56% (深紫色固体) と 15% (暗緑色固体) で得ることができた(Scheme 2)。これらの精製はカラムクロマトグラフィと再沈殿から簡単に行うことができた。

同様に 2,6-ジイソプロピルフェニル基を持つ **3b** とボロン酸エステル **4** との反応も行い、**1b** と **2b** をそれぞれ収率 45% (紫色固体) と 16% (紫色固体) で得ることができた。それぞれの化合物は、¹H NMR スペクトルと FAB-MS スペクトルから同定することができた。



Scheme 2. アントラセンドナーを有するペリレンビスイミド誘導体 **1, 2** の合成



Scheme 3. フェニレンドナーを有するペリレンビスイミド誘導体 **6, 7** の合成

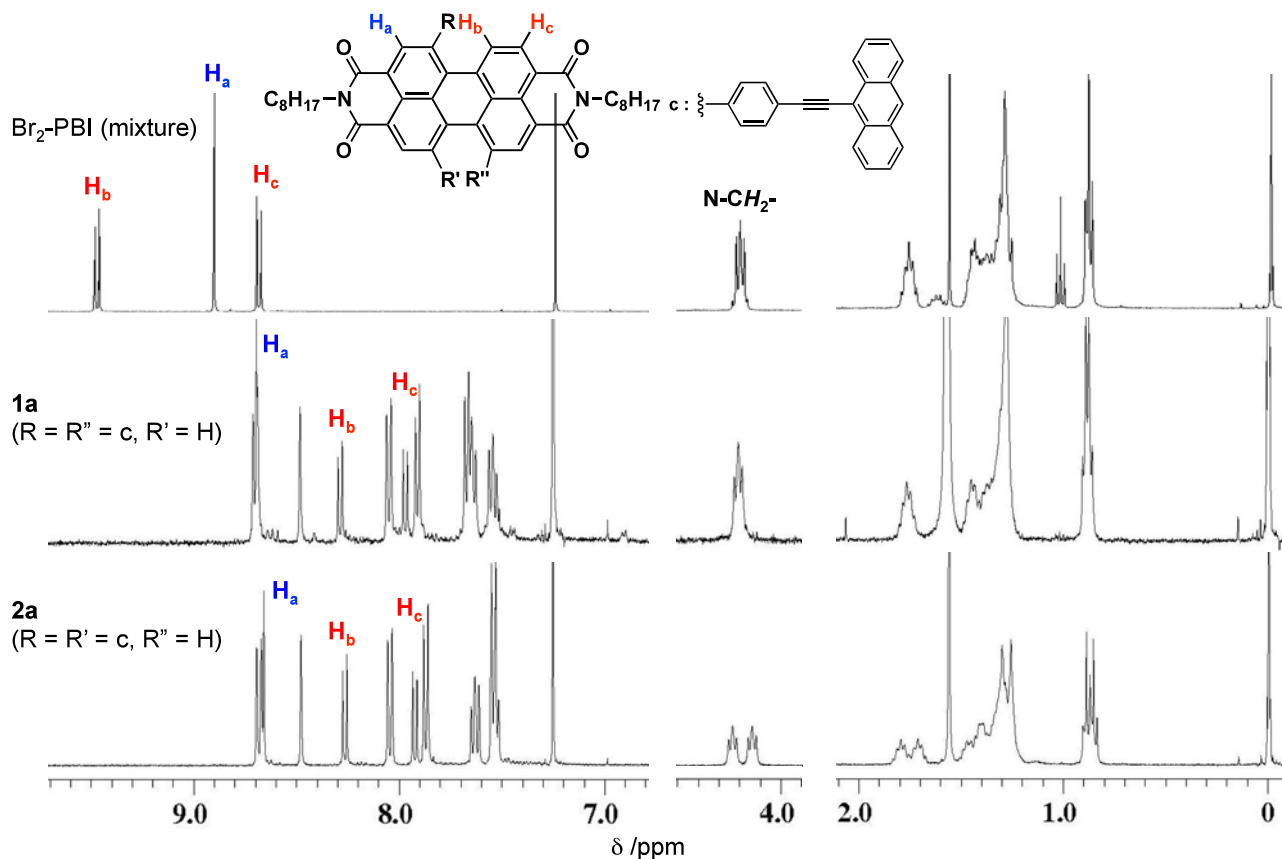
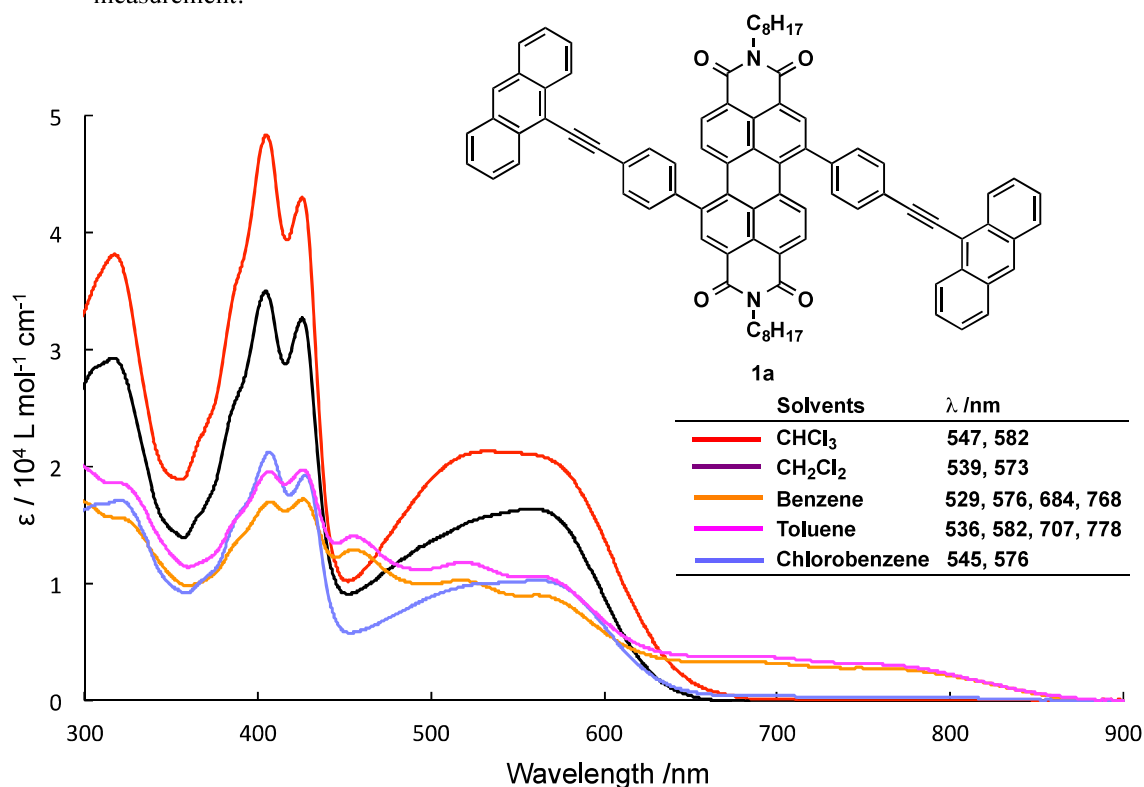


Figure 2. 化合物 **1a, 2a** と **3** の ¹H NMR スペクトル (400MHz, CDCl₃)

Table 1. PBI 誘導体 **1, 2, 6** と **7** の吸収スペクトルと蛍光スペクトルのデータ.

Compound	$\lambda_{\max}$ /nm (ϵ)	λ_{em} /nm (Φ_{F}) ^a	HOMO (eV) ^c	LUMO (eV) ^b
1a	579 (19400)	600 (0.02)	-5.18	-3.36
2a	565 (21000)	594 (0.03)	-5.18	-3.36
6a	565 (23000)	617 (0.78)	-5.67	-3.31
7a	556 (11100)	612 (0.76)	-5.64	-3.36
1b	580 (20400)	599 (— ^c)		
2b	550 (13800)	594 (— ^c)		
6b	567 (34700)	618 (— ^c)		
7b	560 (15400)	613 (— ^c)		

a) Absolute fluorescence quantum yields. b) Calculated at B3LYP/6-31G(d) level. c) Not measurement.

Figure 3. 様々な溶媒条件で測定した化合物 **1a** の吸収スペクトル

またアントラセンドナーの代わりにフェニレンドナーを有する対照化合物 **6, 7** についても同様の条件を用いて、効率よく合成することができた (Scheme 3).

化合物 **1a** と **2a** の ¹H NMR を測定したところ、原料のジプロモ体 **3** と比較して、ペリレン部位のプロトンシグナルが高磁場側にシフトしていた (Figure 2). またイミド位についているメチレン鎖のプロトンシグナルが置換位置によって分子の対称性が異なるため、1,7 位に置換した場合は 4.2 ppm に triplet が

1 種類、1,6 位に置換した場合は 4.1 と 4.3 ppm に triplet が 2 種類観測された。

これまでに合成した化合物 **1, 2, 6, 7** の分光学的性質を明らかにするために、UV-Vis スペクトルと蛍光スペクトルをクロロホルム中で測定した. Table 1 には電子スペクトルデータをまとめて記載している.

アントラセンドナーユニットを導入した **1** と **2** の UV-Vis スペクトルにおいて、500~700 nm 付近に電

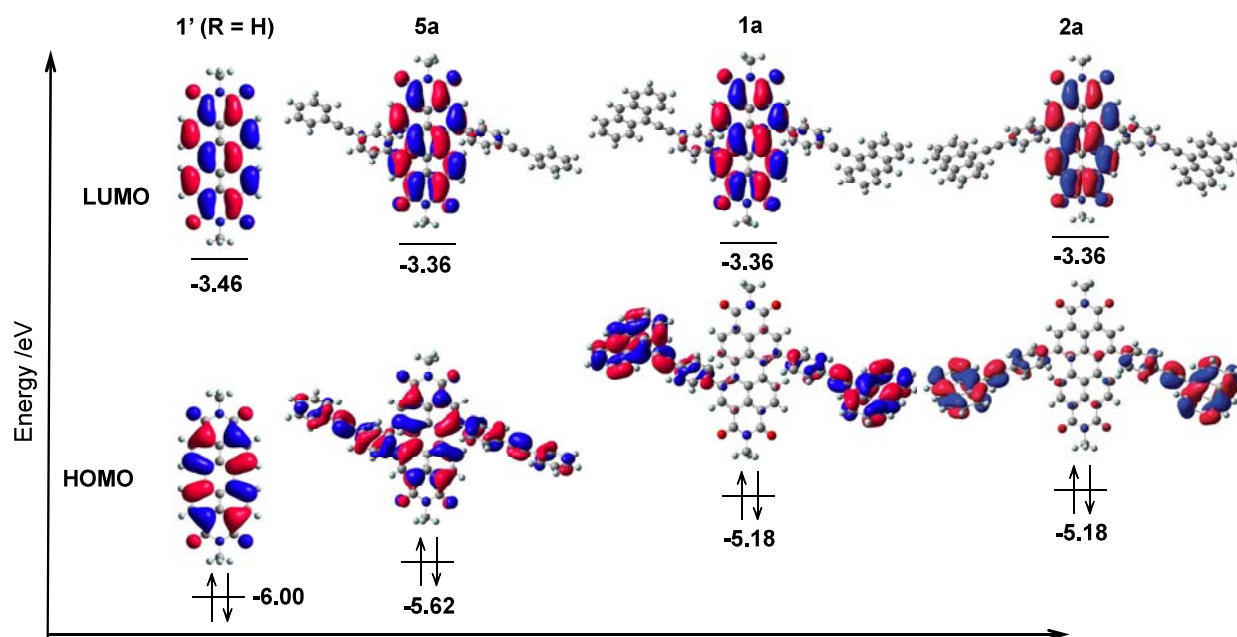
荷移動相互作用に伴う幅広い吸収が確認された。置換位置が異なる化合物 **1** と **2** の最大吸収波長は、その置換位置により若干のシフトがみられたが、*N*-位に導入した置換基の種類による変化はほとんど観察できなかった。一方、棒状のフェニレンドナーユニットを導入した **6** と **7** は、最大吸収波長が 565 と 560 nm に観察され、アントラセンドナーが置換した化合物 **1, 2** と比べてブルーシフトしていた。

また、2つのアントラセンドナーを有する PBI 誘導体 **1, 2** について、溶媒の極性が吸収特性に与える影響を調べるために、様々な溶媒で吸収スペクトルを測定した。1,7-置換誘導体 **1a** のみに顕著な溶媒効果が観察された (Figure 3)。芳香族溶媒中において、クロロホルム中で観察された 500 nm 付近の吸収強度が減少し、800 nm 付近に分子内電荷移動に由来する新しい吸収が現れた。これら特徴ある現象を理解するために、現在、溶媒パラメーターを含めた分子軌道計算を行うことで理論的な考察を、サイクリックボルタンメトリーなどの電気化学的測定を行うことで、溶媒による電子状態の変化を観察する予定である。

興味深いことに、アントラセン骨格を導入した **1a** と **2a** は、ペリレンビスイミド部位を励起させた時の蛍光強度がフェニル基を有する **6a** および **7a** に比

べ、大きくクエンチしていることがわかった。このことは、分子内または分子間でアントラセンドナーからペリレンビスイミドアクセプターへの光誘起電子移動が起こっていることを示唆している。

DFT 計算を行い、種々のドナーユニットの導入による PBI 骨格の分子軌道への影響を調査した (Figure 4)。その結果、フェニレンドナーに比べて、アントラセンドナーを導入したほうが HOMO のレベルを約 0.5eV 程度上昇させる効果がみられ、バンドギャップが小さくなった。実際の吸収スペクトルにおいて、フェニレンドナーを持つ化合物 **6** や **7** と比べて、長波長シフトすることと一致している。また分子軌道を確認したところ、HOMO はドナー部位であるアントラセンユニットに、LUMO はアクセプター部位であるペリレンビスイミドに局在化していることもわかった。これにより光励起した際にドナーユニットからアクセプターユニットへ電子移動が起こっていることが示唆された。また置換位置が異なることで HOMO と LUMO のエネルギーレベルが変化しないことも明らかになった。



Molecular orbitals calculated at the B3LYP/6-31G(d) level.
(Calculation were carried out for *N*-methyl derivatives.)

Figure 4. 化合物 **1a**, **2a** と **5a** の HOMO—LUMO レベルと分子軌道図
(計算の簡略化のため、*N* 位の置換基をメチルに置き換えている.)

【最後に】

本研究の最終目標は、広い π 平面を有するアクセプターユニットに超分子相互作用を発現する置換基を導入して、高効率な発光機能をもつ分子機能性材料の開発を行うことである。本研究課題期間中に、ペリレンビスイミドを基盤骨格とした化合物の合成方法を確立し、様々な吸収波長を持つ材料の開発に成功した。基本骨格のイミド位に複数の長鎖アルキルをもつ置換基を導入し、溶液中および固体での光特性を調べていく予定である。また、イミド骨格の有用性を確かめるために他の芳香環を用いた分子の開発も行っていく予定である。

本研究で達成されるペリレンビスイミドユニットを基盤とした蛍光材料の効率的な開発は、これまでに合成されてきた他の芳香族ビスイミドの性質と比較し、従来にない分子構造と基本物性・性能を提示することで、地域の素材メーカーや薬品メーカーを活性化し、科学技術社会の発展に貢献をしていきたいと考えている。

最後に、公益財団法人ウエスコ学術振興財団の学術研究費助成事業において、本研究課題を採択・助成して頂いたことに感謝いたします。

α7ニコチン性アセチルコリン受容体を介したうつ病発症メカニズムの解明

岡山理科大学 理学部 臨床生命科学科

橋川 直也

概要

多くの疫学研究により禁煙とうつ病が密接な関係があることが報告されているが、ニコチン投与がうつ様行動に及ぼす影響については不明な点が多い。今回、コントロールマウスおよびうつ病モデルマウスにニコチンを投与し、強制水泳試験法を用いてうつ様行動の解析をすることによりニコチンとうつ様行動との関係を解析した。ニコチン投与法は、2週間毎日2回皮下注射で投与する方法と、ニコチンを充填した浸透圧ポンプをマウスの皮下に埋め一定量のニコチンを2週間投与する方法の二つの方法を用いて検討した。コントロールマウスにニコチンを皮下注射投与した群ではうつ様行動に有意な変化は見られなかったが、浸透圧ポンプによりニコチンを投与した群ではうつ様行動の改善が見られた。また、うつ病モデルマウスに皮下注射によりニコチンを投与した群ではうつ様行動に有意な変化は見られなかったが、有意な自発行動量の増加を示した。うつ病モデルマウスへの浸透圧ポンプによるニコチン投与はうつ病モデルマウスの作製法上の問題で実施することはできなかった。以上の結果より、ニコチンの持続的な摂取がうつ様行動を改善する可能性が示唆された。

1.緒言

喫煙とうつ病が密接な関係のあることは、多くの疫学研究により指摘されている。疫学的事実として、喫煙者のうつ病の生涯発病率は非喫煙者よりも高い(Kendler et al., 1993)という報告や、うつ病の既往のある喫煙者は既往のない喫煙者よりも喫煙に対する依存の程度が高い(Breslau et al., 1998)という報告、更に禁煙を開始するとうつ病が発現しやすい(Tsoh et al., 2000)などの報告がされている。

ラットを用いた実験においてニコチン (4 mg/kg/day)を一日2回14日間腹腔内投与すると最終日投与後18時間後のForced swim testにおける不動時間が有意に減少した報告がある(Tizabi et al., 2010)。一方で、ニコチン (1.28 mg/kg/day)を一日2回15日間皮下注射したラットでは投与一月後のForced swim testにおける不動時間の有意な増加が見られ、また1% sucrose preference testにおいてもうつ様行動を示したという報告もある(Iñiguez et al., 2009)。このようにニコチン投与によりうつ様行動を誘発するという報告と改善するという報告の両方があり、ニコチン投与がうつ様行動に及ぼす影響については不明な点が多い。

本モデルマウスは一般的に使用される抗うつ薬で

あるClomipramine, ImipramineやFluvoxamine投与を行っても、Forced swim testにおける不動時間の有意な改善が見られないような、極めて薬剤の効きにくいマウスである。

今回、ストレスを与えない無処置のコントロールマウスにおいて、ニコチン投与によりうつ様行動が誘発されるか否か、また抗うつ薬の効きにくい本モデルマウスがニコチン投与によりうつ様行動を改善させるのかを明らかにすることにした。

2.実験材料及び実験方法

2-1. ニコチン投与による行動変化

2-1-1. 実験動物

実験には、8週齢の雄性ICRマウスを用いた。動物はケージ内に4～6匹ずつ分けて2週間飼育した。自由給餌法にて飼育し、飲料水として水道水を与えた。

2-1-2. 薬物の投与方法

・皮下注射

8週齢の雄性ICRマウスを用い毎日10:00と17:00に3 mg/kg/dayの投与量になるようNicotine hydrogen tartrate salt (sigma-Aldrich JAPAN)を皮下注

射により投与した。

・浸透圧ポンプ

8 週齢の雄性 ICR マウスを pentobarbital-Na (50 mg/kg i.p.)麻酔下にて首周辺の毛を刈った後、首の皮膚を切ってポケットを作り、浸透圧ポンプ(alzet, Model 2002)を埋め込み、切り口を縫ってヨードにより消毒した。浸透圧ポンプにはニコチン投与量が 48 mg/kg/day となるよう調整したニコチン溶液を充填した。

2-1-3. 行動試験による評価

【一般行動の評価】

Open-field test ; オープンフィールド試験

自発行動量や不安行動、探索行動などの一般的な行動を評価する方法である。

円形上のオープンフィールド槽(直径 57.5 cm、高さ 32 cm)を用いた。床は 19 区画にほぼ等面積となるよう線で仕切り、2 つの円(直径 13.5 cm、35.5 cm)を槽の中央に描きその中央の円から 18 等分にするように放射状の線を引いた。この線を横切った回数を自発行動量(locomotor activity)とした。すべての区分は面積が大体直径 13.5 cm の円と同じになるようにした。直径 35.5 cm の円を中央と定義付け、中央滞在時間の評価を行った。このオープンフィールドの中央にマウスを入れ 3 分間の行動を測定した。測定項目は、

- ・ locomotor activity 区画を横切った回数(自発行動量)
- ・ rearing 立ち上がり動作(探索行動)
- ・ time spent in the center area 中央滞在時間(不安行動)の 3 つを観察した。全ての動物の行動はビデオにて録画し、解析を二重盲検的にカウンターを用いて行った。

【抑うつ様行動の評価】

Forced swim test; 強制水泳試験

うつ様行動の指標としてもっとも使用される方法である。

マウスを 28℃ の水を 10 cm まで入れた 1 L ビーカー(高さ 15 cm、直径 11.5 cm)に 6 分間つけ、1 分

後からの行動を 5 分間観察した。暴れることなく浮かんでいる時間(マウスが水から頭を出すのに必要なわずかな動きをしている時間も含む)を不動時間として記録した。実験終了後、マウスを乾かしケージに戻した。

【学習・記憶行動の評価法】

Y-maze test : Y字型迷路試験

短期記憶の行動評価法である。

マウスを Y 字型の装置内を探索させた際に認められる自発的交替行動を短期記憶(空間作業記憶)として評価した。Y 字型の装置は黒色のアクリル板にて作成した(幅 15 cm、壁の高さ 15 cm、アームの長さ 45 cm)。また Y 字型アームの先端はマウスからの視界を遮らないように透明のアクリル板を用いて筒状とした。測定を行う前に Y 字の各アーム先端の外側に新規物を置き、マウスが方向を分かるようにした。測定は 8 分間行った。マウスを Y 字迷路のいずれかのアームの先端に置き、迷路内を自由に探索させ、進入したアームを順に記録し、マウスの行動量とした。また、3 方向のアームに進入する順序を観察し 3 回連続して異なるアームへ進入した回数を空間作業記憶として評価した。

2-2. ストレス負荷マウスにおけるニコチンの影響

2-2-1. 実験動物

実験には、8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いた。動物はケージ内に 4~6 匹ずつ分けて 2 週間飼育した。自由給餌法にて飼育し、飲料水として水道水を与えた。ストレス負荷方法として、8 週齢のマウスを 50 mL チューブの先端を切断し空気穴を作ったものに小試験管とともに入れ、28℃ 温浴に 3 時間浸し、ストレス負荷を 15 日間行った。対照群としてストレス負荷中は絶食絶水を行った。

2-2-2. 薬物の投与方法

・ Subcutaneous injection

ストレス負荷期間中毎日 10:00 と 17:00 に 3 mg/kg/day ニコチンを皮下注射により投与した。

2-2-3. 行動試験による評価

一般行動をオープンフィールド試験、抑うつ様行動を強制水泳試験、学習・記憶行動をY字型迷路試験により評価した。

3. 結果

3-1. コントロールマウスにおけるニコチンの影響

3-1-1. Open-field test ; オープンフィールド試験

ニコチン投与によるマウスの行動変化を見るため、Open-field test を行った。皮下注射、浸透圧ポンプによるニコチン投与により自発行動量、立ち上がり行動、中央滞在時間に有意な変化は見られなかった (Fig 1A, B, C, D, E and F)。

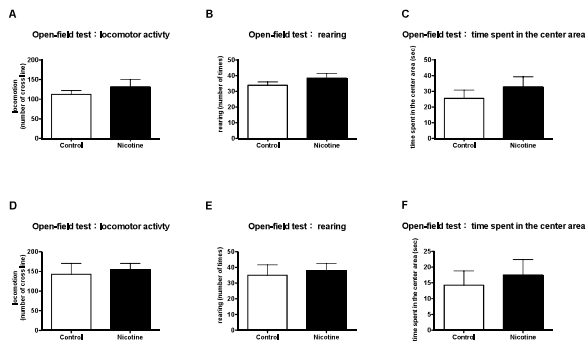


Figure 1. Effect of 2 weeks of nicotine (A, B, C; 3 mg/kg/day s.c. D, E, F; 48 mg/kg/day osmotic pump) treatment on locomotor activity (A), rearing time (B) and time spent in the center area (C) in the open field test. Nicotine were administered by subcutaneous injection (A, B, C) or osmotic pump (D, E, F) for 15 days (n=3-13).

3-1-2. Forced swim test ; 強制水泳試験

ニコチン投与によるマウスの行動変化を見るため、Forced swim test を行った。皮下注射により 3 mg/kg/day ニコチンを投与した群では不動時間に有意な変化は見られなかった (Fig. 2A)。しかし、浸透圧ポンプにより 48 mg/kg/day ニコチンを投与した群では有意な不動時間の改善が見られた (Fig. 2B)。

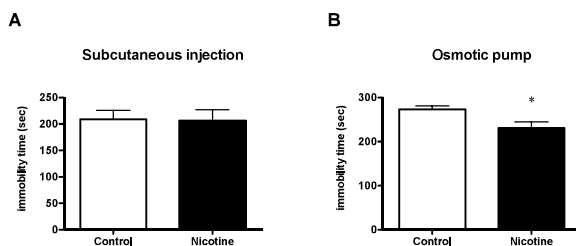


Figure 2. Effect of 2 weeks of nicotine (A; 3 mg/kg/day, s.c. B; 48 mg/kg/day, osmotic pump) treatment on immobility time during the forced swim test. Nicotine were administered by subcutaneous injection (A) or osmotic pump (B) for 14 days. *p<0.05 (t-test) (n=3-24).

3-1-3. Y-maze test; Y字型迷路試験

ニコチン投与によるマウスの短期記憶の変化をみるため、Y字型迷路試験を行った。ニコチン投与により短期記憶の変化は皮下注射、浸透圧ポンプによる投与いずれにおいても見られなかった (Fig 3A, B)。

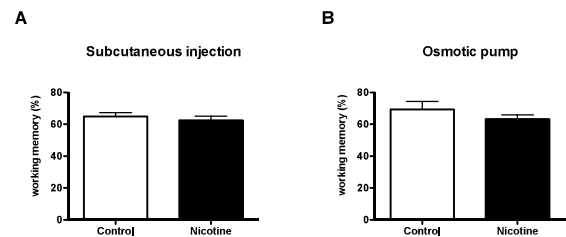


Figure 3. Effect of 2 weeks of nicotine (A; 3 mg/kg/day, s.c. B; 48 mg/kg/day, osmotic pump) treatment on the working memory. Nicotine were administered by subcutaneous injection (A) or osmotic pump (B) for 15 days (n=3-9).

3-2. ストレス負荷マウスにおけるニコチンの影響

3-2-1. Open-field test ; オープンフィールド試験

3 mg/kg/day ニコチン皮下注射によるストレス負荷マウスの基本的な行動変化を見るため、Open-field test を行った。ニコチン投与により自発行動量、立ち上がり行動の有意な増加が見られた (Fig. 4A, B)。しかし、中央滞在時間においては変化が見られなかった (Fig. 4C)。

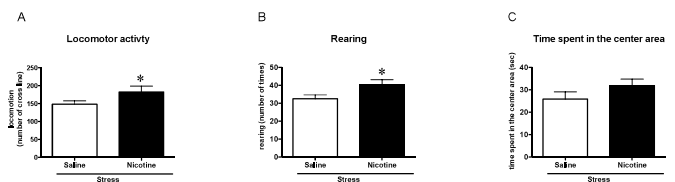


Figure 4. Effect of 2 weeks of nicotine (3 mg/kg/day, s.c.) treatment on locomotor activity (A), rearing time (B) and time spent in the center area (C) in open field test. Nicotine were administered by subcutaneous injection to stress mice twice daily for 15 days. *p<0.05 (t-test) (n=9-13).

3-2-2. Forced swim test ; 強制水泳試験

3 mg/kg/day ニコチン皮下注射によるストレス負荷マウスのうつ様行動の変化を見るため、Forced swim

test を行った。ニコチン投与により有意な不動時間の変化は見られなかった(Fig. 5)。

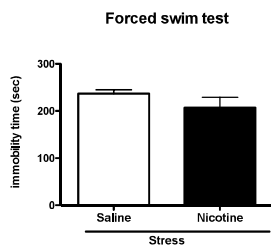


Figure 5. Effect of 2 weeks of nicotine (3 mg/kg/day, s.c.) treatment on immobility time during the forced swim test. Nicotine were administered by subcutaneous injection to stress mice twice daily for 15 days (n=9-23).

3-2-3. Y-maze test ; Y字型迷路試験

3 mg/kg/day ニコチン皮下注射によるストレス負荷マウスの短期記憶の変化をみるため、Y-maze test を行った。ニコチン投与による短期記憶の変化は見られなかった(Fig. 6)。

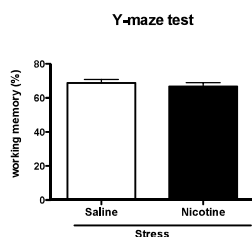


Figure 6. Effect of 2 weeks of nicotine (3 mg/kg/day, s.c.) treatment on the working memory. Nicotine were administered by subcutaneous injection to stress mice twice daily for 15 days (n=9-13).

4.考察

ニコチン投与による行動変化を見るために 8 週齢の雄性 ICR マウスを用い 10:00 と 17:00 に 3 mg/kg/day の投与量になるよう、Nicotine hydrogen tartrate salt を皮下注射により 2 週間毎日投与する方法と、ニコチン投与量が 48 mg/kg/day となるよう調整したニコチン溶液を浸透圧ポンプに充填してマウスに埋め込むことで 2 週間連続投与する二つの方法を用い検討した。皮下注射により 3 mg/kg/day ニコチン投与した群では Open-field test における自発行動量、立ち上がり行動、中央滞在時間、Y-maze test における短期記憶のいずれの項目においても有意な変化は見られず、また Forced swim test における不動時間にも有意な変化は見られなかった。一方、浸透

圧ポンプにより 48 mg/kg/day ニコチン投与した群では Open-field test における自発行動量、立ち上がり行動、中央滞在時間、Y-maze test における短期記憶のいずれの項目においては有意な変化は見られなかったが、Forced swim test における有意な不動時間の減少が見られた。

ニコチンには神経伝達物質の一種であるアセチルコリンと化学構造が似ているため、喫煙後、数秒で脳に達し脳内でアセチルコリンに成り代わってニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に結合し、ドーパミンなどの神経伝達物質の過剰放出を引き起こす働きがある。nAChR は中枢神経に広範囲に分布しているため、ニコチンは脳の広い範囲に影響を与える。また、ニコチンの低用量投与では自律神経節の刺激により、覚醒やリラックスが生じ、集中力や学習力の改善といった作用がある。一方、高用量投与では自律神経節の遮断により低血圧や呼吸麻痺などの作用がある。ニコチンの致死量は成人で 40-60 mg 程度と言われている。

今回浸透圧ポンプによるニコチン投与でのみ Forced swim test における有意な不動時間の減少が見られた。皮下投与では 10:00 と 17:00 の間欠投与であるのに対し、浸透圧ポンプでは常に一定の量投与できるという特徴があり、Forced swim test における有意な不動時間の減少はニコチンの持続投与が中枢神経を興奮させたことによるものと考えられる。また、禁煙時にストレスを受けるとうつ病が出現しやすいという報告もあり(Tsoh et al., 2000)、二回間欠投与ではニコチン摂取が連続的でないため、不動時間の短縮は見られなかった可能性も考えられる。ニコチン投与による記憶への影響として、ニコチンにはシナプス間の伝達速度の促進や長期記憶能力を促す働きがあるという報告がある(López-Hidalgo et al., 2012)。今回浸透圧ポンプ投与、皮下投与いずれも Y-maze test における短期記憶の変化は見られなかった。

ストレスモデルマウスにおけるニコチンの影響を検討するために、ストレス負荷期間中毎日 10:00 と 17:00 に 3 mg/kg/day ニコチンを皮下注射によりニコチンを間欠投与したが、Forced swim test にも

Y-maze test にも有意な変化が見られなかった。しかし、ノーマルマウスへのニコチン皮下投与では、変化が見られなかった Open-field test における自発行動量がコントロール群と比べ有意に増加した。ストレス負荷期間中にニコチンを間欠投与することで Open-field test における有意な自発行動量の増加を示すことが示唆された。この結果は青年期のラットにニコチン (0.4 mg/kg, s.c.)投与しながらストレス負荷を与えたラットではコントロール群と比べ有意な自発行動量の増加を示したという報告(Zago et al., 2012)と一致している。Forced swim test における不動時間に変化が見られなかったのは自発行動量の増加によりマスクされたのではないかと考えられる。

今回、浸透圧ポンプを用いたニコチン投与によるストレスモデルマウスへの影響は検討しなかった。これは、背部へ埋め込んだ浸透圧ポンプが大きすぎるため拘束ストレスをかけるファルコンチューブへマウスが入らないためである。今後更なる検討として、拘束具の改良や、投与方法の見直しを行い、ニコチン持続投与とストレス負荷における行動の変化を検討する必要があると考えられる。また、今回は Forced swim test のみでうつ様行動の評価として用いたが、他のうつ様行動評価法である Tail suspension test や 1% sucrose preference test での検討もする必要があると考えられる。更に今回得られたニコチンによる行動の変化がどのニコチン受容体を介して行われるのか解明が必要である。

参考文献

Breslau N, Peterson EL, Schultz LR, Chilcoat HD, Andreski P (1998) Major depression and stages of smoking. A longitudinal investigation. Arch Gen Psychiatry 55: 161-6.

Iñiguez SD, Warren BL, Parise EM, Alcantara LF, Schuh B, Maffeo ML, Manojlovic Z, Bolaños-Guzmán CA (2009) Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. Neuropsychopharmacology 34: 1609-24.

Kendler KS, Neale MC, MacLean CJ, Heath AC, Eaves LJ, Kessler RC (1993) Smoking and major depression. A causal analysis. Arch Gen Psychiatry 50: 36-43.

López-Hidalgo M, Salgado-Puga K, Alvarado-Martínez R, Medina AC, Prado-Alcalá RA, García-Colunga J (2012) Nicotine uses neuron-glia communication to enhance hippocampal synaptic transmission and long-term memory. PLoS One 7: e49998.

Tizabi Y, Hauser SR, Tyler KY, Getachew B, Madani R, Sharma Y, Manaye KF (2010) Effects of nicotine on depressive-like behavior and hippocampal volume of female WKY rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 34: 62-9.

Tsoh JY, Humfleet GL, Muñoz RF, Reus VI, Hartz DT, Hall SM (2000) Development of major depression after treatment for smoking cessation. Am J Psychiatry 157: 368-74.

Zago A, Leão RM, Carneiro-de-Oliveira PE, Marin MT, Cruz FC, Planeta CS (2012) Effects of simultaneous exposure to stress and nicotine on nicotine-induced locomotor activation in adolescent and adult rats. Braz J Med Biol Res 45: 33-7.

巨大地震の被災地などで非常時に手軽に使えるS E発電の研究

津山工業高等専門学校

鳥家 秀昭

巨大地震の被災地等における電力供給インフラの要素技術であるスターリングエンジン発電について、薪ストーブと二重管煙突を組合せたドラフトチューブ型S E Gを着想した。これは、薪ストーブの排煙を熱源に利用するとともに煙道内にドラフトチューブを配置し、排煙からの伝熱で生じる上昇気流（ドラフト効果）によりS E Gの強制冷却を行う。今回は2種類の実験機について、運転性能・発電出力および予備的な冷却実験を行った。コンプレッサーを用いた α 型実験機の空冷効果は10～15%が得られ、試作 γ 型実験機の最大発電出力は約3Wであった。また、ドラフトチューブ内に生じる上昇気流を目視で確認した。しかし、固形燃料のドラフト効果による空冷実験は上昇気流が弱く、発電出力を増加する効果はなかった。今後、薪ストーブのドラフト効果による空冷実験を行う予定である。

1. まえがき

巨大地震の被災地などにおいて情報通信や夜間照明の電力供給に利用可能な非常用の可搬型スターリングエンジン（S E）発電の研究を行う。このような被災地では、電気、ガス、水道等のインフラが長期間にわたって遮断されるため固定設置型の大型設備（発電所、ガス供給設備、浄水場など）が使用できない。自給自足的に利用できるエネルギー源（燃料）は災害によって発生する可燃性がれきに限られ、各地域や戸別ごとに非常用発電機や薪ストーブなどの設備と被災地外からの支援に頼らざるを得ない。

ところで、外燃機関であるS Eは燃料の種類を問わず使用できる熱機関である⁽¹⁾。従来からストーブの上に設置したスターリングエンジン発電機（S E G）が製品化されているがS Eの冷却性能に限界があり数十分間程度の連続運転に限られる。また、S E Gの発電出力で空冷ファンを運転して強制冷却を行う事例があるが、この方法はS E Gの出力エネルギーの損失になる。

そこで、図1に示すような薪ストーブと二重管煙突を組合せたドラフトチューブ型S E Gを着想した。

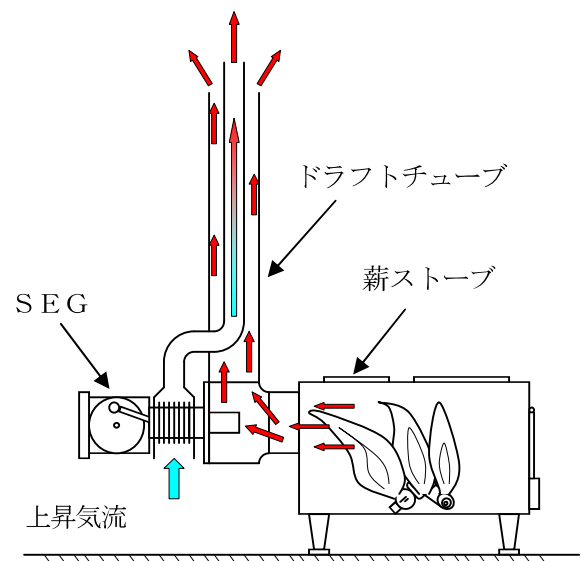


図1 ドラフトチューブ型S E Gの構成

排煙を熱源に利用するとともに煙道内にドラフトチューブを配置し、排煙からの伝熱によりドラフトチューブ内に生じる上昇気流⁽²⁾によって強制冷却を行う。特徴は、(a)燃焼排気ガスの廃熱を利用しているため薪ストーブのエネルギー損失およびS E Gの出力エネルギーの損失にはならない。(b)空冷機構は駆動部がなくシンプルな構造であるためトラブルが少なくコスト面でも有利である。

研究展開は、ドラフトチューブによる強制冷却効

果を検証した後、空冷式SEGの基礎技術を確立し、熱源に薪ストーブを使用した小型SEGの実用化を目指す。平成24～25年度の研究では市販の α 型SEGおよび試作品の γ 型SEGを用いて運転性能・発電出力に及ぼす空冷効果等の検証実験を行った。

具体的には、

- (1) α 型SEG実験機の運転性能と発電出力の調査
 - (2) ドラフト効果により発生する上昇気流の確認
 - (3) エアコンプレッサを用いた α 型SEGの強制空冷実験
 - (4) γ 型SEG実験機の試作および運転性能と発電出力の調査
- である。

2. 実験方法と実験結果

2. 1 α 型SEG実験機⁽³⁾

図2に、実験に使用した α 型SEG実験機（（有）協和金型製⁽⁴⁾、GB-370HP）を示す。熱源にアルコールランプを用いて運転性能と発電特性の調査および強制空冷実験を行った。



図2 α 型SEG実験機

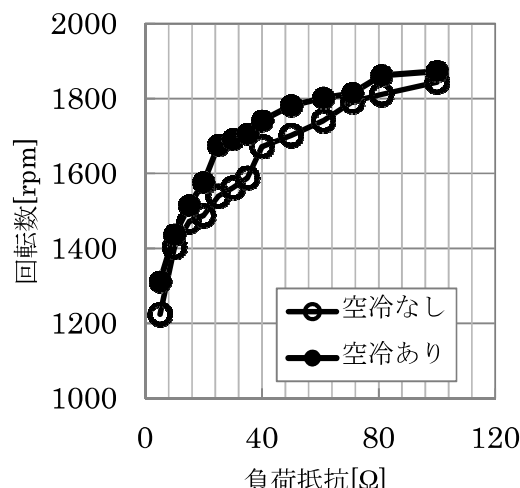
(1) 実験方法

運転性能として、タコメーターで測定したフライホイールの回転数は、無負荷の時に約2200rpmだった。発電特性は、発電出力端子に13種類の負荷抵抗（5～100 Ω ）を順番に接続してデジタルテスター（MASTECH製MS8221C型）で負荷抵抗の電圧降下を測定した。強制空冷実験

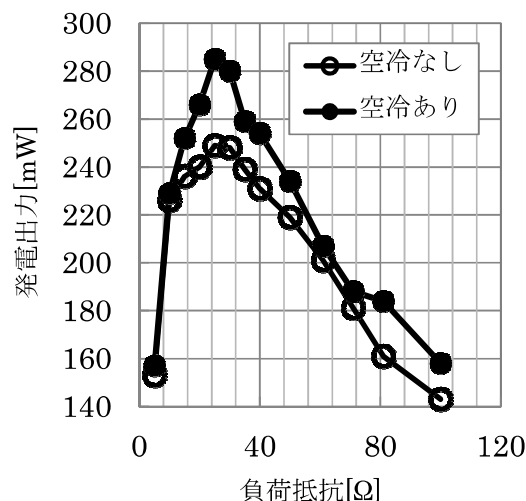
は、冷却側シリンダにエアーコンプレッサ（藤原産業（株）製、AM02-04NA型）で空気を送り空冷をしない場合と同様にして実験を行った。

(2) 実験結果

図3に実験結果を示す。回転数は負荷抵抗が増大するにつれて増加した。負荷抵抗が25 Ω 付近で、発電出力は最大になった。強制空冷により回転数は約10%、発電出力は約15%増加した。



(a) 回転数と負荷抵抗の関係



(b) 発電出力と負荷抵抗の関係

図3 α 型SEGの実験結果

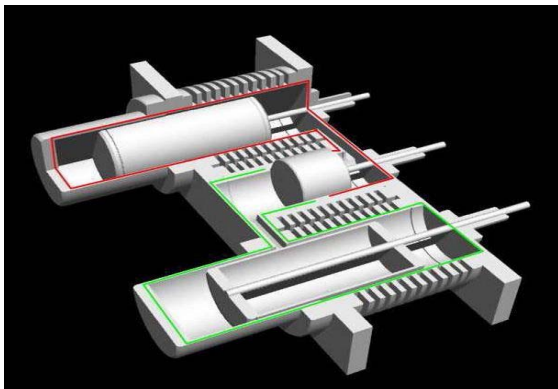
2. 2 γ 型SEG実験機⁽³⁾

図4(a)に3次元CADで描いた γ 型SEG実験機のカットモデルを示し、図4(b)に試作した γ 型SEG実験機の写真を示す。実験機は2個のディスクレーザーシリンダーと1個のパワーピストンで構成

し、サイズ（縦、横、高さ）の概略寸法は、各々、300mm、500mm、200mmである。加熱側シリンダの外径は $\Phi 35$ mmで熱変形の小さいSKS材を使用し、上限温度は約1000℃である。また、起電力定数（無負荷運転時の発電出力と回転数の関係）は約12.5mV/rpmとした。実験前に熱電対で測定した加熱側と冷却側のシリンダの温度は、各々300～400℃と150℃だった。

（１）実験方法

実験機を運転するための熱源として、アルコールランプ、固形燃料およびガスバーナーを使用した。ガスバーナーの熱量が最大である。また、 γ 型実験機のサイズは α 型SEG実験機よりも大きいため、起動するまでの運転方法がやや複雑である。



(a) カットモデル（3次元CAD）



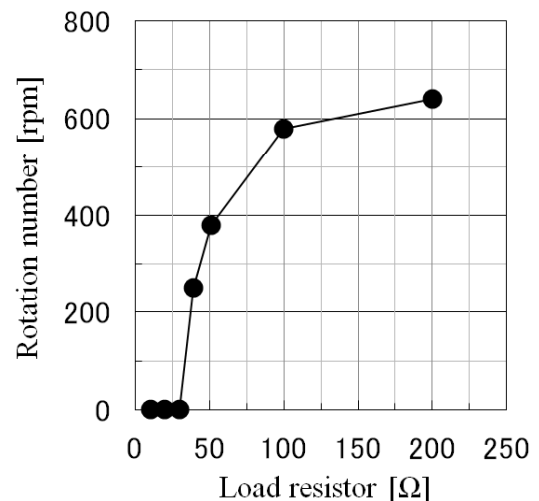
(b) 外観写真

図4 γ 型SEG実験機

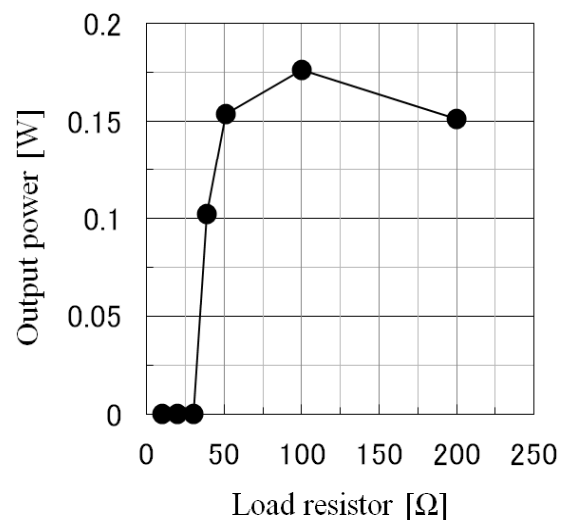
（２）実験結果

①アルコールランプ実験

図5(a)～(b)に空冷なしの場合の実験結果を示す。強制空冷時は運転性能が不安定になったため空冷実



(a) 回転数と負荷抵抗の関係



(b) 発電出力と負荷抵抗の関係

図5 γ 型SEGの実験結果

験は実施できなかった。運転性能は、 α 型SEG実験機と同様であり、発電出力は負荷抵抗が約100Ωの時に最大になった。

図6に、図5(a)、(b)から求めた発電出力と回転数の関係を示す。回転数が600rpmの時に発電出力は最大になり約0.26Wだった。

この理由は次のように考えられる。回転数が約600rpmになると、ディスプレイサーシリンダー内の高温ガスの熱流体特性により、運転トルクが徐々に減少する。一方、発電出力は運転トルクと回転数の積により与えられる。従って回転数がある値まで増大すると発電出力は最大値に到達し、その後、回転数がそれよりも高速になると発電出力は最大値から徐々に減少する。

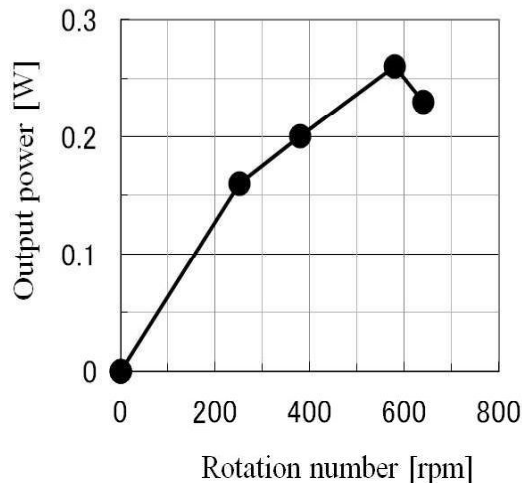


図6 発電出力と回転数の関係

②ガスバーナー実験

熱源にガスバーナーを使用して、空冷なしの場合の回転数と発電出力を調査した。アルコールランプを使った時と比べて発電機の回転速度は2倍程度、速かった。発電出力は、回転数が1200～1300 rpmの時に発電出力は最大になり約3Wだった(グラフは省略)。

以上のことから、

- (1)負荷抵抗が増加するにつれて回転数が高くなる。
 - (2)負荷抵抗のある値で、発電出力は最大になる。
 - (3)発電出力は、ガスバーナー>固形燃料>アルコールランプの順に大きい。
- となる。

2. 3 ドラフト効果の確認および空冷実験

ドラフト効果を利用してSEGの強制冷却実験を行う前に、垂直二重管と水平管で構成した実験装置で、熱源に固形燃料を使用してドラフト効果の目視による確認実験を行った。

実験方法は次のとおり。

- (1)実験装置を組立てた後、水平管の2か所の横穴の位置に固形燃料を置き、固形燃料に火をつける。
- (2)垂直二重管煙突の下部に置いた蚊取り線香に点火して二重管煙突の頂部で上昇気流を確認する。

次に実験結果を述べる。図7(a)に示す目視確認実験で蚊取り線香の煙がドラフトチューブ内を通過して頂部で噴出している。蚊取り線香を置かない場合は

上昇気流の目視確認はできないが、上昇気流が発生していると考えられる。

そこで、図7(b)に示すようにドラフトチューブの基部と α 型SEG実験機の冷却側シリンダーをゴム管で接続して強制空冷の予備実験を行った。 α 型SEG実験機の熱源にアルコールランプを使用し、ドラフト効果の熱源には固形燃料を用いた。しかしながら固形燃料の熱量が小さく、このため上昇気流が弱く空冷効果は得られなかった。



(a) 目視確認実験



(b)強制空冷予備実験

図7 ドラフト効果の実験結果

3. 検討・まとめ

巨大地震の被災地等の電力供給を目的として、要素技術の一つとして空冷式スターリングエンジン発電について、運転性能・発電出力および強制冷却の予備的な実験研究を行った。

(1) α 型SEG実験機

アルコールランプ実験では最大回転数と最大発電出力は各々、1800～2000 rpmと約250 mWだった。エアーコンプレッサによる強制空冷の効果は10～15%だった。

(2) γ 型SEG実験機

アルコールランプ実験の最大回転数と最大発電出力は各々600～700 rpmと約260 mWだった。ガスバーナー実験では、各々1300～1400 rpmと約3 Wだった。強制空冷実験は運転性能が不安定になったため効果を確認できなかった。

(3) ドラフト効果の確認実験

熱源に固形燃料を用いて実験を行い、ドラフトチューブの頂部で発生した上昇気流を目視確認した。 α 型SEG実験機でドラフト効果による強制空冷実験を行ったが、効果は確認できなかった。理由は使用した固形燃料の熱量が小さく、このため上昇気流が弱かったのではないかと考えられる。

今後の課題として、

- (a) α 型SEG実験機では、冷却側シリンダの冷却方法の改善案を検討した後、熱源に薪ストーブ

を使用して強制空冷実験を行う。

- (b) γ 型SEG実験機では、強制空冷時の運転性能を改善する。

- (c) 実験機の運転性能を調査する時に、加熱側と冷却側シリンダの温度差を把握する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり（財）ウエスコ学術振興財団から研究経費を助成していただきました。ここに記して感謝いたします。

参考文献

- (1) 山下巖・濱口和洋・香川澄・平田宏一・百頼豊

「スターリングエンジンの理論と設計」, 山海堂

- (2) ドラフト（チムニー）効果

<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E7%85%99%E7%AA%81%E5%8A%B9%E6%9E%9C>

- (3) スターリングエンジン

<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%B9%E3%82%BF%E3%83%BC%E3%83%AA%E3%83%B3%E3%82%B0%E3%82%A8%E3%83%B3%E3%82%B8%E3%83%B3>

- (4) (有) 協和合金 <http://www.kygn.jp/>

交流磁界環境を用いた植物の成長促進装置の実用化

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床工学科

茅野 功

本研究は、申請者らがこれまでに提案した植物の成長促進装置について、実用化に向けた適用拡大を企図し、3種の植物に対する交流磁界の至適環境について検討した。周波数1 kHz～50 kHz、磁束密度0～50 μ Tの磁界環境を作成できる成長促進装置に対して、カイワレダイコン、オクラ、及びミニトマトを対象とした栽培実験を行った。その結果、本研究で対象とした3種の植物はいずれも成長促進作用を示した。特にカイワレダイコンにおいては、1)成長促進作用には25 kHz近傍を中心とした周波数依存性があること、2)磁束密度と曝露期間の間に至適な組み合わせがあること、をそれぞれ発見した。至適環境で栽培することによりこれまでの手法に比して約71%の電力削減によっても同等の成長促進効果を得ることができ、より効率的な栽培手法を確立した。

1. はじめに

我々の身近にある家電製品は、生活の質の向上に寄与する一方、自然界には存在しなかった電磁界を放射する要因にもなっている。この電磁界における生体への影響は、家電製品の普及に伴って関心が高まっており、影響の有無やメカニズムの解明は社会的急務である。

電磁界環境における生体、特にヒトに対する影響を解明するために世界保健機構（WHO）の環境保健基準計画の一環として国際非電離放射線防護委員会（ICNIRP）が設立され、この委員会によりヒトの非電離放射線（電磁界）の曝露限界に関する国際指針（ガイドライン）が作成された[1]。これを受け、日本でも総務省から電波防護指針が公表され、電波利用の安全基準の指針が提供されている。しかし、これらの防護指針のうち、中間周波帯と呼ばれる低周波領域（300 Hz以下）と高周波領域（10 MHz以上）に挟まれた周波数帯の防護指針値は、低周波帯域と高周波帯域の指針値により補完的に作成されているため、防護指針毎に指針値が大きく異なるという問題がある。また近年、中間周波帯域の磁界（以下、中間周波磁界と示す）を放出する機器が日常に急速に増えたことから、WHOにおいても中間周波磁界における生体影響の研究の重要性が訴えられているが、この研究はアフリカツメガエルのオタマジ

ヤクシから生体への変態に対する影響[2]等で散見される程度であった。

我々は、300 Hz～10 MHzの中間周波磁界が生体に与える影響について検討を続けており、特に中間周波磁界環境下ではカイワレダイコンにおいてその発芽と成長を有意に促進する可能性があることを発見し発表した[3]。さらに、この成果を利用してカイワレダイコンに特化した成長促進装置を開発[4]・提案[5]したが、その磁界環境（周波数及び磁束密度）と成長促進作用の関連性、及び提案装置のカイワレダイコン以外の植物に対する適用可能性の検討は未だ十分ではない。

そこで本研究では、提案した成長促進装置の実用化を企図し、1)カイワレダイコンを対象としたさらなる至適磁界環境（周波数、磁束密度、及び曝露期間）を探る、2)複数の植物に対する成長促進の効果を確認する、の2点に焦点を置き検討を行った。

2. 実験方法

2. 1 実験対象植物

本研究での栽培対象は以下の3種類とした。

対象A：カイワレダイコン

対象B：オクラ（アメリカネリ）

対象C：ミニトマト（品種：ネネ）

2. 2 提案装置（成長促進装置）

我々がこれまでに提案した成長促進装置の概略を説明する．本装置は大きく栽培部と電源部の2部によって構成される．

栽培部は、直径 152 mm のヘルムホルツコイル状に巻いた 2 つのコイル内部の空間で構成される．カイワレダイコンの栽培の場合、図 1 のようにこの空間に対して発泡スチロールで覆われた円筒状ガラス容器を入れ、このガラス容器内部に植物培養ゲルを入れて水耕栽培を行う．また、ミニトマト及びオクラの栽培の場合、栽培中に植物が栽培部外まで成長するため、発泡スチロール及びガラス容器を使用せず、その胚軸部（茎及び根の境目）が常に磁界環境下にあるよう栽培部を固定する．

電源部はコイルに交流磁界を発生させるための低周波発振回路、増幅回路及び電源から構成され、コイルに交流電流を印加する．発振器及び増幅器は、栽培部の交流磁界環境を可変できるよう、1 kHz～50 kHz の帯域で最大 50 μ T までの磁束密度が作成でき、一様な交流磁界環境下で栽培することができる．また電源スイッチを切ることにより通常の磁界環境にすることもできる．

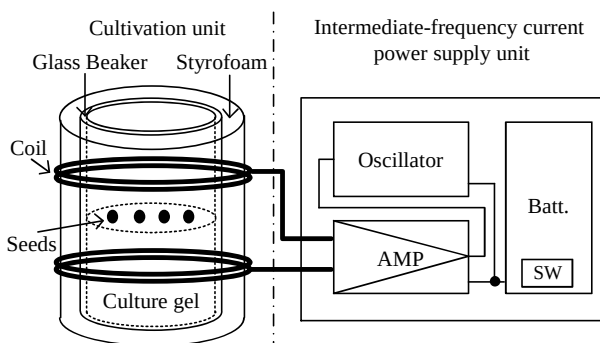


図1 成長促進装置の概略[4][5]

2. 3 栽培方法

2. 3. 1 カイワレダイコンの栽培方法

図 1 の装置における栽培部内は、水耕栽培用土壌保水材をイオン交換水で 200 倍に希釈した培養液 50 ml を装置内のシャーレに注ぎ、これに 0.5 g の高分子ポリマーを添加してゲル状にすることで培地を作成した．この培地にあらかじめ 1 %次亜塩素酸ナ

トリウム水溶液に 3 時間浸したカイワレダイコンの種子 50 個を等間隔に並べ、水耕栽培を行った．また栽培中、ノイズとなる中間周波磁界を放射しないペルチェ型インキュベータ（CN-40：三菱電機エンジニアリング社製）内部にヘルムホルツコイルをおき、カイワレダイコンの発芽至適温度である 20.0 ± 0.1 $^{\circ}$ C の温度環境下で、光の影響を受けないよう暗室状態（0 Lux）で栽培した．また、磁界環境は以下に示す 4 つのすべての組み合わせによりそれぞれ 168 時間栽培した．

- (1) 周波数 : 1, 10, 25, 及び 50 kHz
- (2) 磁束密度 : 10, 30, 及び 50 μ T
- (3) 曝露部位 : 根, 及び茎
- (4) 曝露時間 : 播種から 48 時間, 及び 168 時間

また、比較対象として日常環境で栽培したものを Control 群とし、これら全てに対して栽培後、根、茎、及び全長を測定した．

2. 3. 2 オクラの栽培方法

図 1 の装置を、ハロゲンランプを光源とする室内栽培ハウスに置き、栽培部内部に直径 125 mm の植木鉢を入れ、この中に家庭園芸用培養土を入れた．培養土には、イオン交換した蒸留水約 100 ml で耕し種子（アメリカネリ（通称名：オクラ））を等間隔に 10 粒並べ、3144 時間（131 日）栽培した．

上記セットを 2 セット用意し、片方は装置電源を ON にし、栽培期間中常に周波数 25 kHz、磁束密度 10 μ T の環境で栽培する群（以下 exposed 群）、また一方は装置の電源を OFF とし、日常の磁界環境（10～300 kHz の複合磁界環境 0.24 μ T）で栽培する群（以下 control 群）とした．なお、温度と照度を定期的に測定し、それぞれ 18.0～30.9 $^{\circ}$ C 及び 0～3000 lux とした．

上記、exposed 群及び control 群それぞれについて播種から 720 時間経過後、ランダムに 5 株ずつ間引きを行った後、播種から 3144 時間経過時の根、及び全長をそれぞれ測定した．

2. 3. 3 ミニトマトの栽培方法

図 1 の栽培装置の栽培部に対して、水耕栽培用栽培槽（KYOWA 社製：ホームハイポニカ 601）を設

置した. この栽培槽に水耕栽培用液肥 12 L を入れ, 種子 (ミニトマト: 品種ネネ) をそれぞれ 1968 時間 (82 日) 栽培した.

このセットを 2 セット用意し, 片方は栽培装置の電源部の電源を ON にし, 栽培期間中常に周波数 25 kHz, 磁束密度 10 μ T の環境で栽培する群 (以下 exposed 群), また一方は電源部の電源を OFF とし, 日常の磁界環境 (10~300 kHz の複合磁界環境 0.24 μ T) 栽培する群 (以下 control 群) とした. なお, 温度はエアコンにより管理し室温環境で約 20 $^{\circ}$ C~28 $^{\circ}$ C とした. また, 照度は上記栽培装置を水耕栽培用グロウテント (縦 600 mm×横 600 mm×高さ 2000 mm) 内部にクールチューブリフレクター (600 W) を光源として設置し, これを 12 時間毎に電源を ON, 及び OFF として栽培した. 栽培の様子を図 2 に示す.

上記, exposed 群、及び control 群それぞれについて, 播種から 1968 時間経過時に収穫したミニトマトの重量をそれぞれ測定した.



図 2 ミニトマトの栽培の様子
(左: exposed 群 右: control 群)

3 結果及び考察

3. 1 カイワレダイコンの成長促進作用

カイワレダイコンは, 2. 3. 1 に示す磁界環境 (1)~(4) の特定の組み合わせの磁界環境下において成長を促進することが可能であった. 成長促進作用には周波数依存性が見られ, 25 kHz 時のみ強い成長促進作用が見られた. 特に 25 kHz, 50 μ T の磁界環境において, 播種から 48 時間の限定的な曝露をすることにより, 日常環境の約 1.4 倍成長を促進することが可能であった (図 3).

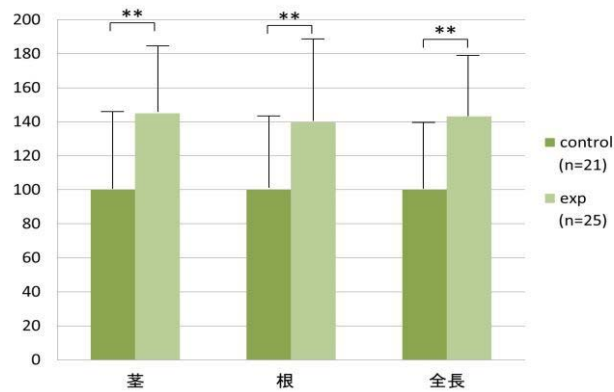


図 3 25 kHz, 50 μ T, 播種から 48 時間の限定的な磁界曝露 (exp) による成長促進性 (Control 群の茎, 根, 及び全長の平均を 100 として正規化したもの)

この結果, カイワレダイコンの成長促進の為, 栽培期間中常に磁界環境下に置く必要はなく, 例えば既存の植物工場の一部に本装置を適用するだけで効率的に栽培が可能になると考えられる. さらに本研究で得られた至適環境によって栽培することにより, これまでの手法に比して約 71% の電力削減によっても同等の成長促進効果を得ることができ, より効率的な栽培手法を確立した. 本提案装置栽培部 1 つ当たりのランニングコスト (消費電力換算) は, 1 回の栽培につき 0.6 円と試算され, 非常に低コストであることから本装置の植物工場への適用に対する有用性が示唆され, 本成長促進装置及び栽培手法を用いたスプラウトの実用化に向けた見通しを得たと考察する.

3. 2 オクラの成長促進作用

3. 1 によるカイワレダイコンによる結果と同様に, 土壌栽培によるオクラでも成長促進作用が示された. この結果を図 4 に示す. 特に根に対する成長の促進作用が顕著であった.

本実験では, 磁界環境を与えるヘルムホルツコイル (栽培部) よりも栽培対象が長い植物であった. このため, 磁界環境は胚軸部 (根と茎の境目) が中心となり, 葉や果実への磁界はほぼ日常環境であったにもかかわらず, 成長促進作用が見られた.

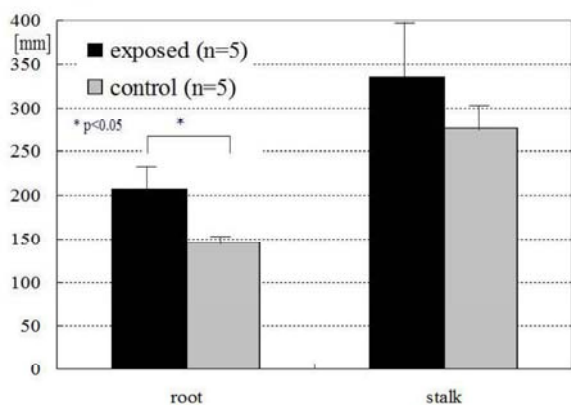


図4 磁界環境によるオクラの成長促進作用

3. 3 ミニトマトの成長促進作用

3. 3. 1 収穫果実の重量について

実験の結果、収穫されたミニトマト果実の重量(平均±標準偏差)は、exposed 群が control 群に比して平均約 46%重くなり、磁界環境下ではより大きな果実を収穫することができた(図5)。

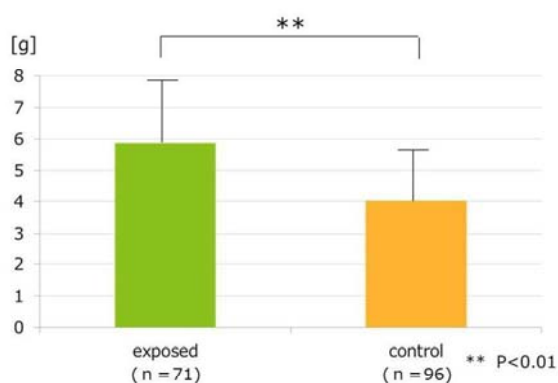


図5 収穫果実の重量

本装置を用いて交流磁界環境下で栽培されたミニトマトにも、他の植物同様に成長促進作用があると仮定すれば、交流磁界環境下で栽培されたミニトマトは成長が促進され、結実以降の期間が日常環境で栽培されたものよりも長かったため、果実の重量が control 群よりも重くなったものと考え、オクラと同様に、中型種に対する胚軸部のみへの磁界環境においても成長促進作用をもたらすことができる可能性が示唆された。

3. 3. 2 収穫果実の商品価値について

栽培したミニトマトの磁界環境による栄養成分の

違いを検討するため、control 群、及び exposed 群それぞれで収穫した果実に対する無機栄養成分(カリウム、ナトリウム、カルシウム、及びマグネシウム)の重量パーセント濃度、及び含水率について原子吸光度法を用いて測定した。この結果を図6に示す。

また、exposed 群、及び control 群それぞれの果実を18歳~39歳(平均21.3歳)の男女39(男女比1:1)名に試食してもらい、色、つや、甘さ、固さ、及び味の濃さについての主観的感想(味覚評価)を0(最低:悪)から10(最高:良)までの無段階評価を依頼した。この結果を図7に示す。

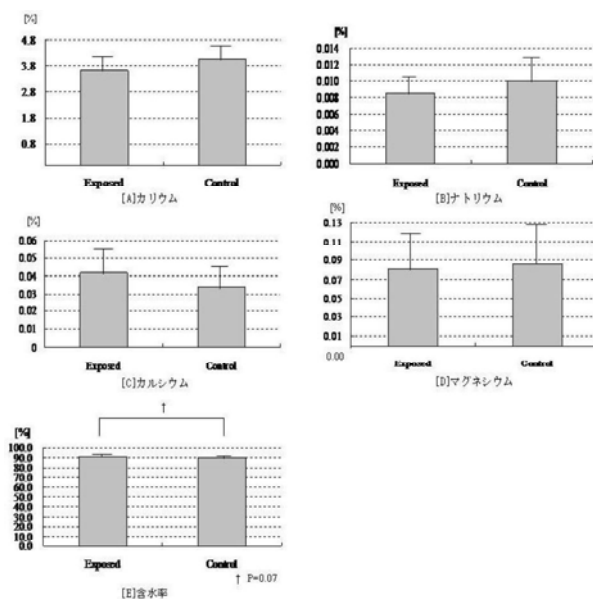


図6 無機栄養成分・含水率の違い

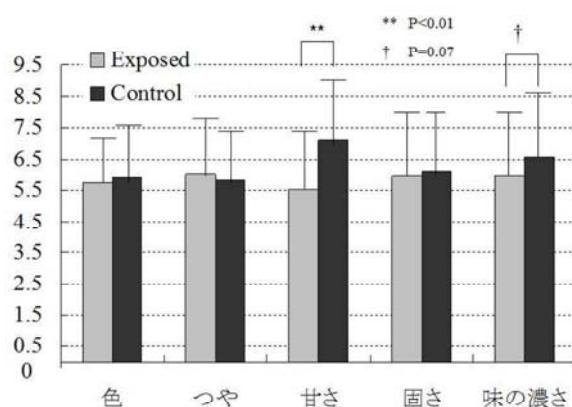


図7 味覚調査結果

交流磁界環境で栽培されたミニトマトの果実は、日常環境で栽培されたものに比べ味覚評価において、甘さと味の濃さの項目で有意に劣っていた。これは、

交流磁界環境で栽培されたミニトマトの果実は、味覚を左右する要因の一つである無機成分量に違いがない一方で、その含水率が高い傾向にあることから、果実が全体的に水っぽい（薄い）印象が強かったためであると考えられる。この結果は、他の植物（カイワレダイコン、オクラ）を対象とした実験と一致[5][6]しており、本装置を用いた交流磁界環境下での栽培は、植物の吸水性を向上する可能性があると考えられる。

4 まとめ

本研究では、これまでに提案した成長促進装置のさらなる実用化を企図し、カイワレダイコンを対象としたさらなる至適な磁界環境、また複数の植物に対する成長促進の効果についてそれぞれ検討した。

その結果、カイワレダイコンにおいては、1)成長促進作用には 25 kHz 近傍を中心とした周波数依存性があること、2)磁束密度と曝露期間の間に至適な組み合わせがあること、をそれぞれ発見した。至適環境で栽培することによりこれまでの手法に比して約 71 %の電力削減によっても同等の成長促進効果を得ることができ、より効率的な栽培手法を確立した。また、土壌栽培や成長促進装置の栽培部より大きな植物に対しても成長促進作用を示すことが示唆され、本装置の有用性を確認した。今後は、各植物に対する至適磁界環境の差異、及び菌類に対する成長促進作用の確認を行い、より実用化に向けた検討を行う予定である。

参考文献

- [1] World Health Organization: Electromagnetic fields and public health Intermediate Frequencies(IF)International EMF Project Information Sheet. 1-4, 2005
- [2] 中馬亜津沙, 塗木淳夫, 辻村誠一, 湯ノ口万友: 電磁調理器の電磁界によるアフリカツメガエルへの作用に関する考察. Journal of the Magnetic Society of Japan, 31(3):263-267, 2007
- [3] 茅野功, 望月精一, 小笠原康夫: 中間周波磁界環境下におけるカイワレダイコンの成長促進手法, 生

体医工学会, 49(1):226-232, 2011

- [4] 茅野功, 望月精一: 成長促進装置及び成長促進方法, 特願 2012-121711, 2012
- [5] 茅野功, 望月精一, 青柳里果: 交流磁界環境を利用したカイワレダイコンの成長促進装置, 日本生体磁気学会誌, 25(1):136-137, 2012
- [6] Satoka Aoyagi, katsushi Kuroda, Ruka Takama, Kazuhiko Fukushima, Isao Kayano, Seiichi Mochizuki, akira Yano, “Evaluation of white radish sprouts growth influenced by magnetic fields using TOF-SIMS and MCR”, Surface and interface analysis, 45(1):264-267, 2013

(なぜ肺炎クラミジアは細胞内にとどまるのか?)

(川崎医科大学)

(築取 いずみ)

本研究では、細胞内寄生性細菌がどのようなメカニズムにより宿主免疫から逃れ、細胞内に寄生し続けることを可能としているのかを明らかにするため、偏性細胞内寄生性細菌である肺炎クラミジアをモデル生物として研究を行った。通常、細胞は細菌などの異物を取り込むと、ファゴソームとリソソームを融合し、異物を消化分解することで、感染防御を行う。しかし、肺炎クラミジアは細胞内に寄生し続けるために、細胞内輸送機構を攪乱することで、宿主免疫から逃れ、生存し続けることを可能にする環境を作り出す。本研究では、肺炎クラミジア機能未知遺伝子 455 個を酵母に発現させるスクリーニングシステムを作製し、これにより、酵母にて細胞内輸送異常を引き起こす分子の探索を行った。その結果、15 個の肺炎クラミジア分子を酵母に発現させると、酵母において、通常リソソームへ輸送される分子を細胞外へと分泌するようになり、細胞内輸送異常を引き起こしていることが明らかとなった。これら肺炎クラミジア分子の機能についてさらに解析を進めていくことで、慢性感染のメカニズム解析につながる事が期待される。

肺炎クラミジアは、集団生活を開始する小児期に初感染を起こし、成人では抗体保有率が 50%以上にのぼる非常にありふれた疾患の 1 つである。感染しても通常は軽症の呼吸器疾患を示すだけに留まること多いが、基礎疾患を有する患者では重症化することもしばしばある。また、一度肺炎クラミジアに感染した後も終生免疫は獲得されず、持続感染や繰り返し感染を引き起こすことも知られている。これまで肺炎クラミジア感染の予防を目指し、肺炎クラミジア外膜構成蛋白の 60%を占める主要外膜蛋白 (MOMP) の可変領域に対する抗体に中和能力があることからワクチン候補蛋白として注目されてきたが、現在まで有効なワクチンの産生は成功していない。感染した菌体の一部は γ -インターフェロンなどの存在下で持続感染菌体に変化し数年間にわたり生体内で生存し続ける。持続感染菌体は通常の抗菌薬に不応であるばかりか、免疫原性の強い HSP60 を持続的に産生し炎症性サイトカインや接着分子の産生亢進により慢性炎症や組織障害を惹起することが知られている。肺炎クラミジアの慢性感染により気管支喘息のような呼吸器疾患だけでなく、動脈硬化、多発性硬化症など様々な疾患との関連が報告されており、肺炎クラミジア感染症が様々な病態を生じる一

因になっていることが予測される。

肺炎クラミジアは偏性細胞内寄生菌であり、宿主細胞内でのみ、生存・増殖することが可能である。宿主細胞への感染を可能にしているのが、近年明らかになった鞭毛と同様の構造をしたⅢ型分泌装置と、エフェクター分子と呼ばれる蛋白質である。肺炎クラミジアは宿主細胞に接着すると、針状の分泌装置を宿主細胞内に打ち込み、エフェクター分子を注入する。比較的解析が進んでいるエフェクター分子の 1 つとして TARP (translocated actin recruiting phosphoprotein) がある。肺炎クラミジアは、宿主細胞に接着すると、この TARP を宿主細胞に注入し、アクチン再重合を行わせ、積極的に菌体自身を宿主細胞内へ取り込ませるように働きかけ、宿主細胞内への侵入を成立させる。肺炎クラミジアには 1069 遺伝子が存在し、このようなエフェクター分子は、肺炎クラミジア全蛋白質の 10-20%に及ぶと推測されている。多くの病原微生物は、病原性アイランドと呼ばれる、病原因子がひとつなぎの塊としてゲノム上に配列する領域を持っていることが知られている。そのためゲノム配列から、病原因子の推測を行うことが可能となる。しかし、肺炎クラミジアは、このような病原性アイランドを持たず、また他のクラミ

ジア属と比較的相同性がある分子でも、異なる機能をもつことがしばしばあり、遺伝子配列からその機能を推測することが困難である。また組換え遺伝子技術を応用することも難しく、現在までに、肺炎クラミジアエフェクター分子の機能はほとんど明らかにされていない。そのため、肺炎クラミジアの詳細な感染機構はわからず、感染予防法や持続感染の治療法の開発は困難である。

本研究では、特に持続感染を引き起こすメカニズムの解明を目的に取り組んできた。通常、細胞は細菌などの異物を取り込むと、ファゴソーム-リソソーム融合により、異物を消化分解し、細胞内の恒常性を維持する。しかし、肺炎クラミジアは感染した宿主細胞内で生存・増殖の場を確保するために、宿主細胞内において輸送異常を引き起こすことにより、ファゴソーム-リソソーム融合阻害を引き起こしていることが考えられる。そこで、肺炎クラミジア分子の中で細胞内輸送異常を引き起こす分子の網羅的探索を試みた。肺炎クラミジア全 1069 遺伝子のうち、機能未知遺伝子 455 個について、検討を行った。酵母は真核生物であることから、病原微生物の遺伝子を発現させることで、動物細胞と比較的良く似た表現型を示すことがすでに明らかにされている。そこで、本研究では、正常時には酵母の液胞（ヒトにおけるリソソームに相当）へ輸送される蛋白質をインベルターゼによって標識し、この組換え蛋白質を発現する酵母を作製した。この組換え蛋白質発現酵母は、正常状態では、野生型と変わらず増殖する。しかし、液胞への輸送に異常を起こす遺伝子を同時に発現させると、インベルターゼ融合蛋白質が、細胞外へと分泌されるようになる。その結果、特定の培地中では、インベルターゼの作用により、培地が茶褐色へと変色する。これにより、酵母内で輸送異常が引き起こされていることを容易に可視化することが可能となる。この酵母に、455 個の肺炎クラミジア遺伝子をそれぞれ発現させ、輸送異常を引き起こす分子の網羅的スクリーニングを行った。スクリーニングの結果、15 個の分子が、酵母の輸送異常を引き起こす肺炎クラミジア分子であることが明らかとなった。これらのエフェクター分子の中で、複数の

分子については、現在さらなる機能解析を進めているところである。また、申請者所属研究室において行った研究から、これらの肺炎クラミジアエフェクター分子の中で、肺炎クラミジア感染患者の血清中に含まれる抗体によって認識される分子が存在することも確認している。このことは2つの可能性の存在を示唆している。1つ目に、この分子が肺炎クラミジア内で蛋白質として産生されていること：本研究では、蛋白質をコードしていると推定される遺伝子を酵母に発現させて、検討を行っている。そのため、実際にこの遺伝子から、肺炎クラミジア内で機能する蛋白質が産生されているかは不明であった。しかし、患者血清中にこの分子を認識する抗体が存在することから、この遺伝子から蛋白質が産生されていることが確認された。2つ目に、この分子が、ヒト抗体に認識される抗原分子になりえること：上述したように、肺炎クラミジアに対する有効なワクチンの産生はいまだ成功していない。そこで、新たなワクチン開発を行うにあたり、どのような蛋白質を標的にするのが良いかを検討する必要がある。抗原としてヒト抗体に認識されうるということは、新たな中和抗体として機能することが推測される。実際、本研究で見出した肺炎クラミジア分子 Fke063 に対する抗体と肺炎クラミジアを混ぜた後に、細胞へ感染させると、対照抗体と混ぜた場合と比較して、約 50%程度の感染の減少を確認することができた。これは、今後感染予防法の新たな開発へつなげる成果であると期待している。

本年度までに、スクリーニングを終了させ、15 個のエフェクター候補分子を見出すことに成功した。さらには、現在各々の分子について、それぞれの機能、相互作用する宿主分子の探索を行っている。また、個々の肺炎クラミジア分子に対する抗体を作製し、感染予防効果の有無についての検討も行っている。今後は本研究で得られた成果をもとに、さらに肺炎クラミジアの感染戦略を明らかにするとともに、新たな予防・治療法の開発へつなげるよう、発展させていきたい。

膵がん転移を抑えるための基礎的検討

川崎医科大学¹生化学教室、²臨床腫瘍学教室山内 明¹、山村 真弘²

がん（悪性新生物）は、死亡数・医療費ともに病因のトップであり、患者・家族に身体的・精神的苦悩を及ぼすことから、医科学研究においても大きな攻略目標である。がんの転移により諸臓器の傷害が起こり死に至ることが多く、がん転移を抑制することが攻略手段の一つとして注目されている。本研究では、膵がん転移を抑制するための新しい転移能評価法の構築を試みた。これまで主に血球系の細胞で多用されてきた細胞動態解析装置 TAXIScan を、膵がん細胞株の走化性アッセイに用いた。その結果、細胞が移動するにはコラーゲン I が必要であること、血清およびリゾフォスファチジン酸が膵がん細胞の走化性を惹起したこと、既存の抗腫瘍薬が走化性を抑制する効果をもつことが分かった。今後この評価方法は、膵がん患者由来の細胞での評価によってその有用性が証明できれば、新規がん転移能評価方法および予後判定方法としてがん診療・研究に役立つことが期待される。

【背景と目的】

細胞が移動する現象は単細胞生物から哺乳類あるいはヒトに至るまで、ほぼ全ての細胞で観られる基本的な現象である。正常な細胞はその役割を果たすためにダイナミックに生体内を動きまわり機能している。がん細胞は正常な細胞が何らかの原因で無限に増殖する形質と他の組織や臓器へ転移する形質を獲得したものであり、正常な組織や臓器を破壊し、その機能を妨げてしまう。がん克服の戦略として、細胞増殖を抑えることやがん転移を抑えることが挙げられる。もし、がん転移を抑えることができれば、がん組織を外科的手術によって取り除くことで治療することが期待できる。一方、がん転移能の指標の一つに細胞走化性が知られている。従来では細胞走化性評価にはボイデンチェンバー法が用いられていたが、この方法では多量の細胞（1 ウェルあたり 10 万個）が必要で、一定時間後に移動した細胞数のみのデータしか得られず真に走化性かランダムな移動かはわからない。我々はこれまで、新しい細胞動態解析方法（TAXIScan 法）の研究を行い、血液系細胞の評価法として新しい診断方法になりうることを報告してきた（J. Immunol. Methods 320, 155, 2007）。この方法では細胞遊走画像を経時的に撮影して定量するので、細胞数に加えて移動の方向性や速さをはじめとする種々のパラメータや細胞形態などの多く

の情報が得られる。しかも微量の細胞（1 ウェルあたり最低 100 個）で測定可能である。本研究ではこの TAXIScan 法を膵がん細胞に応用して、これまで難しかった安定的で再現性のある転移能評価法を確立することを目的とした。

【方法】

膵がん細胞株（BxPC3 および PANC1 細胞）について、以下の項目①～③を、細胞動態解析装置 EZ-TAXIScan を用いて検討した。

①膵がん細胞の走化性評価系の構築：細胞の種類、細胞外マトリックス等のコート剤（ヒトコラーゲン I、ファイブロネクチン、ラミニン、マトリゲル）、遊走を引き起こす因子等の測定条件の最適化を行った。

②走化性刺激物質の探索：次に、細胞の走化性を惹起する種々の走化性刺激物質を探索した。

③細胞走化性制御の試み：さらに、実際に臨床で治療薬として用いられている既知の抗がん剤がこれらのがん細胞の走化性を制御できるか否かを検討した。抗ガン剤には膵がん治療で用いられる代謝拮抗剤 Gemcitabine、および慢性骨髄性白血病の治療で用いられる分子標的薬 Dasatinib を種々の濃度で用いた。

【結果】

① 膵がん細胞の走化性評価系の構築：

ガラス板上のがん細胞遊走の際の足場として種々の

細胞外マトリックスを検討したところ、ヒトコラーゲン I およびマウス肉腫由来マトリックス（マトリゲル）が良好な細胞接着と遊走を支持した。本実験系ではヒトがん細胞の走化性を評価することを目的としていることから、以下の実験では足場としてヒトコラーゲン I を標準的に用いることとした。

② 走化性刺激物質の探索：

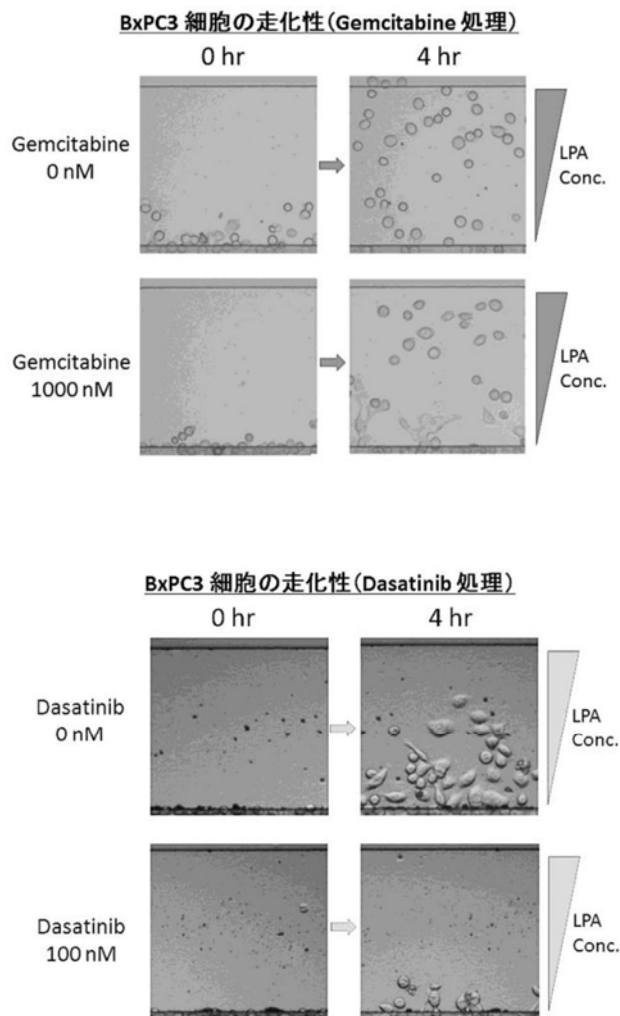
種々の濃度の走化性惹起物質を検討したところ、ウシ胎児血清（FBS）が膀胱癌細胞の良好な走化性を惹起した。さらに FBS 中の走化性惹起因子と考えられる因子を検索したところ、脂質メディエータのリゾフォスファチジン酸（LPA）が走化性惹起性を有することが分かった。

③細胞走化性制御の試み：

Dasatinib および Gemcitabine を種々の濃度で BxPC3 細胞の培養液に加え、走化性アッセイを行った。Dasatinib は 100nM 以上で BxPC3 細胞の走化性を抑制した。一方、Gemcitabine は、1000nM で細胞を処理しても走化性を抑制しなかった（右図参照）。

【考察】

本研究は、これまで血球系の走化性評価によく用いられていた TAXIScan 法を、膀胱がん細胞の走化性評価に初めて応用し、足場としての細胞外マトリックスの一つヒトコラーゲン I、走化性惹起物質として LPA およびウシ胎児血清を使用することで、良好に細胞走化性評価ができることを示した。さらに走化性制御物質の候補として抗腫瘍薬 Dasatinib が 100nM レベルで走化性抑制効果があることを示した。本評価系を用いることで、膀胱がん細胞さらにその他の悪性腫瘍の走化能を正しく評価し、走化能を制御する物質を探索することが可能となり、新薬の探索やがん細胞の機能評価に貢献できるものと考えられる。



油彩画、日本画、染色品に使用される色材の簡易分析法の開発

吉備国際大学 外国語学部 (元 吉備国際大学 文化財学部)

大 下 浩 司

本研究は、油彩画、日本画、染色品などに使用される顔料や染料等の色材の反射スペクトルを簡易に測定できる分析システム（簡易反射スペクトル分析システム）の開発を目指した。初年度にあたる平成25年度は、色材の①色相（極大反射波長）、②明度（反射率の高低）、③彩度（反射率の高低差）を測定できる簡易反射スペクトル分析システムの開発に取り組み、その分析性能を評価した。本研究で開発した簡易反射スペクトル分析システムと市販の反射スペクトル分析システムを用いて、日本画で使用されるベロ藍を分析したところ、本研究で開発した分析システムは、市販の分析システムと同等レベルに反射スペクトルを測定することができ、初年度の目標を達成できた。更に、予定より早く研究が進捗したため、次年度に実施予定だった色材の反射スペクトルの網羅的分析とその分析性能の評価に着手した。本年度内には、油絵具40種の分析用サンプルを調製し、市販の分析システムを用いて反射スペクトルを測定した。次年度は、本研究で開発した簡易分析システムを用いて反射スペクトルを測定し、分析性能を比較評価し、問題点を改善する。

1. はじめに

芸術、工芸、保存修復などの専門分野において、油彩画、日本画、染色品等の文化財に使用される顔料や染料の色材を非破壊かつ簡易に科学分析できる手法の開発に対する需要は高い。

一般に、油彩画には顔料を乾性油で溶いた油絵具が使用され、日本画には顔料を膠と溶いた日本画絵具が用いられ、染色品には染料が使われる。顔料は不溶性、染料は可溶性の化学的性質があり、顔料には無機化合物が多く、染料には有機化合物が多い。そのため、従来は、顔料の分析には蛍光X線分析法、染料の分析にはNMRやIRなどの分析手法が適用されていた。蛍光X線分析では、色材の色相と検出元素から顔料の無機化合物成分を推定できる。しかしながら、NMRは不純物の影響を受けやすいため化学構造の解析は難しく、IRは炭素骨格や官能基の情報は得られるものの正確な化学構造はわからない欠点があった。その課題を解決するために、光ファイバーを接続した三次元蛍光スペクトル分析法が開発された。光ファイバーを通じて染料に、紫外線～可視光線の波長の異なる光を染料に順次照射し、その染料から発せられる蛍光を測定し、その蛍光の励起波長（Ex）、蛍光波長（Em）、蛍光強度を三軸からなる空

間座標に三次元蛍光スペクトルを示し、その三次元蛍光スペクトルの蛍光強度の等高線情報をもとに染料が同定されるようになった。

そのように顔料や染料の成分分析に加え、それら色材の①色相（極大反射波長）、②明度（反射率の高低）、③彩度（反射率の高低差）の分析も大切である。色材の肉眼観察は主観的であるが、色材の反射スペクトルを測定すれば、色相、明度、彩度の分析データを客観的に把握できるようになる。更に、それらの分析情報を活用すれば、色材の種類、粒子径、劣化具合の解析に有用である。その反射スペクトルの測定には、従来、タングステンハロゲンランプを光源に、分光器を検出に、そして、光ファイバーを色材への光の照射・受光に使用した分析システムが使用されていた。しかしながら、そのようなシステム構造のため、装置価格は高価なため分析化学の専門家でなければ入手しようとはせず、芸術、工芸、保存修復の専門家までには浸透していない。

本研究はその課題を解決するために、システム構造の簡便化・ローコスト化を図り、色材の反射スペクトルを簡易測定できる分析システム（簡易反射スペクトル分析システム）の開発に着想するに至った。

2. 研究内容

油彩画、日本画、染色品などに使用される顔料や染料等の色材の反射スペクトルを簡易に測定するために、システム構造を簡便化・ローコスト化した簡易反射スペクトル分析システムの開発に取り組んだ。更に、本研究で開発した簡易反射スペクトル分析システムと市販の反射スペクトル分析システムを用いて、日本画で使用されるベロ藍を測定し、分析性能を比較評価した。また、当初予定より研究が早く進捗したため、次年度に実施する予定だった色材の反射スペクトルの網羅的分析に着手した。本年度は、まず、油絵具 40 種の分析用サンプルを調製し、市販の分析システムを用いてそれらの反射スペクトルを測定した。次年度には、本研究で開発した分析システムを用いて、それらの反射スペクトルを測定し分析性能を評価して、システムの問題を解決し実用化を狙う。

まずは、簡易反射スペクトル分析システムの開発に取り組んだ。市販されている反射スペクトル分析システムは、光源にタングステンハロゲンランプ、検出に分光器、そして、色材への光照射と受光に光ファイバーが使用されている。そのため、システム構造は複雑になり高価になる。その課題を解決するために、本研究は、光源に LED ライト、検出器に光感応素子、光ファイバーを使用しない簡易システムの開発に取り組んだ。分光器を使用しないため、照射光の波長の異なる LED ライトを光源用に複数個用いて、分光器レスの構造が可能になる。また、分解能を高めるためには必要に応じて波長の異なる LED の数を増やせば良い。それらの対処により、大幅なコストダウンが可能になり、システムの簡易化が実現できた。本分析システムの詳細については、本報告書執筆現在、論文や学会に未発表のため詳細な記述は控える。本システムを用いて、日本画に使用されるベロ藍の反射スペクトルを測定した。その比較のために、市販の反射スペクトル分析システムを用いて同様に測定した。それらの結果を図 1 に示す。青色のベロ藍は、400~500 nm に反射スペクトルのピーク（極大波長）があり、肉眼では認識できない 800 nm 辺りから反射スペクトルが緩やかに立ち上が

るベロ藍の反射スペクトルの特徴を、本研究で開発した簡易反射スペクトル分析システムにより正確に捉えることができた。ここまで到達するまでに、分析システムの構造設計や調整に相当の時間を要したものの、当初予定していたよりも早く研究が進捗したため、次年度に予定していた色材の反射スペクトルの網羅的分析とその分析性能の評価に着手することにした。本年度内には、油絵具 40 種の分析用サンプルを調製し、市販の分析システムを用いて反射スペクトルを測定した。

分析用標準サンプルとして、ホルベイン製の油絵具ヴェルネを用いた。通常市販されている油絵具は、色味調整のために複数種の顔料や添加剤が含まれる。本研究にそのような油絵具を用いると、複数種の顔料や添加物が測定データに悪影響を与えるため、本システムの分析性能を適切に評価できない。そのため、本研究では、単一顔料で調製されたホルベイン製油絵具ヴェルネを用いることにした。まずは、ヴェルネ全 40 種類のチューブに記載された Pigment Number から CAS 番号を調べ、ヴェルネに含まれる顔料成分を把握した。続いて、そのヴェルネをスライドガラスに塗布してサンプルを調製した。スライドガラスは TOSINRIKO CO. LTD. 製の一つ穴スライドガラス（主成分：ソーダガラス）を使用した。そのスライドガラスの中心にある円形の凹みにヴェルネを塗布し 2 週間乾燥させた後、分析に供した。

反射スペクトルを測定することによって、色材の色相（極大反射波長）、明度（反射率の高低）、彩度（反射率の高低差）を知ることができる。その分析情報は、色材の種類、粒子径、劣化具合の解析に役立つ。反射スペクトルのピーク波長やスペクトルの立ち上がる波長から色材の色相を客観的に把握できる。400~500 nm 付近に反射スペクトルのピークがあれば青色、550 nm 付近にピークがあれば緑色、反射スペクトルが 500 nm 辺りから立ち上がれば黄色、550 nm 辺りから立ち上がれば橙色、600nm 辺りから立ち上がれば赤色とわかる。そして、反射スペクトル全体の反射率の高低から明度がわかり、その反射率が高ければ明度が高く、低ければ明度が低い。また、反射スペクトルの山と谷の反射率の差が大きけ

れば彩度は高く、小さければ彩度は低いことがわかる。そのような反射スペクトルを測定できる市販の分析システムを用いて、前述の通り調製したホルベイン製油絵具ヴェルネ 40 種を分析した。その分析には、市販の Ocean Optics 製 (USA) 反射スペクトル分析システムを使用した。380~950 nm の可視~近赤外領域の光をサンプルに照射し、各波長の反射率を測定した。Ocean Optics 製 (USA) の LS-1 型タンダステン・ハロゲン光源、USB2000-VIS-NIR マルチチャンネル型分光器、R400-7-VIS-NIR 二分岐型光ファイバー、RPH-1 型遮光ホルダーから本システムは構成される。WS-1 型波長校正用標準白色板を反射率 100% の白色校正に用い、反射スペクトルの解析には 00IBase32 を使用した。また、油絵具は光沢があるため、白色校正の反射率を 70% 程度に合わせサンプルを分析した。

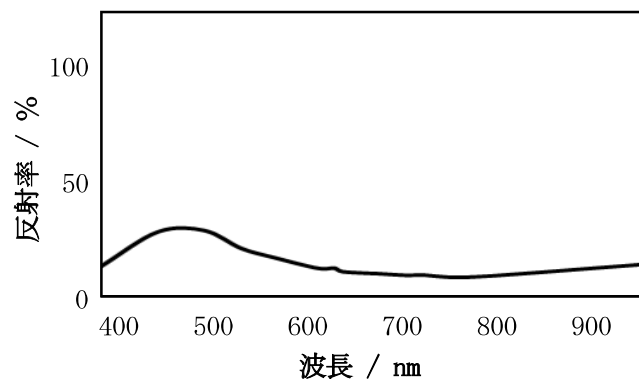
分析したヴェルネ 40 種のうち、紙面の関係上、油彩画に使用される代表的な油絵具 21 種の反射スペクトルを図 2 に示す。それらの油絵具のうち、目視により明度と彩度が低いと認められたサンプルに関しては、反射スペクトルは全波長域において低く、反射スペクトルの山と谷の高低差が小さかった。一方、色相の違いは反射スペクトルから明瞭に読み取れ、青色の油絵具では 400~500 nm に反射スペクトルのピークがあり、緑色の油絵具は 550 nm 付近にピークがあった。黄色の油絵具では 500 nm 付近、橙色は 550 nm 付近、赤色では 600 nm 辺りから反射スペク

トルが立ち上がる傾向が認められた。そして、茶色は、明度の暗い橙色のため橙色と同様に 550 nm 辺りから反射スペクトルの立ち上がり、橙色よりも反射スペクトル全体 (可視~近赤外線領域の反射スペクトル) は低かった。紫色は、青色と赤色の色味をもつため青色の油絵具と同じように 400~500 nm に反射スペクトルのピークがあり、赤色の油絵具と同様に 600 nm 付近から反射スペクトルが立ち上がった。そして、白色の油絵具では、反射スペクトルは測定した全波長域において高い。ただし、紫外線を吸収しやすい酸化チタンを主成分とする油絵具のチタニウムホワイトは、400 nm 以下の光の反射率は 400 nm 以上の光の反射率に比べて低くなることが確認できた。また、黒色の油絵具では、全波長域の光をよく吸収するため反射スペクトルは全体的に低くなる傾向が見られた。

3. おわりに

本研究は、顔料や染料などの色材の反射スペクトルを簡易に分析するためのシステム (簡易反射スペクトル分析システム) の開発に成功し、更に詳細に検討する必要があるものの、開発した分析システムは予想通りの分析性能を有していることがわかった。次年度には、油絵具、日本画絵具、染料等の色材の反射スペクトルを測定し、分析性能を比較評価して、システムの問題点を解決し実用化を図る必要がある。

本研究のシステム



市販のシステム

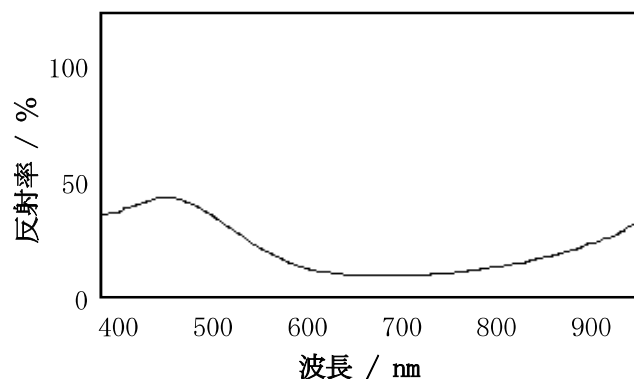
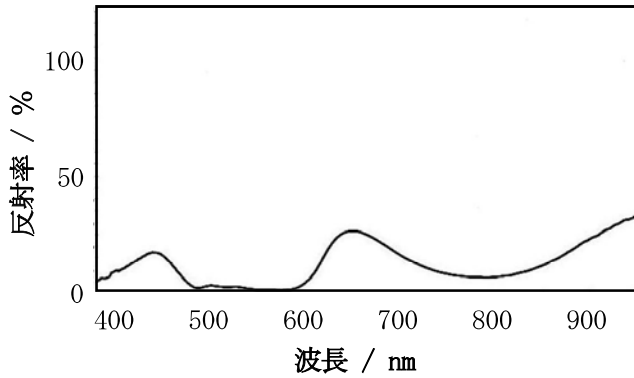
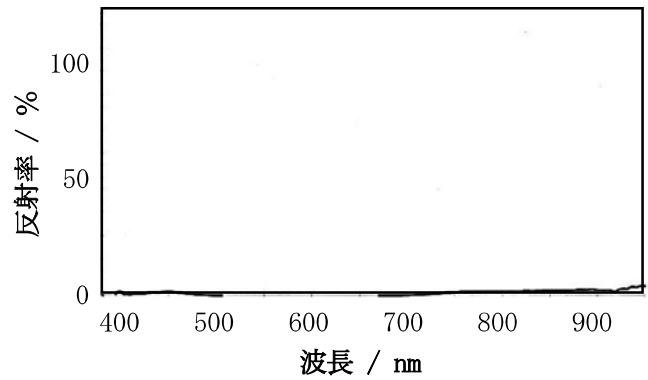


図 1 本研究のシステムと市販のシステムにより測定したベロ藍の可視~近赤外反射スペクトル

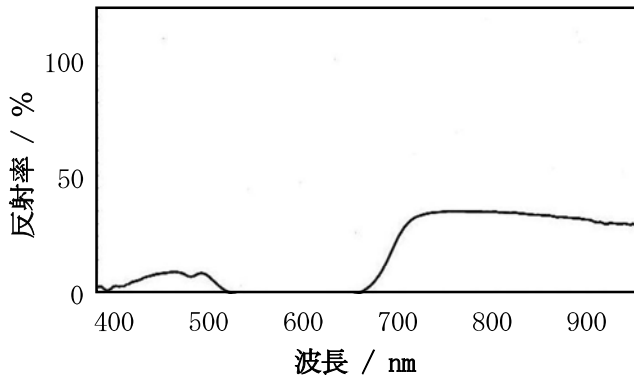
コバルトバイオレット (紫色)



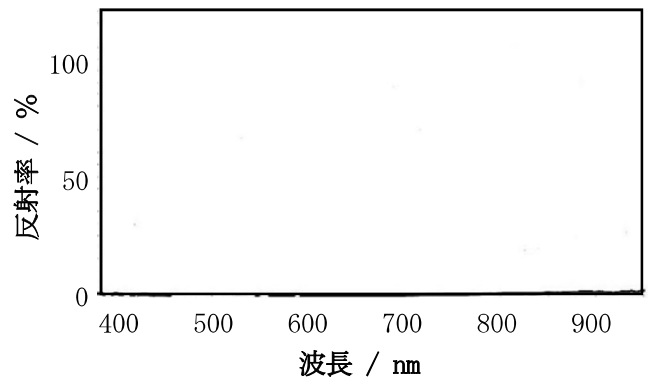
ウルトラマリンブルー (青色)



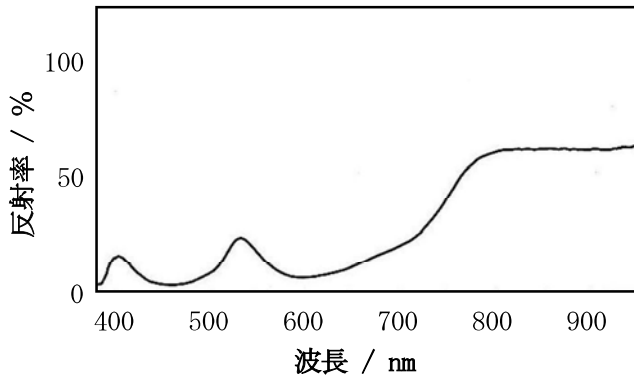
コバルトブルー (青色)



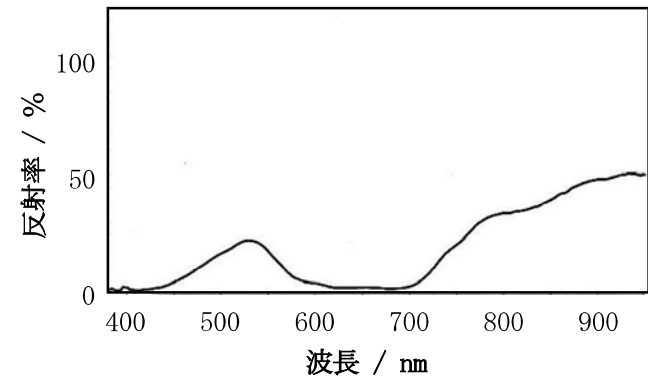
プルシャンブルー (青色)



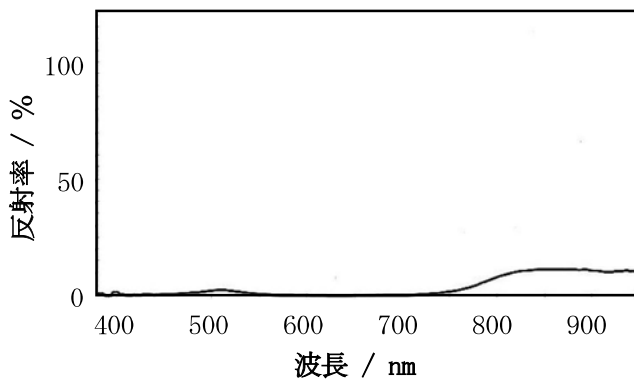
オキサイドオブクロミウム (緑色)



コバルトグリーン (緑色)



ビリジアン (緑色)



イエローオーカー (黄色)

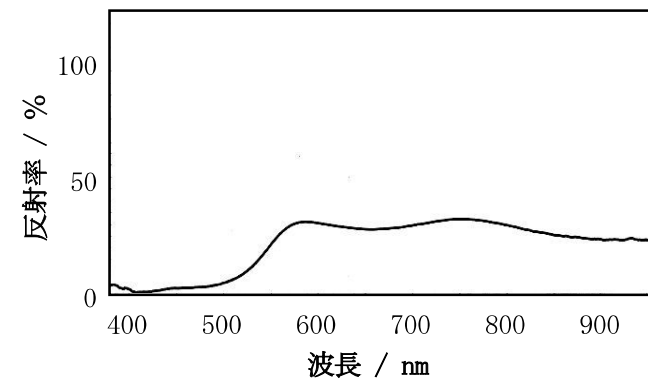
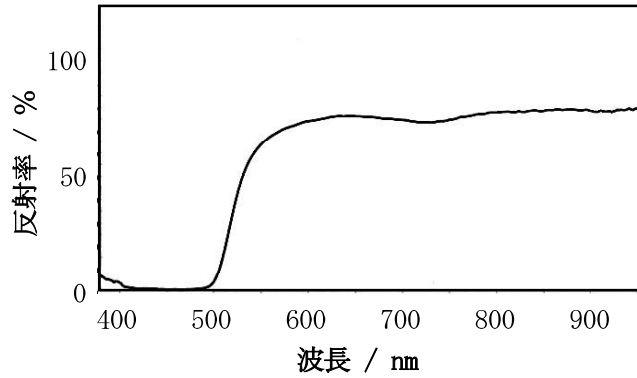
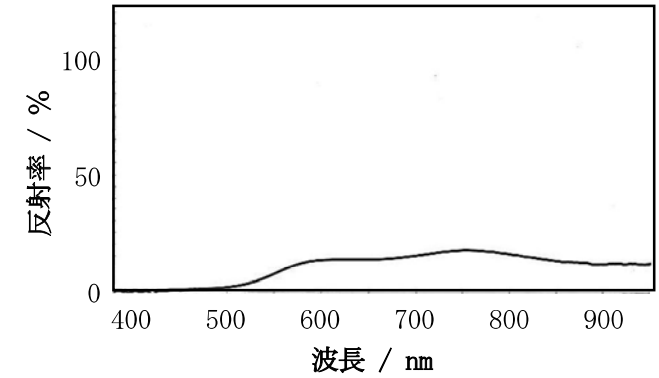


図2 油絵具の可視-近赤外反射スペクトル (次頁へ続く)

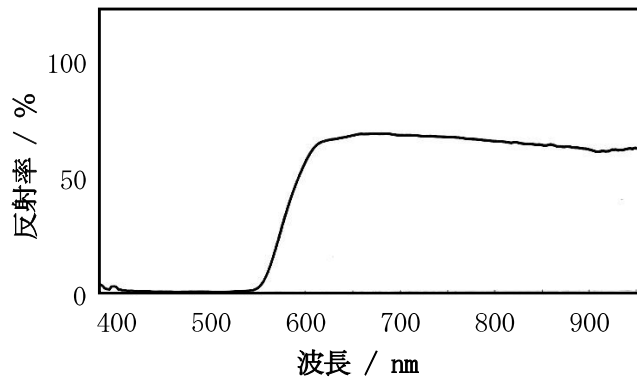
カドミウムイエロー (黄色)



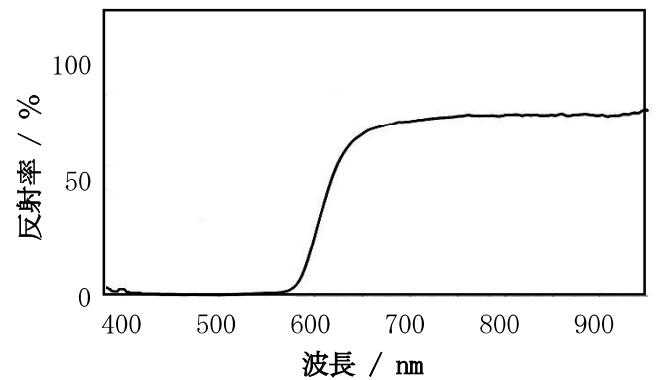
ローシェンナ (黄色)



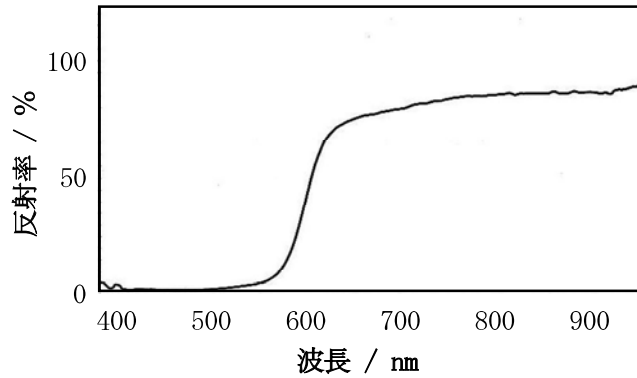
ピロールオレンジ (橙色)



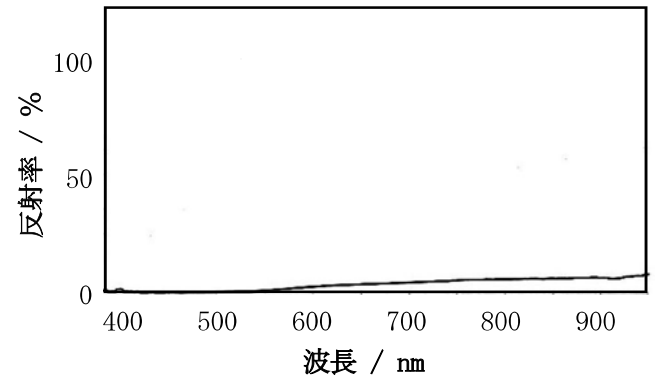
カドミウムレッド (赤色)



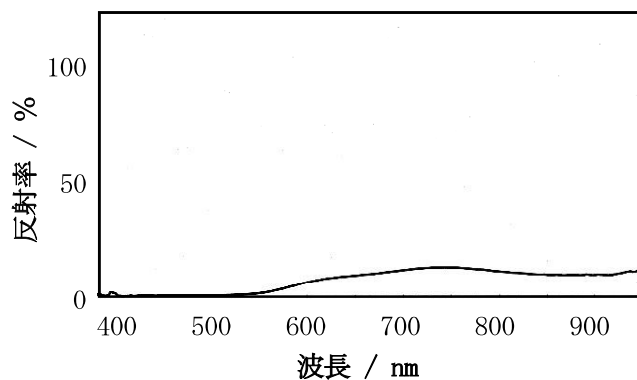
バーミリオン (赤色)



バーントアンバー (茶色)



バーントシェンナ (茶色)



ローアンバー (茶色)

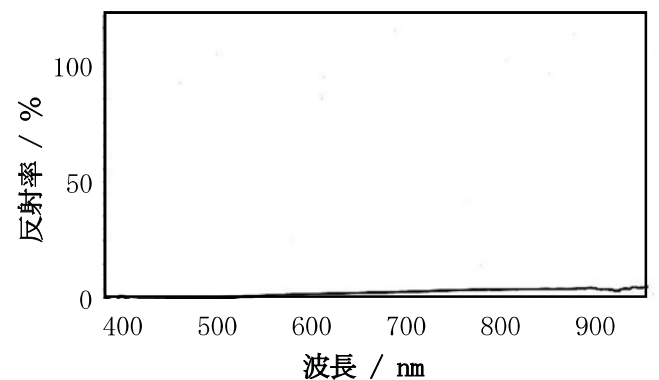
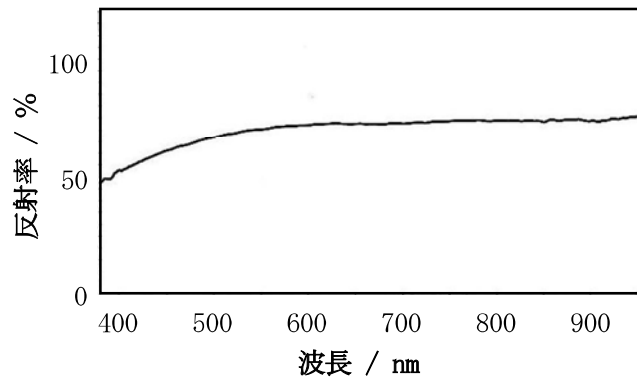
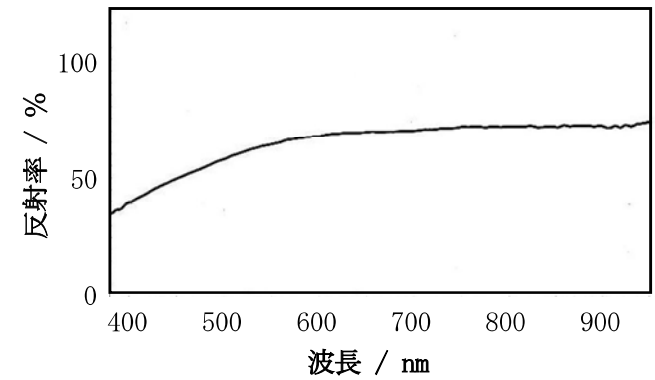


図2 油絵具の可視-近赤外反射スペクトル (次頁へ続く)

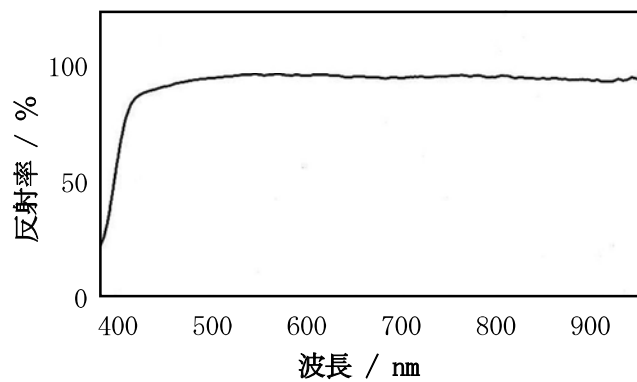
シルバーホワイト (白色)



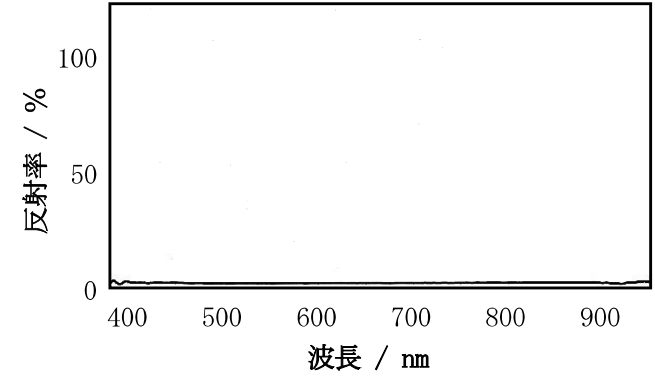
シルバーホワイト (白色)



チタニウムホワイト (白色)



アイボリブラック (黒色)



ランプブラック (黒色)

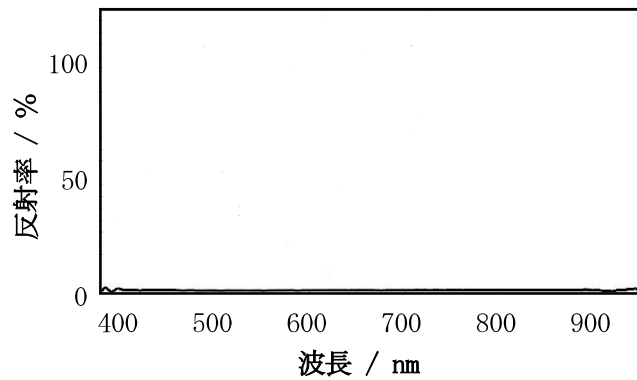


図2 油絵具の可視-近赤外反射スペクトル

不妊症の主要原因である卵胞成熟不全におけるヒマワリ種子成分の活用

(前 くらしき作陽大学)

福元 隆浩

(概要)

不妊症は今後の更なる高齢出産傾向において、社会が解決すべき問題である。不妊症の発症は多くの原因が考えられるが、本研究課題は、卵胞の成熟異常に注目し、特にセロトニンを指標に検討する。我々は現在までに、卵胞の成熟には脳内のセロトニンだけでなく卵巣／子宮内のセロトニンの役割が極めて重要である事を示して来た。他方、周辺顆粒球細胞と卵胞がギャップジャンクションを介してセロトニンの授受を行う事が知られているが、その他に卵胞特異的な細胞接着分子を新規に我々は同定している。本研究期間は、現在までのセロトニンによる卵胞成熟機構における新規細胞接着分子の役割を検討し、卵胞成熟過程のさらなる理解と同時に不妊症の治療を最終目標とした新しい卵胞発育調整法の構築を将来的に目指す。本年度はまず、ヒマワリ由来の天然セロトニンを抽出し、これによる食育での不育症の改善を検討する。

(本文)

最近の生殖補助医療技術の進歩は著しく、胚細胞に大きな遺伝的欠陥がない限りは、成熟卵子と精子細胞が得られれば、ほぼ **100%** 近い確率で受精卵を成立できる。また胚盤胞移植技術の進歩は単一胚子宮内移植の着床率が **50%** を越えるようになり、不妊症治療の大きな壁であった着床問題もかなり改善されるまでになってきた。未熟卵子の体外成熟培養法の発展や、円形精子の選別と顕微受精法の臨床応用は、やや未熟な卵細胞や精子細胞があれば、体外受精胚移植法により臨床的妊娠をさせる事が可能になってきている。胚細胞の凍結解凍技術も、ほぼ **100%** 近い解凍後生存率が得られるまでに確立されてきた。このような不妊治療技術の画期的進歩の中で、残されつつ有る不妊症治療における最大難問の一つが、POOR RESPONDER や高度 PCOS 患者にみられるような重症排卵障害の治療方法の未確立である。これまでは治療医師の経験と知識から試行錯誤で排卵誘発が行われてきた。重症排卵障害の治療方法が未確立である原因は、原始卵胞から発育卵胞におよぶ初期から中期のヒト卵胞発育の制御法が殆ど発見されておらず、臨床応用できるには至っていないことである。この解決策としては、卵胞成熟過程を今まで以上に正確に理解する事が唯一無二であり、本研究は卵胞成熟とセロトニンとの関係に焦点を絞り研究を行う。

本申請研究では、我々がこれまでに行ってきた異種動物の卵胞発育過程におけるセロトニンの生理学的研究をさらに発展させ、ヒト女性不妊症の卵胞発育障害の診断と治療への応用を目指した研究を行う。具体的には、マウス卵胞で成果を具体化させ、使用可能なヒト組織での最終応用および臨床検査への転用可能かを検討する。一方で、我々は **TOPOISOMERASE I 阻害性抗癌剤 CPT-11** を投与された若年女性が、短期間で卵巣機能不全に陥る事、

セロトニン添加により人工卵胞消失が著しく減少する事を確認している。他方で、ヒト PCOS の発症機序解明のため、PCOS 疾患モデルマウスの作成に成功しており、この疾患モデルマウスを用いた病態生理の詳細を検討する。つまり、本申請研究では、正常卵胞発育過程に重要な役割を担っているセロトニンを指標として、ヒト組織および PCOS モデルマウスを用いて、卵胞成熟機構の包括的理解を目指す事を目的としている。

<セロトニン>

セロトニン (5-HT) は神経伝達物質として知られる小分子であり、総合失調症等の精神疾患作用因子としての機能がよく研究されている。歴史的には Page 博士らによって 1948 年に高血圧作用因子として同定され、前立腺癌、卵巣癌、肝臓癌をはじめとする各種腫瘍形成作用因子さらには生物の初期発生および形態形成にも深く関与している事が示されている。5-HT は、必須アミノ酸であるトリプトファンからセロトニン前駆体 (5-HTP) を経て生合成される。2 段階の生合成は、特異的な酵素 (TPH および DDC) により各々調整される。一方、5-HT はミトコンドリア外膜に局在するモノアミンオキシダーゼ (MAO) により不活性化され、代謝産物へと分解される (図 1)。生合成された 5-HT は、トランスポーター (VMAT 及び SERT) を介して組織へ取り込まれる。

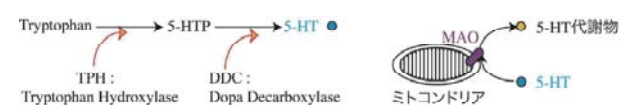
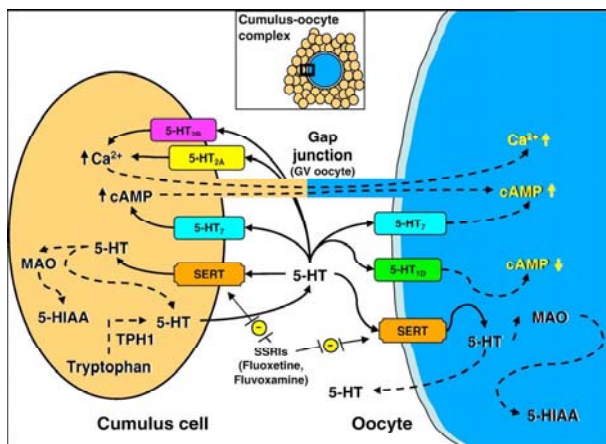


図 1: セロトニンの生合成と代謝機構

また、5-HT には特異的受容体が大きく分けると7種類明らかにされ、各受容体の機能が検討されている。卵胞成熟に関しては、特にフランスに於いて卵胞成熟とセロトニンの関係に関する研究が盛んであり、最近では我々の共同研究者より総説が発表された(DUTE, F AND AMIREAULT, P, 2007: 下図参照)。



今期の研究業績

卵胞の成熟機構は生命現象の根幹である事は疑い用が無く。種々の研究が進んでいる。本研究課題では、セロトニンとセロトニン合成関連分子がどのような作用機序で卵胞成熟を制御しているかのを解明する事を目的とした。実験材料は、岡山県下の農業従事者から各種植物提供受け、マウス、ラット等の卵胞を使用して行った。現在までに卵胞の成熟は脳内からの刺激ならびに分泌ホルモンにより調節されていると考えられていた。本研究では、研究環境が極めて貧弱であり、想像以上に一切の設備も無い大学での研究開始であったので、共同研究先（東京大学先端科学研究所、京都大学薬学部、神戸大学医学部）での測定から開始した。まずは、卵胞成熟期間に置けるセロトニンの局在様式を免疫染色で検討した。再現実験の後、提供を受けた植物から抽出したセロトニン含有溶液を実験動物に添加して、生体内セロトニンおよびセロトニン関連物質と植物由来セロトニンが類似の挙動を示す事を確認した。結果、研究計画通り、類似の挙動結果を得たので、排卵直前までの期間における局在変更を同類の方法ならびに HPLC による量的挙動も併せて確認した。また、我々が世界ではじめて作製に成功した多嚢胞性卵巣症の表現を示すモデルマウスでも検討した。結果、正常と疾患モデルでのセロトニンおよびセロトニン関連分子の挙動変化には顕著な差が認められた。故に、本研究結果を、現在投稿準備中であり、更なる追加実験を加えて投稿する。

一連の研究経過に於いて、他大学より教授就任のオファーを頂き、現在、その手続き中である。貴財団には、教育研究環境および事務作業が極めて未熟な小生所属場所から助成申請にあったにも関わらず、研究内容での選定ならびに多大なるご支援には大変感謝しております。ここに改めて感謝の記載をさせていただきます。