

平成 28 年度研究費助成 研究成果報告書集

研究成果報告書 目次

■ 難治性がんの効果的治療を目指した革新的薬物送達技術の構築 岡山大学 大学院 医歯薬学総合研究科 准教授 大河原 賢一	1
■ メカニカルストレスを利用した心筋細胞のストレス応答機能獲得のしくみ 岡山大学 大学院 医歯薬学総合研究科 助教 片野坂 友紀	6
■ 舌癌に対する Treg 抑制療法の検討 岡山大学 大学病院・耳鼻咽喉科 講師 折田 頼尚	9
■ モリブデンの特徴を活かした炭素－水素結合直接変換反応の開発 岡山大学 大学院 自然科学研究科 助教 浅子 壮美	11
■ CD44 を標的するリポソームの開発 岡山大学 大学院 自然科学研究科 講師 笠井 智成	14
■ 旭川祇園地区における礫河原再生事業が河川の物理環境に与える経年的な影響の検討 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 赤穂 良輔	17
■ 旭川感潮域のケレップ水制域における塩水流動の現地観測および数値解析 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 赤穂 良輔	23
■ 児島湖人工干潟における植生遷移並びに生物多様性を展開するメカニズムの解析 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 中嶋 佳貴	40
■ ウシ卵管の律動的自発収縮を制御するペースメーカー細胞の探索 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 山本 ゆき	46
■ 非モデル珪藻種の比較解析に基づくバイオシリカナノパターン形成機構の解明 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 根本 理子	51
■ アブシジン酸誘導気孔閉口に関与するカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 CPK の機能解析 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 宗正 晋太郎	55
■ 二次曲面とそのクリストッフエル変換の研究 岡山大学 大学院 自然科学研究科 准教授 藤森 祥一	57
■ ゲノム編集技術および透明化技術を用いた 1 細胞レベルでのエピジェネティック修飾の解析 岡山大学 資源植物科学研究所 准教授 長岐 清孝	60
■ 非アルコール性脂肪性肝炎におけるアラキドン酸代謝酵素の役割解明 岡山県立大学 保健福祉学部 准教授 川上 祐生	66
■ Acyl-CoA Synthetase Short-chain family member 3 の機能解析 岡山県立大学 保健福祉学部 助教 吉村 征浩	70
■ 他の組織で収集された情報を用いたソフトウェア不具合発見手法の性能評価法の確立と性能改善手法の開発 岡山県立大学 情報工学部 助教 天寄 聡介	75
■ ステートマシン図を用いた Web アプリケーションの自動テスト環境の開発 岡山県立大学 情報工学部 准教授 横川 智教	81
■ SiC ナノウィスカの内部生成による C/C 複合材料の機械的特性向上 岡山県立大学 情報工学部 助教 小武内 清貴	87

■ 地域在住高齢者の自主的な介護予防、健康づくり活動を促進する支援プログラムの開発 岡山県立大学 情報工学部 教授 高戸 仁郎	 91
■ 高強度・高リサイクル性マグネシウム合金の開発 岡山県立大学 情報工学部 准教授 福田 忠生	 97
■ わが国との比較的視点で捉える台湾における武徳殿建設の経緯についての分析研究 岡山県立大学 デザイン学部 准教授 西川 博美	100
■ 協同研究「現代日本陶芸のデザインと技法」 岡山県立大学 デザイン学部 教授 久保田 厚子	106
■ 総社商店街通りの空き家と空き地の利活用のための住民参加を促す手法に関する研究 岡山県立大学 デザイン学部 教授 福濱 嘉宏	112
■ 電子分極で駆動する有機強誘電体研究のための反射型旋光分光顕微鏡開発 岡山理科大学 理学部 准教授 山本 薫	116
■ RNA による DNA トポイソメラーゼ II α 制御機構の解析 岡山理科大学 理学部 講師 河野 真二	120
■ 微量の水を用いた高分子/疎水性イオン液体の相挙動の制御と機構解明 岡山理科大学 理学部 講師 大坂 昇	122
■ 細胞内エネルギー代謝シフトを利用した iPS 由来肝細胞成熟化の検討 岡山理科大学 工学部 准教授 神吉 けい太	124
■ MMS で取得した大規模全球画像群による高精度な空間検索 岡山理科大学 工学部 講師 太田 寛志	126
■ 人のバイタル・モニタリングによる寒冷ストレス評価ー冷たい局地風「肱川あらし」の事例ー 岡山理科大学 生物地球学部 准教授 大橋 唯太	130
■ 体力が低い中学生・高校生の生活習慣と生活の質 (Quality of Life) を解明する基礎的研究 岡山理科大学 教育学部 講師 笹山 健作	136
■ 複数の振動フィンを組み合わせた二次元推力偏向機構に関する実験的研究 津山工業高等専門学校 総合理工学科 准教授 細谷 和範	141
■ ICT を活用した有害野生獣の捕獲システムの開発 津山工業高等専門学校 総合理工学科 特任教授 鳥家 秀昭	147
■ 青枯病菌エフェクターを利用したトウガラシ育種技術の開発 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所 流動研究員 中野 真人	151
■ 細胞内グルタチオン上昇活性に着目した酒粕加水分解物の肝障害抑制作用とそのメカニズムの解明 就実大学 薬学部 助教 川上 賀代子	154
■ ヒトシトクロム P540 分子種の基質特異性の予測 就実大学 薬学部 教授 丹羽 俊朗	158
■ 含ケイ素小員環化合物の合成とその反応性の解明 倉敷芸術科学大学 生命科学部 教授 仲 章伸	163
■ がん細胞の K ⁺ チャネル過剰発現を利用したクモ毒ペプチド発現ウイルスベクターの選択的抗がん作用 倉敷芸術科学大学 生命科学部 教授 岡田 誠剛	167
■ ヒト姿勢制御におけるフィードフォワード制御の役割に関する研究 倉敷芸術科学大学 生命科学部 准教授 枝松 千尋	170
■ DKK3 遺伝子をターゲットとした頭頸部扁平上皮癌制御 川崎医科大学 分子生物学 助教 片瀬 直樹	175

■ 加齢と腸内細菌叢の関係性から運動の老化予防効果を再検討する 川崎医療福祉大学 医療技術学部 教授 矢野 博己	181
■ 複数のカメラを用いた超高信頼防犯システムの開発 川崎医療福祉大学 医療技術学部 講師 近藤 真史	186
■ 障害児の生涯健康記録の開発にむけた課題の検討～母子健康手帳の活用状況に焦点をあてた調査研究～ 川崎医療福祉大学 医療福祉マネジメント学部 助教 三田 岳彦	192
■ 母胎の免疫機能活性化が胎児の脳形成に与える影響の解析 川崎医療短期大学 医療技術学部 講師 上野 浩司	194
■ 保育士の早期離職予防のための「保護者-保育士間コミュニケーション自己分析尺度」の開発 山陽学園大学 総合人間学部 准教授 上地 玲子	200

海外渡航報告書 目次

■ 岡山大学 大学院 自然科学研究科	准教授	後藤 佑介	206
■ 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科	准教授	高橋 一男	208
■ 岡山大学 理学部	教授	鈴木 孝義	210
■ 岡山理科大学 理学部	講師	橋川 直也	212
■ 岡山理科大学 理学部	教授	森 嘉久	214
■ 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所	専門研究員	畑中 唯史	215
■ 川崎医療短期大学 放射線技術科	准教授	矢納 陽	216

難治性がんの効果的治療を目指した革新的薬物送達技術の構築

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）

大河原 賢一

光増感剤含有ナノ粒子投与後に、固形がん選択的な光照射により血管内で局所的に発生する一重項酸素などの活性酸素種により、難治性がん組織内血管の低い透過性を一時的に亢進させ、その後に別途投与する抗がん剤等含有ナノ粒子製剤の腫瘍組織集積性を改善し、高い抗腫瘍効果を達成する「光誘発型の腫瘍組織選択的な血管透過性亢進技術」の構築を目指し、種々検討を加えた結果、腫瘍組織内の血管透過性が低い固形がんに対して、上記光誘発型の処置を施すと、ペリサイトに覆われた構造的に安定な血管が減少し、腫瘍内の血管透過性が亢進することで、その後に投与する抗がん剤内封リポソーム製剤の腫瘍組織移行量が増大した結果、その抗腫瘍効果が増強されたことを示唆する極めて興味深い結果を得た。

はじめに

ナノ粒子製剤の利用に代表される、がんを標的とした薬物送達は、少ない投与量で安全且つ効率的ながん化学療法を可能にする有望なアプローチとして期待されている。一方、光線力学的治療（photodynamic therapy, PDT）は、光増感剤の静脈内投与と、外部からの光照射によって局所的に発生させた一重項酸素等の活性酸素種により、がん細胞を壊死させる低侵襲性のがん治療法であり、薬物送達技術と組み合わせることで、治療効果の増大と副作用の抑制が期待されている。しかし、これまでに確立された、腫瘍への薬物送達技術の多くは、腫瘍組織に存在する未成熟な血管（新生血管）の構造・機能を利用するものであり¹⁾、血管分布性・透過性の高い腫瘍に対しては効率的な薬物送達が可能になるものの、膵臓がんなどの血管分布性・透過性に乏しい、所謂、「難治性がん」に対する適用は困難であるという問題を抱えている。

PDTは、光増感剤の静脈内投与と、外部からの腫瘍組織選択的な光照射によって局所的に発生させた一重項酸素等の活性酸素種により、その近傍に存在する細胞を壊死させる低侵襲性のがん治療法である。しかし、PDTによる通常のがん治療においては、光増感剤を溶液として投与することが一般的であるため、光増感剤は血液中から非常に速やかに消失し、その腫瘍組織への移行が極めて乏しいことが知られ

ている²⁾。さらに正常組織、特に皮膚に移行した光増感剤は、光線過敏症という同治療法最大の副作用を引き起こすことが知られており、患者のQOL低下の一因となっている。このように、これまでのような光増感剤の溶液投与によるPDTは、安全性の面で問題であるだけでなく、光増感剤の腫瘍への送達が乏しく、効果も不十分なものとなるため実用的ではない。したがって、光増感剤の腫瘍組織への送達効率を含めたその体内動態の改善は、作用の組織選択性の改善のみならず、正常組織における副作用の低減にもつながるため、同治療法の有用性を格段に向上可能であると考えられる。大河原らはこれまでに、光増感剤の血中での高い保持能、および腫瘍への効率的な送達を実現可能にするPDT用光増感剤内封ナノ粒子製剤の開発に成功している³⁾。しかしながら、本ナノ粒子製剤も上述した他のナノ粒子製剤と同様に、血管分布性・透過性の高い腫瘍においては非常に優れた抗腫瘍効果を発揮する一方で、難治性がんに対する適用は困難であるという問題を抱えていた。

従来、PDTによる抗腫瘍効果は、がん細胞に対する直接的な作用によるものと認識されており、これまでの光増感剤の研究開発も、がん細胞に対する殺傷能力を指標に進められてきた。しかし一方で、腫瘍組織局所で発生した活性酸素種は、がん細胞のみならず腫瘍組織内の血管内皮細胞に対しても殺細胞

効果を発揮しており、腫瘍の増殖に不可欠なプロセスである血管新生が阻害され、それにより腫瘍増殖が抑制されていることが示唆されている。そこで我々は、PDTにおける標的細胞として腫瘍組織内血管内皮細胞に着目した。すなわち、光照射により腫瘍組織局所で発生する活性酸素種の局所濃度を適切に制御することにより、腫瘍組織における血管透過性を局所的且つ一時的に亢進させ、その後に別途投与する抗がん剤の腫瘍送達を向上させることが可能ではないかと考えた。

そこで本研究では、光増感剤含有ナノ粒子投与後に、固形がん選択的な光照射により血管内で局所的に発生する一重項酸素などの活性酸素種により、難治性がん組織内血管の低い透過性を一時的に亢進させ、その後に別途投与する抗がん剤等含有ナノ粒子製剤の腫瘍組織集積性を改善し、高い抗腫瘍効果を達成する「光誘発型の腫瘍組織選択的な血管透過性亢進技術 (photo-triggered tumor vascular treatment, PVT)」の構築ならびにその治療へ応用を目指した。

材料と方法

1. PppIX-DME 内封ポリマーナノ粒子製剤 (PN-Por) の調製

光増感剤として、脂溶性のポルフィリン誘導体である Photoporphyrin IX dimethyl ester (PppIX-DME) を用いた。ポリマーナノ粒子調製にはブロック共重合体 PLA-PEG を用い⁴⁾、PppIX-DME を共に溶解させた酢酸エチルに精製水を添加し、プローブ型ソニケーター (大岳製作所) による超音波処理 (50 W, 室温, 5 min) を行い、まずは O/W 型エマルジョンを得た。このエマルジョンに対し 10 倍量の精製水を用いて希釈・攪拌を行い、PppIX-DME 内封ポリマーナノ粒子製剤 (PN-Por) を調製した。またトレーサー標識した粒子 ($[^3\text{H}]$ 標識 PN) を調製する場合には、PppIX-DME の代わりに少量の $[^3\text{H}]$ -Cholesterol 誘導体を酢酸エチルに溶解させ、同様の方法で調製した。

2. 光照射装置

ポルフィリン誘導体の活性化に用いる光照射装置として、ハロゲン光源 (MHAB-150W, MORITEX) に 600 nm 以下の波長をカットするフィルターを適用して用いた。

3. PVT 処理を施した固形がんモデルマウスにおけるリポソーム製剤の腫瘍組織移行量の評価

トレーサーとして $[^3\text{H}]$ -Cholesterol 誘導体を組み込んだリポソームを用いて評価を行った。作製した固形がんモデルマウス腫瘍の体積が約 400 mm³ に達した時点で PVT 処置を施し、直後に放射標識したリポソームを投与した。一定時間の後に摘出した腫瘍は生理食塩水中で洗浄し、全重量を測定後、全量をサンプルとし、Solvable®を 1 mL 加えて 50°C で 2 時間インキュベートすることにより臓器を溶解させた。その後、2 N HCl を加えて中和した後、Clear-sol II (Nacalai Tesque 社) を 10 mL 加え、液体シンチレーションカウンタにより $[^3\text{H}]$ -Cholesterol 誘導体由来の放射活性からリポソームの腫瘍組織移行量を評価した。

4. 固形がんモデルマウスにおける in vivo 抗腫瘍効果の評価

固形がんモデルマウスを作製し、腫瘍組織の体積が約 100 mm³ に達した時点で各種製剤を投与し、その後の腫瘍体積を継続的に測定した。また腫瘍体積は、以下の式に従って算出した⁵⁾。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 \times 0.52$$

5. 腫瘍組織の凍結切片の作製

作製した固形がんモデルマウスの腫瘍組織の体積が一定の大きさに達した時点で腫瘍組織を摘出した。摘出した腫瘍組織は生理食塩水中で洗浄した後、O.C.T. compound (サクラ精機株式会社) を用いて凍結包埋し、クリオスタット (CM1850, Leica Microsystems 社) により 10 μm の厚さに薄切して、スライドガラス (松浪硝子工業株式会社) に付着させ、冷アセトン固定を行った。作製した凍結切片サンプルは、-20°C で保存した。

6. 蛍光免疫染色 (DiI-PL & 血管内皮細胞マーカー分子 (CD31))

調製した蛍光標識リポソーム (DiI-PL) を固形がんモデルマウスに静脈内投与した後、凍結切片を作製した。-20℃ で保存していた凍結切片を室温に戻した後、DAKO ペン (Dako Cytomation 社) で腫瘍組織を囲んでから PBS で洗浄し、blocking PBS (5% FBS) で 15 分間処理した。洗浄後、1 次抗体としてラット抗マウス PECAM-1 抗体 (BD Biosciences 社) を添加し、45 分間処理した。再び洗浄した後、2 次抗体として Fluorescein 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Life Technologies 社) を添加し、60 分間処理した。

7. 蛍光二重免疫染色 (血管内皮細胞マーカー分子 (CD31) & 壁細胞マーカー分子 (α SMA))

壁細胞 (α SMA) の免疫染色は VECTOR M.O.M. Immunodetection Kit (Vector Laboratories 社) を使用して行った。作製した凍結切片を -20℃ から室温に戻し、DAKO ペンで腫瘍組織を囲み、PBS で洗浄した後、blocking PBS (5% FBS) で 15 分間処理した。洗浄後、1 次抗体としてラット抗マウス PECAM-1 (CD31) 抗体を添加し、45 分間処理した。洗浄した後、2 次抗体として RITC 標識ウサギ抗ラット IgG 抗体 (MP Biomedicals 社) で、60 分間湿潤箱中で処理した。再び洗浄した後、M.O.M. Mouse Ig Blocking Regent を添加し、60 分間処理した。洗浄した後、M.O.M. Protein Concentrate により 5 分間処理し、1 次抗体として α SMA マウスモノクローナル抗体 (Thermo Fisher Scientific 社) を添加し、30 分間処理した。洗浄後、M.O.M. Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent を添加し、10 分間処理した。再度洗浄した後、Fluorescein Avidin DCS を添加し、5 分間処理した。

結果と考察

1. PVT 直後に投与した PTX 内封 PEG リポソーム製剤 (PL-PTX) の抗腫瘍効果の評価

血管透過性が低いことが知られている、マウスメ

ラノーマ細胞 B16/BL6 (B16) を用いて作製した固形がんモデルマウス (B16 モデルマウス) に対して PVT を施した直後に、すでに我々がその開発に成功している、優れた血中滞留性を示すパクリタキセル内封リポソーム製剤 (PL-PTX) ⁶⁾ を静脈内投与し、その抗腫瘍効果を評価した (図 1)。その結果、PVT 単独、又は、PL-PTX 単独処置群では腫瘍増殖抑制効果が認められなかったのに対して、PVT 後に PL-PTX を投与した併用群において、有意に腫瘍増殖が抑制されることが明らかとなった。

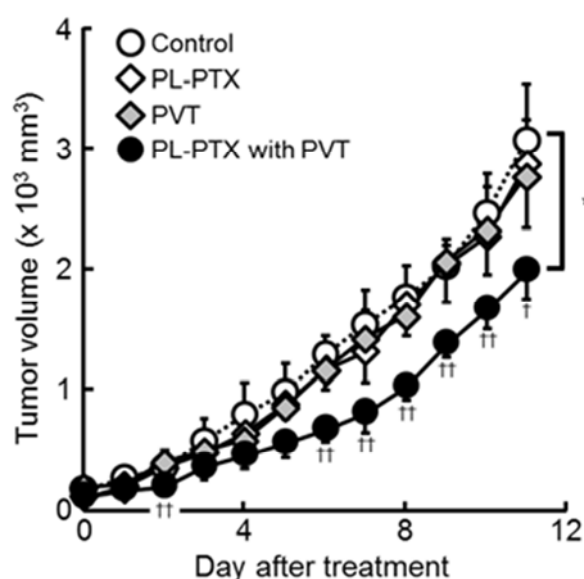


図1 PVT 前処置の有無による B16 固形がんモデルマウスにおける抗腫瘍効果の比較

○コントロール群, ◇PTX 内封リポソーム製剤単独処置群, ◆PVT 単独処置群, ●PVT 処置の後に PTX 内封リポソーム製剤を投与した群 * $p < 0.05$ (比較対象, コントロール群), † $p < 0.01$; † $p < 0.05$ (比較対象, PVT 単独処置群)

2. PVT を施した B16 モデルマウスにおける PEG リポソームの腫瘍組織移行量の評価

PVT を施した直後の B16 モデルマウスに、^[3H]-CHE 標識した PEG リポソームを静脈内投与し、その 24 時間後における腫瘍組織への PEG リポ

ソーム移行量を、液体シンチレーションカウンタにより測定した。その結果、B16 腫瘍への PEG リポソーム移行量は、PVT を施すことにより有意に増大することが明らかとなった ($p < 0.05$)。

3. PVT 後に投与した PEG リポソームの B16 腫瘍組織内分布挙動の評価

PVT を施した直後に DiI で蛍光標識した PEG リポソーム (DiI-PL) を投与し、その 15 分後に摘出した B16 腫瘍を蛍光顕微鏡により観察した。尚、観察の際に PEG リポソームが血管内と血管外のどちらに存在するかを判別可能とする為、血管内皮細胞のマーカー分子である CD31 に対する免疫染色を併せて施した。観察画像に基づき、血管外に漏出した PEG リポソームの分布面積を定量した結果、PVT 後に投与した方が、無処置で投与した場合よりも有意に広いことが明らかとなり ($p < 0.001$)、PVT によって腫瘍内の血管透過性が亢進されたことが示唆された。

4. PVT を施した B16 腫瘍内血管の構造評価

PVT を施した 15 分後に摘出した B16 腫瘍に対して、ペリサイトのマーカー分子である α SMA と血管内皮細胞 (CD31) の二重免疫染色を施した後、蛍光顕微鏡による観察画像全てを定量的に解析し、血管内皮細胞の総面積 (図 2A)、血管壁細胞の総面積 (図 2B)、壁細胞被覆を伴った血管の面積 (図 2C)、及び、血管内皮細胞の総面積に対する壁細胞に覆われた血管の面積の割合 (CD31 and α SMA-double positive area / CD31-positive area) (図 2D) を算出した。その結果、PVT を施しても、血管内皮細胞 (図 2A)、又は、ペリサイトが検出された総面積 (図 2B) にはほとんど変化が認められなかったのに対して、ペリサイトに覆われた血管内皮細胞の割合 (図 2D) は、有意に低下することが明らかとなった。このことから、PVT によって血管透過性が亢進した原因の一つに、ペリサイト被覆を伴った血管の減少が関与していることが示唆された。

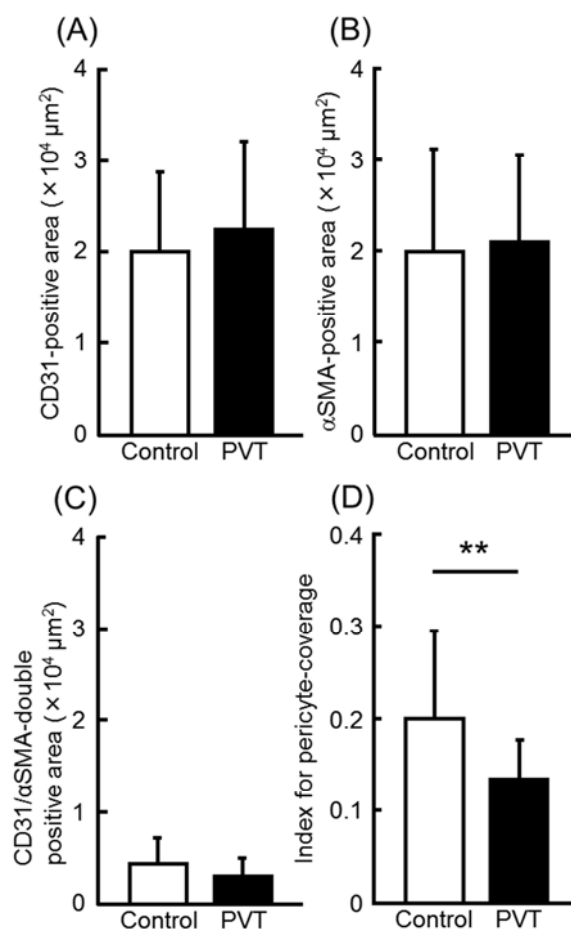


図 2 B16 固形腫瘍組織内血管の構造特性に及ぼす PVT 前処置の影響

(A) CD31 陽性血管の面積, (B) α SMA 陽性部位の面積, (C) CD31 陽性且つ α SMA 陽性血管の面積, (D) 血管総面積に対する壁細胞に覆われた血管面積の割合

** $p < 0.01$ (比較対象, コントロール群)

おわりに

本研究で構築を目指す光誘発型血管透過性亢進技術 (PVT) を利用した新規治療戦略は、血管分布性・透過性の乏しい膵臓がんなど、既に臨床現場において行われているナノ粒子製剤を用いた手法では治療が困難と考えられる難治性がんの効率的な治療を目指すものである。本治療戦略は、“腫瘍組織内血管透過性の亢進”を図るステップと、実際に“抗腫瘍効果の発現”を狙う二つの逐次的なステップから成り立っていることを考慮すれば、これら両処置の実施

条件の最適化が最終的な治療効果を決定する重要な因子となる。今回、紙面の都合により記載することが出来なかったが、本年度（平成 28 年度）に行った検討の結果、光増感剤（0.1 mg/kg）投与後 15 分で光を照射し、その直後に別の抗がん剤内封ナノ粒子製剤を投与することにより、期待した効果を最も顕著に引き出すことを、別途、見出している。今後は、策定した処置条件を適用し、PVT を利用した治療戦略の最適化を目指した更なる検討を進めていく予定である。

謝辞

最後になりましたが、本研究を支援いただきましたウエスコ学術振興財団に深く感謝いたします。

参考・引用文献

- 1) Matsumura Y, Maeda H : *Cancer Res* **46** : 6387-6392 (1986)
- 2) Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemain F, Barberi-Heyob M : *Trends Biotechnol* **26** : 612-621 (2008)
- 3) Ogawara K, Shiraishi T, Araki T, Watanabe T, Ono T, Higaki K : *Eur J Pharm Sci* **82** : 154-160 (2016)
- 4) Araki T, Kono Y, Ogawara K, Watanabe T, Ono T, Kimura T, Higaki K : *Biol Pharm Bull* **35** : 1306-1313 (2012)
- 5) Yoshizawa Y, Ogawara K, Fushimi A, Abe S, Ishikawa K, Araki T, Molema G, Kimura T, Higaki K : *Mol Pharm* **9** : 3486-3494 (2012)
- 6) Yoshizawa Y, Kono Y, Ogawara K, Kimura T, Higaki K : *Int J Pharm* **412** : 132-141 (2011)

メカニカルストレスを利用した心筋細胞のストレス応答能獲得のしくみ

岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科

片野坂 友紀

心筋細胞は、生後ただちに分裂能を失った終末分化細胞であり、一生に渡って、体の成長や運動、妊娠や高血圧などの血行動態（メカニカルストレス）の変化に応じて形や機能を変化させながら、心臓ポンプ機能を一定に保つことが知られている。しかしながら、心筋細胞がメカニカルストレスを感知する機構は、これまで不明であった。これまでの研究において、我々は、心筋細胞の介在板に発現するメカノセンサーTRPV2が、心臓の生理機能の維持に欠かせない重要な分子であることを報告している（Katanosaka et al., 2014, *Nature Communications*）。しかしながら、心筋細胞がメカニカルストレスの変化に応じながら形や機能を維持する仕組みは未だ明らかになっていない。

本研究では、心筋細胞がメカニカルストレスの変化に応じながら形や機能を維持する仕組みを明らかにすることを目的として、大動脈を結紮して左室に圧負荷を与えるモデルを作成し、心臓・心筋細胞・発現分子の変化を16週間にわたって観察した。この結果、圧負荷によって引き起こされる心筋細胞のCa²⁺ハンドリング応答の変容が収縮機能の低下につながることを分子レベルで明らかとなった。また、変容した心筋細胞のCa²⁺ハンドリング能の改善は、一定レベルに収縮機能を改善することも明らかとなった。

【背景】

心臓は、血行動態の変化に応じて、形や機能を変化させながら、ポンプ機能を一定に保とうとする大変ユニークな特徴を持った臓器である。心筋細胞は、生後速やかに分裂能を失うため、その後の成長や運動、あるいは高血圧などによる血行動態の変化に対して、一つ一つの細胞の大きさや形を変えて適応することとなる。このしくみが破綻すると、心臓のポンプ機能は低下し、心不全が発症する。心不全に至る疾患は多様であるが、多くの場合で、血行動態ストレス応答として心肥大が先行する。肥大応答の原因は、細胞内Ca²⁺の持続的な上昇であることが明らかになったが、そのCa²⁺シグナルが、細胞内のどこで生じるか、どの分子によって伝達されるかについては、未だ不明である。

我々は、正常心において介在板に局在する心筋メカノセンサーの候補分子TRPV2を発見し(1,2)、この分子が心臓の形や機能の維持に必須であることを、ノックアウト(KO)マウスの作製・解析から明らかにしたところである(3)。

興味深いことに、TRPV2KOマウスは、大動脈を結紮して左室に圧負荷を与えても、メカニカルストレスに起因する肥大応答能を示さず、数日で重篤な心不全

を呈した(未発表)。そこで、本研究では、圧負荷が生じた心臓で収縮機能を一定に保つためには、心筋細胞や発現分子がどのようにリモデリングするのか、また、このようなメカニカルストレス（血行動態負荷）に対する適応機構に破綻が生じるしくみを調べた。

【方法】

① 動物

実験に使用するマウスは、岡山大学自然生命科学研究所支援センター・動物資源部門鹿田施設において、12時間の明暗サイクル、温度制御下にて飼育した。すべての実験は、10週令の♂マウス（体重：22–24グラム）を使った。これらのマウスは、遺伝的特徴を実験者に対して不明にして、かつランダムに取り扱った。動物実験は、岡山大学動物実験委員会に承認を受けて、ガイドラインに従って行った。

② 大動脈結紮モデルの作製

左室に圧負荷を施すために、マウスの大動脈を結紮した。100 mg/kg ketamine と 5 mg/kg xylazineで麻酔した後、大動脈に27Gの注射針をあて、7-0のナイロン糸で結紮した。

③ 新生仔培養心筋細胞の単離

生後1日の新生仔マウスをエーテル麻酔後、断頭し、心臓を摘出した。左室を細かく刻み、0.2%トリプシン溶液中で、攪拌しながら37度で酵素処理を行い、上澄みを回収した。回収した上澄みは、10%FCS含有のDMEM培地を加えトリプシン活性を止め、遠心分離(1000回転)にかけた。沈殿を10%FCS含有のDMEM培地にて培養した。

④ 組織学的解析

心臓を摘出後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。PBSで洗浄後、パラフィンに包埋し、切片を作製した。切片はHE染色およびマッソントリクロール染色した。新生仔培養細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、PBSで洗浄し、0.1%Triton溶液に浸漬し、透過処理をおこなった。0.3%BSAでブロッキングした。1次抗体に45分間浸漬後、30分PBSで洗浄し、2次抗体(Alexa-labeled抗ウサギ抗体、あるいは抗マウス抗体)を30分間浸漬した。PBSで洗浄した後、ファロイジン染色およびDAPI染色をおこなった。オリンパス社製のLV1000を用いて、観察した。

⑤ 細胞内Ca²⁺イメージング

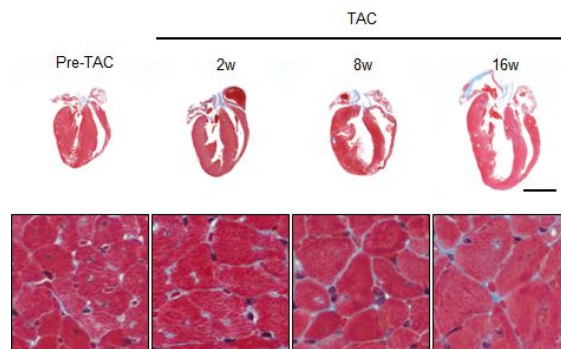
新生仔培養心筋細胞に、2μM Fura-2を37度で30分ロードした。ロード後、細胞は、標準Tyrode溶液に浸し、顕微鏡下で白金電極を用いて電気刺激を与え、電気刺激によって引き起こされる細胞内Ca²⁺濃度の変化を記録した。

【結果】

大動脈結紮に対するマウス心臓の応答

マウスの大動脈を結紮後、2週間、8週間、16週間経過後の心臓の形態、および一つの細胞の横断面の変化を評価した。約2週間で、ひとつひとつの細胞が大きくなることによって心臓が肉厚になるという典型的な肥大応答をひき起こしており、横断面積は16週間後で結紮前と比較して約1.6倍であった(図1)。また、大動脈を結紮後16週間経過した心

臓では、マッソントリクロール染色に陽性となる繊維化像も増加していた。



(図1) マウス心臓の大動脈結紮 (TAC) による圧負荷応答

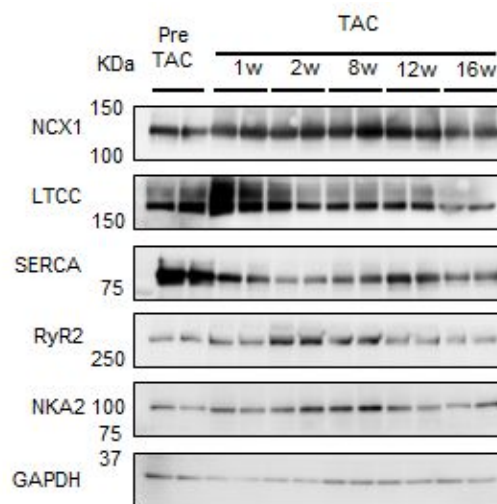
マッソントリクロール染色像

上段: 左より、正常心 (圧負荷なし)、圧負荷2週後、8週後、16週後の心臓横断切片 (スケール: 5mm)

右: より、正常心 (圧負荷なし)、圧負荷2週後、8週後、16週後の左室横断切片 (スケール: 50μm)

大動脈結紮に対するCa²⁺輸送体の発現変化

マウスの大動脈を結紮後の心臓に発現するCa²⁺輸送体の変化を調べた(図2)。

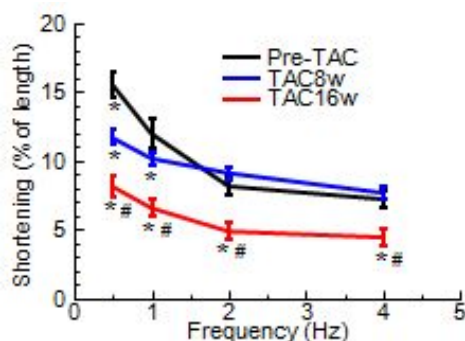


(図2) マウスの大動脈を結紮 (TAC) 後、2週間、8週間、16週間経過後の心臓に発現するCa²⁺輸送体の変化Na⁺/Ca²⁺ 1 (NCX1)、L-type Ca²⁺ channel (LTCC)、SR Ca²⁺-ATPase (SERCA)、リアノジン受容体 (RyR2)、Na⁺/K⁺-ATPase (NKA2)およびGAPDH

図2で示すように、 Ca^{2+} 輸送体の多くは、マウスの大動脈を結紮後、8週間から12週間までの間に発現量が増大するものの、16週間後になると、いずれの分子も発現量の低下を示した。心筋細胞の収縮力は、細胞内 Ca^{2+} ハンドリングに依存する要素が大きいので、 Ca^{2+} ハンドリング分子の発現低下は収縮力低下の大きな要因となると考えられる。

大動脈結紮に対する心筋細胞の機能変化

マウスの大動脈を結紮後、8週間、16週間経過後の心臓から、心筋細胞を単離して、電気刺激依存的な収縮能を調べた(図3)。図2で示した Ca^{2+} ハンドリング分子の発現低下から示唆されたように、16週間経過後は、著しく心筋細胞の収縮率が低下していた。



(図3) マウスの大動脈を結紮(TAC)後、8週間、16週間経過後の単离心筋細胞収縮率

大動脈結紮に対するTRPV2KOマウス心臓の応答

TRPV2KOマウスを大動脈結紮したところ、肥大応答は見られずに、数日で重篤な心不全となった。このことから、メカニカルストレスによって引き起こされる心筋組織、細胞の形や機能を変容して、適応的に肥大応答をするためには、TRPV2が必須であることが明らかとなった。

【考察】

本研究では、心筋細胞がメカニカルストレスの変化に応じながら形や機能を維持する仕組みを明らかにすることを目的として、マウスの肥大応答を臓器・細胞・

発現分子の多階層で解析した。また、メカノセンサーTRPV2KOマウスは、大動脈を結紮しても、正常マウスでみられるような応答は示さず、たちまち重篤な心不全状態に陥った。この結果は、メカノセンサーTRPV2は、心筋細胞の生理的肥大およびメカニカルストレスによって引き起こされる病的肥大に欠かせないことを示している。また、メカニカルストレスに対する適応的な応答の一つとして、正常心筋細胞では、一旦細胞内の Ca^{2+} ハンドリングを過度に活性化させて、収縮に利用する Ca^{2+} を賄っていることが示唆された。このような適応的応答を獲得するためにも、メカノセンサーTRPV2は必須である。今後TRPV2を介したメカノトランスダクションの詳細を解析することによって、心臓がメカニカルストレスをうまく利用しながら形や機能を維持していく仕組みが明らかになっていくだろう。

【謝辞】

最後になりましたが、本研究を支援いただきましたウエスコ学術振興財団に深く感謝いたします。

【参考・引用文献】

- (1) **Katanosaka Y**, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, Sudo A, Toda T, Katanosaka K, Satoshi M, Naruse K. TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. **Nature Communications**, 2014, **Doi:10.1038/ncomms4932**
- (2) Ujihara Y, Iwasaki K, Takatsu S, Hashimoto K, Naruse K, Mohri S, **Katanosaka Y**. Induced NCX1 overexpression attenuates pressure overload-induced pathological cardiac remodeling. **Cardiovascular Res.** 2016, 111:348-361. **Doi:10.1093/cvr/cvw113**.
- (3) Ujihara Y, Mohri S, **Katanosaka Y**. Effects of induced $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger overexpression on the spatial distribution of L-type Ca^{2+} channels and junctophilin-2 in pressure-overloaded hearts. **Biochem Biophys Res Commun.** 2016, **480:564-569. Doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.090**.

舌癌に対する Treg 抑制療法の検討

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科

折田 頼尚

近年多くの癌において regulatory T cell (Treg)の浸潤が予後不良因子として報告されている。Treg は胸腺あるいは抗原に暴露した末梢で産生され、Effector T cell の抗腫瘍効果を抑制すると言われている。しかし、頭頸部癌の癌微小環境中の Treg の働きには不明な点が多い。我々はマウス舌癌モデルを用い、経時的に舌癌発生・進行過程における Treg の動向を観察した。その結果、Treg は癌発生初期に多く浸潤するが、癌進行とともに減少することがわかった。Treg 抑制によって癌の進行をくいとめる治療は、舌癌に関しては初期癌にのみ有効であることが予想された。近年、免疫チェックポイント阻害剤の登場が話題となり、抗 PD-1 抗体は近々頭頸部癌領域にも適応になると見込まれている。抗 CTLA-4 抗体もいずれ頭頸部癌領域に適応になると予想されるが、こちらには Treg を排除する働きがあることが知られている。抗 PD-1 抗体で effector T cell の抗腫瘍効果を高め、抗 CTLA-4 抗体で Treg を排除する治療は、舌癌に関しては癌発生初期段階で最も効力を発揮する可能性があると考えられる。

癌の進行において Treg が高度に浸潤している症例ほど予後が悪いとされているが、それらの研究は主として患者の手術検体を用いた検討であり、Treg の浸潤は癌進行の原因ではなく、癌が進行した結果を観察しているに過ぎない可能性がある。Treg の役割をより正確に理解するためには前癌病変から癌が発症し、そして進行していく過程における経時的な観察が必要であると思われる。我々は、舌癌の発生・進行過程に伴う経時的な観察を行うために、4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)を用いた舌癌マウスモデルを確立した(Remillio A, et al. J Mol Hist, 40; 177-181, 2009)。野性型 C57BL/6 マウスに 4NQO を投与するこのモデルにおいては、15 週目頃から severe dysplasia～squamous cell carcinoma (SCC)が発生し、25 週で 100% のマウスに SCC が発生する。このモデルは喫煙による遺伝子変異と同様の発癌形式をたどり、喫煙による発癌の代替モデルとされている。更にこのモデルの特徴は癌が口腔、食道のみに発癌し、その他の部位には発癌しない点でよりヒト口腔癌の病態に近いと言われている。

Cyclooxygenase(COX)は prostaglandins(PGs)の合成を触媒し、炎症において重要な役割を果たす。その中で、COX-2 は癌微小環境中の PGE2 の合成を促し、ナイーブ CD4+細胞に Foxp3 の発現を誘導し Treg に分化させると言われている。

このマウス舌癌モデルにおいて、我々は経時的 Treg の浸潤様式と、COX-2 抑制の癌発生・進行過程への影響及び Treg の浸潤様式への影響を観察することにした。本研究においては Foxp3 を Treg のマーカーとして用い、同時に IL-10、TGF- β の組織中の量の変化も観察した。癌微小環境中に浸潤した Treg の量は多くなく、それを組織から抽出し活動性まで確認することは困難であるため、我々は同時に Treg の遊走に関わる chemokine CC motif ligands (CCL) 17, 20 と、CC chemokine receptor (CCR) 4 の量の変化を観察した。

各群のマウス（通常の飲料水を与えて育てたコントロール群、飲料水に 4NQO を混じて与えた実験マウス群、実験マウスに COX-2 阻害剤を餌に混じて与えた（通常ヒト投与量、通常量

の3倍量、の2種類)群)から実験開始15週、20週、25週、30週目に各5匹ずつランダムに選出し屠殺し、舌組織を採取した。まず通常のHE染色にて癌の発生・進行状況を確認した。次に、RT-PCR法を用い、前述のFoxp3、サイトカイン・ケモカインを測定定量した。最後に、CD8、Foxp3免疫染色を施行した。

実験マウスにおけるFoxp3の発現は、コントロールマウスと比較し、15週、20週目で有意に増加を認めたが、癌の発生・進行に伴い有意に減少した。コントロールマウスにおいてはFoxp3の量に経時的変化は見られなかった。IL-10も実験マウスにおいてコントロールと比較し高値を示す傾向にあった。実験マウスにおいてもコントロールマウスにおいても、IL-10の量に癌の発生・進行に伴う有意な変化は認められなかった。TGF- β はコントロールマウスにおいて15、20、30週目で実験マウスよりも有意に高値を示した。同様に実験マウスにおいてもコントロールマウスにおいても、癌の発生・進行に伴う有意な変化は認められなかった。実験マウスにおけるCCL20の量はコントロールマウスよりも有意に増加していたが、CCL17とCCR4においては明らかな有意差は認められなかった。COX-2阻害剤の投与は、癌の発生・進行に特に影響を与えず、上述の計測結果に4NQO投与のみの群と比較し有意差をもたらさなかった。

CD8陽性細胞はコントロールマウスにおいても実験マウスにおいても殆ど観察されず、統計的解析の対象とならなかった。Foxp3陽性細胞をカウントし解析した結果、実験マウスにおいては15週目で最も多く、癌の発生・進行とともに減少することがわかった。Foxp3陽性細胞は主として癌の浸潤部先端に見られ、同部でカウントしたFoxp3陽性細胞はCOX-2阻害剤投与群で15週目において有意に実験マウスよりも減少していることがわかった。

今回の実験において、実験マウスの実験初期

段階においてTregはコントロールマウスと比較して10倍多いことがわかった。そのため、舌癌においてTregはその発生初期段階に関与している可能性が示唆された。IL-10は抗原提示細胞におけるMHC class IIと腫瘍細胞におけるMHC class Iを抑制し抗原提示を不活化し、腫瘍の進行を促進すると言われている。本実験ではIL-10はFoxp3と同様腫瘍進行とともに減少傾向であったが、Foxp3ほど顕著ではなかった。これはIL-10はTregと腫瘍細胞の両方から産生され、メインはTregであるため、腫瘍の増殖に伴いTregが減少する結果このような結果になったと思われる。TGF- β は実験初期においてコントロールよりも更に低い値を示した。TGF- β は癌の発生と抑制どちらにも寄与すると言われており、SCCにおいては発生初期に抑制、進行期に促進の方向に作用すると言われている。そのため、癌発生初期にはdownregulationしているのではないかと考えられた。COX-2阻害剤は残念ながら今回の検討では癌抑制に殆ど効果は見られなかったが、癌浸潤部先端へのTregの遊走を阻害する可能性があるのではないかと考えられた。CCR4、CCR8等のケモカインによってTregは炎症の有る場所に遊走しT細胞の効果を抑制する。CCL17はCCR4のリガンドであり、TregはCCL17とCCL20に反応し遊走する。本実験において、実験マウスにおいては有意にCCL20が高値となっていた。

これらの結果から、もしTreg抑制療法が舌癌に有効あるいは適応となったとしても、それは初期段階に行わなければ十分な効果が得られない可能性が高いと結論づけた。今後、舌癌発症・進行過程の様々な時期で実際にTregを除去し、その効果を観察したいと考えている。

モリブデンの特徴を活かした炭素-水素結合直接変換反応の開発

岡山大学大学院 自然科学研究科

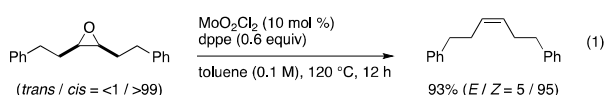
浅子 壮美

有機化合物中に遍在する炭素-水素結合を切断して新しい官能基を導入する反応は、直截的かつ効率的な有機分子構築法として近年精力的に研究されている。しかしながら、現在主として用いられる金属触媒は希少かつ毒性のあるパラジウム、ロジウム、ルテニウムといった限られた「特権金属」に大きく偏っている。本研究では、これまで着目されてこなかったモリブデンを触媒として用いる炭素-水素結合直接変換反応を一から探索し、モリブデンに特徴的な反応を開発した。すなわち、カルボニル基の脱酸素と炭素-水素結合切断を経る分子内環化反応を見出した。この反応では、カルボニル炭素がカルベン等価体として働き、 sp^2 および sp^3 炭素-水素結合へ挿入する。これまで同様の反応を行うためにはカルボニル化合物をジアゾ化合物へ変換する必要があったが、本反応により合成ルートが簡略化されカルボニル化合物を直接用いることができるようになった。また、炭素と同族元素であるケイ素-水素結合の切断を経るアレンのヒドロシリル化反応を開発し、DFT 計算により前例のない位置選択性の発現要因を解明した。

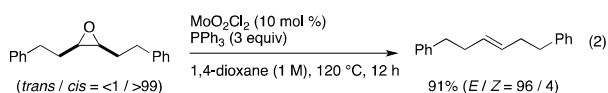
【炭素-水素結合切断を経る反応】

申請者らは、最近、モリブデン触媒を用いると二置換エポキシドの脱酸素反応が立体特異的に進行することを見出している (Eqs. 1 and 2, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, 358, 3966–3970.)。すなわち、触媒量の MoO_2Cl_2 の存在下、還元剤として 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane (dppe) を用いると立体保持で、 PPh_3 を用いると立体反転を伴い脱酸素反応が進行し、*cis*-エポキシドからそれぞれ対応する *Z* および *E* オレフィンが得られる。

Conditions A: Stereoretention



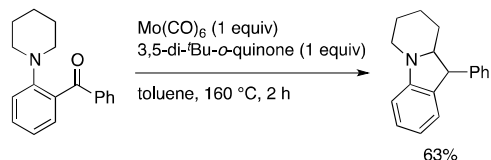
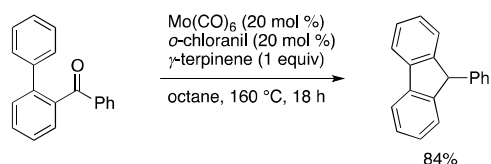
Conditions B: Stereo-inversion



本反応から着想を得てエポキシドのかわりにカルボニル化合物を基質として用いたところ、カルボニル基からの脱酸素反応が近傍にある炭素-水素結合の切断および分子内環化反応を伴って進行することを見出した (Scheme 1)。すなわち、ベンゾフェノン

のオルト位にピペリジル基 (Scheme 1a) およびフェニル基 (Scheme 1b) を有する基質から、それぞれ、 sp^3 炭素-水素結合および sp^2 炭素-水素結合へカルボニル炭素が形式的に挿入した環化生成物が得られた。これまで、このような反応を行うには、カルボニル化合物を一度ジアゾ化合物へ変換した後に、分子内カルベン挿入反応を行う必要があった。それに対し、本反応ではカルボニル化合物をカルベン等価体としてそのまま用いることができるため、合成ルートを大幅に簡略化することができた。この反応は、酸素原子に対する親和性の高いモリブデンに特徴的な反応である。

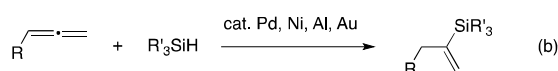
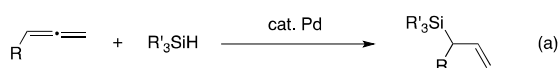
Scheme 1.

a: Deoxygenative insertion of carbonyl carbon into C(sp^3)-H Bondb: Deoxygenative insertion of carbonyl carbon into C(sp^2)-H Bond

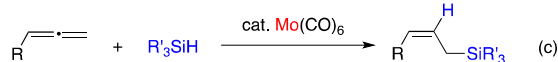
【ケイ素-水素結合切断を経る反応】

炭素と同族元素であるケイ素-水素結合切断を経るアレンへの付加反応、すなわちアレンのヒドロシリル化反応がモリブデン触媒を用いると位置選択的に進行することを見出した。アルキン、アルケン、1,3-ジエンのヒドロシリル化は、膨大な数の研究成果が蓄積され成熟した合成法になりつつある。一方、アレンのヒドロシリル化は、アルケニルシランやアリルシランといった有用な反応剤の効率的な合成法になり得るにもかかわらず、最近までほとんど研究されてこなかった。これは、アルケンやアルキンに比べ、アレンのヒドロシリル化で生成し得る異性体の種類が多いため、反応の位置および立体選択性の制御が特に困難であることが一因として考えられる。これまでに、パラジウム、ニッケル、アルミニウム、金触媒を用いる位置選択的なヒドロシリル化が僅かながら報告されており、分岐アリルシラン (Scheme 2a) やビニルシラン (Scheme 2b) を得ている。しかしながら、アレンのヒドロシリル化で直鎖アリルシランを選択的に得る一般合成法はなかった。本研究において申請者らは、安価で入手容易なモリブデン錯体を触媒とするアレンのヒドロシリル化を開発し、直鎖アリルシランが選択的に得られることを見出した (Scheme 2c)。

Scheme 2.
Previous works



This work



反応は、触媒量の Mo(CO)_6 存在下、トルエン中 110°C において円滑に進行した (Table 1)。1,1-二置換アレン、1,3-二置換アレン、および一置換アレンを用いると位置選択的に反応が進行し、対応する直鎖アリルシランが Z 選択的に良好な収率で得られた。非対称 1,1-二置換アレンを用いた場合は、二つの置換基の高さの違いが大きくなるほど、Z 選択性が向上した。アルキル基だけでなく、ケイ素やホウ素

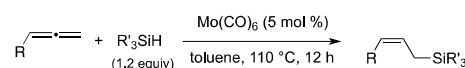


Table 1. Molybdenum-Catalyzed Hydrosilylation of Allenes^a

entry	substrate	R ₃ SiH	product	Yield ^b / % (E / Z) ^c
1	ⁿ Bu-C≡C-C≡C-	Ph ₂ SiH ₂	ⁿ Bu-CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂	80
2	ⁿ Bu-C≡C-C≡C-	PhMe ₂ SiH	ⁿ Bu-CH=CH-CH ₂ -SiHPhMe	63
3	Cyclohexyl-C≡C-C≡C-	Ph ₂ SiH ₂	Cyclohexyl-CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂	65
4	Ph-CH ₂ -C≡C-C≡C-	Ph ₂ SiH ₂	Ph-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂	71 (45 / 55)
5	Cyclohexyl-C≡C-C≡C-	Ph ₂ SiH ₂	Cyclohexyl-CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂	65 (21 / 79)
6	ⁿ Bu-C≡C-C≡C-	Ph ₂ SiH ₂	ⁿ Bu-CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂	65 (7 / 93)
7	ⁿ C ₅ H ₁₁ -C≡C-C≡C-	Ph ₂ SiH ₂	ⁿ C ₅ H ₁₁ -CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂	70 (15 / 85)
8		Ph ₂ SiH ₂		83 (13 / 87) ^d
9		Ph ₃ SiH		53 (8 / 92)
10	Cyclohexyl-C≡C-C≡C-	Et ₃ SiH	Cyclohexyl-CH=CH-CH ₂ -SiEt ₃	52 (10 / 90)
11		BnMe ₂ SiH		72 (15 / 85)
12		PhMe ₂ SiH		78 (9 / 91)
13	Ph-CH ₂ -C≡C-C≡C-	Ph ₂ SiH ₂	Ph-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂ + Ph-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂	21 (<1 / >99) + 45 ^e
14	Ph-CH ₂ -C≡C-C≡C-	Ph ₂ SiH ₂	Ph-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂ + Ph-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -SiHPh ₂	53 (8 / 92) + 3 ^{f,g}
15	PhMe ₂ Si-C≡C-C≡C-	PhMe ₂ SiH	PhMe ₂ Si-CH=CH-CH ₂ -SiMe ₂ Ph	78 (20 / 80)
16	Bpin-C≡C-C≡C-	PhMe ₂ SiH	Bpin-CH=CH-CH ₂ -SiMe ₂ Ph	61 (30 / 70)

^aReaction conditions: allene (0.2 mmol), R₃SiH (1.2 equiv), and Mo(CO)₆ (5 mol %) in toluene (0.2 mL) at 110°C for 12 h. ^bIsolated yields. ^cDetermined by ¹H NMR and GLC. ^dBranched allylsilane was obtained in 3% yield. ^eLinear allylsilane (21%) was obtained as a mixture with branched allylsilane (45%). ^fMo(CO)₃(MeCN)₃ was used instead of Mo(CO)₆ at 60°C . ^gLinear allylsilane (53%) was obtained as a mixture with branched allylsilane (3%) and alkenylsilane (5%).

が置換したアレンを用いても反応は進行した。このようにして得られる生成物は、二官能性合成中間体として有用な化合物である。ヒドロシランは、第二級および第三級のいずれを用いた場合も、目的の直鎖アリルシランが Z 選択的に得られた。また、アルキニルシランを用いても、アルキン部位を損なわずに反応が進行した。

本反応における前例のない位置選択性の発現要因を解明するために、DFT 計算により反応機構研究を行った。 π -アリルモリブデン中間体を経由する反応機構を Figure 1 に示す。一般的なヒドロシリル化の反応機構であり 2 段階からなるケイ素-水素結合酸

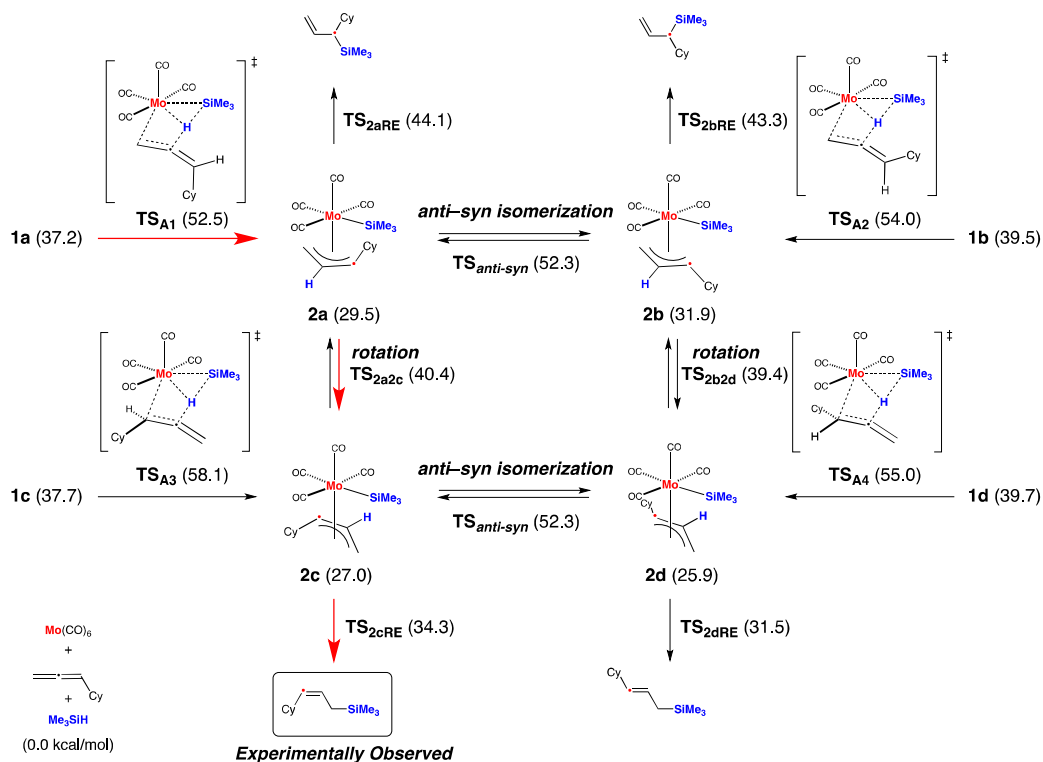


Figure 1. Molybdenum-Catalyzed Hydrosilylation of Cyclohexylallene and Me_3SiH Calculated at B3LYP-D3/SDD:6-31G(d) Level.

化的付加によるヒドリドモリブデンの生成および引き続くアレンへのヒドロモリブデン化ではなく、ケイ素-水素結合酸化的付加とヒドロモリブデン化が協奏的に進行する遷移状態を見出した。似たような遷移状態は、パラジウム/NHC 触媒によるアレンのヒドロシリル化で報告されている (Scheme 2a)。置換基の位置により異なる 4 つの遷移状態のうち、Cy 基が外側を向いた TS_{A1} (52.5 kcal/mol) が最もエネルギーが低い。 π -アリルモリブデン中間体 **2a–2d** からの還元的脱離により、分岐アリルシラン、*Z* および *E* 直鎖アリルシランが生成する。これらの π -アリルモリブデンは、アリル回転および *anti-syn* 異性化による相互変換が可能のため、**2a** はそのまま還元的脱離をして分岐アリルシランを生成する ($\text{TS}_{\text{2aRE}} = 44.1$ kcal/mol) 前に、アリル回転により熱力学的により安定な **2c** に異性化し ($\text{TS}_{\text{2a2c}} = 40.4$ kcal/mol)、還元的脱離により *Z* 体の直鎖アリルシランを与えることを明らかにした ($\text{TS}_{\text{2cRE}} = 34.3$ kcal/mol)。

以上本研究では、モリブデン触媒を用いる炭素-水素結合およびケイ素-水素結合の切断を経る新規物質変換反応を開発した。いずれの反応も、他の金

属には見られない、モリブデンに特徴的な反応性や選択性を示すことを見出した。今後は、これらの知見をもとに、モリブデンの特徴をより引き立たせるような反応開発および反応機構解明に取り組む。

【謝辞】

本研究にご支援賜りました公益財団法人ウエスコ学術振興財団に深く感謝申し上げます。

【発表論文および学会発表】

- [1] Sobi Asako, Sae Ishikawa, Kazuhiko Takai, "Synthesis of Linear Allylsilanes via Molybdenum-Catalyzed Regioselective Hydrosilylation of Allenes", *ACS Catal.* **2016**, 6, 3387–3395.
- [2] Sobi Asako, Sae Ishikawa, Kazuhiko Takai, "Molybdenum-Catalyzed Synthesis of Linear Allylsilane via Regioselective Hydrosilylation of Allene", International Conference on Organometallic Chemistry 2016 (ICOMC 27), Melbourne, Australia, July 2016.
- [3] 石原聖奈, 浅子壮美, 高井和彦, 「モリブデン触媒によるカルボニル脱酸素を利用するピリドイソインドール合成」, 日本化学会第 97 春季年会, 1E2-39, 慶応大学, 神奈川, 2017 年 3 月.

CD44 を標的するリポソームの開発

岡山大学大学院自然科学研究科

笠井 智成

ヒトグリオーマ（神経膠腫）由来細胞株のマウスモデルは脳に同所移植した場合を除いて、安定して腫瘍を形成するモデルを作製するのは困難であったため、U251MG 細胞から CD44 タンパク質を高発現する悪性度が高い細胞を分離して、ヌードマウス皮下で安定して造腫瘍能を有する U251MG-P1 株を作製した。また、当研究グループでは、がん治療薬のパクリタキセルをリポソーム内に封入する技術を開発してきたので、この技術を応用して抗 CD44 抗体を表面に提示したグリコシル化パクリタキセル内封リポソーム (antiCD44-gPTX-IL) を作製した。antiCD44-gPTX-IL をヒトグリオーマ由来 U251MG 細胞に *in vitro* で曝露することによって増殖抑制効果を検証すると、遊離の薬剤と比較して有意に抑制することが判った。ヒト大動脈線維芽細胞に曝露した場合には特異性が認められなかったため、副作用を低減しながら CD44 タンパク質高発現細胞を標的する可能性を見出した。

はじめに

グリオブラストーマは神経膠腫の中でも悪性度が高く、遊走能や浸潤能を有することが知られている。また、他のがんと同様に不均一な細胞集団を形成し、がん幹細胞を含んでいることが判ってきた。がん幹細胞は自己複製能や多分化能、薬剤耐性、放射線治療耐性、造腫瘍能を有し、増殖を繰り返して分化を継続することでがん細胞を生み出すため、再発や転移の原因となり、がんの根治を困難にする原因と考えられている。

CD44 タンパク質は、膜貫通型糖タンパク質であり、ヒアルロン酸レセプターとして知られている。この CD44 タンパク質ががん細胞では高発現し、がんの転移に強く関わっていることが報告されている。特に脳腫瘍、膵臓がん、前立腺がん、乳癌などのがん幹細胞マーカーとして注目されており、CD44 タンパク質の機能研究はがん研究において非常に重要な役割を担っている。そこで本研究では、ヒト脳腫瘍細胞株を用いて、CD44 タンパク質を標的することでがん細胞およびがん幹細胞の標的を行い、腫瘍に選択的かつ効率的に薬剤を輸送する薬剤輸送システム、いわゆるドラッグデリバリーシステム (DDS) を開発することを目的とした。DDS とは、必要な時だけに必

要なだけの薬剤を患部へ特異的に送達する医用技術であり、この DDS の開発により、より副作用が少なく薬効の高い薬剤の開発に繋がると考えられる。

結果と考察

1. ヒトグリオブラストーマ担癌マウスの作製

ヒトグリオブラストーマのマウスモデルを作製するために、CD44 タンパク質を高発現する細胞集団を分離する目的で、培地中にヒアルロン酸を添加して浮遊培養を行った。ヒトグリオーマ由来 U251MG 細胞を非接着ディッシュ上でヒアルロン酸 (HA) を添加した培地 (100 μ g/ml ヒアルロン酸ナトリウム、10% FBS、50 U/ml ペニシリン、および 50 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM) 上と添加していない通常の培地 (10% FBS、50 U/ml ペニシリン、および 50 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM) 上で 2~5 日間培養した。HA を添加しない場合には殆ど細胞が增殖しなかったが、HA を添加した場合には一部で細胞塊が形成された。この浮遊培養後の U251MG 細胞 1×10^6 個をそれぞれマウス背部皮下に移植して、体重測定と腫瘍体積の測定を行った。体重に大きな変動は認められなかったが、HA を添加して培養した細

胞では移植 10 日後から腫瘍の成長が認められた。形成された腫瘍から初代培養細胞を作製して U251MG-P1 とした。

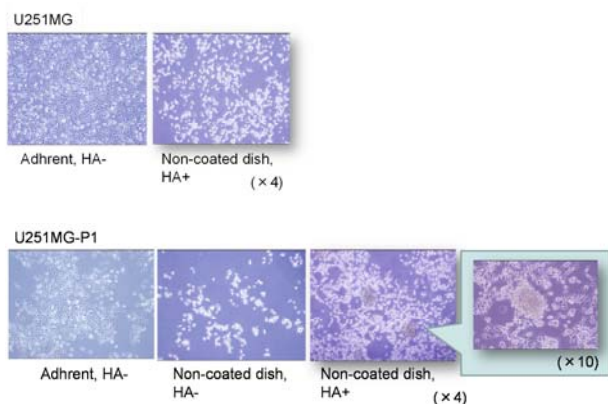


図 1. ヒアルロン酸を添加した浮遊培養

HA+は 100 μ g/ml の濃度でヒアルロン酸を添加して浮遊培養を行った。

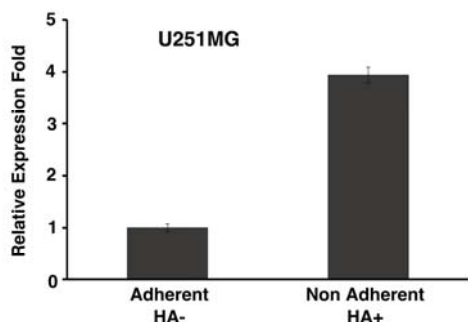


図 2. CD44 遺伝子発現量の比較

ヒアルロン酸の添加無しの接着培養とヒアルロン酸を添加した浮遊培養で U251MG 細胞を培養した場合の CD44s mRNA 発現量を qPCR で相対比較した。

また、得られた U251MG-P1 細胞は、幹細胞マーカー遺伝子の発現や SOX2 タンパク質発現が亢進することが判り、がん幹細胞様の集団であると考えられた。

これまで、薬効評価を *in vivo* で簡易に行うことが難しかったグリオーマの評価系の一つを構築することができた。今後は U251MG-P1 細胞を用いて CD44 を標的するリポソームの評価を行う。

2. CD44 を標的するリポソームの作製

抗 CD44 抗体を産生するハイブリドーマ (Hermes3, HB9480 細胞) を培養して、抗 CD44 抗体を精製した。antiCD44-gPTX-IL を作製するため、ジパルミトイルホスファチジルコリン、コレステロール、ジパルミトイルフォスファチジエタノールアミンを主要な構成成分とする脂質を混合して、クロロホルム/メタノール溶液中で均一に溶解した後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を取り除き、脂質フィルムを作製した。この脂質フィルムを用いて、クレモホル/エタノール/リン酸緩衝液から成る溶液 (CEP) を内包したリポソームを作製し、溶解度勾配法によって、gPTX を内封したリポソームを作製し、表面に抗 CD44 抗体を提示した antiCD44-gPTX-IL を作製した。antiCD44-gPTX-IL 作製時の薬剤内封効率は 32.5%、担持率は 3.6%、粒径は 147 nm、Z 電位は -6.6 mV であった。この結果から、antiCD44-gPTX-IL は薬剤が効率良く封入されており、さらに DDS に適した大きさの粒子であり、分散性も高いと考えられた。antiCD44-gPTX-IL を U251MG-P1 細胞に *in vitro* で曝露すると、遊離の gPTX と比較して 60%未満の薬剤濃度で同等の細胞増殖抑制効果が得られることが判った。一方、ヒト大動脈線維芽細胞の増殖阻害のためには遊離の gPTX と同程度の薬剤濃度が必要であり、また antiCD44-gPTX-IL で曝露する場合、U251MG-P1 細胞を阻害する濃度の 1.8 倍以上を必要とすることが判った。すなわち、正常細胞に対する傷害性は低減されていると考えられた。

また、ドキシソルビシン (dox) を内封したリポソームを既報の pH 勾配法に依って封入したところ、83%-99%の内封効率が得られた。

今後は antiCD44-gPTX-IL および、ドキシソルビシンを内封した CD44 標的リポソーム antiCD44-dox-IL を用いて、*in vivo* での評価を行って効果を確認する。一方、リポソームの標的特異性の向上、安定性向上を目指した脂質の検討や、封入法の検討、またシスプラチンを内封したリポソーム作製法の検討を行う予定である。

3. まとめ

in vivo での簡便な評価を可能にするモデルマウスの作製と、CD44 を標的するリポソームの基礎を構築できたため、今後、これらを用いてさらに評価を行うことが可能となった。グリオブラストーマだけでなく、悪性度が高いと考えられる CD44 タンパク質高発現がん細胞、およびがん幹細胞を標的するリポソームの開発に向けての足掛かりを得た。

謝辞

本研究課題の推進にご支援いただいたウエスコ学術振興財団に深く感謝いたします。

本研究助成による研究成果に関する発表

Vaidyanath A, Mahmud HB, Khayrani AC, Oo AK, Seno A, Asakura M, Kasai T, Seno M.

“Hyaluronic Acid Mediated Enrichment of CD44 Expressing Glioblastoma Stem Cells in U251MG Xenograft Mouse Model” . *J. Stem. Cell. Res. Ther.* (2017) 7, 384. DOI: 10.4172/2157-7633.1000384

参考文献

Shigehiro T, Kasai T, Murakami M, Sekhar SC, Tominaga Y, Okada M, Kudoh T, Mizutani A, Murakami H, Salomon DS, Mikuni K, Mandai T, Hamada H, Seno M. Efficient Drug Delivery of Paclitaxel Glycoside: A Novel Solubility Gradient Encapsulation into Liposomes Coupled with Immunoliposomes Preparation. *PLoS One*. 2014;9(9):e107976. doi: 10.1371/journal.pone.0107976.

Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* (2015) 3: 225-238.

旭川祇園地区における礫河原再生事業が河川の物理環境に与える経年的な影響の検討

岡山大学 大学院環境生命科学研究科 准教授

吉田 圭介

近年、岡山市を流れる旭川では河道の樹林化が問題となっている。河道の樹林化は一般に、洪水時の流下能力の低下、低水路の深掘れ、生物多様性の減少といった様々な問題を引き起こすことが知られる。旭川では樹林化対策として、2005年に大原・祇園・分流部の3つの地区において植生伐採と砂州の切下げを含む礫河原再生事業が試験的に行われたが、事業が実施された旭川下流部はアユの生息域として知られ、河川整備事業による水環境への影響が懸念される。そこで、本研究では、旭川の洪水履歴や河川整備事業の有無が治水と河川環境に与える影響を経年的に検討するため、祇園地区を対象に、過去10年程度の水文・土砂・植生動態および魚類の生息状況の変遷について整理すると共に、現況の現地調査、漁協へのヒアリングを行った。また、流況・河床変動・植生動態を模した数値シミュレーションを行った上で、PHABSIMによる解析指標を用いて、礫河原再生事業が河川の物理環境に与える影響を検討した。その結果、祇園地区の周辺域はアユの産卵場として適した河道の状態であることが示され、また整備事業はその適性範囲を維持・拡大することが分かった。

1. はじめに

岡山市を流れる一級河川・旭川は、かつて礫河原が多く存在する河川であった。しかしながら、1954年に旭川ダム、1955年に湯原ダムが建設され、洪水規模が縮小したことによる土砂供給量の減少や、1960年代前半の土砂採取などにより、河道内において河床の攪乱作用が低下し、砂州の樹林化がかなり進行している。その結果、河川本来の姿である礫河原が減少するとともに、川の多様性が失われ、河川固有の生態系が変化している。

このような中、旭川下流部に位置する祇園地区では、礫河原再生に向けた取り組みとして、2005年に砂州の切下げ、植生伐採が実施された。2011年以降、植生の再繁茂の傾向はあるものの、事業実施後の数年間は、中小規模の洪水により、礫河原の維持が図れることを示した。祇園地区の河道の変遷を図-1.1に示す。しかしながら、事業後の河道や植生状況が経年的に変化していることを考えると、それに伴う水生生物の生息環境への影響も経年的に検討する必要がある。

以上の背景より、本研究では、旭川祇園地区を対象に、砂州上の河床変動量、植生動態、河床材料の調査、および砂州付近の平水時の流況調査と河床材料の調査を行った。また、アユの生息状況の現状を把握する

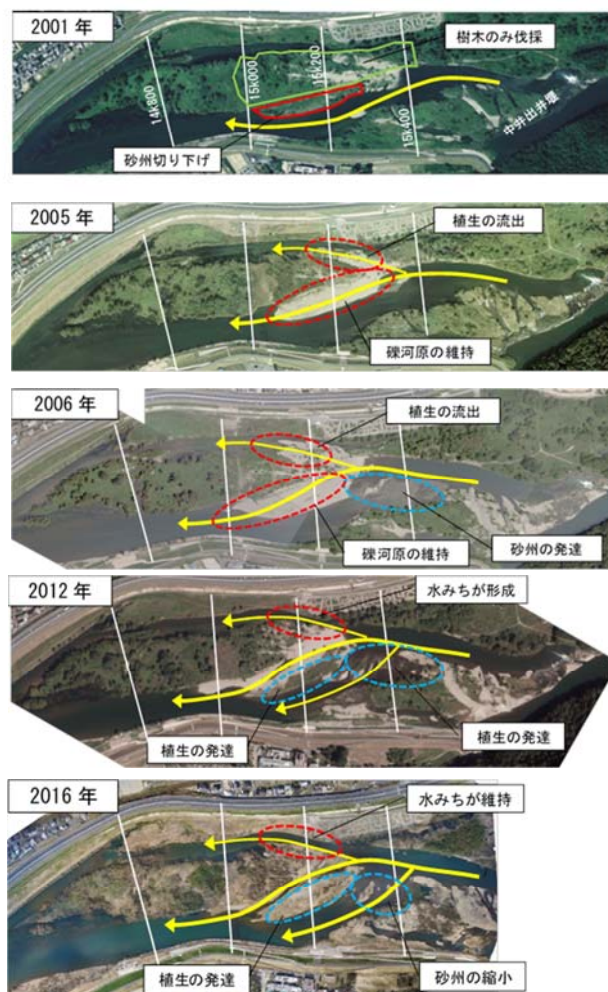


図-1.1 祇園地区における河道の変遷（2001～2016年）

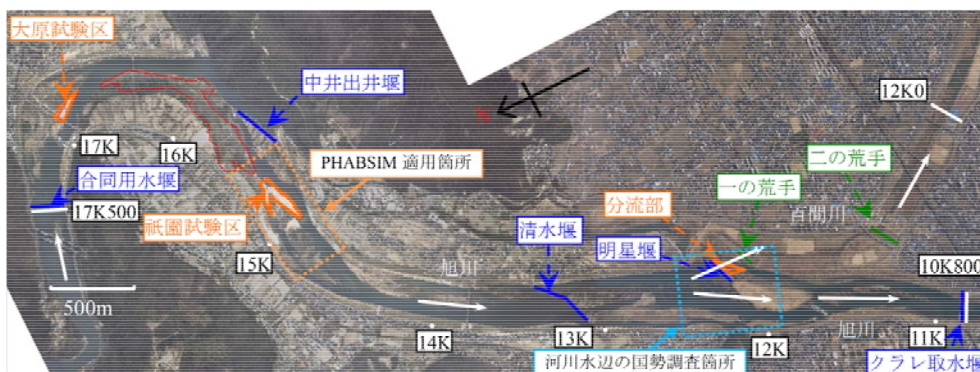
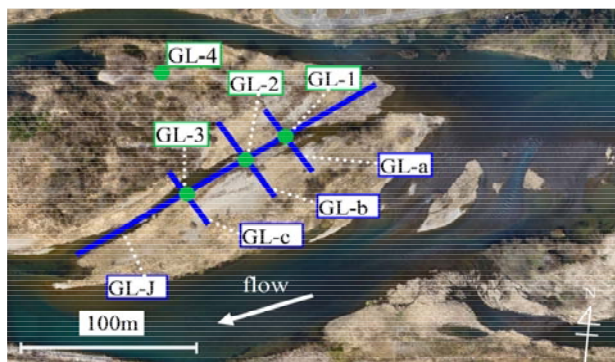
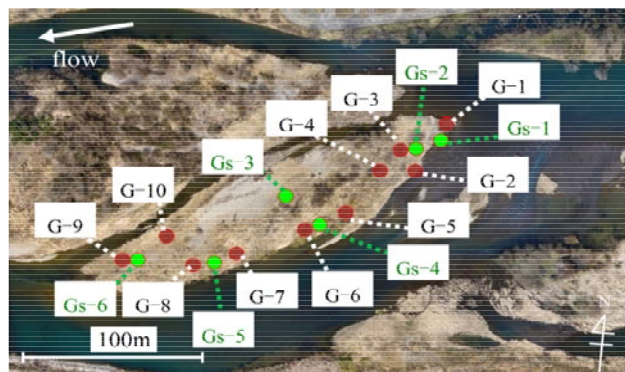


図-2.1 対象河道



● : 採掘位置

図-2.2 河床高計測ライン, 河床材料採掘位置



● : 木本類 ● : 草本類

図-2.3 植生調査位置

ため、河川水辺の国勢調査の結果を確認するとともに漁協等へのヒアリングも行った。さらに、河床変動計算及び植生消長シミュレーションにより、切下げを行った場合と行わなかった場合とで、数年間の土砂、植生動態の結果を比較した。次に、アユの産卵場としての適性を PHABSIM によって評価した。以上の結果を踏まえ、礫河原再生事業による効果を調べた。

2. 現地調査

旭川下流部に位置する祇園地区(図-2.1)で、5月、8月、11月に現地調査を実施した。各時期で砂州上の河床の洗掘・堆積、植生高を計測した。それぞれの調査位置を図-2.2, 2.3に示す。祇園地区では、GL-J 付近で新たな水みちの形成が進行しており、その水みちを横断するような GL-b 上では、GL-J との交点付近で1年間を通して変動が見られた(図-2.4)。植生に関しては、年々成長しており、今年度は平均約1mの成長が確認できた。近年は大規模な洪水が発生していないためか、洪水外力による植生への影響はほとんどない。同様の状況が続く場合、調査対象としている樹木がヤナギ類(最大樹高約10~20m)であることを踏ま

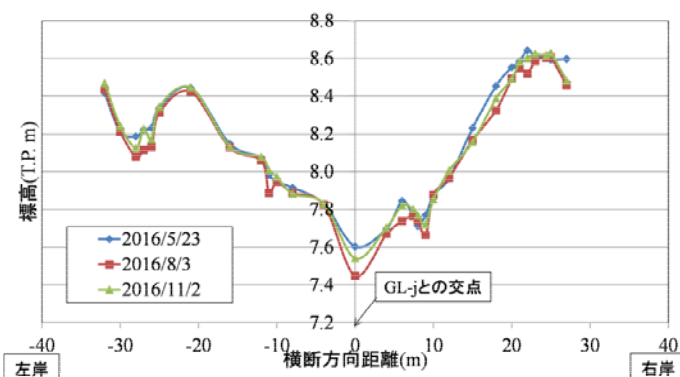


図-2.4 河床高 (GL-b)

えると、今後も成長は続くと考えられる。樹高の経年変化をそれぞれ図-2.5に示す。また、洪水の前後で、図-2.3に示す4か所で河床材料を採取し、粒度分布の計測も行った。しかし、今年度の出水規模では、その前後の粒度分布に変化は見られなかった。5月には図-2.6に示す箇所で平水時の流況調査を行った。測線上の流速を概ね5mピッチで計測した。調査箇所では左岸側が主流になっており、左岸側の測線上では、流速が最大160cm/s程度となる箇所も見られ、河道中央寄りの流れ場でも最大130~140cm/s程度となる箇所が見られる。左岸上流の計測結果を図-2.7に示す。大塚

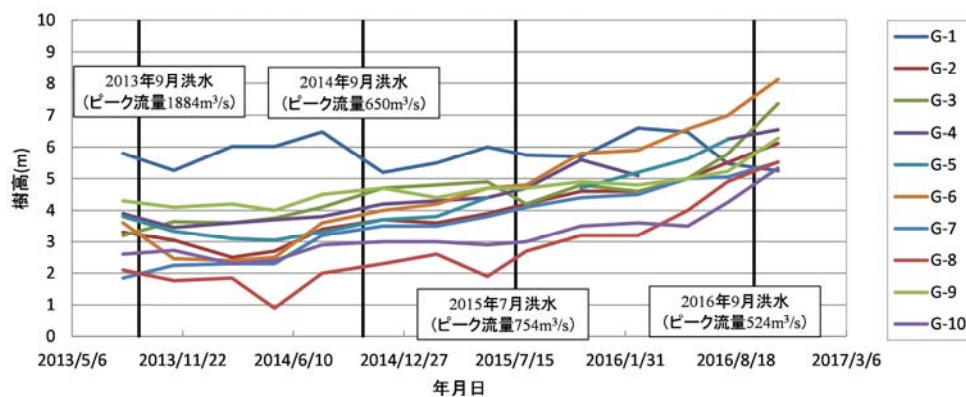


図-2.5 樹高の経年変化

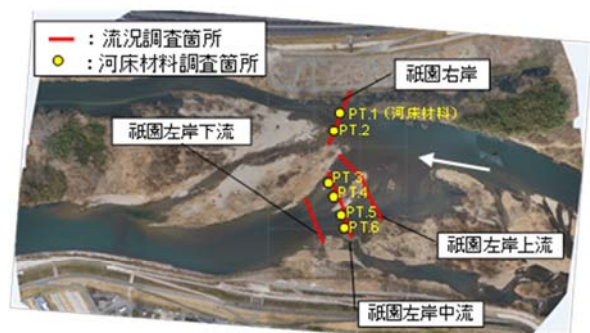


図-2.6 流況調査箇所(2016年), 河床材料調査箇所(2015年)

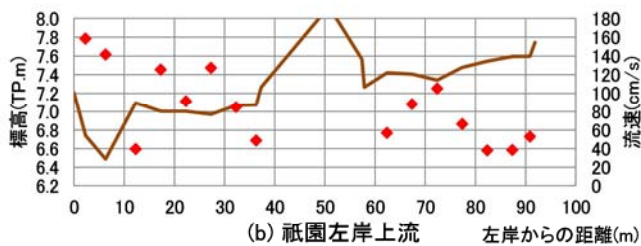


図-2.7 流況調査結果(祇園左岸上流, ◆: 流速値)

ら¹⁾が提案したアユの産卵場に適した流速は、60～100cm/s で選好値を 1.0 としている。左岸側の主流部で流速が 100cm/s を超過する箇所が見られるものの、平水時の流速の観点から見れば、祇園地区はアユの産卵場に適した箇所であることがわかる。

3. アユの生息状況

地元水産関係者へのヒアリングによると、祇園地区の切下げ箇所周辺ではかつてアユの産卵場であったが、滞筋部の河床低下などにより流れが単調になったことから、その機能を徐々に失っていた。しかし、2005年に実施された砂州の切下げにより、洪水中に低水路への流れの集中が緩和され、砂州や瀬が創出されたことにより、以前のようなアユの産卵場に適した状態に

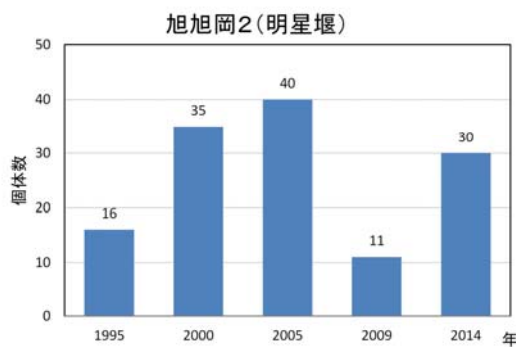


図-3.1 アユの個体数の遷移

回復してきている。しかしながら、水産関係者によると、アユの産卵場に適した河道の状態に回復しているものの、アユの数はむしろ減っているという。これは、砂州の切下げにより右岸側にも水みちができ、全体的に水深が浅くなったことから釣り人が入りやすくなり、産卵期にも関わらず網を使って漁を行い、産卵場を荒らしていること、また、瀬が創出されたことにより水深が浅くなり、カワウに狙われやすくなったことが原因として挙げられている。特に、カワウに関しては、樹林化の進行により、その棲み処が増え、より被害が増加した可能性も考えられる。

一方で、図-2.1の青破線で示した箇所(旭旭岡2(明星堰))と大原地区付近(旭旭岡3(大原))で行われた河川水辺の国勢調査の結果、2009年度及び2014年度で各箇所でもアユの生息が確認されている。このことから、アユは祇園地区を遡上していることが考えられる。また、「旭旭岡2(明星堰)」では1995年から5回調査が行われており、アユの個体数を整理すると、図-3.1に示すとおりである。2000年及び2005年には35、40個体数が確認されたが、2009年には減少し、

その後 2014 年には 30 個体まで回復している。

以上の結果から、祇園地区ではアユの生息数は減少しているものの、以前のような産卵場として適した環境が回復していることは事実であるといえる。

4. 礫河原再生後の物理環境の経年変化

祇園地区の切下げ事業の効果を調べるため、切下げを行った場合と行わなかった場合で解析を行い、河道形状の変化、植生消長およびアユの産卵場としての適性面積を比較する。まず、河川の流れ・河床変動解析ソフトウェアである iRIC に含まれる平面二次元ソルバー Nays2DH²⁾を用いて、年最大洪水に対して流況解析を行う。その結果を踏まえ、前野ら³⁾の植生消長モデルを用いて洪水時の植生の流失・倒伏、洪水後 1 年間の植生の成長・入植の計算を行う。得られた地形データは翌年の初期データとし、この計算を繰り返し行う。アユの産卵場としての生息環境評価の検討にあたっては、PHABSIM モデルを採用し、アユの選好曲線は、大塚ら¹⁾、永矢ら⁴⁾が検討した式を用いた。アユの産卵適性値 CSI は次式で与えられる。

$$CSI = SI(h) \times SI(v) \times SI(s) \quad (4.1)$$

ここで、 $SI(h)$ 、 $SI(v)$ 、 $SI(s)$ は、それぞれ水深、流速及び底質に対する選好値である。河床変動解析及び植生消長計算後の河道・植生状況をもとに、下牧観測所の平水流量 $40\text{m}^3/\text{s}$ (解析期間の平均値) で流況解析を行い、その水理量から適正値を算出した。また、PHABSIM を適用した箇所については、図-2.1 に橙破線で示す。

(1) 解析条件

祇園地区における砂州の切下げによる効果を検討するため、解析の対象区間は旭川の 14.3k~16.4k 区間とし、施工後の 2005 年から 2014 年まで解析を行った。

格子幅は概ね 10m とし、地形データについては 2004 年の定期横断測量や切下げの施工図面をもとに、また、河床の粗度、植生高、密生度等の設定に関しては、既往の現地調査結果⁵⁾をもとに設定した。境界条件については、上流端流量は下牧観測所 (河口から 19km) における年最大洪水の流量とし、洪水の立ち上がりから減衰までの時刻データを与えた。下流端水位は三野水位観測所 (河口から 11.6km) の水位データをもとに

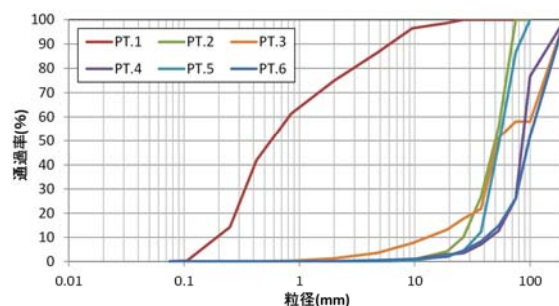


図-4.1 2015 年 7 月 河床材料調査結果
(採取位置は図-2.6 参照)

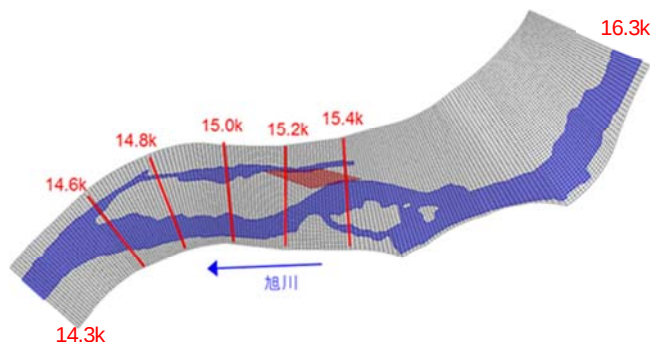


図-4.2 解析メッシュ図

別途構築した流況解析より得られた 14.3km 地点 (解析対象区間の下流端) の計算水位を与えた。ただし、2011 年、2013 年に関しては 14.3km 地点に設置された水位計により計測されたデータを用いた。河床変動モデルの交換層厚は関根の研究⁶⁾を参考に d_{90} の 3 倍程度の値を用いた。河床材料は高水敷と低水路に分けて、混合粒径 (高水敷 $d_{50}=34\text{mm}$ 、低水路 $d_{50}=58\text{mm}$) を与えた。ここで、高水敷は 2008 年に祇園地区で、低水路は 1996 年に中原橋付近で採取されたものとした。ただし、2015 年 7 月に実施した祇園地区での河床材料調査の結果 (図-4.1) によると、いずれの調査箇所も d_{60} は約 50~100mm であるが、右岸側の PT.1 では、他と比べて粒径は非常に小さく、 d_{60} は 1mm 以下となっているため、図-4.2 の赤色で塗りつぶした範囲については、右岸側の調査箇所である PT.1 と PT.2 の粒度分布の平均値を与えた。

(2) 解析結果

a) 河床変動及び植生繁茂による評価

砂州の切下げを実施した場合と実施しなかった場合の、各年度の河床変動量の平面図を図-4.3、4.4 に、植生高の平面図を図-4.5、4.6 に示す。

砂州の切下げを実施した場合は、2006 年の洪水後では施工箇所及びその上流で河床低下が著しい。2011

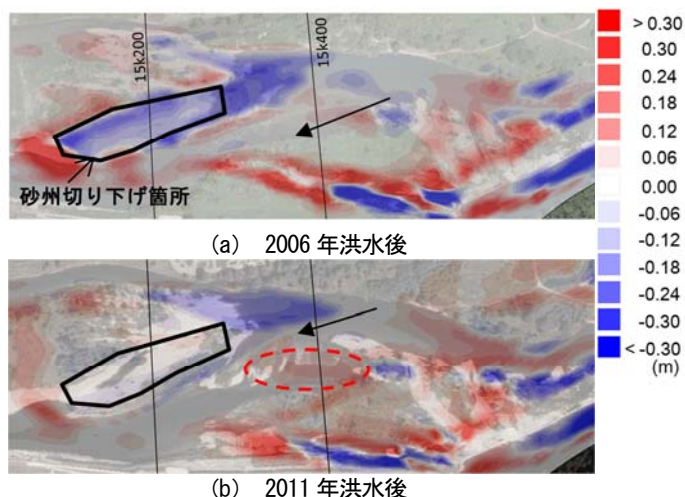


図-4.3 河床変動量 (切下げあり)

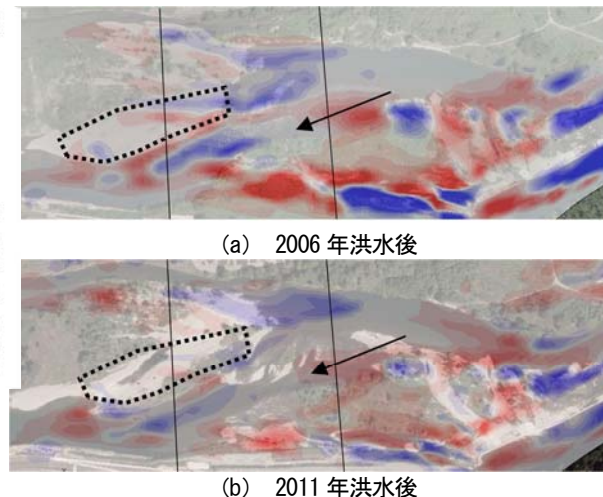


図-4.4 河床変動量 (切下げなし)

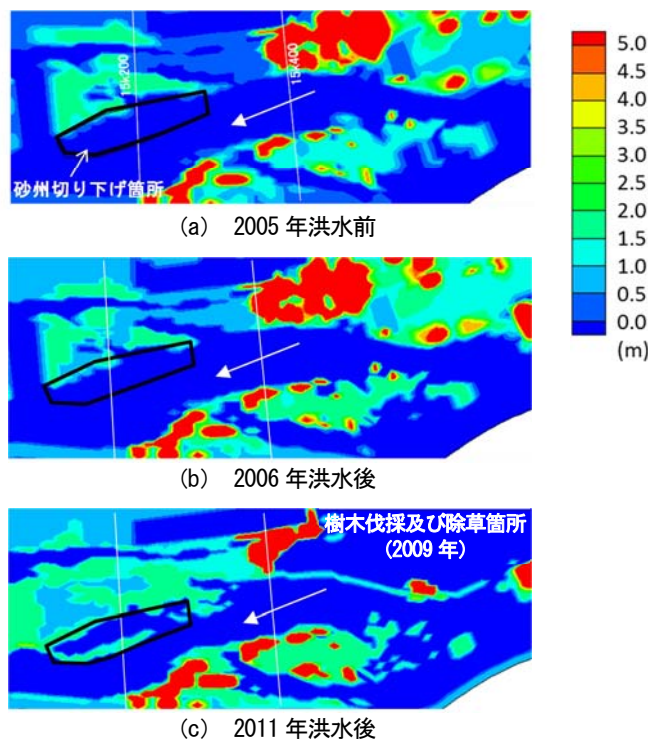


図-4.5 植生高 (切下げあり)

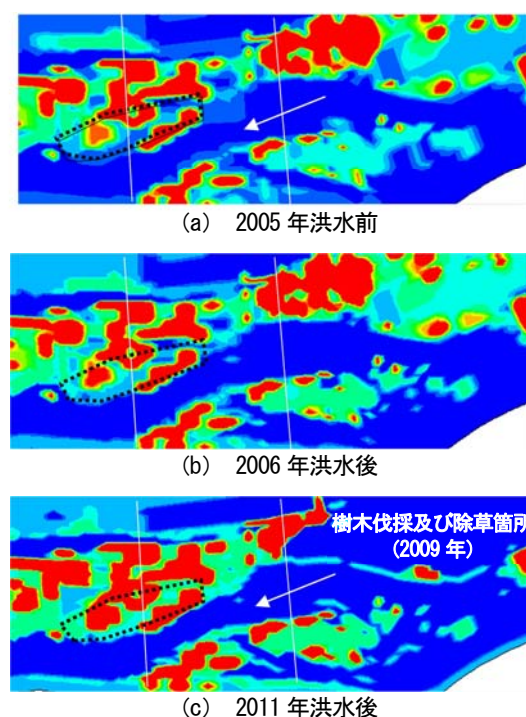


図-4.6 植生高 (切下げなし)

年の洪水後では変動量は小さくなるものの、河床変動の傾向は同様となっている。しかしながら、実際に測量された15.4kの横断面図では、2004年以降に、右岸側で側岸侵食とみられる著しい河床低下が生じているが、河床変動解析結果の横断形状では、河床低下があまり見られない。これは、本モデルでは側岸侵食を考慮できていないことが原因であると考えられる。植生高の結果については、2009年の樹木伐採及び除草による影響を除いて、大きな変化はないが、砂州の切下げ箇所に着目すると、2011年洪水後に、植生の入植が見られる。これは、2007年～2010年の間に大きな洪水がなかったために植生が繁茂し、2011年洪水によって

流出したものの、一部植生が残ったためである。

砂州の切下げを実施しなかった場合は、切下げ箇所の左岸側で河床低下が著しい。これは、左岸側へ張り出した固定砂州によって、この箇所では流れが集中したためであり、今後、河床低下が進行していくことが予想される。

以上のことから、砂州の切下げによって、礫河原の維持、拡大が図られたことに加え、左岸側の深掘れ箇所においても、河床低下が抑制されることがわかった。しかし、今後、砂州を攪乱するような大きな洪水が、数年続けて発生しなかった場合には、植生が繁茂し、砂州を切下げ前の状態に戻ってしまうことが懸念される。

b) PHABSIM モデルによる評価

アユ産卵場の適性については、適性値 CSI が 0.8 以上となる解析格子の面積で評価すると、図-4.7 に示すとおり、砂州の切下げを実施した場合の方が、切下げを実施しなかった場合と比べ、適性面積が大きくなっていることがわかる。特に、2010 年洪水後では $2,000\text{m}^2$ もの差がみられる。また、各ケースの経年的な変化について着目すると、切下げを実施しなかった場合には、 $6,000\text{m}^2$ 程度から、2007 年には $5,200\text{m}^2$ 程度に減少し、その後も同程度の値で推移している。これは、低水路の河床低下により平水時に冠水する面積の減少や流速が低下する箇所が現れたためである。切下げを実施した場合では、2010 年まで適性面積は増加傾向を示したが、2011 年洪水後は 900m^2 程度減少した。これは、2011 年洪水により、一部で早瀬が形成され、流速が増大したためである。

以上より、礫河原再生事業における砂州の切下げによってアユの産卵場の創出につながることがわかった。また、地元水産関係者へのヒアリング調査からもアユの産卵場の回復が確認されており、この解析結果の妥当性が示された。

5. まとめ

本研究で得られた知見を以下に纏める。

- 現地調査により、近年、大規模な洪水が発生していないためか、祇園地区では年々樹木が成長していることが確認できた。一方で、新たな水みちの形成が進行しており、徐々に砂州の形状が変化している。来年度以降も定期的な調査を行い、データを蓄積していきたいと考える。
- 平水時における現地の流速調査を行い、流速値が概ね、アユの産卵場にとって適していることがわかった。また、地元水産関係者へのヒアリング等から、祇園地区周辺の水域がアユの産卵場に適していることが言える。
- 河床変動解析結果から、砂州を切下げることにより、礫河原の維持、拡大が図られたことが明らかになった。また、15.2k 左岸付近の流れが集中する箇所では、砂州の切下げによって、深掘れ箇所の河床低下を抑制することがわかった。
- 植生消長計算結果から、砂州切下げ箇所においても、砂州を攪乱させる大きな洪水が数年間発生しなかった場合は、植生の入植、繁茂により、砂州を切下げ

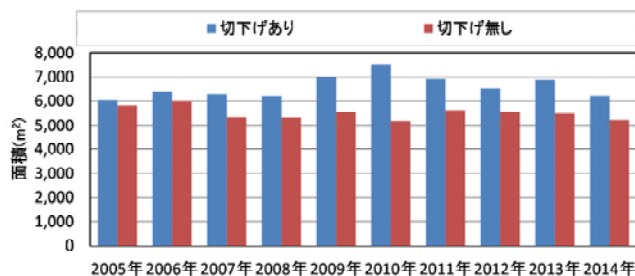


図-4.7 アユの産卵場適性面積 ($CSI \geq 0.8$)

る前の状態に戻ってしまうことが懸念される。

- 生息環境評価 (PHABSIM) の結果、砂州の切下げによって、新たに瀬が形成されることから、アユの産卵場の創出につながることが定量的に示された。

参考文献

- 1) 大塚法晴, 鬼束幸樹, 東野誠, 高見徹, 永矢貴之: アユの産卵床と物理環境に関する研究～五ヶ瀬川, 特に派川大瀬川をフィールドとして～, 土木学会河川懇談会, 共同研究最終報告, 2005.
- 2) 北海道河川財団: iRIC, <http://i-ric.org/ja/>
- 3) 前野詩朗, 吉田圭介, 松山悟, 藤田駿佑: 旭川大原試験区における植生消長シミュレーションモデルの構築と検証, 土木学会論文集, B1 Vol.70, No.4, pp.I_1369-I_1374, 2014.
- 4) 永矢貴之, 釜瀬明日香, 白石芳樹, 鬼束幸樹, 東野誠, 高見徹, 東均, 秋山壽一郎: アユ産卵場の保全と創出を目指した河道掘削断面の選択手法の提案, 河川技術論文集, 第 15 巻, pp.79-84, 2009.
- 5) 前野詩朗, 渡辺敏, 藤塚佳晃: 簡易に得られる植物特性値を考慮した数値解析モデルの精度向上の提案, 土木学会論文集, No.803 / II -73, pp.91-104, 2005.
- 6) 関根正人: 移動流れの水理学, 共立出版, pp.153-184, 2005.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人 ウエスコ学術振興財団に深く感謝いたします。また、国土交通省中国地方整備局岡山河川事務所から多数の貴重なデータを頂きました。記して謝意を表します。最後に、岡山大学 環境生命科学研究科の平井康隆 様, 岩城智大 君, 山口華穂さんには本研究の現地調査や結果の整理等で協力いただきました。記してお礼申し上げます。

旭川感潮域のケレップ水制域における塩分流動の現地観測および数値解析

岡山大学大学院環境生命科学研究科

赤穂 良輔

概要

岡山市を流下する旭川下流域は緩混合型の汽水域であり、河口から2.2～6.6 kmの区間の左岸側に19基のケレップ水制が設置されている。このケレップ水制域は鳥類や貝類などの生息場となっているため、本水域の水環境を保全することは非常に重要である。この領域における物理環境の特性を把握するためには、水制周辺の順流・逆流時の流況と、長期的な塩水流動の特性について調査する必要がある。

本研究では、季節的な塩水流動の基本的な特徴を理解するために、3種類の現地観測と準三次元モデルを用いた数値解析を行った。観測結果より、約23PSUの高い濃度の塩水が夏季を除き下層に存在していることが明らかになった。また、水制によって止水域が発生し、高濃度の塩水が水制間水域に貯留していることが示された。さらに、観測データを用いて各季節の解析を行ったところ、水制周辺の流況や冬季に水制域の上流まで海水が遡上する現象を再現することができた。

1. 序論

旭川は岡山県の中央部に位置し、岡山市の中心部を貫流して児島湾に注ぐ、流域面積1,810 km²、幹川流路142 kmの一級河川である。旭川下流域は汽水域であり、また図-1に示す河口から2.2～6.6 kmの区間の左岸側にケレップ水制が19基設置されている。

ケレップ水制とは、図-2に示すようなT字型の河川構造物であり、旭川では昭和10年代に設置された。本水制域の設置当初の目的は、水の流勢を川岸から遠ざけ堤防の破損を予防することと、水路内の流勢を強めて掃流力を増加させ土砂の堆積を防ぎ水深を維持して舟運の便を図ることであった。一方、近年では、シジミやエビ、カニ類などの生息場となっており、この河川環境を保全することは非常に重要な課題となっている。

感潮河川では、平常時に低層に塩水が侵入し汽水状態が形成される。この汽水域では、多様な物理・化学的環境や生物生息地が微妙な釣り合いの下で成立している。そしてそこに生息・生育する生物は、微妙なバランスの上に形成される環境に依存しているため、わずかな環境の変化が生物の生息・生育に大きな影響を及ぼすことがある。また、旭川下流域における水環境について支配的な流れは図-3に示すような塩水楔であることが既往の研究より明らかとなっている。

したがって、水制域の良好な環境状態を維持するため



図-1 旭川周辺の航空写真(Google Map)



図-2 旭川ケレップ水制域の航空写真 (Google Map)

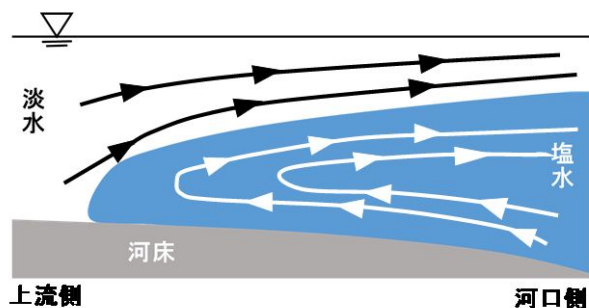


図-3 下流域における塩水楔

には、水制周辺の流況を調べるとともに、感潮河川における長期的な塩水流動の特性を把握する必要がある。旭川においては、ケレップ水制が水環境にどのような影響を与えているのかを知ることができれば、河川環境保全のための新たな手掛かりを得ることができると考えられる。長縄ら²⁾は、感潮河川である旭川における現地観測によって、ケレップ水制域における塩分挙動について研究した。また、辻本ら³⁾は、岡山県児島湾において有孔虫群集の季節変動を調べるために底質の有機物および塩分を季節ごとに観測した。一方、ケレップ水制域における季節的な塩水挙動の検討はされていない。

そこで本研究では、現地観測および数値シミュレーションを用いて、汽水域のケレップ水制域を含む領域での季節的な塩水挙動を把握することを目的とする。

2. 現地観測

2.1 定点観測

塩分が季節によってどう変動するのかを長期的に調べるために、図-4 に示す塩分観測装置を旭川河道内に設置し、塩分の定点観測を実施した。塩分測定器には、HOBO 電気伝導率ロガーCO-U24-002C を使用し、水面付近、河床付近、中層(水面より2 m)の3点の電気伝導率を一時間毎に測定するように設定した。計測された電気伝導率より塩分を換算し、各水深における塩分の時間変化を推定する。

図-5 に設置位置を示す。本観測では、ケレップ水制群の上流に位置する桜橋(河口からの距離 6.73 km)より 20 m 程度下流側に設置した。設置位置の平均水深は約 4 m で、橋脚による流れの変化の影響はほぼないと考えられる。測定器は2~3 か月ごとに回収し、データ収集後に再設置を行う。観測期間は 2016 年 1 月 14 日から 2017

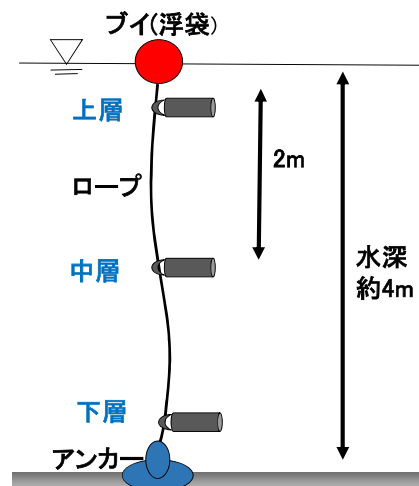


図-4 塩分観測装置の概要図

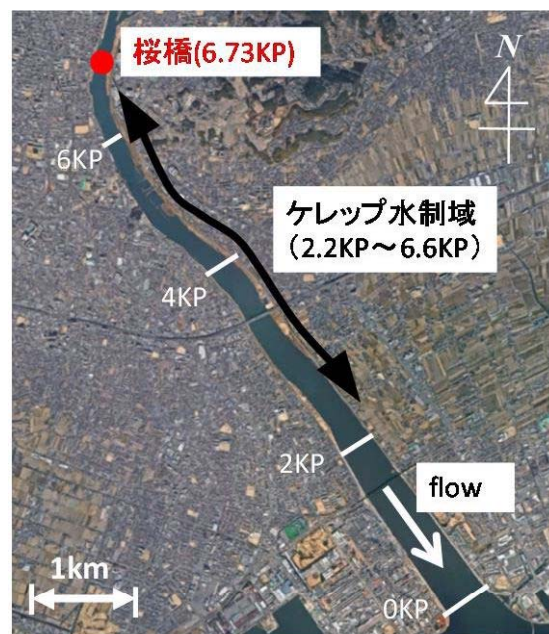


図-5 観測装置の設置位置 (Google map)

年 3 月 10 日であり、本研究では、2016 年 11 月 25 日までの観測データを用いた。

2.2 ケレップ水制間の集中観測

ケレップ水制が周辺の塩水挙動に与える影響を調べるために、水制と水制の間の領域において塩分の鉛直分布を短時間で集中的に観測した。図-6 に示すような観測装置を用いて鉛直分布を調べた。塩分測定器には定点観測で使用したものと同様のものを用い、塩分と同時に水深を記録するために水位測定器として、HOBO-U20 水位ロガー(U20-001-04)を用いた。それぞれ 1 分毎に電気

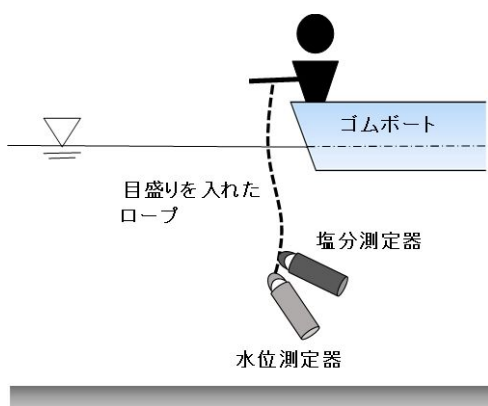


図-6 水制間観測方法の概要図

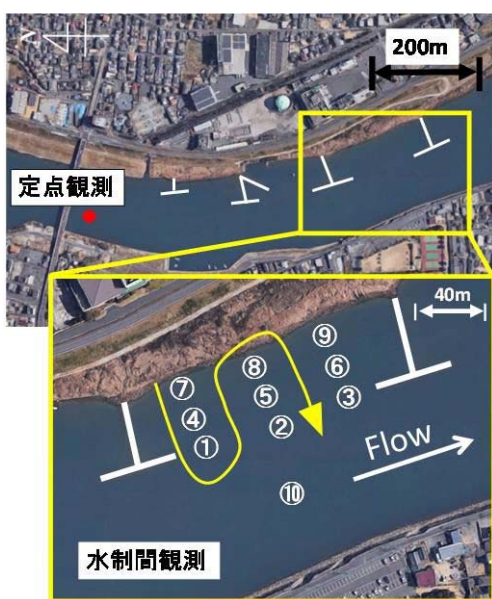


図-7 水制間観測の実施経路 (Google map)

伝導率と水圧を測定するように設定し、1分毎に約50cmずつ測定器を沈めていき、塩分の鉛直分布を測定した。図-7に示すように水制間の任意の9点と、浅瀬と渚を比較するために渚の任意の1点にて測定した。観測は2016年10月31日の下げ潮(順流時)と11月8日の上げ潮(逆流時)の計2回実施し、順流時と逆流時の違いについて検討する。1回目の観測時に観測地点の水平方向座標値(XY座標)をトータルステーションで記録し、2回目は、1回目の観測点に可能な限り近い点で測定した。

2.3 縦断観測

河川の縦断方向で塩分の鉛直分布がどのように変化するかを把握するために、定点観測と水制間観測を行っ

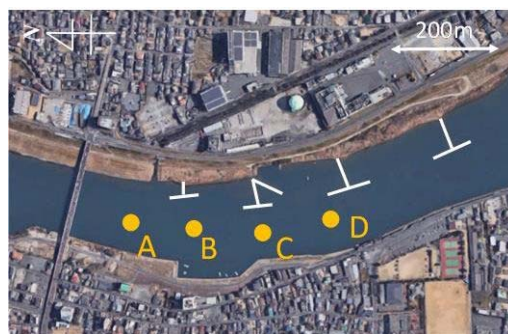


図-8 縦断観測の測定場所 (Google Map)

た場所を結ぶ縦断方向に沿って観測を行った。水制間観測で用いたものと同じ観測装置、同じ観測方法で観測した。観測箇所は図-8に示す4つの点A～Dで、間隔はそれぞれ約100mである。本観測は、2016年12月21日の上げ潮(逆流時)に行った。

3. 数値解析

3.1 塩分流動モデル

塩水流動を生じさせる圧力勾配は性質上“順圧”と“傾圧”に分けられる。順圧とは水位差による全層的な圧力勾配であり、これによる運動は浅水流方程式で記述できる。一方、傾圧は密度の鉛直分布の差異による断面内の圧力勾配である。そこで本研究では、浅水流方程式と同等のフレームで三次元性が考慮できる準三次元モデルを用いることによって、浅水流方程式を用いて順圧的な流動を求めた後に、傾圧的流動による“分散の効果”を加えるという、赤穂ら⁴⁾が開発した塩分流動モデルをベースに修正を加えた。以下、塩分流動モデルの概要について記述する。

(1) 塩分の鉛直分布

本研究では、塩分の鉛直分布を線形と仮定することにより、傾圧の効果を簡略に考慮できる二次元塩分流動モデルを用いた。塩分の鉛直分布の概念図を図-9(a)に示す。ここで、横軸は旭川における塩分の最大値 S_i に対する相対塩分 $\sigma = S/S_i$ であり、左側が淡水($\sigma = 0$)、右側が旭川の塩分の最大値($\sigma = 1$)である。また縦軸は水面からの深さを z 、水深を h としたとき、 $\xi = z/h$ で定義される相対水深である。平均相対塩分 $\bar{\sigma} (= \bar{S}/S_i, \bar{S}$: 塩分の鉛直平均値が0(淡水)や1(旭川の塩分最大値)の場合には塩分は鉛直方向に一樣になる(このとき、 $\Delta\sigma = 0$)。一方、中間密度の場合は下

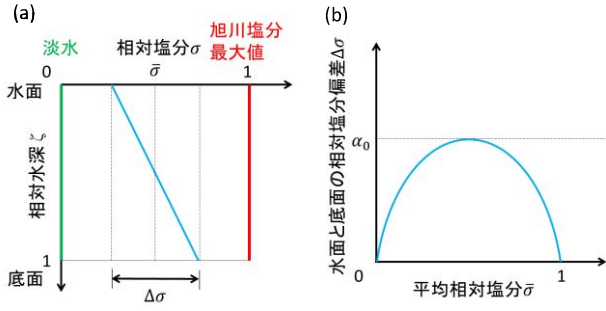


図-9 塩分の鉛直分布の概念図：(a)相対塩分の鉛直分布，(b)相対塩分偏差と平均相対塩分の関係の近似曲線

層の塩分が上層に比較して大きくなる。

本研究では， $\bar{\sigma}$ および上層と下層の相対塩分偏差 $\Delta\sigma = \Delta S/S_i$ を用いて，次式のように相対塩分の鉛直分布を仮定した． $\bar{\sigma}(= \bar{S}/S_i, \bar{S}$:塩分の鉛直平均値)

$$\sigma(\zeta) = \bar{\sigma} + \Delta\sigma(\zeta - 1/2) \quad (1)$$

また，

$$\begin{cases} \bar{\sigma} = 0, 1 \rightarrow \Delta\sigma = 0 \\ \bar{\sigma} = \frac{1}{2} \rightarrow \Delta\sigma = \text{Max} \end{cases} \quad (2)$$

の条件より， $\Delta\sigma$ と $\bar{\sigma}$ の関係を式(3)のように放物線で近似する(図-9(b))．

$$\Delta\sigma = 4\alpha_0\bar{\sigma}(1-\bar{\sigma}) \quad (3)$$

ここで， α_0 は 0～1 の範囲の値をとる偏差係数であり，混合状態を示すパラメータである． α_0 の値が小さいほど水面と底面の塩分偏差が小さい．すなわち混合が強い状態を示す．また，淡水密度 ρ に対する塩水の相対密度差を $\varepsilon = \Delta\rho/\rho$ ($\Delta\rho$ は塩水と淡水の密度差)とし，相対塩分を相対密度差の関係を線形で仮定する(図-10)．

$$\varepsilon = \varepsilon_0\sigma \quad (4)$$

ここで， ε_0 は海水の相対密度差で 0.031 とする．

(2)偏差流速のモデル化

密度差によって生じる過剰圧力は $\rho g\varepsilon$ と書けるので，これを水面から深さ z まで積分することによりその層に働く全水圧が求まる．具体的にはそれぞれ式(5)，(6)より得られる．

$$P(z) = \rho g \int_0^z \varepsilon dz = \rho g \varepsilon_0 \int_0^z \sigma dz \quad (5)$$

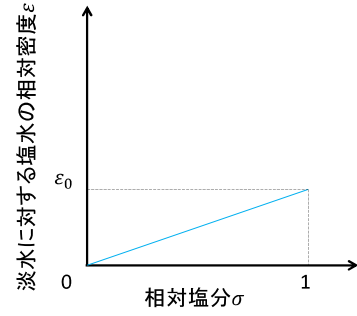


図-10 淡水に対する相対密度差 ε と相対塩分の関係 (ε_0 は海水の相対密度差：0.031)

$$F(z) = \int_0^z P dz \quad (6)$$

本研究では，モデルを単純化するために，まず式(7)に示す重み関数を定義し，上層と下層に作用する全水圧 F_u, F_d を式(8)より与える(図-11(a))．

$$w_u = \begin{cases} 1 & 0 \leq \zeta \leq 1/2 \\ 0 & 1/2 \leq \zeta \leq 1 \end{cases} \quad (7)$$

$$w_d = \begin{cases} 0 & 0 \leq \zeta \leq 1/2 \\ 1 & 1/2 \leq \zeta \leq 1 \end{cases}$$

$$\begin{cases} F_u = \int_0^{\zeta} P \cdot w_u d\zeta = F(1/2) \\ F_d = \int_0^{\zeta} P \cdot w_d d\zeta = F(1) - F(1/2) \end{cases} \quad (8)$$

今，図-11(b)のように順圧分布を P_t (赤線)，実際の圧力分布を P (緑線)とすると傾圧は $P_c = P - P_t$ (青斜線)となる．塩水層厚が縦断方向に変化するため上層では $P < P_t$ となり右向きに傾圧が生じ，合力 f_u (青矢印)は順圧成分による合力 f (赤矢印)に対して小さく，下層では $P > P_t$ となるため合力 f_d は大きくなる．本研究では，モデルを単純化するために，傾圧成分を Δf とし， f_u, f_d を以下の様に表す(図-11(c))．

$$\begin{cases} f_u = \partial_x F_u = f - \Delta f, \\ f_d = \partial_x F_d = f + \Delta f \end{cases} \quad (9)$$

式(9)を整理することで傾圧成分は式(10)より得られる．

$$\Delta f = \frac{1}{2}(\partial_x F_d - \partial_x F_u) \quad (10)$$

その結果，順圧により生じる平均流速 $\bar{U}$ に対して，偏差流速 u' が生じる．本研究では，流速の鉛直プロファイルと塩分プロファイルと同様に以下のような線形と仮定する

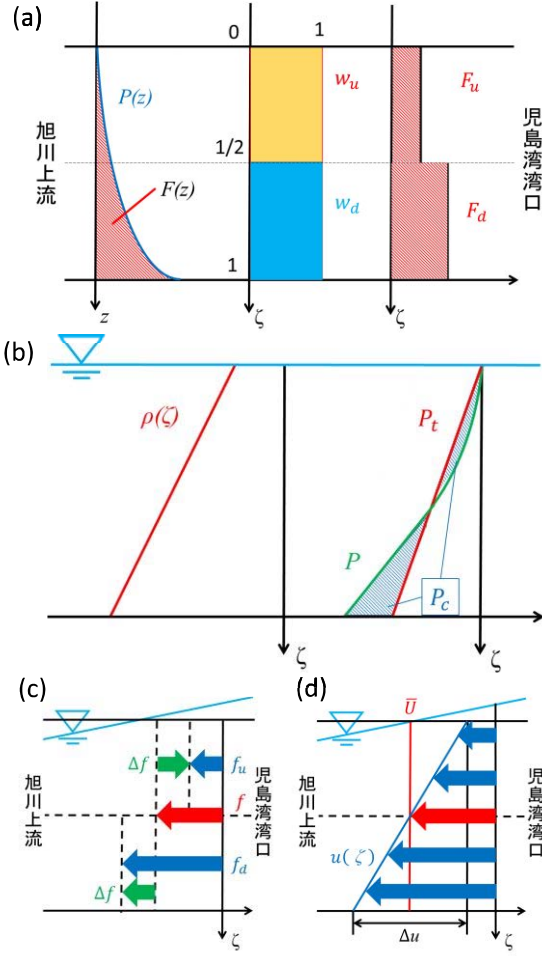


図-11 圧力分布のアンバランスによる速度残差の生成メカニズム (a) 重み関数および全水圧, (b) 密度および水圧の鉛直分布, (c) 合力のアンバランス, (d) 流速の鉛直分布 (図-11(d)).

$$u(\zeta) = \bar{U} + u' = \bar{U} + \Delta u(\zeta - 1/2) \quad (11)$$

$\bar{U}$ による塩分フラックスに, u' による付加的な塩分フラックスを加えることで移流分散モデルの構築を行う. 層内の傾圧成分 Δf による力のアンバランスが界面での摩擦によって解消されると仮定し, さらに界面摩擦が偏差流速 Δu の2乗に比例すると仮定することで式(12)が得られる. ここに ϕ は無次元のパラメータである.

$$\rho\phi\Delta u^2 = \Delta f \quad (12)$$

式(1), (3)で仮定した塩分の鉛直分布を式(5)に代入し, 式(6)~(10)を順番に解くことで, 偏差流速 Δu が式(13)より得られる.

$$\Delta u = \pm \sqrt{\frac{g\varepsilon_0 h^2}{8\phi} \left| \frac{\partial \bar{\sigma}}{\partial x} \right|} = \pm \sqrt{\frac{g\varepsilon_0 h^2}{8\phi S_i} \left| \frac{\partial \bar{S}}{\partial x} \right|} \quad (13)$$

なお, 正負の符号は $\partial \bar{S} / \partial x$ の符号と一致する. すなわち, 上層の偏差流速は塩分の低い方から高い方へ, 下層では逆向きに向かうことになる.

(3) 塩分の付加的フラックス

平均流速および偏差流速によって生じる塩分フラックスは式(14)のように書かれる.

$$Flux = \bar{S}\bar{U} + \int_0^\zeta s'u'd\zeta \quad (14)$$

ここに $\bar{S}$, $\bar{U}$ は平均塩分および平均流速, s' , u' は偏差塩分を表す. 式(1), (10)を代入することで付加的フラックスは次式より得られる.

$$\begin{aligned} \int_0^\zeta s'u'd\zeta &= \int_0^\zeta \Delta u \Delta s (\zeta - 1/2)^2 d\zeta \\ &= \pm \frac{\alpha_0 \bar{S} (S_i - \bar{S})}{6S_i} H^2 \sqrt{\frac{g\varepsilon_0}{2\phi S_0} \left| \frac{\partial \bar{S}}{\partial x} \right|} \end{aligned} \quad (15)$$

(4) 塩分の輸送方程式

塩分の輸送方程式は次式で書かれる.

$$\partial_t (h\bar{S}) + \partial_x (M\bar{S} + F_x) + \partial_y (N\bar{S} + F_y) = 0 \quad (16)$$

ここで $M\bar{S}$ と $N\bar{S}$ はそれぞれ x , y 方向の順圧による塩分フラックスであり, M , N は流れの準三次元モデルより得られた x , y 方向の水深平均線流量を用いる. また, F_x , F_y は上で求めた傾圧による塩分の付加的フラックスであり, それぞれ次式より求められる.

$$F_x = \pm \frac{\alpha_0 \bar{S} (S_i - \bar{S})}{6S_i} h^2 \sqrt{\frac{g\varepsilon_0}{2\phi S_0} \left| \frac{\partial_x \bar{S}}{\partial x} \right|} \quad (17)$$

$$F_y = \pm \frac{\alpha_0 \bar{S} (S_i - \bar{S})}{6S_i} h^2 \sqrt{\frac{g\varepsilon_0}{2\phi S_0} \left| \frac{\partial_y \bar{S}}{\partial y} \right|} \quad (18)$$

3.2 離散化手法

本研究では, 三角形格子における有限体積法を用いて基礎方程式の離散化を行った. Godunov 系統の計算手法を採用しており, 特性線に沿って波動方程式を分解し, 波の風上方向を考慮した定式化を行うことで, 安定かつ高精度に移流計算を行うことができる. また GPGPU を用いた高速並列計算プログラムを作成し, 計算時間の短

縮化を行った。

3.2 再現計算

(1) 計算条件

図-12 に計算領域および標高を示す。下流端を見島湾の湾口、上流端を旭川の河口より 10 km とし、図-13 のように三角形非構造格子で分割した。また、ケレップ水制は三角形の辺に沿うように配置させ、越流量を本間の越流公式より与えた。境界条件として、上流端には北方水位・流量観測所の流量を与え、下流端には宇野潮位観測所の水位を与えた。ただし、本解析期間の北方における水位・流量データはともに未公開であったので、三野水位観測所の水位データから北方流量観測所での流量を求めた。また、灌漑期である夏季(6 月から 9 月の約 4 ヶ月間)は新堰ゲートが操作されるため、北方流量ではなく新堰で観測された流量を与えた。見島湾内の塩分については観測データがないため、旭川で観測された塩分の最高値 $S_i=24$ [PSU]を与え、湾内については塩分の流動を計算せず一定とした。塩分の初期条件については、水制域において $S_i=24$ [PSU]を与えた。

本研究では、平水時での季節変化や水制の有無による塩水挙動の変化、さらに出水後の塩分の回復具合の検討を目的としている。そこで計算期間を表-1 のように平水時 3 日間、出水時は助走期間を含めて 4 日間とした。それぞれ初日の 0:00 から最終日の 24:00 までとした。ただし、夏の平水時においては、新堰流量のデータ数の都合で計算期間を 1 日とした。また、出水時における新堰流量データは観測されていないため、出水時には夏も北方流量を与えた。出水時の解析として夏を選んだ理由は後述することとする。

(2) 観測結果を用いた偏差係数の設定

式(26), (27)に示すように、傾圧による塩分の付加的フラックスは、混合の強弱を表すパラメータ α_0 を含んでいる。本研究では、2.1 で示した定点観測から得られた、桜橋付近における上層と下層の塩分を用いて以下のように α_0 を求めた。定点観測から旭川における塩分の最大値 $S_i=24.72$ [PSU]が得られた。平均相対塩分 $\bar{\sigma} = \bar{S} / S_i$ と相対塩分偏差 $\Delta\sigma = \Delta S / S_i$ の関係を整理すると図-14 のようになり、最小二乗法を用いて分布を二次曲線で近似した。このとき、 $\alpha_0 = 0.819$ となる。またこの値は、季節ご

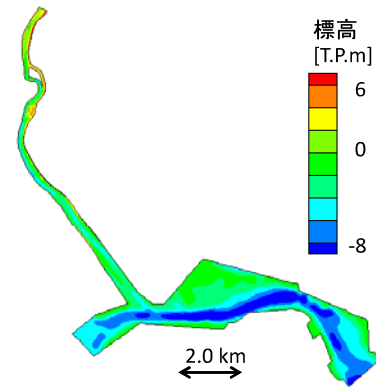


図-12 計算領域および標高

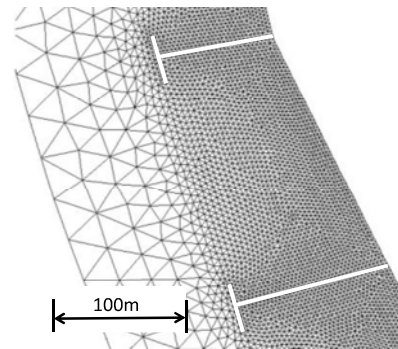


図-13 ケレップ水制周辺の計算格子

表-1 各季節における解析期間

	平水	出水
冬	1/24～1/26	
春	4/15～4/17	
夏	7/7	7/8～7/11
秋	9/10～9/12	

とに変動すると考えられるが、今回は観測器の故障により夏以降の上層のデータが得られていないため、冬～春のデータから求めた α_0 の値で一定として解析を行った。

4. 結果と考察

4.1 定点観測の結果と考察

図-15 は 2016 年 1 月 14 日 16 時から同年 11 月 25 日 11 時までの各層の塩分の推移を示している。図中の紫点線で示した a～g の 7 つの期間に分けて検討を行う。具体的な各期間の範囲を表-2 に示す。

ここで、上層(青線)については、観測器の故障のために期間 d からのデータが得られていない。そのため、以降の上層塩分は中下層塩分から線形の式を用いて推定し、グラフには黄色線で示した。ただし、計算の結果、上

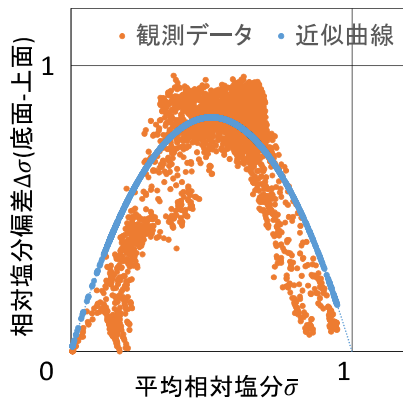


図-14 観測結果から得られた相対塩分偏差と
平均相対塩分の関係

層塩分が負の値となるときは 0 PSU とした。

また、期間 e と期間 f の境界に注目すると、データが不連続になっていることがわかる。これは、9 月 2 日に現地で観測器を回収した際、観測器にフジツボ等が付着しており、観測器が正常に機能していなかったと考えられる。具体的にいつから観測器が正常に機能しなくなったのかは定かではないが、6 月の桜橋付近の下層における塩分の値は 17 PSU 付近であることが既往研究で判明している。本観測データでも、期間 d では下層塩分の最大値が約 15 PSU となっていて、既往データの値に近い。一方、期間 e については、中層と下層に設置した 2 つの観測器の塩分データの値がほぼ同じもしくは中層のほうが高くなっている。塩水は淡水よりも密度が高いため、中層よりも下層の塩分のほうが基本的には高いはずである。よって観測器設置後約 1 ヶ月半から正常に機能しなくなっていたのではないかと考えられる。この「観測器が正常に機能していない可能性のある時期」の特徴として、塩分が上流流量や下流水位の動きにほとんど影響を受けず変動幅が小さいことが挙げられる。期間 g にもこの特徴は当てはまり、また 11 月 25 日に現地で観測器を回収した際、観測器にフジツボ等が付着していたため、期間 g も同様に観測器が正常に機能していなかった可能性があるといえる。以上の理由から、期間 e と期間 g は考察の対象外とする。

ここでは、始めに全期間を通した観測結果について述べ、その後に各期間の観測結果の特徴について述べる。

(1)全期間

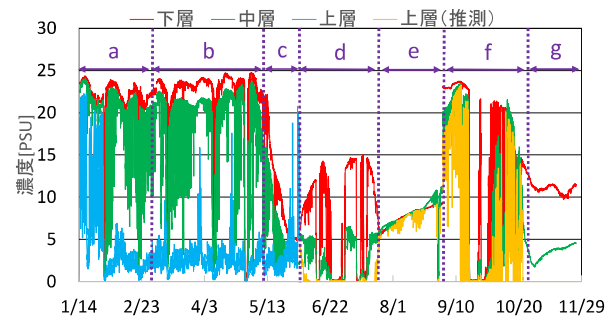


図-15 各層の塩分の時間変化

表-2 各期間の範囲

期間	日時
a	01/14～02/29
b	03/01～05/11
c	05/12～06/02
d	06/03～07/22
e	07/23～09/01
f	09/02～10/24
g	10/25～11/25

図-16 は桜橋における平均塩分(上)とケレップ水制域上流に位置する北方流量観測所における流量(下)の時間変化を示している。平均塩分は、冬から夏にかけて低下し、秋には再び上昇し、期間 a と f で高い値を取っている。北方流量の推移と比較すると、ケレップ水制域の平均塩分は、上流からの流量の増減と負の相関があることが確認できる。

(2)期間 a

図-17,18 は冬季である期間 a における平水時の下流端水位(宇野水位)および上流端流量(北方流量)と、桜橋における塩分の時間変化を示している。この期間では、北方流量は約 25 m³/s でほぼ一定であり、下層塩分は大きな変動がなく 20 PSU 以上で安定している。一方、上層塩分は宇野水位の変動と概ね一致して、5～20 PSU の間を変動している。

図-19,20 は北方流量が 150 m³/s 以下の比較的小規模な出水時の結果を示している。平水時には 20 PSU 付近を維持していた中下層塩分が北方流量の増加とともに急激に減少し、その後、北方流量の緩やかな減少とともに、潮汐の動きに合わせて塩分が下層から回復している。ただし、この出水を境にしてそれまで 5～20 PSU の間を変動していた上層塩分は、北方流量が平水時に戻った後も回復しないまま、3 PSU 以下の値を維持するようになっている。

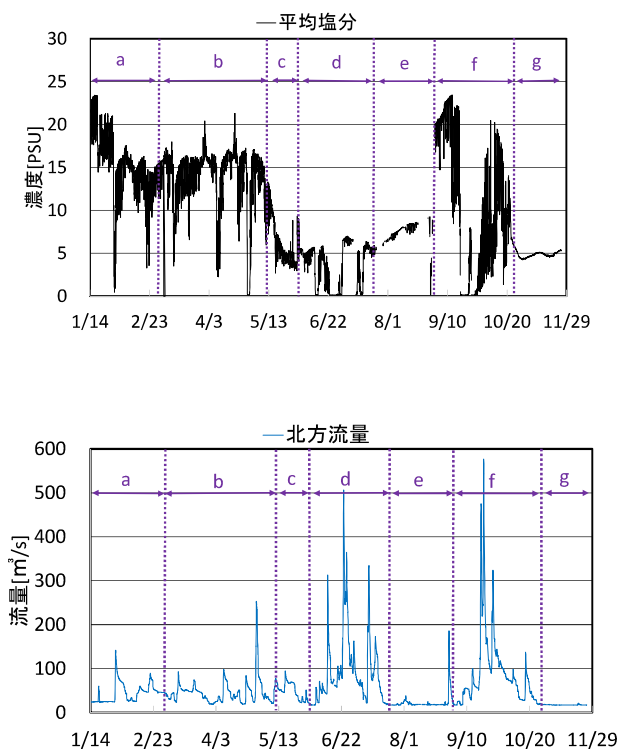


図-16 平均塩分と北方流量の推移：(上) 平均塩分，(下) 北方流量

(3)期間 b

図-21,22 は春季にあたる期間 b において小規模な出水が発生した時の、宇野水位および北方流量と桜橋における塩分の時間変化を示している。出水により、それまで安定して 20~24 PSU を維持していた中下層塩分が潮汐の動きに合わせて約 4 日間、中層は 0~20 PSU の間を、下層は 5~23 PSU の間を変動し、不安定になっている。また、流量が増えた際、下層塩分が減少し始めるのが中層塩分よりも約 8 時間遅れている。

図-23,24 はより大きな出水が発生した時を示している。小規模な出水時と同様に、下層塩分が減少し始めるのが中層塩分よりも約 8 時間遅れている。これらより、春季では冬季と比べ、流量が増えても下層の塩水は押し流されにくい考えられる。

(4)期間 d

図-25,26 は梅雨から夏季にあたる期間 d における出水時の宇野水位および北方流量と、塩分の時間変化を示している。出水直前の平水時から塩分が全体的に他期間よりも低く、中層では 5 PSU 付近、下層では 15 PSU 弱を維持している。ただし、平水時の北方流量は 40 m³/s 前後

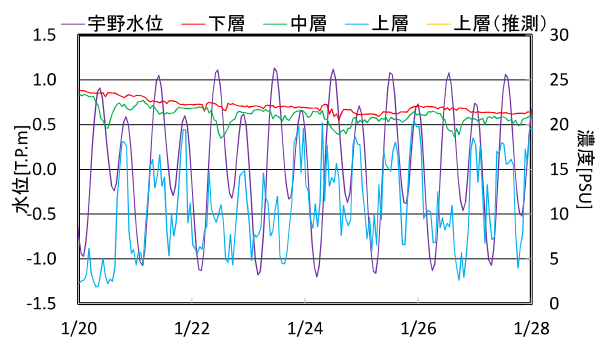


図-17 期間 a の平水時における宇野水位と塩分の推移

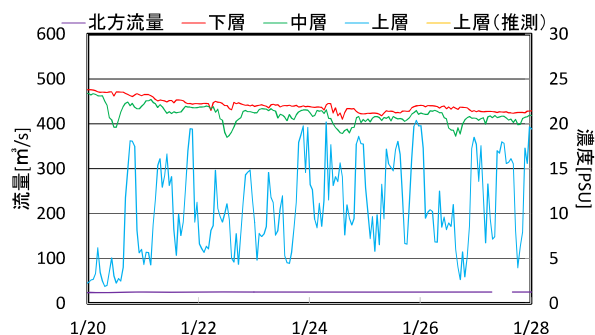


図-18 期間 a の平水時における北方流量と塩分の推移

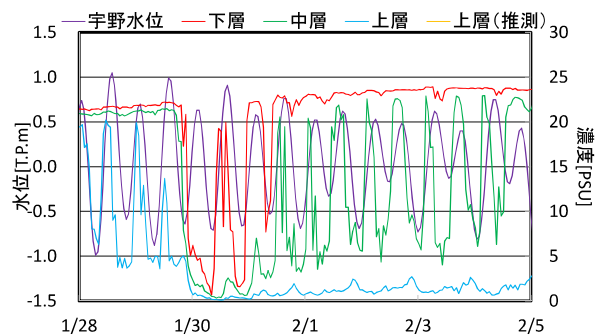


図-19 期間 a の小規模な出水時における宇野水位と塩分の推移

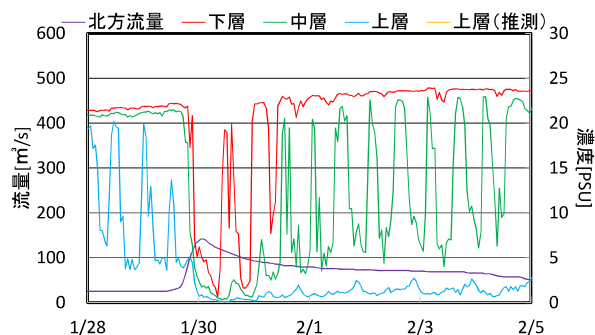


図-20 期間 a の小規模な出水時における北方流量と塩分の推移

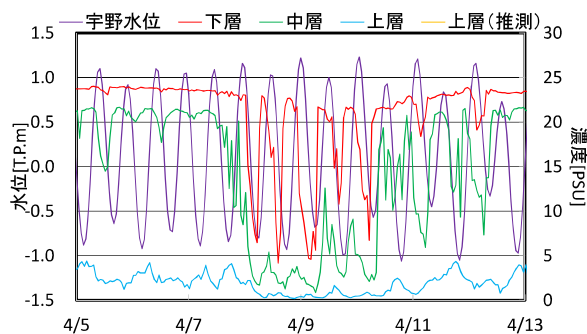


図-21 期間 b の小規模な出水時の宇野水位と塩分の推移

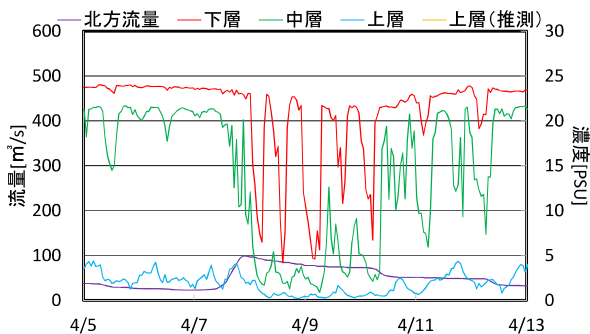


図-22 期間 b の小規模な出水時の北方流量と塩分の推移

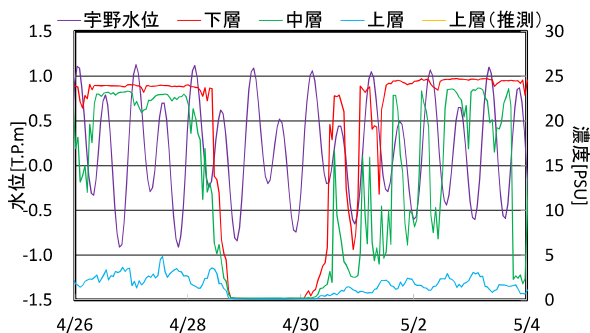


図-23 期間 b の出水時の宇野水位と塩分の推移

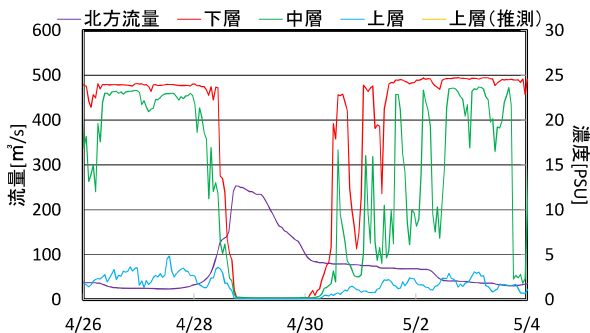


図-24 期間 b の出水時の北方流量と塩分の推移

であり、他の季節に比べて特別に大きくはなく、(1 月平水時: 約 25 m³/s, 4 月平水時: 20~50 m³/s, 9 月平水時: 17~50 m³/s), また、新堰ゲートの操作により、クレップ水

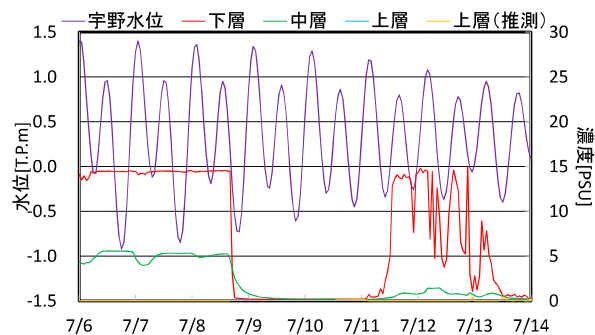


図-25 期間 d の出水時における宇野水位と塩分の推移

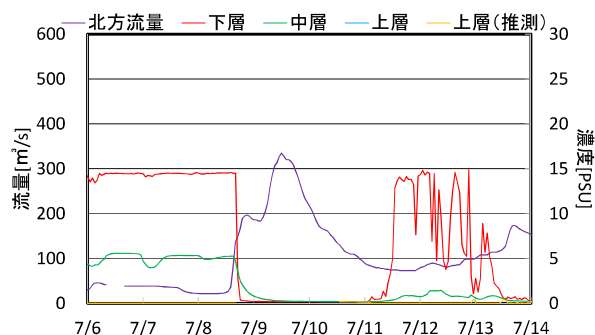


図-26 期間 d の出水時における北方流量と塩分の推移

制域での流量は、北方流量よりも少なくなっていると考えられる。

旭川の流量が減少するにも関わらず、塩分が低下する原因としては、吉井川と百間川の流量の増加が考えられる。すなわち、吉井川および百間川の流量の増加により、本期間では児島湾内が希釈されるため、下流端より流入する塩分が低下していると考えられる。また、既往の研究から夏季には児島湾は弱混合状態となり、表層の塩分が下がることが明らかになっている。

今後、河口付近での塩分の定期観測を行い、湾内塩分とクレップ水制域の塩分の関係について検討する必要がある。

(5)期間 f

図-27,28 は秋季にあたる期間 f における出水時の宇野水位および北方流量と、塩分の時間変化を示している。上層塩分が約 23 PSU で、期間 a と同程度の高い値を維持している。一方、出水時には急激な流量の増加に伴い、下層の高塩分水が 6 時間ほどで一気に押し流され、淡水に近い状態になっている。出水が約 5 日と比較的長期に続いたため、塩分回復が他期間に比べ遅くなっている。

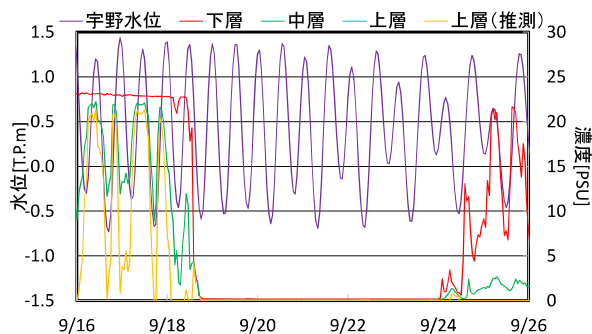


図-27 期間 f の出水時における宇野水位と塩分の推移

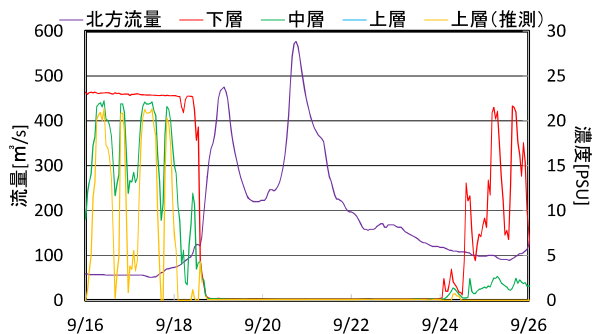


図-28 期間 f の出水時における北方流量と塩分の推移

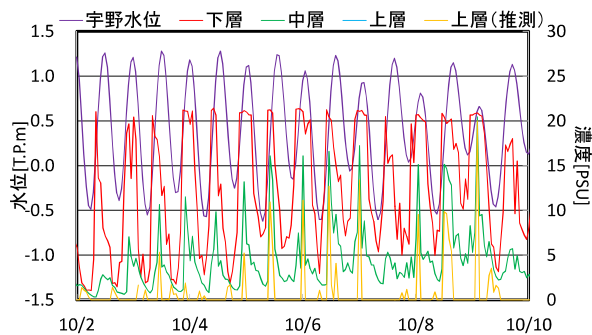


図-29 期間 f の平水時における宇野水位と塩分の推移

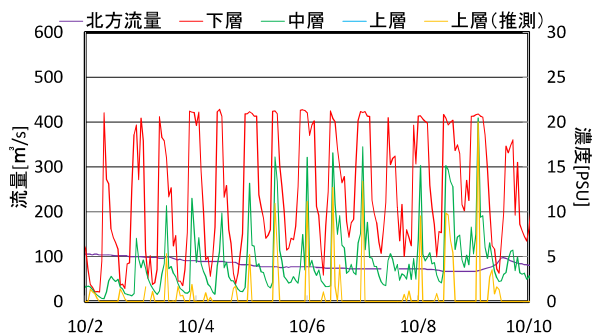


図-30 期間 f の平水時における北方流量と塩分の推移

図-29,30 は秋季にあたる期間 f における平水時の宇野水位および北方流量と、塩分の時間変化を示している。本期間では、各層とも 2~20 PSU の間で大きく変動して

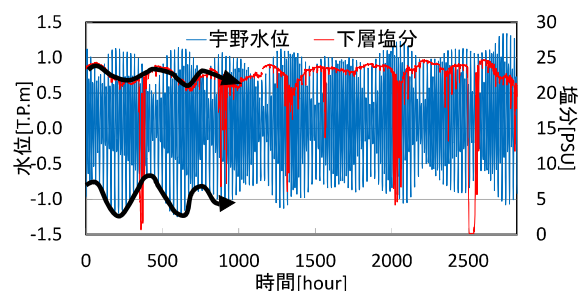


図-31 宇野水位と下層塩分の推移

おり、塩水楔の先端部分(淡水と塩水の境界部分)が観測点に近い位置にあると考えられる。

(6) 塩分と潮汐の相関

期間 a と b について、下層塩分と大潮小潮の動きに注目してみると、出水時以外では相関があるように見える(図-31)。そこで、まず、宇野水位の極小値と同時刻の下層塩分の値を取りだし(図-32)、線形内挿を行い、1 時間ごとのグラフを作った。次に、出水時のデータを除き(図-33)、出水時から出水時までの各期間(最初は 1 月 15 日 8 時から最初の出水時まで、最後は最後の出水時から 5 月 11 日 20 時まで)で相関が最も高くなるように塩分の位相補正を行った(図-34)。ここで、図-31,32,33,34 の横軸は 1 月 15 日 8 時を時刻 0 時としたときの時間軸である。各期間をそれぞれ(ア)~(キ)とし、それぞれの期間で下層塩分の値と下流水位の極小値の相関係数を計算した。それぞれの期間における相関係数と位相のずれ幅は表-3 の通りである。(オ)と(カ)を除く各期間では、高い相関があるといえる。宇野水位の極小値が比較的低いときというのは極大値との差が比較的大きくなるとき、つまり大潮のときである。このとき、塩分は低くなる。逆に、小潮のときに塩分は上昇するということである。既往の研究で川内川における塩分は潮汐の干満差の最も小さい小潮時よりも 48~72 時間程度の遅れをもって塩分が最大となることが示されている。同様に少なくとも期間 a, b (1~5 月)においては旭川でもそれに似た関係が見られると言える。また、出水によって位相差が変動するということも考えられる。

4.2 水制間の集中観測の結果と考察

はじめに、本観測の方法上、各データ間に時間差があるため、以下に示すデータはそれぞれ同じ観測点で観

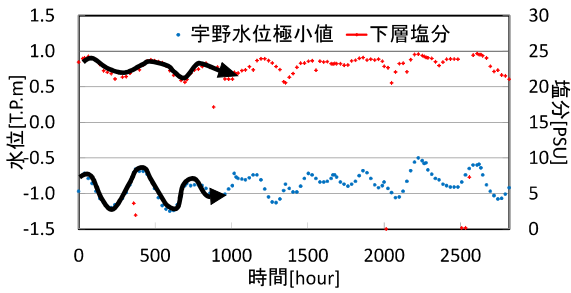


図-32 宇野水位の極小値と同時刻の下層塩分の値

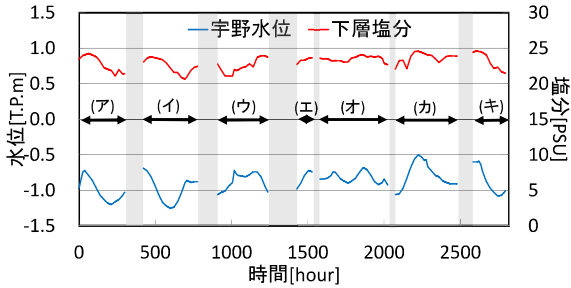


図-33 宇野水位と下層塩分（線形内挿）

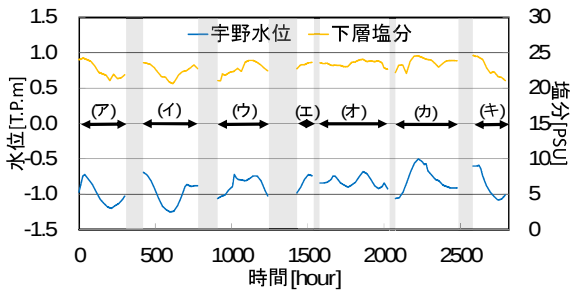


図-34 宇野水位と下層塩分(塩分の位相補正)

表-3 位相のずれと各機関における相関係数

期間	(ア)	(イ)	(ウ)	(エ)	(オ)	(カ)	(キ)
位相のずれ[hour]	35	80	78	1	1	3	24
相関係数	0.96	0.97	0.82	0.94	0.41	0.72	0.97

測されたものであっても、同時刻に観測されたものではない。そのため、以下に示す濃度と水深の関係を表したグラフは同時刻における鉛直分布を表したものではない。

図-35 は1回目の観測日である10月31日とその前日の宇野水位と北方流量であり、薄緑色で示した午前11時12分から午後14時30分までの時間帯(順流時)に観測を行った。この日観測を終えるまで、上流から流れてくる水は水制を越流していた。

図-36 は2回目の観測日である11月8日とその前日の宇野水位と北方流量であり、薄緑色で示した午前11時56分から午後2時6分までの時間帯(逆流時)に観測を行った。観測開始時刻では、水面は水制よりも低い位置

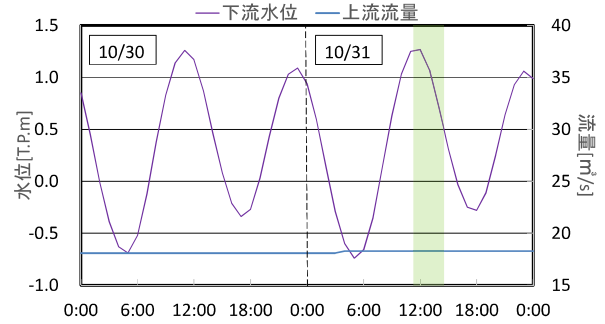


図-35 10/30,31の宇野水位と北方流量

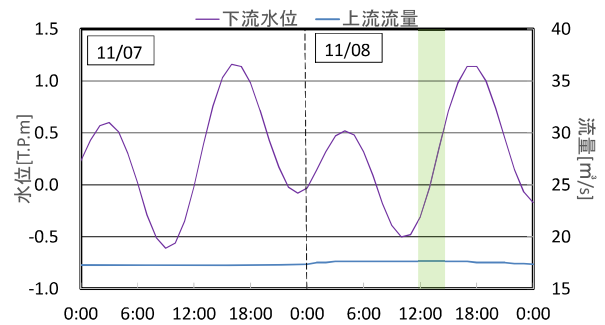


図-36 11/7,8の宇野水位と北方流量

にあった。どちらも観測は点⑦→④→①→②→⑤→⑧→⑨→⑥→③→⑩の順で行った(図-37)。

図-38～46 に観測地点①～⑩において得られた塩分の鉛直分布を示す。

まず、全ての点でほとんどの場合、順流時より逆流時のほうが同じ水深でも塩分が高い値を取っている。これは、順流時に塩水楔が後退している一方で、逆流時には塩水が河口から侵入しているためであると思われる。また、左岸側に近づくほど水深が浅くなっている。

次に、高い濃度の塩水が水制域に侵入していることが確認できる。例えば、逆流時においては、水深1mで15PSUを超えている点がみられる(点①③⑤⑥⑨など)。特に点⑨は、水深1mという浅瀬であるにもかかわらず、20PSUを超える濃度の塩水が侵入してきている(図-45の赤線)。これは点⑩(図-46の赤線)の観測結果より、逆流時には水面から1m付近のところにおいても塩分が上昇し、それが水制域に侵入しているためであると考えられる。

4.3 縦断観測の結果と考察

はじめに、本観測も水制間観測と同様に、それぞれの



図-37 観測地点および計測の順番 (Google Map)

データとデータの間に時差があるため、以下に示すデータはそれぞれ同じ観測点で観測されたものであっても、同時刻に観測されたものではない。

図-47 は 12 月 21 日とその前日の宇野水位と北方流量であり、薄緑色で示した午前 10 時 51 分から午前 11 時 56 分までの時間帯(逆流時)に観測を行った。観測は上流側から点 A→B→C→D の順に行った。

図-48 に、4 つの点 A～D で観測された塩分と水深の関係を示す。また、水制間観測で逆流時に観測した点⑩のデータも示している。まず本観測で行った 4 つの点について、水深 1.5 m では塩分が低いほうから点 A→B→C→D という順になっており、下流に行くほど 1～2 PSU ずつ塩分が高くなっていることがわかる。

逆流時であるから時間がたつほど塩分が高くなり、また、河口に近いほど塩分が高くなるはずなので、これは妥当なように思われる。ただし、その 2 つの要素を満たしている割には、点 D のデータは点 A のデータと大差ない。むしろ、塩分の最高値は点 D では約 25 PSU だが、点 A ではそれをわずかに上回っている。

その原因として、上げ潮前半であるため塩分が上昇し始める前に観測を終えてしまった可能性があると考えられる。そこで、点 A で観測してから点 D で観測するまでの時間差による塩分の変化を考慮しないとすると、この本観測区間(河口から約 6.2～6.5 km)では塩分の鉛直分布に大差はないと考えられる。

4.4 数値解析の結果と考察

(1)水制の有無で比較

まず冬の平水時の北方流量と宇野水位を境界条件と

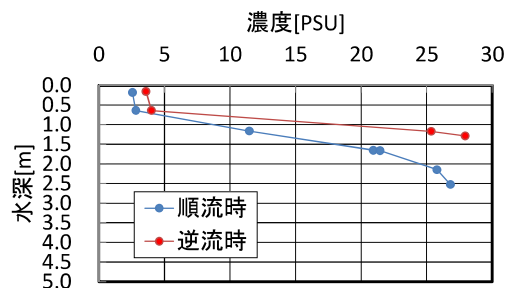


図-38 点①における塩分の鉛直分布

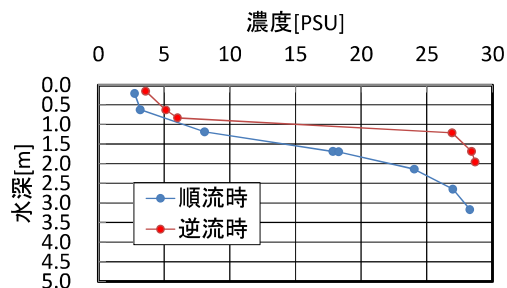


図-38 点②における塩分の鉛直分布

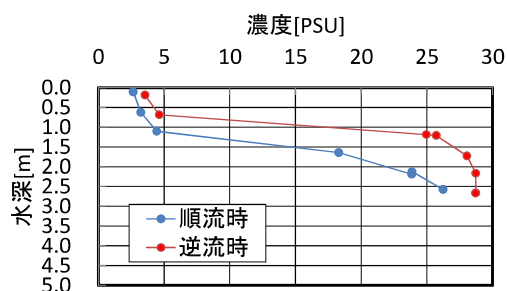


図-39 点③における塩分の鉛直分布

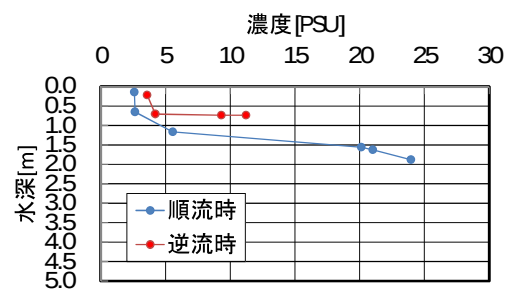


図-40 点④における塩分の鉛直分布

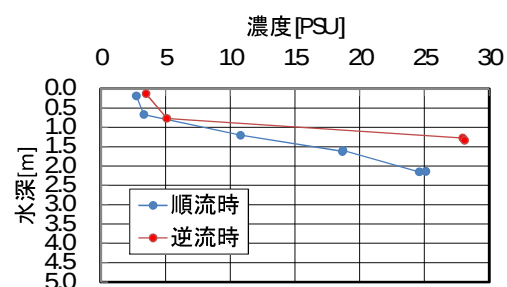


図-41 点⑤における塩分の鉛直分布

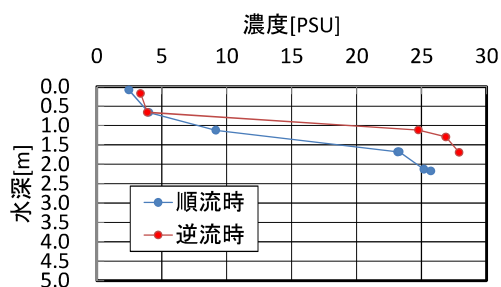


図-42 点⑥における塩分の鉛直分布

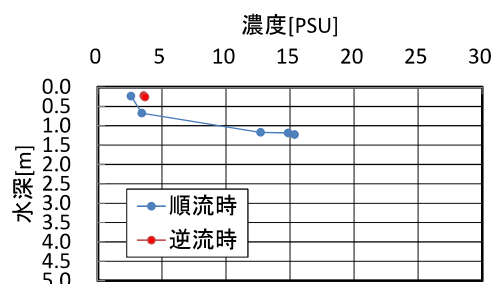


図-43 点⑦における塩分の鉛直分布

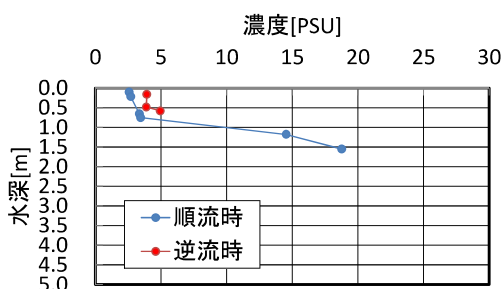


図-44 点⑧における塩分の鉛直分布

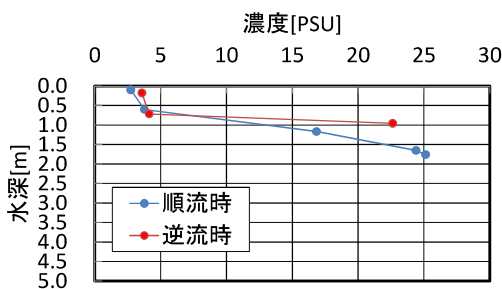


図-45 点⑨における塩分の鉛直分布

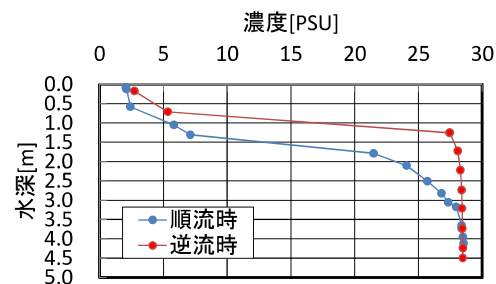


図-46 点⑩における塩分の鉛直分布

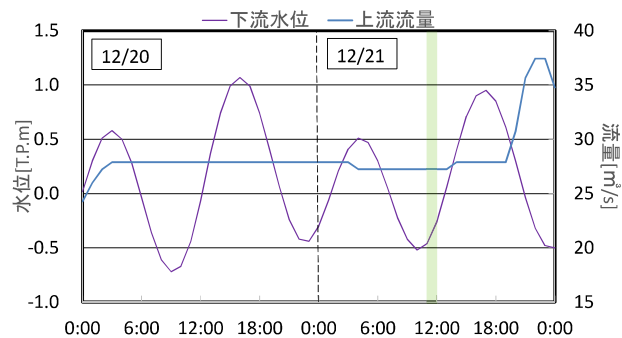


図-47 12/20,21 の宇野水位と北方流量

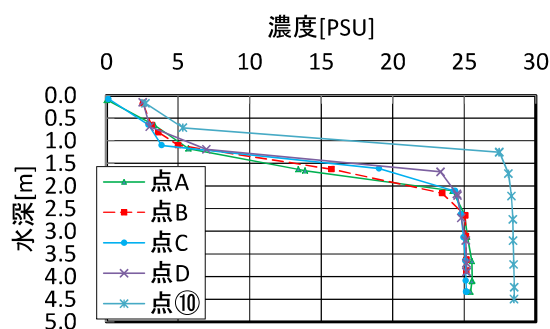


図-48 点 A-D および点⑩における塩分の鉛直分布

して与えて、水制の有無によって塩水挙動がどのように変化するかを調べた。図-49 の(a)が水制無しの場合、(b)が水制有りの場合の順流時における水深平均流速ベクトルである。場所は定点観測地点よりも 300～550 m ほど下流の地点で、水制間観測を行った水制域付近である。水制があるかないかで特に左岸側の浅瀬での水の動きが大きく異なっているのがわかる。水制があることで、浅瀬において渦のような水の動きが発生し、付近の流速が 0 m/s に近い値になっている。水制間観測で水制域の浅瀬の底層にある高塩分水は流出しにくい可能性があることが示された。本解析結果からも水制による止水域が生じていることがわかり、同じように水制域の浅瀬の底層にある高塩分水は流出しにくい可能性があることが示された。

図-50 は、順流時における図-49 の青い点線における塩分の横断分布である。(a)は冬・水制無し、(b)は冬・水制有りの場合である。横断面を見ると、水制の有無で塩分分布にほとんど違いが見られない。この理由としては、本解析では平面二次元モデルに二次流の効果を加えた準三次元モデルを用いているため、鉛直方向の水の挙

動を考慮していないためであると考えられる。実際には、滞における下層の高塩分水が水制域の浅瀬へ入り込んでいる可能性も考えられる。今後、ケレップ水制域への下層高塩分水の流入を考慮できる準三次元モデルの改良を行う必要がある。

(2)季節の特徴

図-51は、各季節での塩水遡上時(逆流時)における水深平均流速ベクトルおよび塩分分布である。上流流量については(a)は $25 \text{ m}^3/\text{s}$, (b)は $49 \text{ m}^3/\text{s}$, (c)は $6 \text{ m}^3/\text{s}$, (d)は $31 \text{ m}^3/\text{s}$ を与えた。

本解析では、偏差係数を全て一定としているため、季節による変化は上流流量と下流水位に依存している。特に上流流量の影響が大きいと考えられる。つまり、流量が

多いほど、下流からの塩水が上流側に侵入しにくく、塩分が低くなると予想できる。それを踏まえて結果を見てみると、やはり流量が比較的多い春や秋は流量が少ない冬や夏よりも塩分が低い。

一方、定点観測データでは冬や秋は塩分が高く、春から夏にかけて減少していた。そのため本解析結果で見られた特徴は観測データと異なっている。このことから、塩水挙動の変化は単純に上流流量に依存するということではないということがいえる。定点観測結果の考察でも述べたが、夏の旭川においては新堰ゲートの操作によって、流量が比較的少なくなり、その分、塩水楔も上流まで侵入しやすくなる。しかし、児島湾の塩分が吉井川・百間川や児島湖からの流量の増加によって低下するため、旭

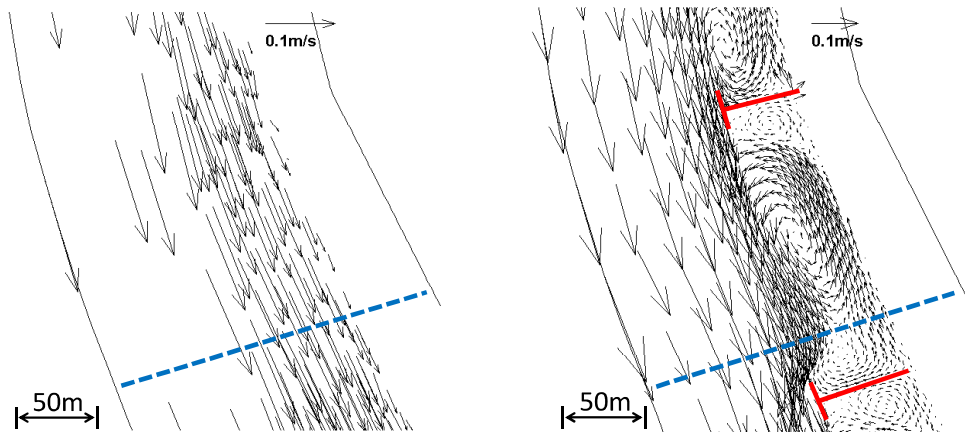


図-49 順流時における水深平均流速ベクトル：(a)冬・水制無し，(b)冬・水制有り

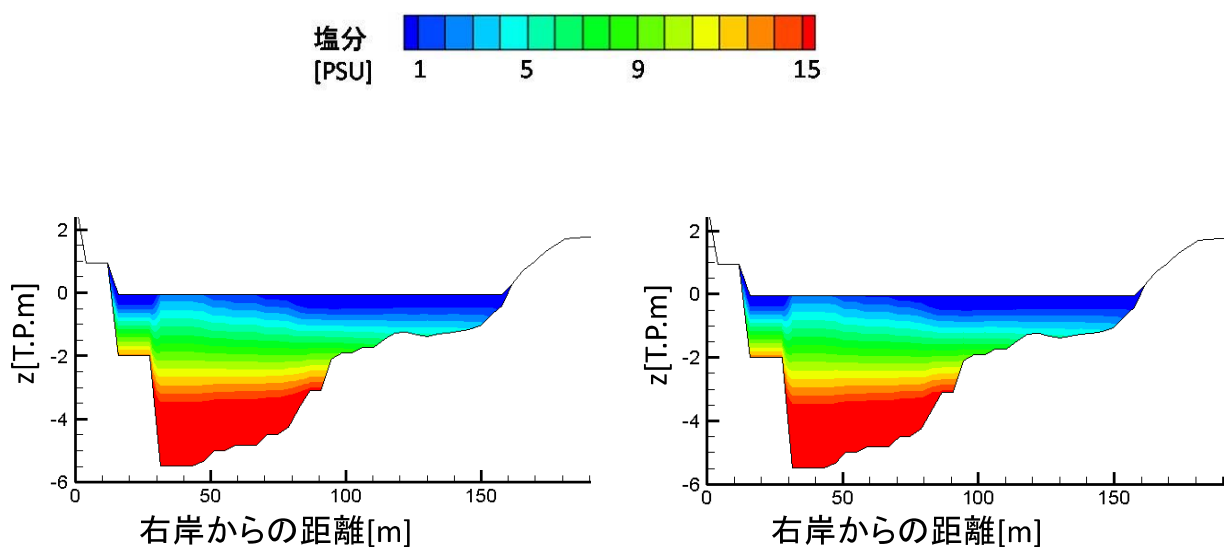


図-50 順流時における塩分の横断分布：(a)冬・水制無し，(b)冬・水制有り

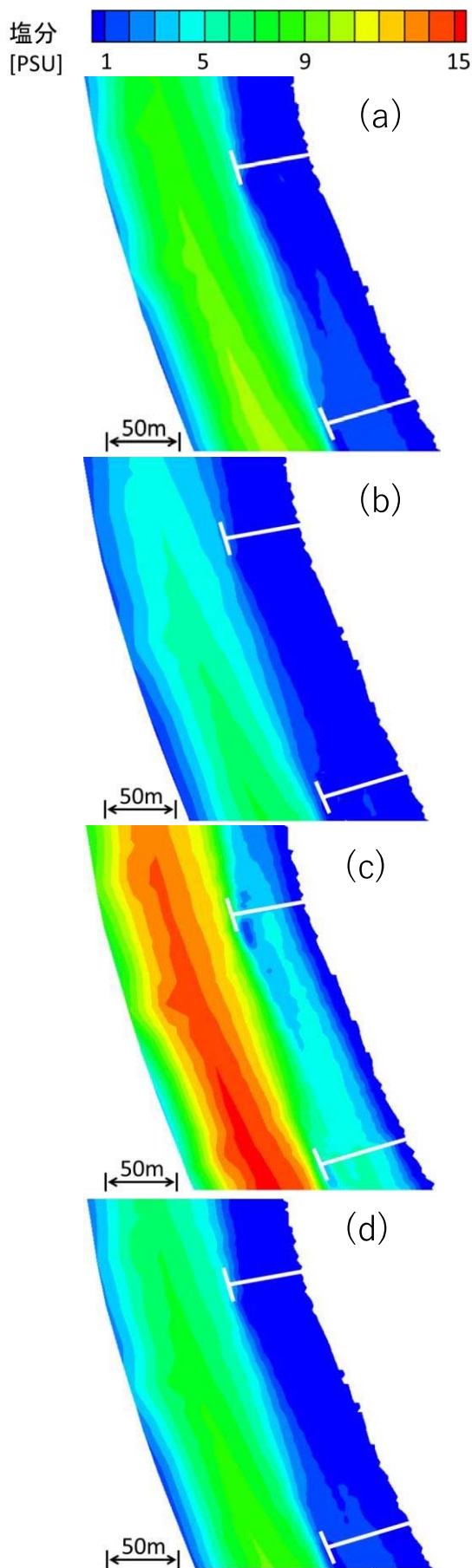


図-51 塩水遡上時における塩分分布
(平水時、水制有り)：(a)冬、(b)春、(c)夏、(d)秋

川に侵入する塩水が薄いものになる、と考えられる。つまり、上流流量が少ないほど河口からの水は侵入しやすくなるが、あくまで侵入してくる水に含まれる塩分によって、河川感潮域における塩分が影響されるということであるといえる。

また、出水時の解析に夏を選択した理由を述べる。図5-4-3で示すように、解析結果では観測地付近における塩分は、夏が最も高い。そのため、平水時と出水時において塩分の変化が最も激しくなると予想したからである。

一方、図-51を見る限り、解析結果の塩分は夏季以外において、観測データよりも低い値となっている。本解析では、児島湾内の塩分を一定としているため、下流より流入する塩分の季節変化による効果が考慮できていない。今後、吉井川および百間川からの流入を考慮し、児島湾内の塩分の季節変動を導入した解析を実施したいと考えている。

(3)出水後の塩分回復について

図-52は、夏の出水前から出水が起きた後(7月8日～7月11日)の塩分の縦断分布である。赤い点線のところが定点観測地付近の河口から約6.7 kmの地点である。(a)の出水直前の平水時には上流流量として新堰流量を与えた。(b)、(c)では北方流量を与えた。(a)は7月8日14時、(b)は7月9日0時、(c)7月11日13時の塩分分布である。観測地付近を見ると、出水によって、それまで下層にあった20 PSU付近の塩水(a)が淡水に押し流されている(b)。図-26を見ると、その後7月11日13時には下層塩分が14 PSU付近まで回復している。しかし同時刻である(c)を見ると、解析では下層もまだ淡水に近い状態となっている。このような違いが生じる原因は(3)で述べたことと同様なことだと考えられる。また、(b)を見ると、出水が起きても河口から5 kmまでの領域の塩分にはほとんど変わらないことがわかる。この原因としては、上流から入ってくる淡水の量と河口から侵入してくる塩水の量が釣り合っているということが考えられる。

5. 結論

本研究では、旭川下流域のケレップ水制域における季節的な塩分流動特性について、現地観測および数値解析から検討を行った。本研究の結論と今後の課題を以下に示す。

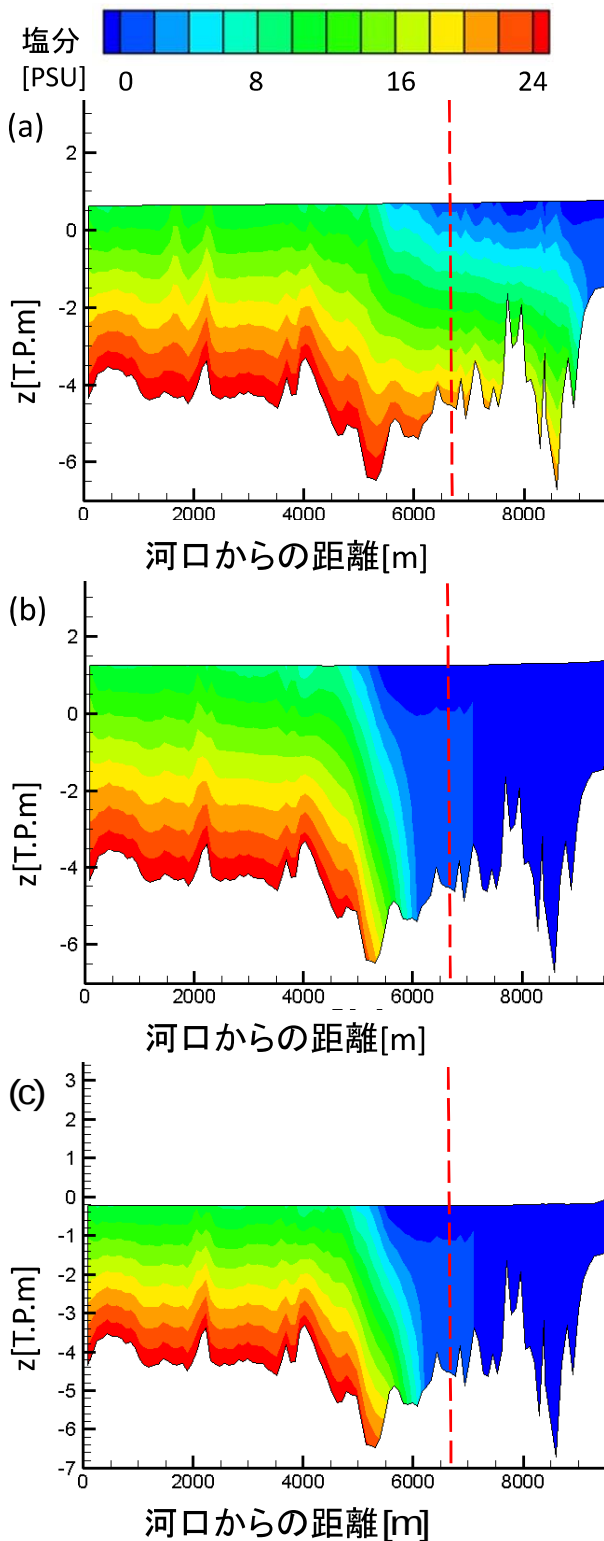


図-52 塩水遡上時における塩分分布

(平時時、水制有り) : (a)冬, (b)春, (c)夏, (d)秋

- ・ 旭川ケレップ水制域においては、約 23PSU の高濃度の塩水が夏季を除き下層に存在していることが明らかとなった。
- ・ 冬から春にかけては、潮汐の干満差が最小となる時

期から 24～80 時間遅れて塩分が最大値をとることが判明した。

- ・ ケレップ水制域では順流時において、水制域の浅瀬における底層の高塩分水は流出しにくい可能性があることが示された。
- ・ 出水が起きても河口から 5 km までの領域においては、上流から入ってくる淡水の量と河口から侵入してくる塩水の量が釣り合うことで、塩分がほとんど変動しないことが示された。
- ・ 本研究で行った定点観測では、観測器を回収するのが設置した 3 か月後になってしまった時期があり、正確に観測を行えなかった可能性がある。そこで、今後は 1 か月ごとのような短期間で観測器を回収し、その都度データを取るようにしたい。
- ・ 定点観測において上記のように観測器を短期間で回収すれば付着物も少なく、より正確な観測が可能となるので、偏差係数 α_0 の値を季節ごとに変化させて数値解析を行うことが今後の課題となる。
- ・ 水制付近の水深が浅い領域における現地観測データと数値解析結果に違いがみられた。これは本研究で行った数値解析では、鉛直の動きを考慮していないことが原因のひとつではないかと考えられる。そこで、今後は鉛直方向の動きも考慮できる計算モデルの開発を行っていくことが課題となる。あわせて、吉井川や児島湖による影響を考慮した解析モデルへの改良も課題である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、岡山大学環境生命科学研究科の前野詩朗教授、吉田圭介准教授にご助言をいただきました。また、岡山大学環境理工学部学部 4 年生の稲見俊輝君には現地観測、数値解析について多くの協力をして頂きました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 国土交通省河川局:旭川水系河川整備基本方針, 2008.
- 2) 長縄真吾, 池田満之, 藤岡賢哉, 川島明昌:旭川感潮水域におけるケレップ水制域物理環境特性の観測, 陸水雑, Vol.58, pp.261-276, 1997.
- 3) 辻本彰, 野村律夫, 福田賢一:岡山県児島湾における底質中の有機物と底生有孔虫群集の季節変動, Laguna, Vol.20, pp.61-71. 2013.
- 4) 豊嶋弘一:児島湾およびそれにそそぐ河川感潮部における塩素イオン濃度の変化特性に関する研

究, 岡山大学工学部土木工学科特別研究卒業論文, 1980.

- 5) 赤穂良輔, 石川忠晴, 安河内美咲, 鶴田泰士: 高瀬川の塩分遡上に関する二次元分散モデルの開発, 水工学論文集, 第 58 巻, I_877-I_882, 2014.
- 6) 赤穂良輔, 石川忠晴: 三角形格子における CIP 有限体積法を用いた準三次元浅水乱流計算モデルの開発, 土木学会論文集 B1 (水工学), Vol.67, No.4, pp.1207-1212, 2011.
- 7) Volkan Avcu, Flow Characteristics around Groins Installed in Tidal Regions of the Asahi River Using Quasi 3D Numerical Model , Master's Thesis Defence, 2015.
- 8) 気象庁, 潮汐・海面水位に関する診断表・データ
- 9) 国土交通省, 水文水質データベース

児島湖人工干潟における植生遷移並びに生物多様性を展開するメカニズムの解析

岡山大学大学院環境生命科学研究科

中嶋 佳貴

(概要)

児島湖内に 2002 年に造成された児島湖人工干潟において、2005 年に新たに造成された渚型護岸に、フトイ・ヒメガマ・ヨシの生育特性に応じた水草ゾーンを設定して植栽した結果、植栽後、約 3 年で渚型護岸の大部分を植生が覆った。本研究では、造成後 11 年が経過した渚型護岸における現植生の優占種への遷移状況を把握し、地形測量によって植生帯が土壌浸食及び堆積に及ぼす影響と、土壌深度別の物理的及び化学的環境を調査した。地形測量の結果から、渚型護岸の中央付近一帯でヨシを主としたリターが多く堆積したエリアは 20 cm～30 cm 程度、地盤が上昇した。植栽後 11 年が経過した 2016 年にはヨシ群落が多く分布して優占したが、ヨシ群落もリターが堆積したエリアでは消失もしくは低密度化した。陸側のヨシ群落はウチワゼニグサと広く階層構造を形成していた。リターは表層に堆積し、有機物によって腐植土壌が形成され、堆積厚によって強熱減量及び CN 比など化学的環境、粒径組成などの物理的環境にも違いが生じる事が確認された。一方、ブラジルチドメグサは倉敷川河口付近まで小群落を形成し、*Lagarosiphon major* は笹ヶ瀬川河口にキレモが散見された。

1. はじめに

児島湖では水質改善を目的とした児島湖沿岸農地防災事業が 1992 年より着手され、水質悪化の一因となっている湖底に堆積したヘドロが浚渫された¹⁾。浚渫されたヘドロは脱水処理が施され、一部は沿岸帯に埋め戻して、50cm 厚の覆砂処理を施した人工干潟（幅 10m, 奥行き 100m, 1/100 緩傾斜）が 2002 年 12 月に造成された（図 1）。岡山大学環境理工学部環境管理工学科植生管理学研究室では、種々の雑草性を有する沿岸帯植物種を選抜し、人工干潟に植栽して群落形成の適性を調査した⁴⁾。その結果、灌漑期に真沿岸帯となる範囲(A.P.+0.8～1.0m)では、波浪による土壌浸食を防ぐ必要性を確認した。

2005 年には東側に新干潟として渚型護岸（幅 86m, 奥行き 100m, 1/100 緩傾斜）が造成され、波浪対策として真沿岸帯（約 110m）に大型抽水植物群落を発達させる事となった⁴⁾。環境保全団体「児島湖流域エコウェブ」及び岡山大学環境理工学部生が中心となり、フトイ(*Schoenoplectus validus*)・ヒメガマ(*Typha angustifolia*)・ヨシ(*Phragmites australis*)の生育特性に応じた水草ゾーンを設定して、2005 年 5 月に植栽して、境界部での競合・侵入関係を調査し、ビオトープ創成期の適切な管理方策を模索した。



図 1 児島湖人工干潟の位置



写真 1 児島湖人工干潟渚型護岸（2007 年）

植栽後、約3年で渚型護岸の大部分を植生が覆い、生態系の側面からは貝類が定着し、野鳥も飛来して植物群落発達に伴うビオトープの創出は成功した。

しかしながら、植物生態学の分野において、植物群落の発達に伴うヘドロを基盤とする土壤環境の変化あるいは温暖化に伴う微気象が植生遷移に与える影響は、富栄養化の進んだ水域において、国内外であまり研究がなされていない。さらに、富栄養湖内に人工的に造成された干潟における生物多様性に関与する環境要因も明確ではない。そこで、著者は本研究において、造成後11年が経過した渚型護岸における現植生の優占種への遷移状況を把握し、地形測量によって植生帯が土壌浸食及び堆積に及ぼす影響を調査した。さらに、土壌深度別の有機物の堆積状況及び下層の脱水ヘドロからの栄養塩類溶出の現状も調査することで、人工干潟の生態系の基盤となる植生遷移のメカニズムを総合的に解析し、将来の児島湖の環境保全に資する事を目的とした。

一方、昨今、外来水生雑草の過繁茂は社会的に大きな問題となっており、特定外来植物や重点対策外来種が閉鎖系水域に侵入する過程を把握する研究は、今後の外来種の制御に大きく貢献すると考えられる。そこで、著者は本研究において、倉敷川流域に繁茂する特定外来生物ブラジルチドメグサ(*Hydrocotyle ranunculoides*)と、笹ヶ瀬川以東の用排水路にて分布を拡大しつつある重点対策外来種 *Lagarosiphon major* に着目し、児島湖内への現在の侵入状況を把握し、今後の人工干潟への定着の可能性を検討した。

2. 材料及び方法

児島湖人工干潟渚型護岸(写真1, 図2)において、2016年10月11日に地形変化を確認するために、2mメッシュで水準測量を実施し、等高線図を作成した。2016年10月18日には、2mメッシュを活用してライン法にて植生調査を実施し、植生分布図を作成した。

次に、植生調査の結果から、図2に示す通り、ヨシ群落(湖側)、リター堆積エリア、ヨシ群落(陸側)、ヨシ・ウチワゼニグサ(*Hydrocotyle verticillata*)混生群落を対象に、表層(0~5cm)、中層(10~15cm)及び下層(20~25cm)からハンドオーガー(株式会社

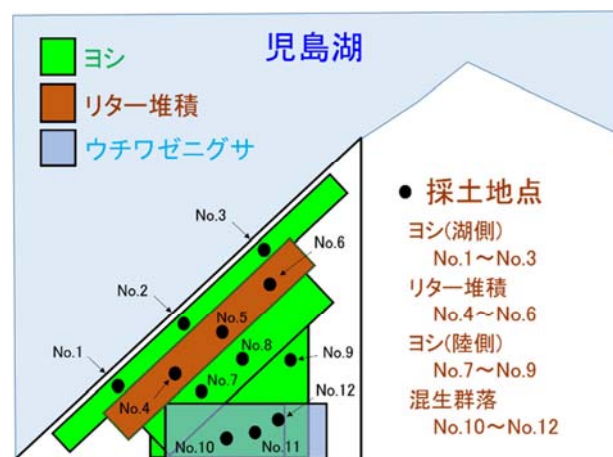


図2 児島湖人工干潟渚型護岸における調査地点

ウエスコより借用)を用いて土壌試料を採取した。ただし、ヨシ(湖側)、ヨシ(陸側)及び混生群落の下層は、サンプリング時に地下水が浸出したため、下層のみ採土できなかった。採取後、1:5 浸出法により土壌溶液を作成して、pH、EC、無機態窒素濃度及び無機態リン濃度を分析し、残りの土壌は風乾処理後、粒径組成及び強熱減量を測定した。乾土の一部は、CHN コーダー(パーキンエルマー ジャパン CHNS/O アナライザー)により、土壌中の炭素含有率及び窒素含有率を分析した後、CN比を算出した。

次に、特定外来生物ブラジルチドメグサ及び重点対策外来種 *Lagarosiphon major* の児島湖内への侵入状況を把握するために、2016年9月23日にキレモの分布及び定着状況を船上より調査した。

3. 結果及び考察

児島湖は児島湾締切堤防樋門の操作により、灌漑期(6月~10月)と非灌漑期(11月~5月)で平均水位に約30cmの差があり、樋門の開閉に伴って、特に灌漑期には約30cmの水位日変動も生じる。

図3及び図4に、造成1年後(2006年10月)及び造成11年後(2016年10月)の渚型護岸の等高線図を示した。2016年は2006年と比較すると、陸側及び湖側では目立った変化は認められないものの、中央付近一帯で20cm~30cm程度、高い場所では40cm程度まで地盤が上昇し、凹凸が顕著であった。地盤が上昇した場所は、図5及び図6の造成1年後(2006年10月)及び造成11年後(2016年10月)

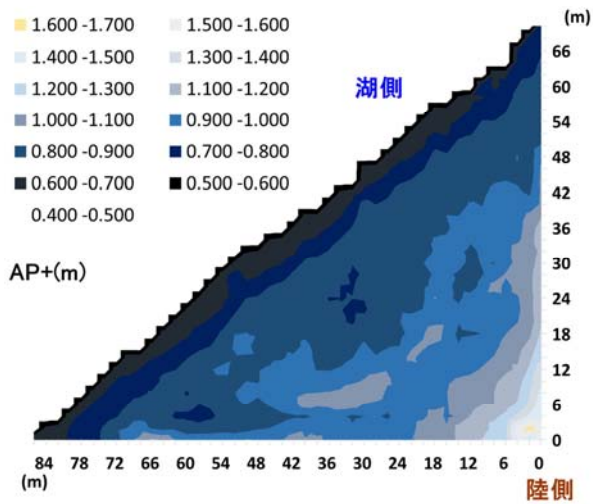


図3 造成1年後の渚型護岸の等高線(2006年10月)

注) AP は児島湾児島湾飽浦港最低海面を示す。

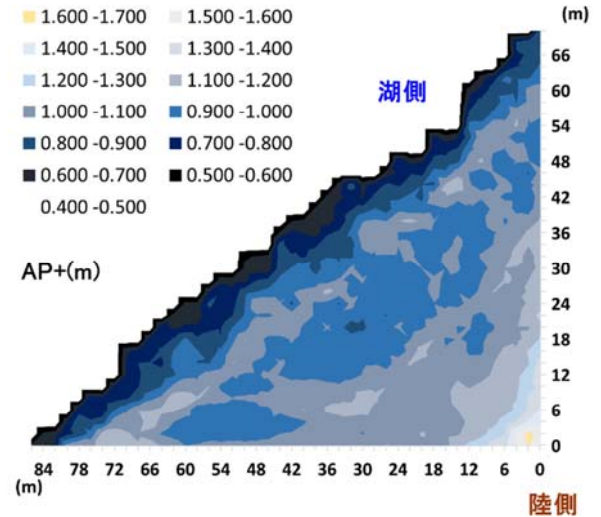


図4 造成11年後の渚型護岸の等高線(2016年10月)

注) AP は児島湾児島湾飽浦港最低海面を示す。

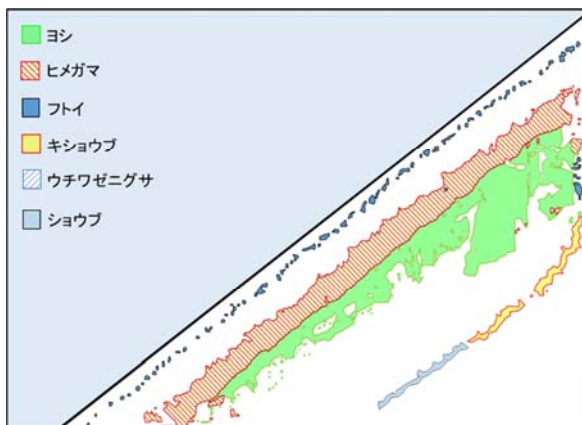


図5 造成1年後の渚型護岸の植生分布(2016年10月)

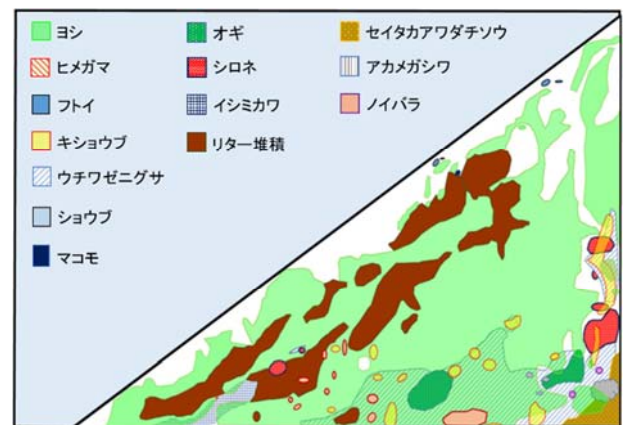


図6 造成11年後の渚型護岸の植生分布(2016年10月)

表1 渚型護岸において確認された植物種(2016年10月)

科	種名	学名	生活型	繁殖様式
イネ	ヨシ	<i>Phragmites australis</i>	抽水	種子(風)、地下茎
	マコモ	<i>Zizania latifolia</i>	"	"
	オギ	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	湿生	"
セリ	ウチワゼニグサ	<i>Hydrocotyle verticillata</i>	抽水～湿生	地下茎
アヤメ	キショウブ	<i>Iris pseudacorus</i>	"	種子(風・水)、地下茎
ガマ	ヒメガマ	<i>Typha angustifolia</i>	抽水	種子(風)、地下茎
カヤツリグサ	フトイ	<i>Schoenoplectus validus</i>	"	"
タデ	イシミカワ	<i>Polygonum perfoliatum</i>	湿生	種子(被食)
シソ	シロネ	<i>Lycopus lucidus</i>	"	種子(風)、地下茎
トウダイグサ	アカメガシワ	<i>Mallotus japonicus</i>	中生	種子(被食)
バラ	ノイバラ	<i>Rosa multiflora</i>	"	"
キク	セイタカアワダチソウ	<i>Solidago altissima</i>	"	種子(風)、地下茎

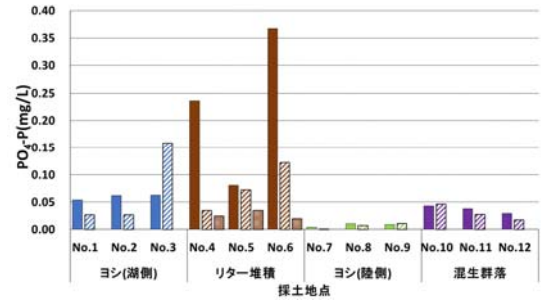


図 11 各調査地点における土壌溶液の $PO_4\text{-P}$ 濃度

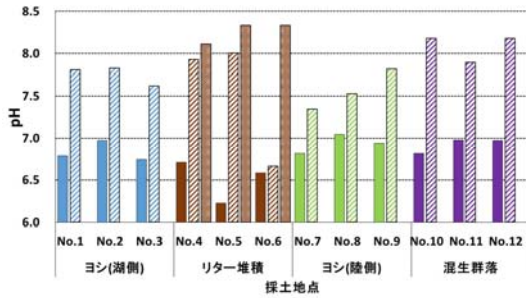


図 7 各調査地点における土壌溶液の pH

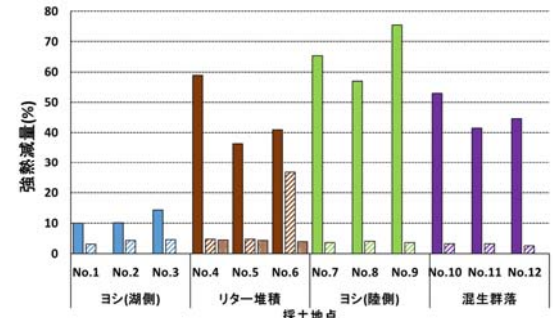


図 12 各調査地点における土壌の強熱減量

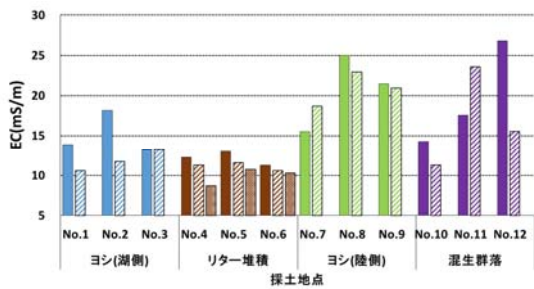


図 8 各調査地点における土壌溶液の EC

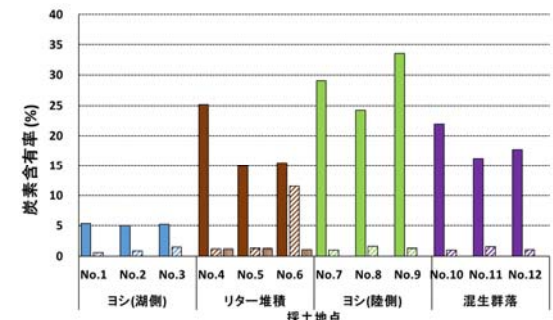


図 13 各調査地点における土壌の炭素含有率

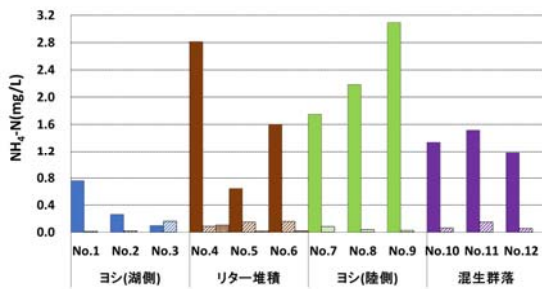


図 9 各調査地点における土壌溶液の $NH_4\text{-N}$ 濃度

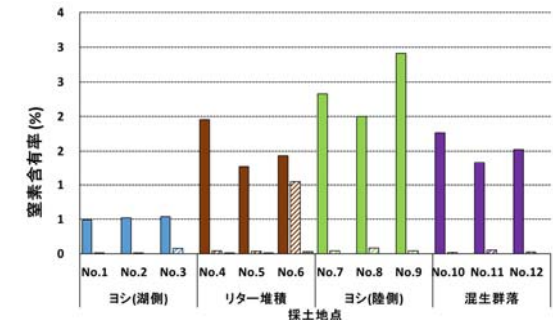


図 14 各調査地点における土壌の窒素含有率

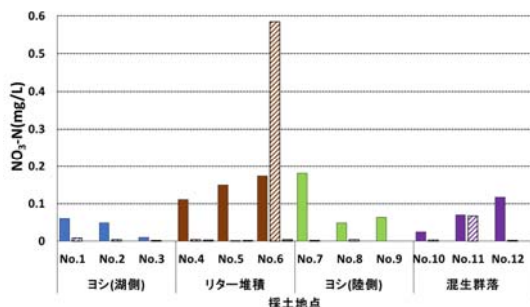


図 10 各調査地点における土壌溶液の $NO_3\text{-N}$ 濃度

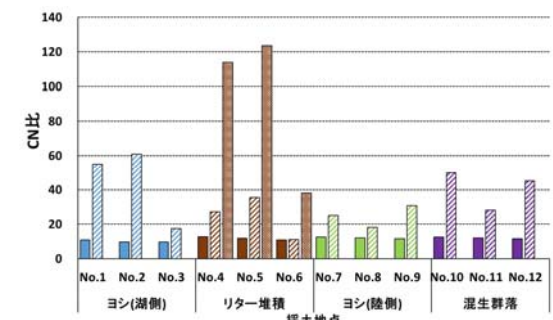


図 15 各調査地点における土壌の CN 比



写真2 リターの堆積状況(2016年10月)

写真3 ヨシとウチワゼニグサによる階層構造
(2016年10月)

表1 各調査地点における土壌の粒径組成

調査地点	採土地点		粗粒分				細粒分	
			礫分	粗砂分	中砂分	細砂分	シルト分	粘土分 (%)
ヨシ(湖側)	No.1	表層	8.00	8.31	40.00	16.05	10.64	17.00
		中層	9.09	22.75	54.33	6.04	1.99	5.80
	No.2	表層	7.35	17.66	39.05	14.26	3.23	18.44
		中層	12.18	24.41	44.87	10.84	1.43	6.27
	No.3	表層	3.16	2.36	20.86	26.89	21.26	25.48
		中層	12.94	24.50	48.02	2.75	5.52	6.27
リター堆積	No.4	表層	12.09	3.38	29.88	1.71	3.60	49.34
		中層	11.18	22.61	46.91	7.44	3.86	8.00
		下層	12.34	26.55	50.16	3.45	2.47	5.03
	No.5	表層	9.67	0.61	41.38	3.95	5.88	38.52
		中層	11.41	23.80	42.96	7.60	6.54	7.69
		下層	14.03	29.14	47.26	1.87	2.85	4.84
	No.6	表層	12.55	1.10	39.82	3.22	9.21	34.09
		中層	4.02	8.33	35.10	4.88	15.19	32.48
		下層	11.24	19.92	48.57	9.05	4.85	6.37
ヨシ(陸側)	No.7	表層	23.98	9.46	7.36	6.92	15.37	36.91
		中層	12.94	23.30	47.24	6.37	3.13	7.03
	No.8	表層	16.23	1.01	19.33	1.88	3.04	58.50
		中層	14.62	25.78	45.71	5.05	2.66	6.17
	No.9	表層	18.19	10.33	3.29	2.28	19.47	46.44
		中層	19.63	25.10	43.69	5.40	1.80	4.37
混生群落	No.10	表層	24.75	6.19	20.83	1.33	17.38	29.53
		中層	12.25	18.90	54.64	6.81	1.14	6.26
	No.11	表層	17.70	16.97	34.12	1.26	9.48	20.47
		中層	11.92	20.76	55.32	3.27	4.37	4.36
	No.12	表層	9.29	13.40	35.37	3.14	19.07	19.73
		中層	11.65	22.42	55.08	1.66	4.17	5.02

の植生分布図から、ヨシを主としたリターが多く堆積したエリアであり、ヨシなどの枯草を刈取って系外へ撤去しないことが渚型護岸の物理的環境に影響を与えたと推察される。

植生分布図において、植栽後1年が経過した2006年は、湖側からフトイ、ヒメガマ、ヨシの順に帯状に群落を形成したが(図5)、2016年にはヨシ群落が多く分布して優占し、フトイ群落及びヒメガマ群落は衰退した(図6)。ただし、ヨシ群落もリターが堆積したエリアでは消失もしくは低密度化した(写真2)。また、陸側のヨシ群落はウチワゼニグサと広く階層構造を形成していた(写真3)。フトイ群落の衰

退は、渚型護岸の湖側が波の影響を受けやすい上、桜井⁵⁾が指摘するように、沿岸帯に漂着した流木や粗大ゴミによるローリングを受けて、地上部が折損等のダメージを受けた事が一因と考えられる。ヒメガマ群落は、植栽当初は渚型護岸が軟弱地盤であるため、地盤沈下を予測して植栽計画を立てたものの、リターの堆積によって地盤高は上昇し、陸側に植栽したヨシとの競合によって衰退したと推察される。

2016年度の植生調査によって確認された草種の一覧を表1に示した。特に、ウチワゼニグサ、キシヨウブ(*Iris pseudacorus*)、オギ(*Miscanthus sacchariflorus*)、シロネ(*Lycopus lucidus*)などの

分布面積が大きかった。ウチワゼニグサは横走茎により分布を拡大し、キショウブ、オギ及びシロネは種子が漂着して新たな群落を形成したと考えられる。

各調査地点における土壌溶液の pH, EC, $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度, $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度及び $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度を図 7, 図 8, 図 9, 図 10 及び図 11 に示した。pH は表層が 6.23~7.05 で差異は小さく、中層は No. 6 を除いて表層より高かった。EC はヨシ(陸側)及び混生群落で高い地点が確認された。陸側は湖側と比較して冠水頻度が少なく、無機イオンの先脱が起こりにくかったと考えられる。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度はリター堆積エリア、ヨシ(陸側)及び混生群落の表層が高かった。高濃度の $\text{NH}_4\text{-N}$ は還元化を示唆し、リターの堆積はヨシ群落の衰退を助長し、ヨシ(陸側)及び混生群落もリターの堆積が進めば、ヨシ群落は今後さらに衰退する可能性がある。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度はリター堆積の No. 6 の中層が顕著に高い値を示し、No. 6 の中層では何らかの要因で硝化作用が促進されていた。 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度はリター堆積エリアの表層で高い値を示したため、リターが分解されて $\text{PO}_4\text{-P}$ が溶出していると考えられる。

各調査地点における土壌の強熱減量、炭素含有率、窒素含有率及び CN 比を図 12, 図 13, 図 14 及び図 15 に示した。強熱減量は表層が中層及び下層より高く、主にリターによって表層に有機物の堆積が促進されていた。ヨシ(湖側)は他の調査地点より少なく、湖側は水位変動や波浪によってリターが流失したと推定される。炭素含有率及び窒素含有率は強熱減量とほぼ同じ傾向を示した。CN 比について、表層は調査地点による差異が小さく、中層は表層より高かった。また、リター堆積エリアの下層の No. 4 及び No. 5 の CN 比は 100 以上を示し、著しく窒素飢餓の状態にあったため、ヨシ群落の衰退の一因と考えられる。

各調査地点における土壌の粒径組成を表 1 に示した。礫分から細砂分を粗粒分、シルト分と粘土分を細粒分として区分した。リター堆積エリアの No. 6 を除き、表層は中層より細粒分の割合が多く、腐植土壌が堆積していた。No. 6 は、採土地点の中でリターの堆積厚が最も厚かったため、中層も表層と同様に細粒分が多く、他の環境要因の差異に影響したと考えられる。ゆえに、リターは堆積厚により、物理

的かつ化学的環境に違いが生じる事が確認された。

一方、ブラジルチドメグサは倉敷川河口付近まで小群落を形成していたため、児島湖内の沿岸帯に群落を形成するのは時間の問題である。*Lagarosiphon major* は笹ヶ瀬川河口にキレモが散見されたが、群落形成には至っていなかった。

4. 結論

以上より、ヨシの刈取り及び枯草の撤去が 10 年以上実施されなかった結果、リターの堆積が生じて地盤の上昇に繋がった。また、表層の腐植化により植物種の多様度が増した一方で、ヨシ原は荒れた状況を呈した。時期別や場所別による刈取り等の植生管理を維持することが、渚型護岸において種の多様性を考慮したヨシ群落の維持に繋がると考えられる。また、ブラジルチドメグサ及び *Lagarosiphon major* については、被害を生じる前に、今後も分布及び定着状況を注視していく必要がある。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご助成頂いた公益財団法人ウエスコ学術振興財団と、ハンドオーガーを借用させて頂いた株式会社ウエスコに深く感謝致します。

参考文献

- 1) 中国四国農政局 2013. 国営土地改良事業事後評価 国営総合農地防災事業「児島湖沿岸地区」.
http://www.maff.go.jp/chushi/kyoku/jigohyoka/pdf/2_3_kiso.pdf (2017 年 4 月 30 日確認)
- 2) 中嶋佳貴・沖 陽子 2017. 特定外来生物ブラジルチドメグサの栄養繁殖特性. 日本緑化工学会誌 42(4), 101-107.
- 3) 中嶋佳貴・沖 陽子 2012. 岡山市南部における沈水雑草 *Lagarosiphon major* の発生分布状況. 雑草研究 57(別), p. 90.
- 4) 沖 陽子 2013. 雑草の多面的機能を活用した環境修復に関する実証研究. 雑草研究 58(4), 190-197.
- 5) 桜井善雄 1997. 水辺の環境学 生きものとの共存. 新日本出版社, 122-125.

ウシ卵管の律動的自発収縮を制御するペースメーカー細胞の探索

岡山大学 大学院環境生命科学研究科

山本ゆき

卵管は、配偶子を受精の場へ、初期胚を子宮へと輸送する役割をもち、その輸送能には平滑筋の自発的な律動的収縮による卵管のぜん動運動が重要である。一部器官の筋組織は自ら動くことができる「自動能」を有し、それを制御するのがペースメーカー細胞である。そこで卵管自動能の発生メカニズムを明らかにするため、本研究ではペースメーカー細胞の探索を試みた。ペースメーカー細胞の活動にはイオンの流出入によって引き起こされる脱分極が必要である。そこで、卵管収縮能に与えるイオンチャネルについて検討したところ、塩素チャネルがウシ卵管自動能の制御に関与していることが明らかとなった。次に腸管のペースメーカーであるカハール介在細胞 (ICC) に発現する塩素チャネル「Anoctamin-1」および ICC マーカー「c-kit」の発現を検討したが、平滑筋層に明瞭な陽性反応は認められなかった。以上より、ウシ卵管自発収縮には塩素イオンの移動が必須であるものの、腸管とは異なるペースメーカーが存在している可能性が示された。現在卵管平滑筋細胞の培養法確立に取り組んでおり、*in vitro* でのペースメーカー細胞の機能解析方法を検討中である。

＜緒言＞

哺乳動物の卵管は受精の場、配偶子および初期胚の輸送通路であり、卵管輸送の機能異常は不妊や卵管妊娠の原因になりうる。卵管膨大部で受精した初期胚は卵管内で発育しながら子宮に向けて輸送され、受精後数日で子宮に入る。配偶子および初期胚は、卵管上皮細胞の繊毛運動および平滑筋の収縮弛緩運動によって輸送されることが知られている。峡部は厚い平滑筋層を持つ一方で繊毛上皮細胞が少なく、峡部における初期胚の輸送は主に平滑筋の収縮弛緩運動に依存すると考えられる。しかし、卵管平滑筋の運動の制御メカニズムは明らかでない。

一般的に体の器官は神経系の支配を受けて動いているが、一部器官の筋組織は神経系による命令無しに自ら動くことができる。この能力を自動能と言い、それを担っているのがペースメーカー細胞である。ペースメーカー細胞は筋収縮に必要な電気刺激(細胞膜脱分極)を自ら定期的に生み出し、筋肉を自発的に収縮させる。ウシ卵管峡部組織でも律動的な自発収縮が確認されている。自動能を持つ器官の代表例として、心臓や消化管が多く研究されている。心臓においては特殊心筋/洞房結節がペースメーカー細胞であると知られている。消化管においてはカハール介在細胞 (Interstitial Cells of Cajal: ICC) がペースメーカー細胞であると提唱され、以来様々な動

物種において研究されている。ペースメーカー細胞があることにより、心臓は血液を拍出し、消化管は食物を消化・運搬している。

心臓ペースメーカー細胞の脱分極にはナトリウム (Na) イオンの細胞内への流入が、消化管ペースメーカー細胞では塩素 (Cl) イオンの流出が重要であると考えられている。Na や Cl イオンは各イオンチャネルを介して移動し、細胞を脱分極させる。脱分極は、心筋または平滑筋に伝達され、筋細胞の電位依存性カルシウム (Ca) チャネルが開き、細胞外からの Ca が流入することで収縮が開始する(図 1)。消化管の ICC における自発的な脱分極は Cl チャネルの一つである Anoctamin-1 (ANO1) を介していることが示されている。

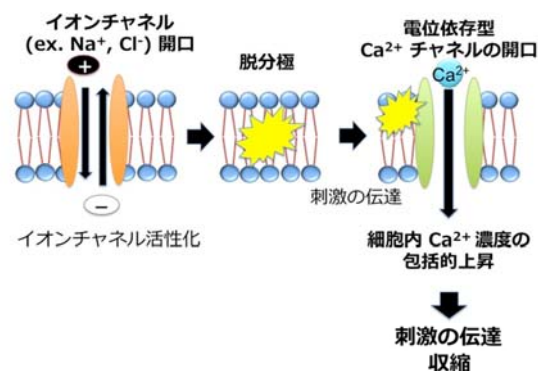


図 1. 自発収縮発生時に認められるペースメーカー細胞または平滑筋細胞での変化

これらのことから、卵管の収縮弛緩運動は一連のイオンの流れにより卵管筋層内のペースメーカー細胞で電位が発生し、それが伝達された結果生じている可能性が考えられる。本研究では、ウシ卵管峡部における自発性収縮の制御機構とペースメーカー細胞の分布を明らかにするために、自発収縮に関与するイオンチャネルとその局在について検討した。

<材料と方法>

1. ウシ卵管の採取および分類

食肉処理センターにおいて採取したウシ卵管を氷冷した生理食塩水に浸漬して研究室に持ち帰った。卵管間膜および子宮広間膜から卵管を切り取り解剖台に固定し、脂肪組織や結合組織などの余分な組織を除去した。その後、卵管采および子宮卵管移行部を切除し、残りの卵管を卵管采側から三等分して、膨大部、膨大部峡部移行部、峡部とした。以降、峡部を実験に用いた。

2. ウシ卵管峡部平滑筋の収縮試験 (マグヌス法)

峡部組織を切り開き、約 4 mm の長さで切り分けた。それぞれの切片は片側をマグヌス管内にて固定し、もう片側はトランスデューサーに接続した。各マグヌス管内にはクレブスリンガー液を 10 ml ずつ入れ、温度を 38.5℃ で保った。また実験中はクレブスリンガー液中に混合ガス (95% O₂, 5% CO₂) を供給し続けた。切片はまずクレブスリンガー液中にて約 1 時間平衡化を行った。卵管組織が律動的な自発収縮を示すことを確認したのち、各マグヌス管に Na チャネル阻害剤であるテトロドトキシン (1 μM)、および Cl チャネル拮抗剤である 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) と Niflumic acid (NFA) を 50 μM 又は 100 μM の濃度で添加した。コントロールには阻害剤の溶媒として用いた 0.1% Dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加した。収縮頻度を force-displacement transducer を用いて測定し、ポリグラフを用いて図示した。

3. データ解析

本実験では、抽出された律動的な卵管平滑筋運動

の波形の各ピーク(最大収縮時) の数をカウントし、収縮回数とした。処理前 0-15 分、処理後 0-120 分までの毎 15 分間における収縮回数をカウントし、時間経過に伴う収縮回数の推移を図示した。

4. 卵管組織切片の作製

1 で切り分けた峡部を長さ 5 mm の輪切りにし、10% 中性ホルマリン液に 20-24 時間浸漬した。その後 70% エタノール、90% エタノールおよび 100% エタノールで段階的に脱水した。続いてキシレンで透徹後、キシレン・パラフィン等量液で 45 分、パラフィンで 3 時間浸漬して包埋した。包埋したサンプルは 6 μm に薄切後、シランコート済みスライドガラスに接着させ、免疫組織化学に用いた。また、ポジティブコントロールとしてウシ空腸を使用した。

5. 免疫組織化学

ICC に発現する Cl チャネル「Anoctamin-1 (Ano1)」と、ICC マーカーとして知られる「c-kit」タンパク質を免疫組織化学法 (ポリマー法) により染色した。切片の観察、撮影にはバイオイメージングナビゲーター (FSX100, Olympus) を用いた。

7. 統計処理

結果は GraphPad Prism version. 6.03 (GraphPad Software Inc.) により Repeated measure Two-way ANOVA で分散分析を行った後、データの経時的変化は Dunnett's multiple comparisons test を、拮抗剤の各添加濃度による変化は Tukey's multiple comparisons test を用いて解析した。また P<0.05 である場合に統計学的に有意差があるとみなした。

8. 実験デザイン

実験 1: Na チャネル阻害剤及び Cl チャネル阻害剤がウシ卵管自発収縮に与える影響

卵管平滑筋の自発収縮に Na チャネルまたは Cl チャネルのいずれが関与しているかを明らかにするために、排卵後 0-3 日および 19-21 日のウシ卵管峡部平滑筋にテトロドトキシン、または NPPB または NFA を添加した際の影響を収縮試験にて検討

した。

実験 2: ウシ卵管峡部平滑筋層におけるペースメーカー細胞局在の検討

腸管のペースメーカーとして知られる ICC が存在しているかを明らかにするために、ICC の活動に重要な Cl チャネル「Ano1」タンパク質局在と ICC のマーカーとして知られる c-kit タンパク質局在を、免疫組織化学にて検討した。

<結果>

実験 1: Na チャネル阻害剤及び Cl チャネル阻害剤がウシ卵管の自発収縮に与える影響

1) Na チャネル阻害剤の影響

ウシ卵管峡部平滑筋に Na チャネル阻害剤である テトロドトキシンを $1\text{ }\mu\text{M}$ の濃度で添加した結果、自発収縮に影響は認められなかった (図 2)。

2) Cl チャネル阻害剤の影響

ウシ卵管峡部平滑筋に Cl チャネル拮抗剤である NPPB (Cl チャネル全てに有効) を $50\text{ }\mu\text{M}$ 又は $100\text{ }\mu\text{M}$ の濃度で添加した結果、検討した全て ($n = 5$) の卵管組織において時間経過に伴い収縮回数は顕著に減少した。コントロールに比べいずれの添加濃度、時間区においても有意差が認められた。

さらに、NFA (カルシウム依存性 Cl チャネルに有効) を $50\text{ }\mu\text{M}$ 又は $100\text{ }\mu\text{M}$ の濃度で添加した結果、検討した全て ($n = 5$) の卵管組織においていずれの濃度においても時間経過に伴い収縮回数は顕著に減少した。コントロールに比べいずれの添加濃度、時間区において有意差が認められた (図 3)。

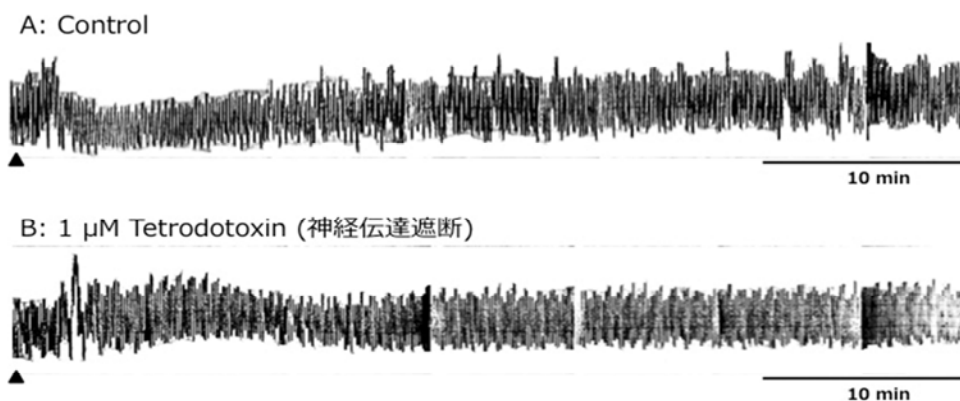


図 2. Na チャネル阻害剤 (テトロドトキシン) がウシ卵管峡部の自発収縮に与える影響。

A: DMSO, B: テトロドトキシン添加 (▲)

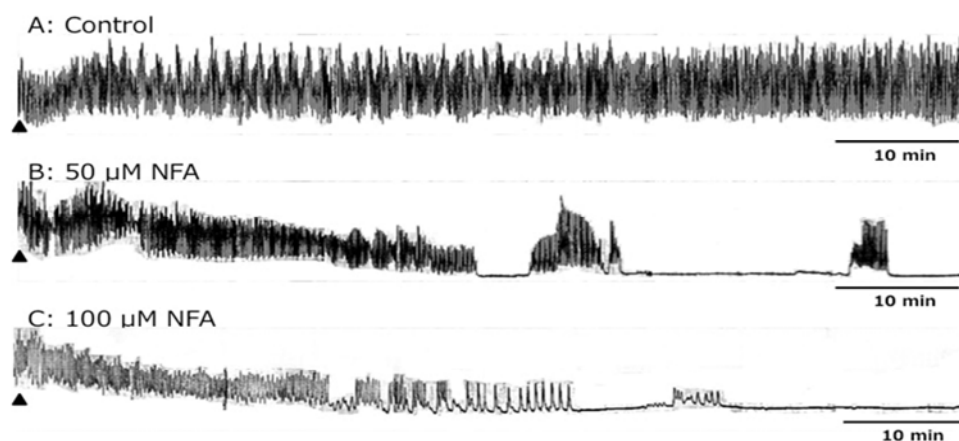


図 3. NFA がウシ卵管胸部の自発収縮に与える影響。A: DMSO, B: NFA $50\text{ }\mu\text{M}$, C: NFA $100\text{ }\mu\text{M}$ 添加

実験 2:ウシ卵管峡部平滑筋層におけるペースメーカー細胞局在の検討

実験 1 より、ウシ卵管峡部の自発収縮には カルシウム依存性 Cl チャンネルが関与している可能性が考えられた。そこで腸管における自発収縮ペースメーカー細胞である ICC に発現するカルシウム依存性 Cl チャンネル「Ano1」と、ICC マーカーの「c-kit」の局在を、ウシ卵管胸部組織で検討した。ポジティブコントロールとして用いたウシ空腸の平滑筋層には Ano1 ならびに c-kit (ICC マーカー) の明瞭な陽性反応が認められた。一方、卵管峡部組織では Ano1 および c-kit 陽性細胞は平滑筋層には観察されなかった (図 4)。

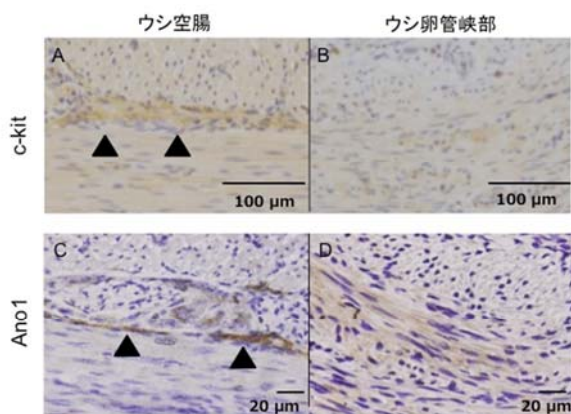


図 4. ウシ卵管峡部 (B,D) および空腸 (A,C) 平滑筋層における、c-kit (A,B) および Ano1 (C, D) タンパク質の局在。各タンパク質の陽性反応はウシ空腸にのみ確認された (▲)。

<まとめ>

本研究において、NPPB (広範の Cl チャンネル阻害剤) ならびに NFA (カルシウム依存性 Cl チャンネル選択的阻害剤) を添加した結果、自発収縮の回数が減少したことから、ウシ卵管峡部平滑筋の自発収縮には Cl チャンネル、特にカルシウム依存性 Cl チャンネルが関与している可能性が示された。また、Na チャンネル阻害剤であるテトロドトキシンは自発収縮に影響を及ぼさなかったことから、ウシ卵管峡部組織の自発収縮機構に Na イオンは関与しないことも示

された。これにより、カルシウム依存性 Cl チャンネルの開口によって脱分極を発生させる消化管のペースメーカー細胞 ICC の存在を疑ったが、ICC に発現する Cl チャンネルやマーカータンパク質の局在はウシ卵管峡部では確認されなかった。ウシ卵管自発収縮の制御機構は消化管と異なり、Ano1 以外の Cl チャンネルを有するペースメーカー細胞が関与しているものと考えられた。

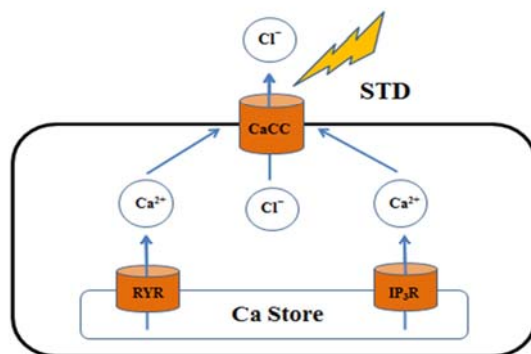


図 5. ウシ卵管ペースメーカー細胞における脱分極発生機構の仮説。小胞体などの細胞内カルシウムストアに存在する RYR または IP₃R が開口することで細胞内カルシウム濃度が上昇し、カルシウム依存性 Cl チャンネルが開口する。Cl イオンが細胞外へ流出することで膜電位が変化し脱分極が発生する。CaCC: カルシウム依存性 Cl チャンネル、RYR: リアノジン受容体、IP₃R: イノシトール三リン酸受容体

<今後の展望>

本研究結果より、ウシ卵管自発収縮を制御する機構の一端は明らかになったものの、ペースメーカー細胞の同定には至らなかった。今後、他のイオンチャンネルの関連やその局在を検討し、組織におけるペースメーカーの分布を検討する。それと同時に、*in vitro* でのペースメーカー細胞及び平滑筋の活動を検討するため、現在平滑筋細胞の単離培養系を確立中である。培養系が確立次第、細胞における脱分極の発生を測定することでペースメーカー細胞の活動を検出し、より詳細なウシ卵管の自発収縮制御機構を明らかにすることを想定している。

<謝辞>

本研究に多大な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。さらに、多大なご助言をいただきました奥田潔博士（帯広畜産大学学長）ならびに木村康二博士（岡山大学教授）に深謝いたします。また、試験機器やサンプル譲与にご協力下さった畑生俊光博士（岡山大学准教授）、北村延夫博士（帯広畜産大学教授）ならびに松山秀一博士（農研機構畜産草地研究所主任研究員）に深く感謝申し上げます。

非モデル珪藻種の比較解析に基づくバイオシリカナノパターン形成機構の解明

岡山大学大学院環境生命科学研究科

根本 理子

珪藻が形成するシリカ殻は現在の微細加工技術では合成不可能なナノパターン構造を持つ。近年、珪藻シリカ殻のナノパターン構造が持つ特性（フォトニック結晶特性、多孔質性）をナノテクノロジー分野に応用する研究が行われている。珪藻は種特異的なナノパターン構造のシリカ殻を形成するが、その構造制御機構は未だ不明である。以前の研究から、珪藻のシリカ殻に局在するタンパク質が種特異的なナノパターン構造を規定している可能性が示唆された。そこで本研究では、珪藻シリカ殻のナノパターン形成機構を明らかにするため、異なるナノパターン構造のシリカ殻を持つ非モデル珪藻種のシリカ殻局在タンパク質を抽出し、比較解析を実施した。さらに、同定したシリカ殻局在タンパク質の機能解析のため、2 種の非モデル珪藻種について遺伝子組換え系の確立に取り組んだ。

1. 目的

真核微細藻類の一種である珪藻の形成するシリカ (SiO_2) から成る殻は、現在の微細加工技術では合成不可能なナノパターン構造を有する。また、そのナノパターン構造は種によって異なる。珪藻のシリカ殻が持つ規則的なナノパターン構造は、フォトニック結晶特性を示すことから、その特性を生かし、生体分子検出のためのバイオセンサー、ガスセンサー、太陽電池等、ナノテクノロジー分野への応用が報告されている (*Trends Biotechnol.* 27, 116-27 (2009))。例えば、フォトニック結晶の場合、ナノパターン構造が変化することで、その光学特性が変化するため、ナノパターン構造を自在に制御可能になれば材料特性の向上や新規機能の付加につながることを期待される。

申請者の以前の研究 (*Marine genomics* 16, 39-44 (2014)) から、珪藻の殻に含まれるタンパク質のサイズや配列パターンによって種特異的なナノパターン構造が規定されている可能性が示唆された。そこで本研究では、異なるナノパターン構造のシリカ殻を持つ非モデル珪藻 3 種 (図 1) のシリカ殻に含まれるタンパク質を同定し、その配列及び機能を詳細に比較することで珪藻種特異的なシリカ殻ナノパ

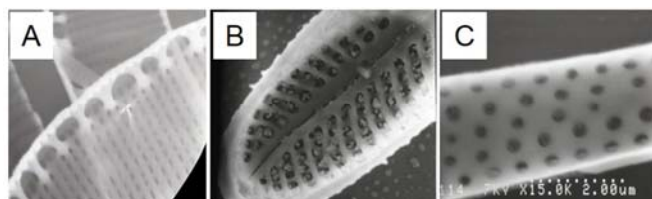


図 1 本研究で用いた非モデル珪藻種
A. *Nitzschia* 属、B. *Achnanthes* 属、
C. *Pseudodelyanella* 属

ーン構造の形成に関わる生物学的因子を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

2-1. RNA-seq による発現遺伝子データセットの構築

藻体のトータル RNA の抽出は、フェノールグアニジン法に基づく TRI Reagent (MOR) を用いて行った。対数増殖期の藻体を 9,000 g, 10 分, 4°C で遠心回収した後、ただちに液体窒素で凍結した。その後、藻体と同重量のジルコニアビーズと TRI REAGENT 1 mL を添加し、ビーズビーターで細胞を破碎した (3,200 rpm, 30 秒)。その後の操作はキット添付のプロトコールに従った。抽出した RNA を

さらにスピнкаラム (RNeasy Mini Kit (Qiagen)) を用いて精製した。上記方法で得られたトータル RNA から mRNA を精製し、次世代シーケンサ (illumina HiSeq) 解析のためのライブラリを作製した。次世代シーケンサを用いた RNA-seq 解析により得られたリード配列をトリミング後、*de novo* アセンブルすることでコンティグ配列を取得した。得られたコンティグ配列を発現遺伝子データセットとして用いることとした。

2-2. シリカ殻局在タンパク質の抽出及び解析

シリカ殻中に含まれるタンパク質の抽出は以下の方法を用いて行った。1.5 L の培地で一週間培養を行い、遠心回収後-20℃保存しておいた藻体のペレットに、2%SDS, 100 mM EDTA を添加し、100℃, 30 分加熱処理した。遠心後、沈殿に対し同操作を再度行い、シリカ殻以外の細胞成分を除去した。その後、シリカ殻表面に残った有機物をさらに除去するためアセトンを用いて、シリカ殻が完全に白くなるまで洗浄を行った。精製したシリカ殻を顕微鏡で観察し、シリカ殻のみ精製できていることを確認した。超純水で洗浄後、*overnight* で凍結乾燥したものをシリカ殻画分とした。得られたシリカ殻に対し、フッ化水素酸を添加し、シリカを溶解させた。その後、遠心し不溶性画分を除去した後、上清画分を真空下で乾燥させた。乾燥後のペレットを超純水に懸濁後、水酸化ナトリウムを添加し中和した。この溶液をシリカ殻局在タンパク質画分とした。

上記のシリカ殻局在タンパク質を、BCA 法を用いて定量後、トリシン SDS-PAGE を用いて分離した。その後、SDS-PAGE のバンドを切り出し、各種プロテアーゼを用いてゲル内消化を行うことでペプチドを抽出した。抽出したペプチドは HPLC-Chip/QTOF MS を用いて解析した。

2-3. 非モデル珪藻の遺伝子組換え系の確立

シリカ殻局在タンパク質の機能解析を行うため、2 種の珪藻種 (*Nitzschia* 属、*Achnanthes* 属) について遺伝子組換え系を確立することを目的として実験を行った。形質転換体の選抜には、ブレオマイシン系の

抗生物質である Zeocin を使用することとした。まず、形質転換体の選抜に用いる薬剤の感受性試験を行った。0, 1, 10, 100, 1000 µg/mL の Zeocin を含む 1% 寒天培地に対数増殖期の藻体を播種し、コロニー形成の有無を調べた。

次に遺伝子組換え用プラスミドの構築を行った。これまでの報告から、珪藻の形質転換においては、内在性の fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein (*fcp*) 遺伝子のプロモーターを用いた場合に高効率で形質転換体を得られることが報告されている。*Nitzschia* 属、*Achnanthes* 属の *fcp* 遺伝子プロモーターを取得するため、まず他種珪藻の *fcp* 遺伝子のコンセンサス配列に基づき設計したプライマーを用いて、ゲノムから *fcp* 遺伝子の増幅を行った。その後、得られた *fcp* 遺伝子の上流、下流配列を解析し、*fcp* 遺伝子の推定プロモーター及び推定ターミネーター配列を決定した。上記で取得した推定プロモーター及び推定ターミネーター配列を用いて、放線菌由来ブレオマイシン耐性遺伝子(*Sh ble*)と *gfp* 遺伝子を発現するプラスミドを構築した。

構築したプラスミドを、パーティクルガン法を用いて珪藻へ導入した。パーティクルガン法においては、ヘリウムガス圧力は 1550 psi, タングステン粒子は、直径 0.6 µm もしくは 1 µm のものを使用した。ポジティブコントロールとして、既に遺伝子組換え系が確立されているモデル珪藻の *Phaeodactylum tricornutum* および *P. tricornutum* の内在性プロモーターが組み込まれた pPha-T1 プラスミド (*J. Phycol.* 36, 379-386 (2000)) を使用して同様にパーティクルガン法を用いた形質転換を行った。

3. 結果及び考察

3-1. 発現遺伝子データセットの構築

全ての珪藻について、RNA-seq の結果得られたリード配列の 80%以上を *de novo* アセンブルに用いることができた。最終的にコンティグ数 40,469 ~ 71,930、平均コンティグ長 991 bp ~ 1,147 bp の発現遺伝子データセットを構築した (表 1)。本研究で用いる 3 種の非モデル珪藻の比較解析に向けた基盤情報を構築することができた。

表1 構築した非モデル珪藻の発現遺伝子データセットの概要

	Number
Number of contigs	
- <i>Nitzschia</i> sp.	40,498
- <i>Achnanthes</i> sp.	74,830
- <i>Pseudoleyanella</i> sp.	45,400
Average contig length (bp)	
- <i>Nitzschia</i> sp.	1,021
- <i>Achnanthes</i> sp.	991
- <i>Pseudoleyanella</i> sp.	1,147
Maximum contig length (bp)	
- <i>Nitzschia</i> sp.	11,288
- <i>Achnanthes</i> sp.	19,775
- <i>Pseudoleyanella</i> sp.	19,181

3-2. シリカ殻局在タンパク質の抽出及び解析
SDS, EDTA およびアセトンを用いた洗浄により、シリカ殻のみ精製することに成功した(図2)。



図2 藻体懸濁液(左)と精製後のシリカ殻懸濁液(右)

顕微鏡観察からも、精製されたシリカ殻を確認した。精製したシリカ殻をフッ化水素酸処理することで、シリカ殻に含まれるタンパク質の抽出を行った。その結果、1 mg のシリカ殻重量当たり 4.3~6.8 μg のタンパク質が回収された(表2)。この結果より、異なる珪藻種においてもシリカ殻重量

当たりのタンパク質含量は大きく変わらないことが示された。本研究により、3 種の非モデル珪藻について、シリカ殻の精製条件及びシリカ殻局在タンパク質の抽出条件を確立することができた。

表2 珪藻シリカ殻からのタンパク質抽出結果

珪藻	<i>Nitzschia</i> 属	<i>Achnanthes</i> 属	<i>Pseudoleyanella</i> 属
藻体湿重量 (g)	2.2	1.1	2.6
精製後のシリカ殻乾燥重量 (mg)	49	32	26
シリカ殻から抽出したタンパク質量 (μg)	334	145	113
シリカ殻重量当たりのタンパク質含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	6.8	4.5	4.3

次に抽出したシリカ殻局在タンパク質をトリシン SDS-PAGE を用いて分離した。その結果、各珪藻種に特異的なタンパク質バンドが確認された(図3)。

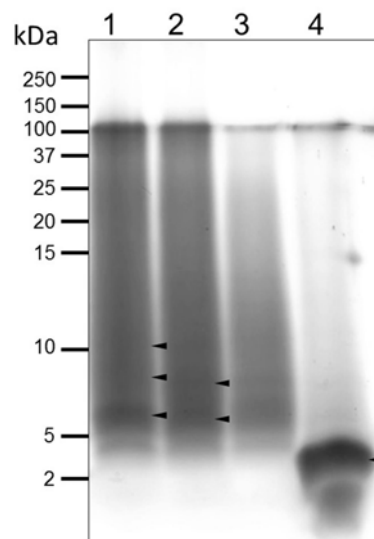


図3 シリカ殻から抽出したタンパク質の SDS-PAGE 結果

レーン 1, *Achnanthes* 属;
レーン 2, *Nitzschia* 属;
レーン 3, *Navicula* 属;
レーン 4, *Pseudoleyanella* 属

得られたタンパク質バンドを切り出し、各種プロテアーゼを用いてゲル内消化を行い、ペプチドを抽出した。抽出したペプチドを HPLC-Chip/QTOF MS を用いて解析した結果、複数のタンパク質が同定された。現在同定したタンパク質の配列を比較し、3 種の珪藻のシリカ殻ナノパターン形成との関係を解析中である。

3-3. 非モデル珪藻の遺伝子組換え系の確立

上記で同定したシリカ殻局在タンパク質の機能解析を行うため、2種の珪藻種 (*Nitzschia* 属、*Achnanthes* 属)について遺伝子組換え系を確立することを目的に実験を行った。薬剤感受性試験の結果、*Nitzschia* 属及び *Achnanthes* 属において、Zeocin 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で生育が阻害されることが示された。

他種珪藻の *fcp* 遺伝子のコンセンサス配列に基づき設計したプライマーを用いて、*Nitzschia* 属及び *Achnanthes* 属ゲノムから *fcp* 遺伝子を増幅することに成功した。得られた *fcp* 遺伝子上流、下流配列を解析し、*fcp* 遺伝子の推定プロモーター及び推定ターミネーター配列を決定した。推定プロモーター配列中には TATA ボックスや GC ボックスと考えられる配列が確認された。次に決定した *fcp* 遺伝子の推

定プロモーター及び推定ターミネーター配列を用いて、放線菌由来ブレオマイシン耐性遺伝子(*Sh ble*)および *gfp* 遺伝子を発現するための遺伝子組換え用プラスミドを構築した。*Nitzschia* 属の内在性 *fcp* プロモーターを組み込んだプラスミドを pNitfcp、*Achnanthes* 属の内在性 *fcp* プロモーターを組み込んだプラスミドを pAchfcp とした。構築したプラスミドを、パーティクルガン法を用いて *Nitzschia* 属及び *Achnanthes* 属に導入を行ったが、現在までに形質転換体は得られていない。ポジティブコントロールとして用いた *P. tricornutum* に本研究で構築したプラスミドを導入したところ、pNitfcp を導入した場合に、薬剤耐性の形質転換体を得ることができた。さらに、得られたクローンを蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP 蛍光を発していることが確認された (図4)。このことから構築したプラスミド pNitfcp が珪藻の形質転換に使用できることが示された。本研究で用いた *Nitzschia* 属及び *Achnanthes* 属珪藻の遺伝子組換え系の報告はないため、遺伝子導入のためのパーティクルガン法の条件等をさらに検討する必要があると考えられた。

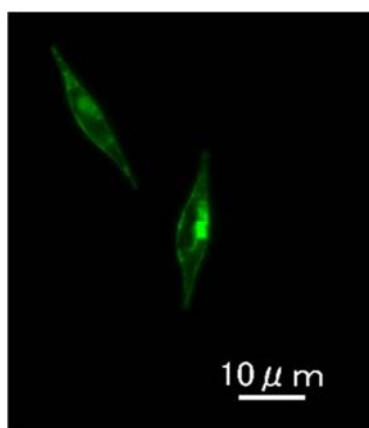


図4 pNitfcpを導入した *P. tricornutum* の
蛍光顕微鏡像

謝辞

本研究を支援いただきましたウエスコ学術振興財団
に深く感謝致します。

アブシジン酸誘導気孔閉口の調節に関与するカルシウムセンサータンパク質 CPK の機構解析

岡山大学大学院環境生命科学研究科

宗正 晋太郎

(概要) 気孔閉口を制御する植物ホルモンであるアブシジン酸は、乾燥ストレス下で生合成され、過度の蒸散による水分損失を抑制する働きを持つ。気孔閉口を制御するアブシジン酸シグナル伝達経路において、カルシウムイオンが重要なセカンドメッセンジャーとして機能することが古くから知られている。しかしカルシウムイオンがどのように気孔閉口応答の調節に関与しているのか、その分子機構の詳細は不明である。モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、孔辺細胞に高発現するカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 (CPK) をいくつか選抜し、その遺伝子破壊変異体を作成した。作成した変異体 *cpk4ple* では、野生株 *Col* と比較してアブシジン酸気孔閉口が抑制されていた。その原因を調査するため、ゲル内タンパク質リン酸化酵素アッセイを行い、アブシジン酸シグナル伝達の重要な調節因子である OST1 キナーゼの活性を調査した。結果、今回同定した CPK は、アブシジン酸による OST1 キナーゼの活性化には関与していないことがわかった。

【1. 背景】

乾燥ストレスは、農作物の収穫量に多大な影響を与える環境要因である。食糧の安定確保のために、農作物の乾燥ストレス耐性を向上させる技術の開発が求められている。しかしそのためには植物の乾燥ストレス応答の分子機構を詳細に理解する必要がある。植物の葉の表皮に存在する気孔は、一対の孔辺細胞と呼ばれる高度に分化した細胞から成る小孔である。気孔は、開閉運動を行うことで光合成に必要な二酸化炭素の取込みや蒸散による水分放出の調節を行う重要な場所である。一般的に、陸上高等植物において根から吸収した水分の 90%以上が気孔からの蒸散によって失われていると言われている。そのため、水の利用が限られた乾燥ストレス下では、植物は気孔を速やかに閉口し水分損失を抑制する必要がある。

植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) は、乾燥ストレスに応答して生合成され、気孔閉口を誘導する働きを持つ。その結果、植物は乾燥ストレス下で過度の蒸散を抑制することができる。ABA が気孔閉口を誘導する際に起こる細胞内情報伝達において、カルシウムイオン (Ca^{2+}) が情報伝達因子として機能することが知られている。しかしながら、その機能の詳細は不明である。 Ca^{2+} 結合モチーフである EF ハンドを持つカルシウム依存性タンパク質リン酸化

酵素 (CPK) は、植物や一部微生物に固有の Ca^{2+} センサータンパク質である。過去の研究で、孔辺細胞で発現する CPK のいくつかは、ABA 誘導気孔閉口の制御に関与することが報告されている (1, 2)。本研究では、CPK による ABA 誘導気孔閉口の制御機構をさらに明らかにするため、孔辺細胞に高発現する CPK を 4 つ破壊したシロイヌナズナ変異体 *cpk4ple* を用いて、その気孔の ABA 応答性の解析を行った。また気孔閉口運動の制御において中心的な役割を担う ABA 応答性タンパク質リン酸化酵素である OST1 の活性を評価した。

【2. 方法】

①植物

実験には、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた。シロイヌナズナ植物体は、明期 16 時間・暗期 8 時間サイクル、 21°C 、相対湿度 70%の人工気象器内で生育した。また 1000 倍希釈したハイポネックス (ハイポネックスジャパン) を週 2 回与えた。

②気孔開度のトラッキング測定実験

切り取ったロゼット葉の裏面を medical adhesive 7730 (Hollister US) を用いてカバーガラスに貼り付けた。その後、カミソリを用いて葉裏表皮が以外の組織を除去し、人工気象器内でバッファー中 (5 mM

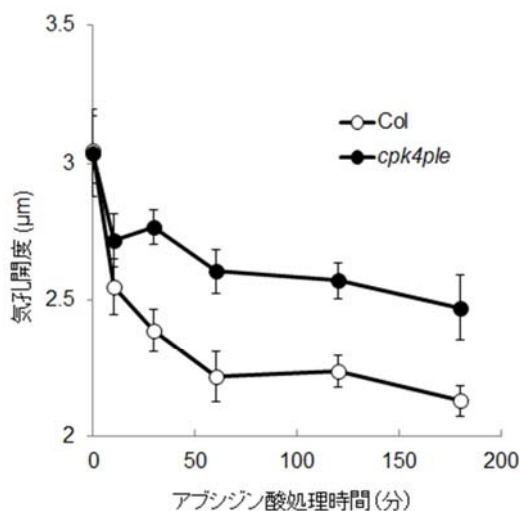
KCl、50 μ M CaCl、10 mM MES-Tris pH 5.6) に 2 時間浸漬した。その後 10 μ M アブシジン酸を加えて 3 時間、倒立顕微鏡を用いて葉裏表皮の気孔開度の変化をモニターした。

③インゲルキナーゼアッセイ

切り取ったロゼット葉を冷却した蒸留水を用いてブレンダーで破碎し、孔辺細胞リッチな表皮断片を大量に獲得した。この表皮断片からタンパク質を抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、タンパク質リフォールディングを行った (2)。その後 gamma-32P-ATP とヒストンを基質としてインゲルキナーゼアッセイを行い、OST1 キナーゼの活性を評価した。

【3. 結果・考察】

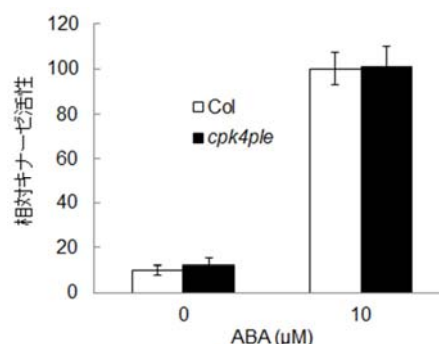
孔辺細胞に高発現する CPK のうち 4 つを破壊した変異体 *cpk4ple* を単離した。まず *cpk4ple* の気孔の ABA 応答性を調査した。気孔開度測定の結果、*cpk4ple* 変異体では、野生株 Col と比較して ABA に応答した気孔閉口が抑制されていることがわかった (図 1)。そのため今回調査した 4 つの CPK は、ABA 誘導気孔閉口の制御に関与することが明らかとなった。



(図 1) 気孔開度測定

さらに *cpk4ple* 変異体を用いて OST1 キナーゼの活性測定を行った。*cpk4ple* 変異体においてもアブシ

ジン酸に応答した OST1 キナーゼの活性化は野生株 Col と同様に起こることが明らかとなった (図 2)。この結果から、CPK は ABA による OST1 キナーゼの活性化には関与していないことが明らかとなった。以上の結果から CPK は、気孔閉口運動を制御する ABA シグナル伝達において OST1 キナーゼ活性化より下流のイベントの制御に関与することが示唆された。その詳細なメカニズムの解明に関しては今後のさらなる研究が必要である。



(図 2) OST1 キナーゼ活性測定

【4. 謝辞】

最後になりましたが、本研究の遂行を支援いただきましたウエスコ学術振興財団に深く感謝いたします。

【5. 参考文献】

- (1) Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang YF, Andreoli S, Tiriack H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM, Schroeder JI. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺- permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* (2006) 4:e327.
- (2) Brandt B, Munemasa S, Wang C, Nguyen D, Yong T, Yang PG, Poretsky E, Belknap TF, Waadt R, Alemán F, Schroeder JI. Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis guard cells. *eLife* (2015) 4:e03599.

二次曲面とそのクリストッフェル変換の研究

岡山大学大学院自然科学研究科

藤森 祥一

本研究 [1] では、曲面のクリストッフェル変換という概念に着目し、特に二次曲面のクリストッフェル変換で得られる曲面に共通する幾何学的性質を明らかにした。楕円面のクリストッフェル変換として得られる曲面については、平均曲率が 0 の曲面（極小曲面と呼ばれる）と深い関係があることが以前から知られていたが、一葉双曲面や二葉双曲面のクリストッフェル変換で得られる曲面の幾何学的性質については明らかにされていなかった。本研究では、一葉双曲面や二葉双曲面を通常のユークリッド空間ではなく、時空（ローレンツ・ミンコフスキー空間）の中の曲面とみなすことで、それらのクリストッフェル変換として得られる曲面も平均曲率が 0 の曲面と関係があることを明らかにした。

1. はじめに

3 次元ユークリッド空間の曲面で平均曲率が消えているものを極小曲面という。極小曲面は石鹸膜の数学的モデルとして 18 世紀頃から現在まで活発に研究が行われており、微分幾何学の中でも古典的な研究分野である。特に 19 世紀中頃からは複素解析的手法を用いた曲面の構成方法が発見され、理論が飛躍的に発展した。この複素解析的手法を用いると、すべての極小曲面は等長的でかつ各点で接平面が一致する 1 径数族を持つことがわかる。

1867 年クリストッフェルは上述の条件を少し弱め、共形曲率線座標系を持つ与えられた曲面に対し、その曲面と共形的でかつ各点で接平面が一致する曲面の研究を行った。このことから、与えられた曲面と共形的かつ各点で接平面が一致する曲面のことを、元の曲面のクリストッフェル変換で得られる曲面という。

二次曲面は一般に共形曲率線座標系を持つ（ヤコビの楕円関数を用いて具体的に書くことができる）。二次曲面の中で特に楕円面のクリストッフェル変換を考え（図 1）、楕円面を球面に近づけると、極限で対応する曲面はシャークタワーと呼ばれる極小曲面になり（図 2）、元の曲面（球面）はシャークタワーのガウス写像と一致する [2]。

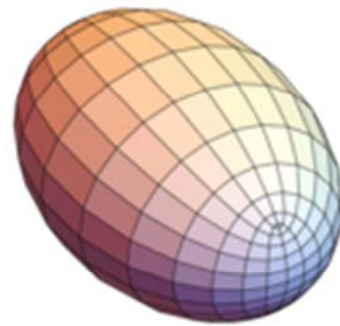


図 1. 楕円面の共形曲率線座標表示

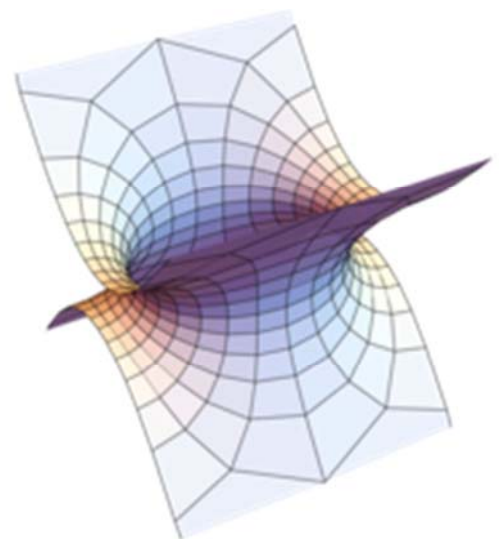


図 2. 図 1 のクリトッフェル変換で得られる曲面

同様に一葉双曲面や二葉双曲面も共形曲率線座標を持ち、そのクリストッフェル変換を考えることができるが、得られた曲面の幾何学的な特徴付けは得られていなかった。

本研究 [1] では、一葉双曲面や二葉双曲面、およびそれらのクリストッフェル変換で得られる曲面を、ユークリッド空間ではなく時空（ローレンツ・ミンコフスキー空間）の曲面とみなし、一葉双曲面や二葉双曲面を標準形に近づけると、その極限として時間的極小曲面や空間的極大曲面と呼ばれる曲面が得られることを示した。

2. 二葉双曲面とそのクリストッフェル変換

不定値計量 $(,) = dx^2 + dy^2 - dz^2$ を持つ 3 次元ベクトル空間を 3 次元時空または 3 次元ローレンツ・ミンコフスキー空間といい、 L^3 で表す。 L^3 の 0 でないベクトル x は $(x, x) > 0$ を満たすとき空間的、 $(x, x) = 0$ を満たすとき光的、 $(x, x) < 0$ を満たすとき時間的と呼ばれる。 L^3 の曲面上の点は、その 0 でない全ての接ベクトルが空間的なとき空間的点、空間的ベクトルと時間的ベクトルを共に接ベクトルに持つとき時間的点という。全ての点が空間的点である曲面を空間的曲面、全ての点が時間的点である曲面を時間的曲面という。空間的曲面に対しては、時間的単位法ベクトル場、すなわち $(n, n) = -1$ を満たす単位法ベクトル場をとり（ n は L^3 の標準的二葉双曲面に値をとる）、第二基本形式および平均曲率が定義される。この平均曲率が恒等的に消えている曲面を空間的極大曲面という。極大曲面という名前は、この曲面が局所的に面積極大であるという性質に由来する。空間的極大曲面はユークリッド空間の極小曲面と類似の複素解析的表示を持つが、完備なものは平面しかなく、大域的な性質を調べるためにはある種の特異点を許容する必要がある。

正の実数 a, b, c に対して、 L^3 の二葉双曲面

$$(x/a)^2 + (y/b)^2 - (z/c)^2 = -1$$

を考える。 x 軸と y 軸は共に空間的軸であるから、必要なら x 軸と y 軸を取り替えることで $a > b$ としてよい。この二葉双曲面をヤコビの楕円関数を用いて共形曲率線座標系で表示し、そのクリストッフェル

変換で得られる曲面を求める。 $a > b > c$ 、 $a > c > b$ 、 $c > a > b$ の 3 つの場合がある（図 3）。

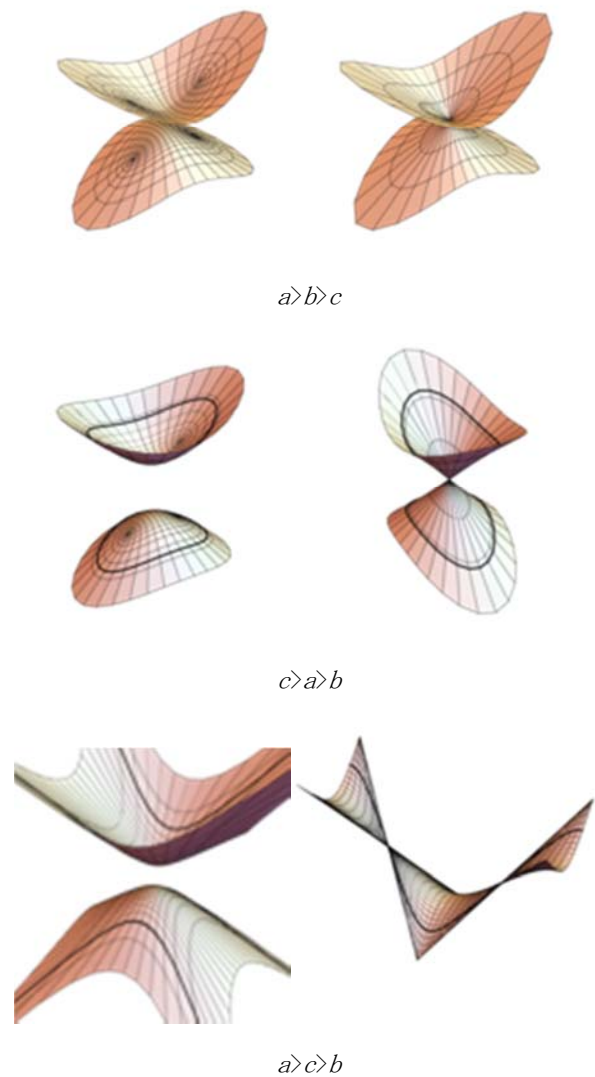


図 3. 二葉双曲面（左）とそのクリストッフェル変換で得られる曲面（右）。太線は計量が退化する箇所、すなわち曲面が時間的から空間的に型変化する箇所である。

いずれの場合も a, b, c を 1 に近づけ極限をとると、クリストッフェル変換で得られる曲面は空間的極大曲面となり、二葉双曲面はそれぞれのガウス写像と一致することを証明した [1]。

3. 一葉双曲面とそのクリストッフェル変換

L^3 の時間的曲面に対しては、空間的単位法ベクトル場、すなわち $(n, n) = 1$ を満たす単位法ベクトル場をとり（ n は L^3 の標準の一葉双曲面に値をとる）、第二基本形式および平均曲率が定義される。この平均

曲率が恒等的に消えている曲面を時間的極小曲面という。極小曲面という名前はユークリッド空間の極小曲面の名前を流用したものであり、 L^3 の時間的曲面で平均曲率が恒等的に消えているものが面積極小という性質を持っている訳ではない。時間的極小曲面は空間的極大曲面やユークリッド空間の極小曲面のように複素解析的表示を持たず、曲面も実解析的とは限らない。ただし時間的極小曲面はパラ複素構造と呼ばれる構造を持ち、これを用いると形式的には空間的極大曲面やユークリッド空間の極小曲面と類似の表示式がある。

正の実数 a, b, c に対して、 L^3 の一葉双曲面

$$(x/a)^2 + (y/b)^2 - (z/c)^2 = 1$$

を考える。前節と同様に $a > b$ としよ。この一葉双曲面をヤコビの楕円関数を用いて共形曲率線座標系で表示し、そのクリストッフェル変換を求める。前節と同様に $a > b > c$ 、 $a > c > b$ 、 $c > a > b$ の3つの場合があり、いずれの場合も a, b, c を1に近づけ極限をとると、クリストッフェル変換で得られる曲面は時間的極小曲面となり、一葉双曲面はそれぞれのガウス写像と一致することを証明した [1]。ただし、 $a > c > b$ の場合は一葉双曲面の全てを共形曲率線座標系で覆うことができず、覆えなかった部分のクリストッフェル変換に関する幾何学的特徴付けは今後の課題である (図 4)。

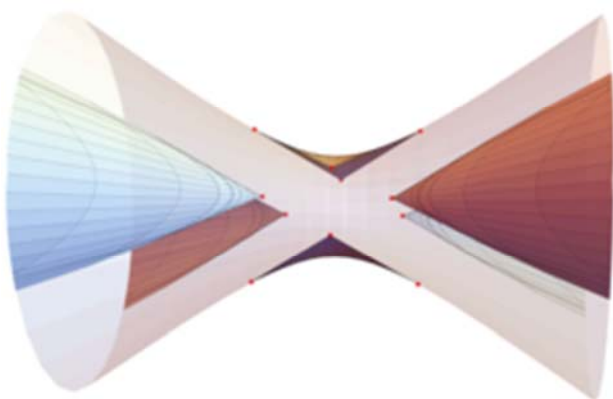


図 4. 一葉双曲面、 $a > c > b$ の場合。図の色が薄い部分は共形曲率線座標系で覆うことができなかった部分。また、赤い点は共形曲率線座標系の分岐点である。

4. 謝辞

本研究は公益財団法人ウエスコ学術振興財団の支援をいただいた。ここに記して感謝の意を表する。

5. 参考文献

- [1] S. Fujimori, U. Hertrich-Jeromin, M. Kokubu, M. Umehara, and K. Yamada, *Quadrics and Scherk towers*, preprint (arXiv: 1701.02134).
- [2] U. Hertrich-Jeromin, *Introduction to Möbius differential geometry*, London Math. Soc. Lec. Note Series 300, Cambridge University Press (2003).

ゲノム編集技術および透明化技術を用いた1細胞レベルでのエピジェネティック修飾の解析

岡山大学・資源植物科学研究所

長岐清孝

個々の細胞は組織内で異なるエピジェネティック修飾を受け制御されていると考えられる。これまで個別座位のエピジェネティック修飾は、クロマチン免疫沈降（ChIP）により解析されてきた。しかし、ChIP では、組織全体のエピジェネティック修飾が平均値として得られ、個々の細胞におけるエピジェネティック修飾は検出不能である。ChIP 以外にも蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫染色を組み合わせた方法が試みられているが、この方法では組織内位置情報が失われてしまう上に核内の構造変化も起きてしまう。そこで、本研究では、ゲノム編集技術の「標的 DNA 結合部位」と蛍光タンパク質を組み合わせ、染色体上の個別座位を可視化することにより、その座位のエピジェネティック修飾を1細胞レベルで検出する方法の開発を試みた。加えて、根以外の組織では葉緑体の自家蛍光が観察の障壁となるが、これまでの透明化技術はエピジェネティック修飾検出の為の感度をもたないので、組織免疫染色に利用可能な透明化技術を開発した。この方法では、葉組織を切片化すること無くエピジェネティック修飾が検出できた。

【イントロダクション】

細胞内の各染色体領域（個別座位）は、同一種内においても、その細胞の種類、組織内位置および周辺環境により異なるエピジェネティック修飾を受け制御されていると考えられる。このようなエピジェネティック制御による環境応答を理解する為には、組織内の個々の細胞のエピジェネティック制御の解析のみならず細胞の相互作用を鳥瞰図的に解析する必要がある。

これまで、エピジェネティック修飾は特異的な抗体を用いたクロマチン免疫沈降（ChIP）により解析されてきた。しかしながら、ChIP 法では数グラムの細胞をすり潰して解析するため、個々の細胞のエピジェネティック修飾を細胞ごとに解析することは不可能で、ChIP で得られる結果は用いた細胞集団のエピジェネティック修飾の平均値となる。

ChIP 法以外のエピジェネティック修飾の解析法として、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）と免疫染色を組み合わせた方法により個別座位のエピジェネティック修飾解析が試みられているが、この方法にはプロトプラスト化した細胞を用いるので、組織内位置情報は失われてしまう。加えて、FISH は「DNA の変成」を含み、これにより核の構造が変化

してしまう。

これまで、私たちは、エピジェネティック修飾の組織内観察を行う方法として、組織切片に対する免疫染色法を用いてきた。この方法により、切片の切断面に存在する細胞のエピジェネティック修飾は検出可能となったが、この方法は以下の問題点をもつ。

（1）FISH の為の変成により組織が変形してしまうので、FISH による組織内での個別座位の可視化は不可能である。（2）抗体の浸透は組織の切断面付近の細胞に限られ、組織の深部のエピジェネティック修飾の観察は不可能である。（3）根以外の組織では葉緑体や細胞壁由来の自家蛍光によりシグナルの観察が不可能である。

そこで、本研究では、FISH の代わりにゲノム編集技術の「標的 DNA 結合部位」と蛍光タンパク質を組み合わせ、染色体上の個別座位を可視化し、組織内の個々の細胞で検出する方法の開発を試みた。加えて、自家蛍光を除去する為に透明化法を適用したが、既存の方法では組織内でエピジェネティック修飾を検出することができなかったため、これらを改良し抗体の浸透効率を高めることにより組織内エピジェネティック修飾解析が可能な透明化法を開発した。

【ゲノム編集技術による個別座位の可視化】

シロイヌナズナ、イネ、タバコおよびトマトの動原体反復配列内に TALE (**transcription activator-like effectors**) 標的配列を設定し、これらを認識する TALE をコードする DNA 配列を Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 2.0 を用いて作成した。これらを植物形質転換用バイナリベクターの 35S プロモーターと GFP 遺伝子の間に挿入し、動原体配列を標的とした TALE-GFP 発現用のコンストラクトを作成した。

シロイヌナズナおよびタバコのコンストラクトをアグロバクテリウムに形質転換し、このアグロバクテリウムを植物体または培養細胞へ感染させることにより、形質転換植物または培養細胞を得た。しかしながら、蛍光顕微鏡を用いてこれらの形質転換体細胞内の GFP 局在を確認したが、いずれの細胞においても明確な GFP 局在は観察されなかった。

続いて、もうひとつのゲノム編集系である CRISPR/Cas9 を用いた GFP 融合コンストラクトを作成していたところ、2016 年 10 月に同様に TALE を用いたアプローチでシロイヌナズナのリボソーム遺伝子および動原体配列を可視化した論文が発表された (Fujimoto et al., 2016, Experimental Botany, Vol. 67, pp. 6101-6110)。この論文では、プロモーターに 35S プロモーターよりも高発現するプロモーター (PRS5a) が用いられていたことから、我々のコンストラクトの 35S プロモーターでは、TALE-GFP の発現量が不十分であった可能性がある。

同様の論文が発表されてしまったため、ゲノム編集技術による DNA 配列の可視化は、上記研究を行った東京理科大の松永研究室と共同で進めることとした。彼等の系を用いて PRS5a プロモーターをもつタバコ動原体配列を標的とした TALE-GFP 融合コンストラクトを作成し、現在形質転換植物を作成している。

【透明化技術を用いた免疫染色によるエピジェネティック修飾の組織内可視化】

始めにこれまでに発表されている透明化法である ClearSee 法 (Kurihara et al., 2015, Development,

Vol. 142, pp. 4168-4179) が組織免疫染色に利用可能かを確認したところ、ClearSee 処理により透明化した後にもエピジェネティック修飾および動原体特異的ヒストン H3 (CENH3) の抗原性が残存していることが確かめられた (図 1)。しかしながら、免疫染色シグナルは切断面もしくは導管から数細胞でしか観察されなかった。この結果は、分子量は 60 kDa と大きな抗体が植物組織に浸透するのに十分なスペースが無いためと考え、酵素処理による部分的な細胞壁除去とアルコール処理による部分的な細胞膜の破壊のステップを加えることにより抗体の浸透性の向上をはかった。試したアルコールのうちプロパノール処理で、抗体の浸透性が著しく向上することが明らかになった (図 1)。しかし、プロパノール処理のみでは、自家蛍光が残存するので、酵素処理、プロパノール処理、ClearSee 処理を連続的に行うことにより葉組織内でエピジェネティックシグナルを切片化すること無く検出できることがわかった (図 1 および 2)。

続いて、この方法の拡張性を確かめる為に他の植物種を材料に同解析を行ったところ、試した全ての単子葉植物 5 種 (コムギ、オオムギ、イネ、トウモロコシおよびニンニク) および双子葉植物 4 種 (シロイヌナズナ、タバコ、トマトおよびヒマワリ) で、この方法が利用可能であることが示された (図 3)。加えて、この方法が適用可能なエピジェネティック修飾について調べたところ、メチル化ヒストン、アセチル化ヒストンおよびメチル化 DNA が検出可能であることがわかった。エピジェネティック修飾以外にも CENH3 や GFP が検出できたことから、この方法は多くのタンパク質の組織内免疫染色に利用可能であることがわかった。

また、この方法で得られるシグナルは強く、蛍光顕微鏡による解析に比べて、より強いシグナルが要求される共焦点レーザー顕微鏡による 3 次元解析やハイレゾリューション解析にも利用可能であった (図 4 および 5)。加えて、根では 200 μm の深さでもシグナルが観察された (図 6)。この深さは共焦点レーザー顕微鏡による生体観察の限界値に近く、開発した方法が共焦点レーザー顕微鏡による多くの解

析に適用可能であることが示された。

これらの結果を論文にまとめ、Scientific Reports に掲載された (Nagaki et al., 2017, Scientific Reports, srep42203)。

現在、エピジェネティック修飾と DNA 配列を組織内で同時検出する為に「*in situ* TALE」により DNA 配列の組織切片内での観察を試みている。TALE-GFP は、このタンパク質のみで標的 DNA 配列を認識する

ことが可能である。このタンパク質は抗体に比べて小さなタンパク質であり、抗体以上の浸透性をもつと考えられる。組織内 *in situ* TALE による個別座位の可視化が可能となれば、「形質転換が必要」という植物における TALE を用いた個別座位の可視化の障壁を取り去ることが可能で、全ての植物で利用可能なユニバーサルな技術となることが期待される。

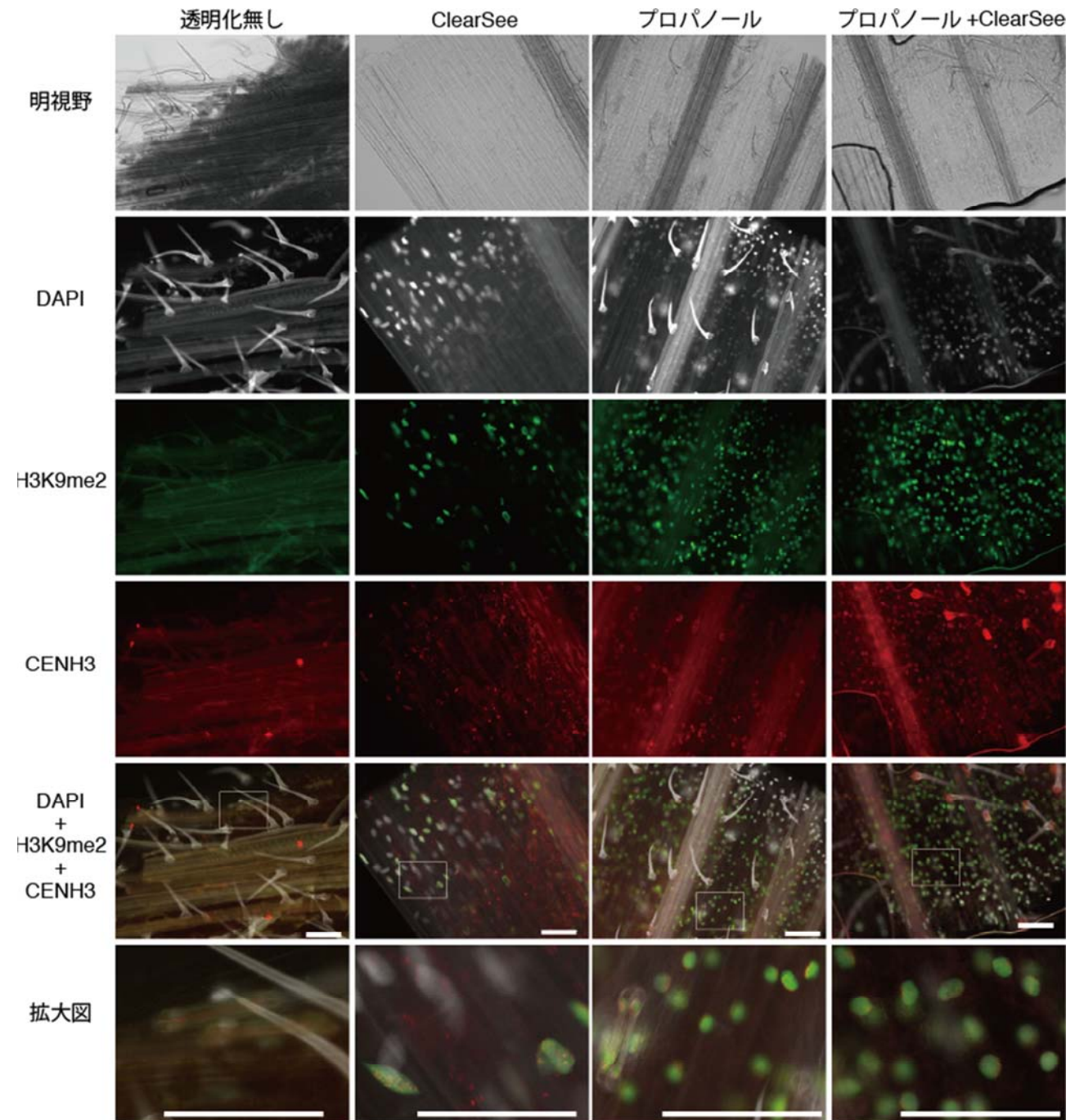


図 1、コムギの葉に対する透明化の効果 スケールバーは 100 μ m を示す。

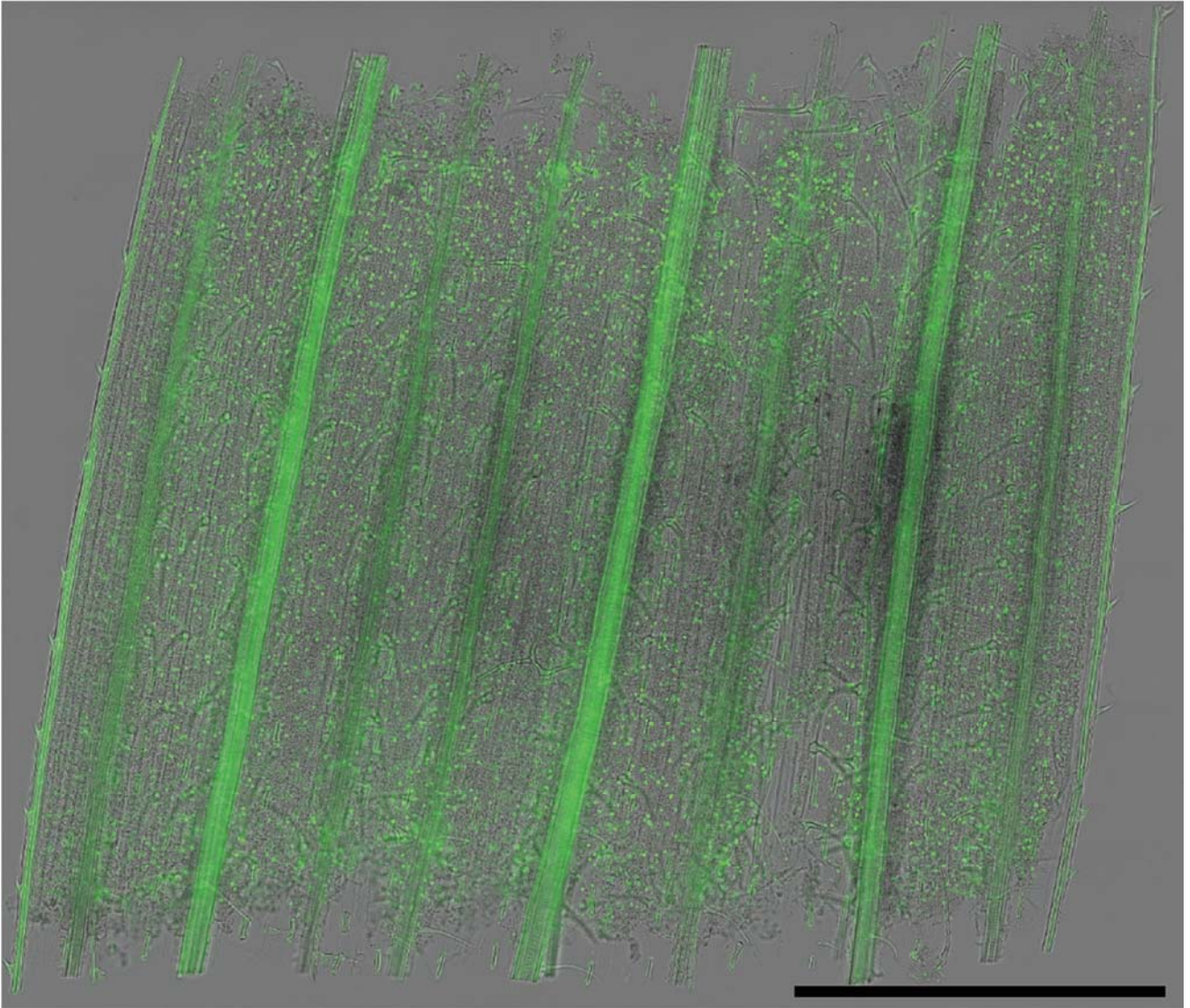


図2、透明化したコムギの葉におけるヒストンメチル化の検出

緑色の点はメチル化ヒストンのシグナル。スケールバーは1 mmを示す。

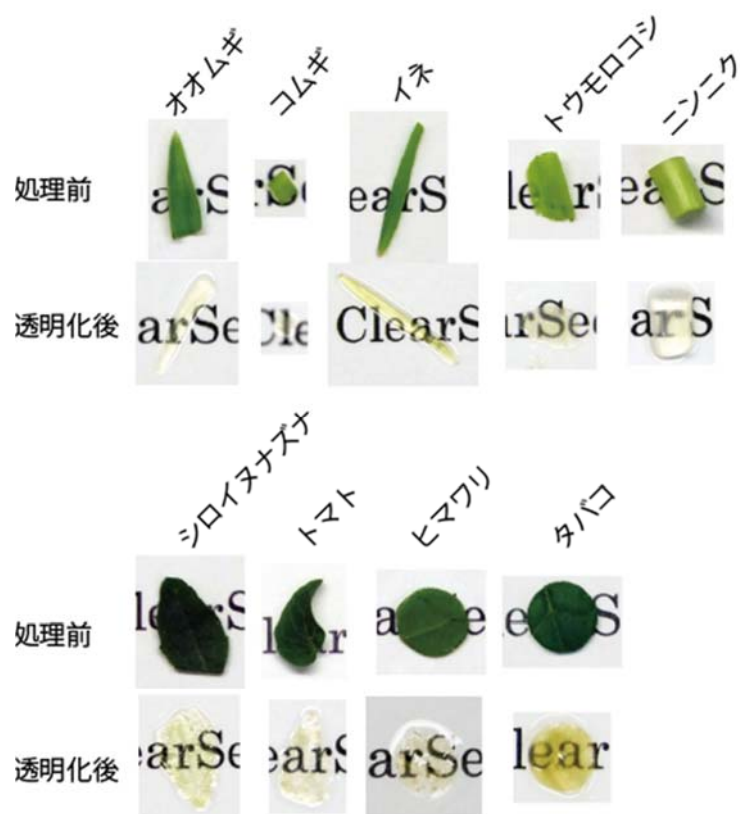


図 3、様々な植物の葉に対する透明化

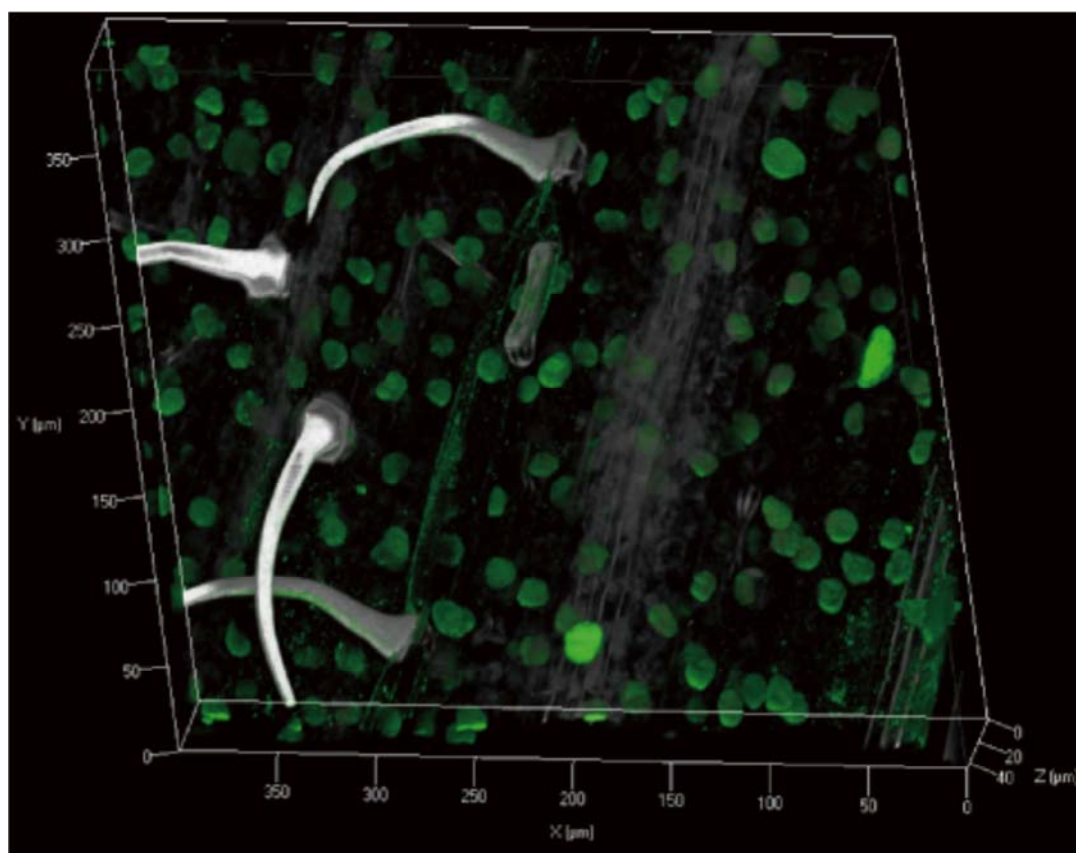


図 4、共焦点レーザー顕微鏡によるコムギの葉の3次元解析
緑色の点はメチル化ヒストンのシグナル。

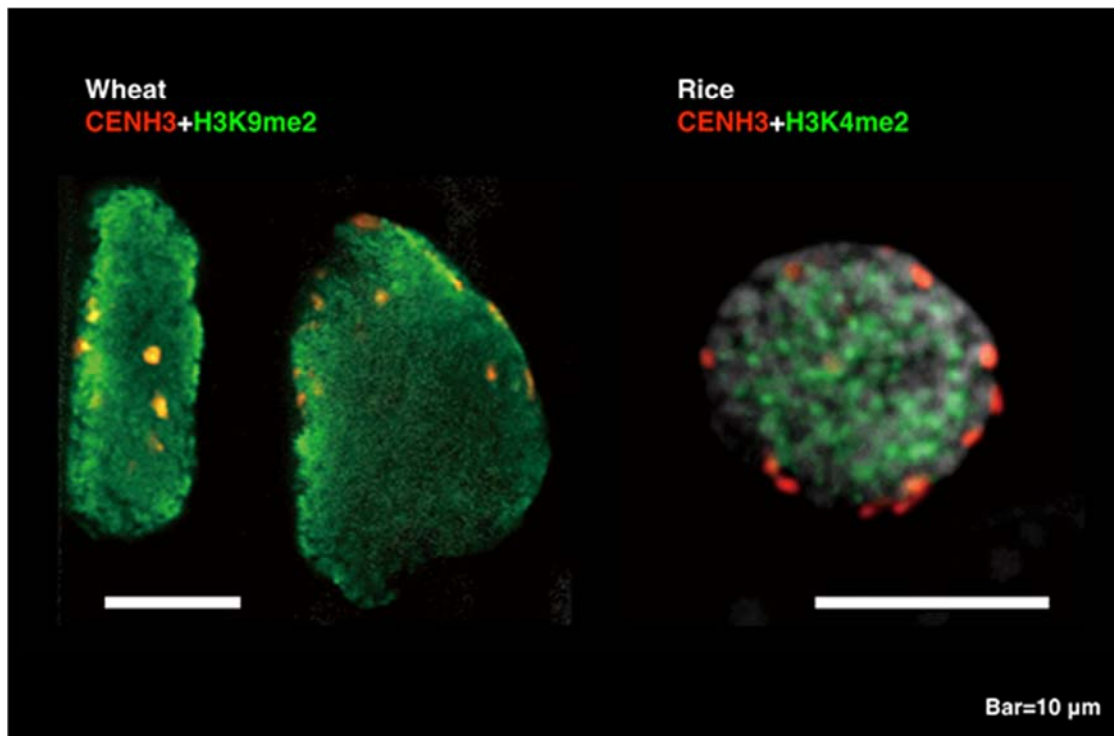


図5、共焦点レーザー顕微鏡によるハイレゾリューション解析

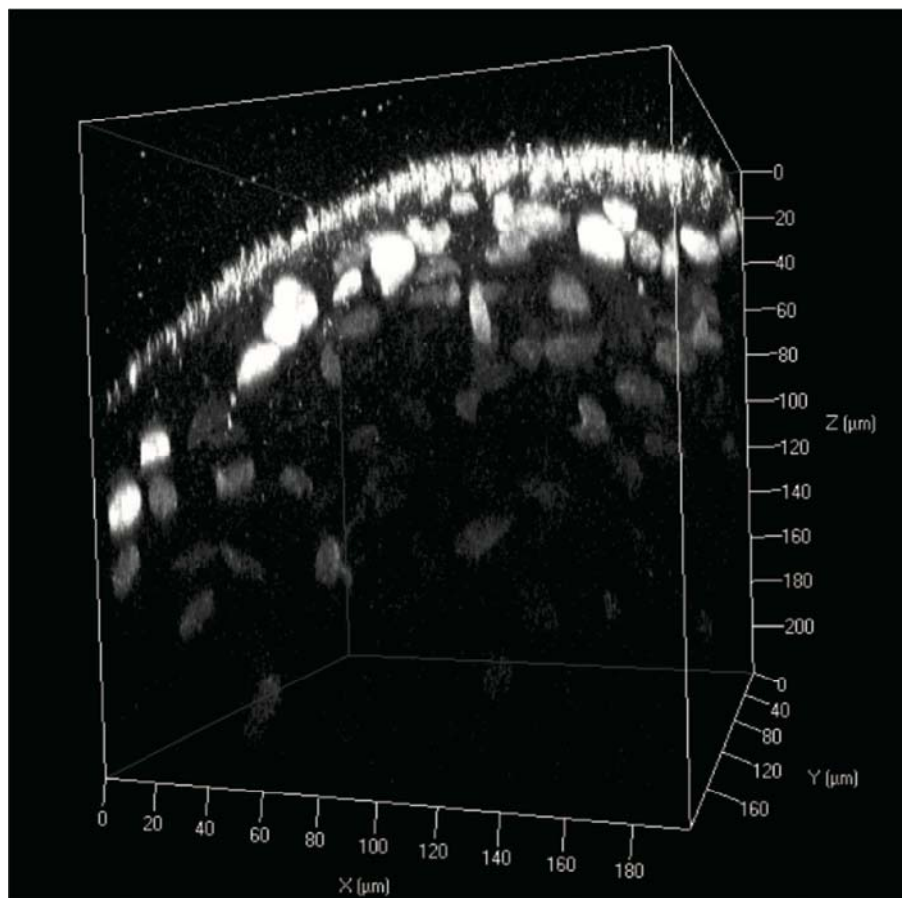


図6、共焦点レーザー顕微鏡によるニンニクの根の解析

非アルコール性脂肪性肝炎におけるアラキドン酸代謝酵素の役割の解明

岡山県立大学 保健福祉学部

川上 祐生

アラキドン酸代謝酵素であるリポキシゲナーゼは、アラキドン酸のような不飽和脂肪酸から過酸化脂質であるヒドロペルオキシ酸を生成する酵素である。これまでの報告において、発症、進展のメカニズムが未だ明らかにされていない非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の病態形成において、リポキシゲナーゼの関与を示唆する報告がいくつかなされている。私たちはNASHにおけるリポキシゲナーゼの役割を解明することを目的として、まずNASHモデルマウスの肝臓で上昇するリポキシゲナーゼのアイソザイムの同定を試みた。メチオニン・コリン欠損（MCD）食を8週間、自由摂取させて作製したNASHモデルマウスと普通固形飼料を摂取させたマウス（コントロール）の肝臓からそれぞれサイトゾルを調製してアラキドン酸と反応させた。その結果、コントロールと比較してMCD食を摂取したマウスにおいて12-リポキシゲナーゼ生成物の量が100倍以上に上昇した。種々の12-リポキシゲナーゼアイソザイムに対する抗体を用いて、免疫沈降を行った結果、MCD食摂取マウス肝臓において血小板型12-リポキシゲナーゼの発現が上昇していることが示された。

1. はじめに

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）とは著しいアルコールの摂取がないにもかかわらずアルコール性肝炎類似の肝組織所見を呈するもので、進行すると肝臓における炎症から肝細胞が傷害され、肝臓の線維化を引き起こし、肝硬変や肝臓癌に至る可能性のある疾患である。肝細胞に中性脂肪が過剰に蓄積することを脂肪肝という。この中で飲酒歴がないにもかかわらず引き起こされる単純性脂肪肝を非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）と呼ぶが、NAFLDとは正しくは単純性脂肪肝の状態からこれが進行して肝内の炎症や肝細胞の傷害、線維化が起きている状態、すなわちNASHの病態までを含んでいる。NAFLDおよびNASHは生活習慣病に関連していると言われており、その患者数は年々増加し、今後も増加し続けることが予測される。NASHの成因については生活習慣によって肝臓に脂肪が蓄積し、その後の酸化ストレスなどの各種ストレスによって炎症が引き起こされるというツーヒットセオリーが広く知られているが、NASHの発症、進展のメカニズムについては多くの研究がなされているにもかかわらず未だに解明されていない。

リポキシゲナーゼはアラキドン酸などの不飽和脂

肪酸に1分子の酸素を添加して過酸化脂質であるヒドロペルオキシ酸（HPETE）を生成する酸素添加酵素であり、慢性炎症性病変部位に集簇するマクロファージなどに発現している。生成したHPETEは細胞内のグルタチオンペルオキシダーゼなどの働きによってヒドロキシ酸（HETE）に還元されることが知られている。これまでの報告において、NASHの病態形成にリポキシゲナーゼの関与を示唆する報告がいくつかなされている。メチオニン・コリン欠損（MCD）食投与によって作製されたNASHモデルマウスでは血清中に12-リポキシゲナーゼ生成物である12-HETEが有意に増加していることがメタボローム解析によって示されており、肝臓の12-リポキシゲナーゼmRNA発現量の上昇が確認されている（1）。また、アポリポrotein E（アポE）ノックアウトマウスに高脂肪食を投与すると脂肪肝の形成や炎症が引き起こされ、NASH類似の病態を呈するが、アポEと白血球型12-リポキシゲナーゼをノックアウトしたダブルノックアウトマウスでは、脂肪肝や炎症、肝傷害の軽減などが認められることが報告されている（2）。しかしながら、これらの報告はNASHにおける12-リポキシゲナーゼの関与を示唆する現象を報告したのみであり、具体的に12-リポキシゲナーゼ

が NASH の発症、進展のどの段階にどのような機序で作用しているかについては明らかにされていない。そこで本研究では、NASH の発症、進展におけるリポキシゲナーゼの役割をより詳細に検討にすることを目的とした。

これまでの報告において NASH の病態形成に関与することが示唆されている 12-リポキシゲナーゼには、12*S*-ヒドロペルオキシ酸を生成する血小板型、白血球型、皮膚型の 3 つのアイソザイムに加えて、12*R*-ヒドロペルオキシ酸を生成する酵素が知られている。そこでまず、NASH モデルマウスを作製し、その肝臓で上昇するリポキシゲナーゼのアイソザイムの同定を試みた。

2. 実験方法

(1) 動物実験

実験に使用した 7 週齢の c57BL/6J マウスは 1 週間予備飼育を行った。その後、メチオニン・コリン欠損 (MCD) 食を摂取させる MCD 食群と普通固形飼料を摂取させたコントロール食群に分け 2~8 週間飼育した。飼育期間中は、食餌および水の摂取は自由とした。すべての動物実験は岡山県立大学動物実験指針に基づいて実施した。

(2) 組織染色

マウスから採取した肝臓を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィンあるいは OCT コンパウンドで包埋した。炎症細胞の浸潤の程度を検討するための HE 染色と線維化の程度を評価するためのシリウスレッド染色はパラフィンで包埋した試料を使用した。また、脂肪蓄積の程度を検討するためのオイルレッド染色では OCT コンパウンドで包埋した試料を使用した。

(3) 遺伝子発現解析

マウスから採取した肝臓から RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。その後、抽出した RNA は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems) を用いて cDNA 合成を行った。この cDNA を用いて、real-time

PCR 法により、遺伝子発現解析を行った。反応および解析は、Step One Plus Real Time PCR System (ライフテクノロジー・ジャパン) を用いて行った。

(4) 酵素活性測定

マウスから採取した肝臓からホモジネートを調製し、超遠心機で $100,000 \times g$ 、4℃、1 時間で超遠心分離を行い、上清のサイトゾル画分を得た。この肝臓サイトゾル画分を酵素源として、25 μ M のアラキドン酸と 37℃ で 30 分反応させた。その後、還元型グルタチオンとグルタチオンペルオキシダーゼの存在下で 37℃ でさらに 20 分反応させ、不安定な生成物である 12-HPETE から比較的安定な 12-HETE への還元を行った。その後ジエチルエーテルを含む溶媒を加えて反応を停止した。反応生成物を含むジエチルエーテル画分を回収し、高速液体クロマトグラフィーにより、生成物量を測定することにより、酵素活性を評価した。高速液体クロマトグラフィーは、カラムとして 4.6×250 mm (COSMOSIL 5C18-MS-II、Nakalai)、移動相としてメタノール：水：酢酸=80：20：0.01 (v/v)、流速 1 ml/min により分離し、235 nm の吸光度を連続的に追跡することにより生成物を検出した。内部標準として添加した 15-ヒドロキシ酸 (15-HEDE) の面積と反応生成物である 12-HETE の面積との比較から酵素の活性を求めてタンパク質量から比活性を計算した。

(5) 免疫沈降法

白血球型 12-リポキシゲナーゼあるいは血小板型 12-リポキシゲナーゼに対する抗体をプロテイン A セファロースに結合させ、マウスの肝臓から調製したサイトゾル画分と反応させた。沈殿物と上清それぞれをアラキドン酸と反応させて酵素活性を調べた。

3. 結果

肝臓切片のオイルレッド染色を行った結果、MCD 食摂取 2 週目で赤く染まった脂肪滴が最も多く、その後摂食期間が進むにつれて、赤い染色部分は減少した (図 1A)。MCD 食の摂取による脂肪蓄積を確認することができた。また、肝臓切片のシリウスレッド

染色を行った結果、MCD 食摂取 6 週目から少しずつ赤く染色された膠原繊維の増加が観察され、8 週目では肝臓のより広い範囲で赤い染色部分が確認され、肝臓の繊維化の進行が確認された (図 1B)。

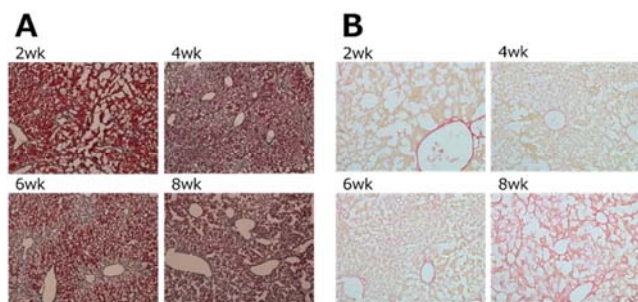


図 1 肝臓切片のオイルレッド染色 (A) とシリウスレッド染色 (B)

NASH の病態モデルとして肝臓の炎症を確認するため、NASH における代表的な炎症マーカーである腫瘍壊死因子 (TNF) - α の mRNA 発現量を調べた。その結果、TNF- α の発現量は MCD 食摂取 2 週目でコントロール群の約 2 倍に上昇し、6 週目には 4 倍、8 週目には 5 倍といった発現上昇が認められた (図 2A)。肝臓切片の HE 染色をおこなうと、MCD 食群では炎症細胞の浸潤が観察された (図 2B)。

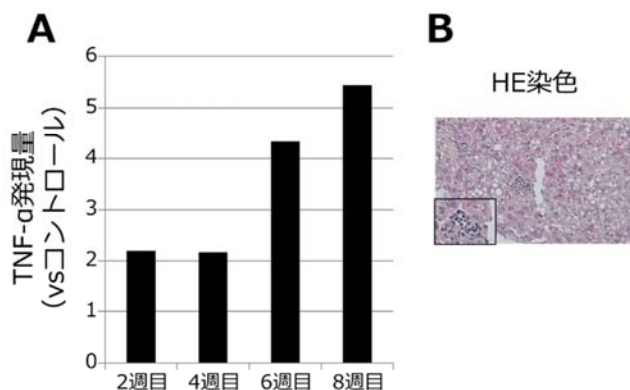


図 2 MCD 食摂取による TNF- α の mRNA 発現量の上昇と炎症細胞の浸潤

MCD 食を摂取したマウス肝臓のリポキシゲナーゼ活性を測定した結果、MCD 食摂取 8 週目のマウスの肝臓において、12-リポキシゲナーゼ生成物が検出された。この生成物について光学異性体を分離できるキラルフェーズの高速液体クロマトグラフィーで分離し、標準品と移動度を比較したところ、生成物は

S 体 (12*S*-ヒドロキシ酸、12*S*-HETE) であることが示唆された。そこで、S 体を作る白血球型、血小板型、皮膚型のいずれであるのかを調べるため、白血球型あるいは血小板型 12-リポキシゲナーゼに対する抗体を用いて免疫沈降を行い、沈殿物と上清それぞれの酵素活性を調べたところ、抗血小板型 12-リポキシゲナーゼ抗体では抗体量に依存して沈殿で酵素活性が検出され、それに応じて上清では酵素活性が低下した (図 3)。一方、抗白血球型 12-リポキシゲナーゼ抗体では酵素活性の免疫沈降は起こらなかった。

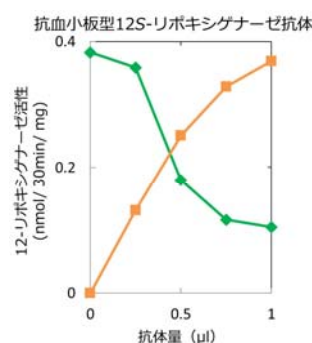


図 3 NASH モデルマウス肝臓の 12*S*-LOX 活性の抗 12*S*-LOX 抗体による免疫沈降

4. 考察

今回の研究では、NASH 病態モデルとして MCD 食摂取マウスを用いた。本モデルでは、MCD 食によりメチル基が不足し、肝臓でホスファチジルコリンの合成ができず、肝臓からのリポタンパク質の分泌不全によって肝臓に脂肪が蓄積し、炎症が引き起こされることにより NASH の病態に至ることが知られている (3)。今回の研究において、MCD 食摂取マウスを 2 週間毎にみると、MCD 食の摂取 2 週目で著しい脂肪の蓄積が起これ、過剰な脂肪の蓄積を主体とした病態から 6 週目以降には炎症、8 週目には線維化を主体とした病態に移行したことが考えられた。この過程で、繊維化を主体とした病態形成が起こる MCD 食摂取 8 週目の 12-リポキシゲナーゼの活性がコントロール食を摂取したマウスよりも上昇していることが確認され、血小板型であることが示唆された。今後は、NASH 病態形成のどの時点で血小板型 12-リポキシゲナーゼの発現が上昇しているかを明らかにす

るとともに、血小板型 12-リボキシゲナーゼを発現している細胞の同定を進めることにより NASH の発症、進展における血小板型リボキシゲナーゼの役割の解明につながるものと考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人ウエスコ学術振興財団による研究助成を賜りましたことを、深く感謝申し上げます。

参考文献

- (1) Tanaka N, et al. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 56(1): 118-129, (2012).
- (2) Marcos MC, et al. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene (Alox15) protects hyperlipidemic mice from nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 52(6): 1980-2010, (2010).
- (3) Karen DC, et al. Choline Metabolism provides novel insights into non-alcoholic fatty liver disease and its progression. *Curr Opin Gastroenterol*, 28(2):156-165, (2012).

Acyl-CoA Synthetase Short-Chain family member 3 の機能解析

岡山県立大学・保健福祉学部・栄養学科

吉村 征浩

Acyl-CoA Synthetase Short-chain family member (ACSS) 遺伝子は、現在までに3種類、哺乳類ゲノム上に見出されている。本研究では、詳細が分かっていないACSS3の特徴を明らかにした。ラット *acss3* の発現組織を調べたところ、肝臓、腎臓で高発現していた。ヒト培養細胞に発現させたラット ACSS3 はミトコンドリアに局在し、ラット肝臓において、ACSS3 はミトコンドリアマトリックスに存在した。リコンビナント ACSS3 の基質特異性を調べた結果、プロピオン酸を最適な基質とする酵素であることがわかった。HepG2 細胞を用いて、*acss3* をノックダウンしたところ、*acss3* ノックダウン細胞の破碎液中の acyl-CoA 活性は酢酸、酪酸を基質とした場合には変化がなかったが、プロピオン酸を基質とした場合のみ活性低下がみられた。ラットの肝臓における ACSS3 の発現量が飢餓によって影響を受けるか調べたところ、飢餓状態では ACSS3 の発現量が増加し、プロピオニル CoA 合成酵素活性も増加することが分かった。以上のことから、ACSS3 は肝臓ミトコンドリアマトリックスに存在するプロピオニル CoA 合成酵素の一つであり、飢餓状態で発現が誘導されることが分かった。

【背景】 主に腸内細菌の働きにより産生される酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸 (SCFA) は、宿主に吸収されエネルギー源として利用されるだけでなく、その受容体を介して、様々な宿主の生理機能を制御することが分かってきている。SCFA は組織に取り込まれた後、Acyl-CoA synthetase short-chain family (ACSS) member によって CoA を付加され、重要な代謝中間体として利用される。ACSS 遺伝子は現在までに3種類すなわち *acss1*, *acss2*, *acss3* が哺乳類ゲノム上に確認されている (1)。

ACSS1 はミトコンドリアに局在し、酢酸に対して高い親和性を持ったアセチル CoA 合成酵素である。ACSS1 は心臓、骨格筋、褐色脂肪組織に多く発現しており、絶食によりその発現量は増加する (2)。骨格筋特異的な *acss1* ノックアウトマウスでは、絶食時に骨格筋 ATP レベルがコントロールマウスの50%に低下し、低炭水化物食で飼育すると低体温症を呈する (3)。このことから、ACSS1 は炭水化物の代替として酢酸をエネルギー源として利用するために必要な酵素であることが示されている。一方、ACSS2 は細胞質および核に分布する酵素であり、ACSS1 同様に酢酸に高い親和性を有するアセチル CoA 合成酵素である (4)。ACSS2 は広範な組織に発現しており、当初は絶食で発現量が低下することから脂質合成に

関与すると考えられていたが、近年、その核への局在が注目され、様々な遺伝子の転写を活性化すると考えられるヒストンや転写因子のアセチル化に関与することが分かってきている (5, 6)。

現在までに機能が明らかになってきている ACSS1 および ACSS2 とは対照的に、ACSS3 に関しては、acyl-CoA 合成酵素遺伝子メンバーの存在を哺乳類ゲノム上で網羅的に調べた研究の中でその存在が言及されただけで (1)、その基質特異性、細胞内局在、組織発現分布、生物学的重要性などの詳細は全く報告がなく、不明なままであった。

【結果】**・ラット *acss3* 遺伝子クローニング**

ラットゲノムデータベースより推定 *acss3* 遺伝子配列 (XM_006241302) を得た。この塩基配列上の推定開始コドンおよび終始コドンのそれぞれ 5' 側および3' 側、また内部配列にもプライマーを設計し、ラット肝臓 total RNA を逆転写したものを鋳型として、RT-PCR を行った。最終的に、5' 末端を含む PCR 産物は 5' -RACE によって取得し、3' 末端を含む PCR 産物と overlap extension PCR 法により推定 ORF を含むラット *acss3* 遺伝子断片を取得した。取得した断片の塩基配列を解析後、開始コドンに *EcoRI* サイ

ト、終始コドンを含むあるいは含まない *Xho* I サイトを付加したプライマーを用い、推定 ORF 全長を PCR によって増幅し、哺乳類用発現ベクター pcDNA3.1myc-His に組み込み、pcDNA3myc-His-AcSS3 を得た。

・ACSS3 推定アミノ酸配列

クローニングしたラット *acss3* の ORF は 2,049 bp、683 アミノ酸をコードすると推定された。ラット ACSS3 はラット ACSS1 および ACSS2 と 32.6%、31.9% の相同性を有していた。ACSS3 推定アミノ酸配列にはアシル CoA 合成酵素の活性に重要なアミノ酸残基がすべて保存されていた。また、その N 末端側には ACSS1 と同様に、ミトコンドリアへのシグナル配列が存在し、ミトコンドリアへ局在することが予想された。サルモネラ菌アセチル CoA 合成酵素 (*Salmonella* ACS) の結晶解析から、基質特異性に影響を及ぼすアミノ酸残基が分かっており、そのうち 366 番目のバリンをアラニンに置換した場合、基質親和性が酢酸からプロピオン酸へ顕著にシフトすることが判明している (7, 8)。酢酸に親和性の高い ACSS1 および ACSS2 において、細菌 ACS の 366 番目に対応するアミノ酸残基はいずれもバリンであり、一方で ACSS3 はアラニンであった。したがって、ACSS3 は酢酸よりもむしろプロピオン酸に親和性の高いプロピオニル CoA 合成酵素であることが示唆された。

・ラット ACSS3 はミトコンドリアに局在し、アセチル CoA 合成酵素活性を有する。

ラット *acss3* (pcDNA3.1mycHis ベクターに組み込んだ) が短鎖アシル CoA 合成酵素をコードするかどうか、HeLa 細胞に導入し、過剰発現させ、その細胞破碎液を酵素液としてアセチル CoA 合成酵素活性を測定した。その結果、空ベクター導入細胞 (mock) と比較して、約 10 倍の活性上昇が確認された (図 1 A)。発現タンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、推定分子量よりも小さく、翻訳後にシグナル配列が除かれていることが示唆された (図 1 B)。myc タグの付加した発現タンパク質は HeLa 細胞および HepG2 (ヒト肝がん由来) 細胞において、ミトコンドリア

に局在することが分かった (図 1 C, D)。

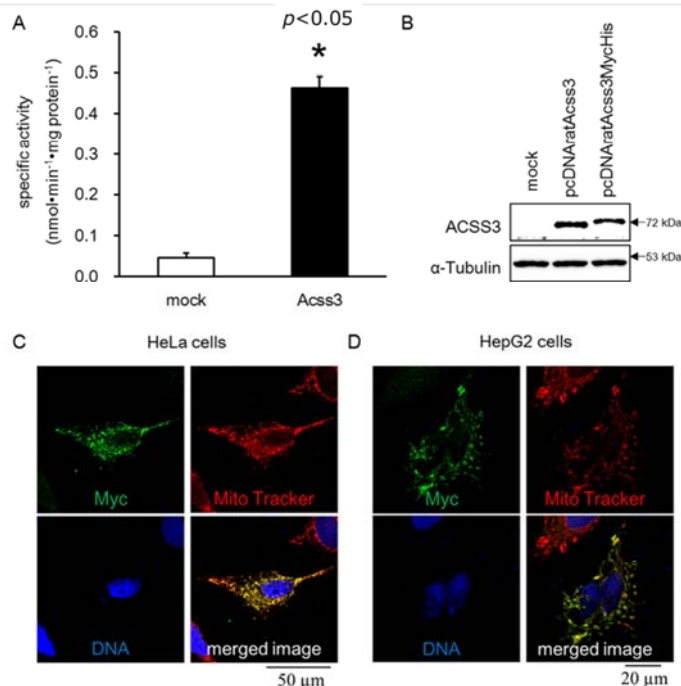


図 1 ヒト培養細胞におけるラット ACSS3 の強制発現 cDNA 導入細胞破碎液の Acetyl-CoA 合成酵素活性 (A) および ACSS3 抗体を用いた Immunoblot (B), * $p < 0.05$, HeLa 細胞 (C) および HepG2 細胞 (D) を用いた過剰発現ラット ACSS3 の免疫染色

・ *acss3* は肝臓と腎臓で高発現し、遺伝子産物は肝臓ミトコンドリアマトリックスに局在する。

acss3 の転写産物がどの組織に多く発現しているかを調べるために、ラットの各組織から total RNA を抽出し、逆転写後、リアルタイム PCR を行い、各遺伝子の転写産物を ddCt 法によって定量した。その結果、*acss3* は肝臓で最も多く発現し、腎臓においても高い発現が見られた (図 2)。

リアルタイム PCR の発現解析により、*acss3* は肝臓において高発現し、機能しているものと考えられた。培養細胞において過剰発現させた場合、ACSS3 はミトコンドリアに局在したが、生体組織内の細胞内局在は不明であるため、ラット肝臓を細胞分画法に従い、ミトコンドリアを調整後、外膜画分、内膜・マトリックス画分もしくは膜成分、可溶化成分に分画し、各画分のタンパク質を SDS-PAGE に供し、内在性 ACSS3 を検出した。肝臓において、ACSS3 はミトコンドリア内膜・マトリックス画分に存在し (図 3 A, B)、可溶性画分に存在することから (図 3 c)、ミトコンドリアマトリックスに存在する可溶性酵素であることが分かった。

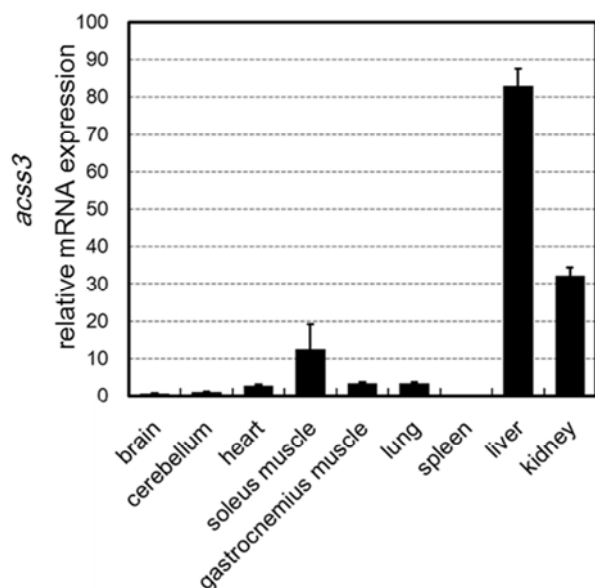


図2 ラット組織における *acss3* mRNA の発現量
ラットの各組織より total RNA を抽出し、逆転写後、リアルタイムPCRによって各組織における *acss3* mRNA の発現量を比較した。

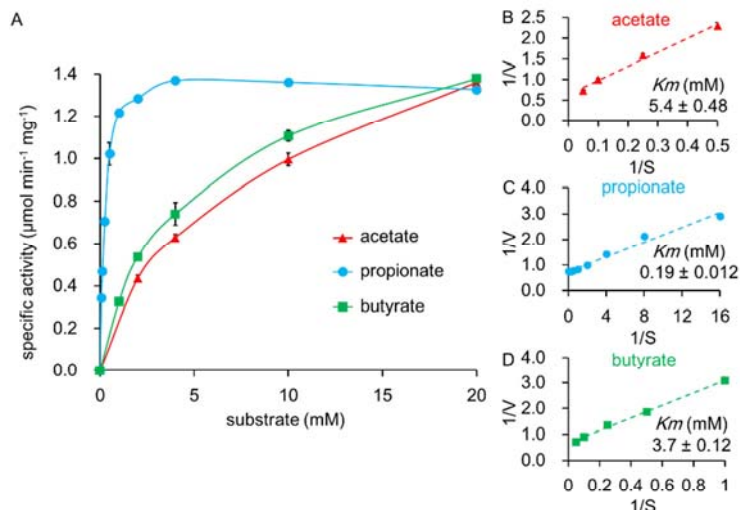


図4 リコンビナント ACSS3 の基質特異性
リコンビナント ACSS3 の基質飽和曲線 (A), 各基質の Lineweaver-Burk プロット (B)

・ *acss3* は HepG2 細胞においてプロピオニル CoA 合成酵素の責任遺伝子である。

acss3 遺伝子がプロピオニル CoA 合成酵素の責任遺伝子か調べるため、ヒト肝がん由来培養細胞 HepG2 細胞において、siRNA を用いて *acss2* と *acss3* をノックダウンし (図 5B, C)、その細胞破碎液の各短鎖脂肪酸への CoA 付加活性を調べた (図 5D-F)。まず、HepG2 細胞における内在性 ACSS3 の細胞内分布を調べたところ、ラット肝臓と同様にミトコンドリアに分布することが分かった。一方、ACSS2 は主に細胞質に分布し、ACSS1 は検出できなかった (図 5A)。*acss2* ノックダウン細胞破碎液では酢酸を基質とした場合、コントロールと比較して CoA 付加活性が低下したが、*acss3* ノックダウンでは低下しなかった (図 5D)。一方で、プロピオン酸を基質とした場合、*acss2* ノックダウン細胞破碎液では、コントロールと比較して統計的な有意差はないが、*acss3* ノックダウンの場合は、顕著に低下した (図 5E)。酪酸を基質とした場合には、顕著な変化は見られなかった (図 5F)。このことは HepG2 細胞において、*acss3* がプロピオニル CoA 合成酵素をコードしており、*acss2* とは基質が異なることを示している。

・ リコンビナント ACSS3 はプロピオン酸に対して親和性が高い。

ACSS3 は短鎖脂肪酸を基質とするアシル CoA 合成酵素であると推測されているが、基質特異性を明らかにした例は無い。そこで、ラット ACSS3 (シグナル配列は除く) を大腸菌に大量発現させ、His タグを利用して粗精製した。精製酵素の基質特異性を調べたところ、調べた脂肪酸の中ではプロピオン酸に最も親和性が高いことがわかった ($K_m: 0.19 \text{ mM}$) (図 4)。推定アミノ酸配列からも予想された通り、ACSS3 はミトコンドリアに局在するプロピオニル CoA 合成酵素であることが判明した。

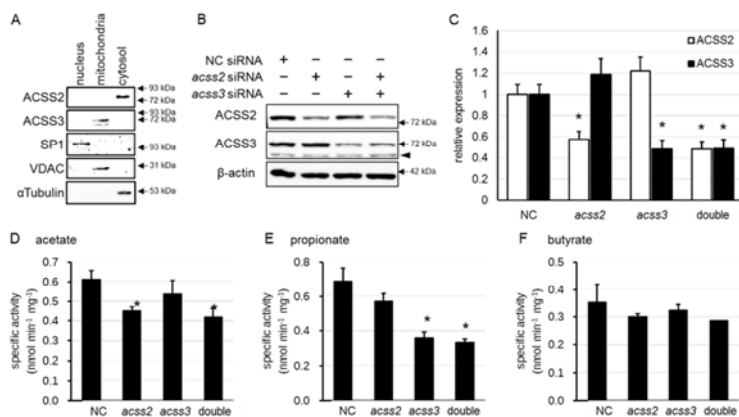


図5 HepG2 細胞における *acss3* ノックダウン
HepG2 細胞における ACSS2 および ACSS3 の細胞内局在 (A), siRNA によるノックダウン効果 (B, C), ノックダウン細胞破碎液の Acetyl-CoA 合成酵素 (D), propionyl-CoA 合成酵素 (E) および butyryl-CoA 合成酵素 (F) 活性 * $p < 0.05$

・肝臓の ACSS3 は飢餓状態で誘導され、プロピオニル CoA 合成酵素活性も上昇する。

先行研究では、飢餓状態において、*acss1* および *acss2* 発現量が変化することが示されてきており (2, 9)、最近の研究では *acss3* 発現量も肝臓において、増加することが示されている (10)。肝臓における ACSS3 の生物学的機能を推測するために、飢餓状態での発現誘導を調べた。その結果、飢餓状態での肝臓において、ACSS2 は先行研究同様に発現が減少し (図 6 A, B)、ACSS3 は発現が有意に増加することが分かった (図 6 A, C)。細胞質型の ACSS2 とミトコンドリア型の ACSS3 の飢餓状態における発現変化に伴い、細胞質のアセチル CoA 合成酵素活性は有意に低下し (図 6 D)、ミトコンドリアのプロピオニル CoA 合成酵素活性は有意に増加した (図 6 E)。以上のことから、飢餓状態において ACSS3 は発現が増加し、なんらかの機能を果たしていると考えられた。

【考察】

哺乳類において、プロピオン酸は主に腸内細菌の発酵によりつくられ、腸管より吸収されたのち、肝臓ミトコンドリア中でプロピオニル CoA へ変換され、いくつかの段階を経てエネルギー源として利用される他、特に反芻動物では、糖新生の基質として利用されることがわかっている。また、プロピオン酸血症とよばれる先天性疾患 (プロピオニル CoA カルボキシラーゼ欠損) が確認されており、このことは生

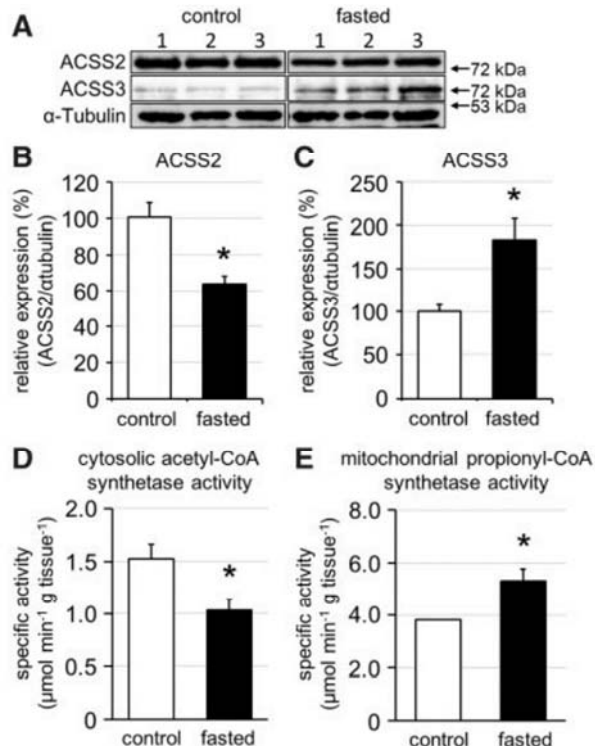


図6 飢餓が肝臓における ACSS3 発現量に与える影響
48 時間餌を与えないラットの肝臓における ACSS2 (A, B) および ACSS3 発現量 (A, C), 飢餓が肝臓細胞質画分における acetyl-CoA 合成酵素活性 (D) およびミトコンドリア画分における propionyl-CoA 合成酵素活性 (E) に与える影響

物学的にプロピオン酸代謝が非常に重要であることを示している。しかしながら、その律速酵素であるプロピオニル CoA 合成酵素は現在まで同定されてこなかった。本研究において初めて、哺乳類のプロピオニル CoA 合成酵素が同定され、今後の ACSS3 の機能解析により、未だ明らかになっていないプロピオン酸代謝の全容解明につながることを期待される。

【謝辞】

最後になりましたが、本研究を支援いただきましたウエスコ学術振興団に深く感謝いたします。

【研究成果】

(1) Y. Yoshimura, A. Araki, H. Maruta, Y. Takahashi, and H. Yamashita (2017) Molecular Cloning of Rat *acss3* and Characterization of Mammalian Propionyl-CoA Synthetase in the Liver Mitochondrial Matrix. *Journal of Biochemistry*, 161 (3), 279-289

(2) 吉村征浩, 荒木彩, 丸田ひとみ, 高橋吉孝, 山下広美 Molecular Cloning of Rat acss3 and Characterization of Mammalian Propionyl-CoA Synthetase in the Liver Mitochondrial Matrix 第89回日本生化学会大会

1076-1080

【参考文献】

1. Watkins, P.A., Maiguel, D., Jia, Z., and Pevsner, J. (2007) Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *Journal of lipid research.* 48, 2736-2750

2. Fujino, T., Kondo, J., Ishikawa, M., Morikawa, K., and Yamamoto, T.T. (2001) Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *The Journal of biological chemistry.* 276, 11420-11426

3. Sakakibara, I., Fujino, T., Ishii, M., Tanaka, T., Shimosawa, T., Miura, S., Zhang, W., Tokutake, Y., Yamamoto, J., Awano, M., Iwasaki, S., Motoike, T., Okamura, M., Inagaki, T., Kita, K., Ezaki, O., Naito, M., Kuwaki, T., Chohnan, S., Yamamoto, T.T., Hammer, R.E., Kodama, T., Yanagisawa, M., and Sakai, J. (2009) Fasting-induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2. *Cell metabolism.* 9, 191-202

4. Luong, A., Hannah, V.C., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000) Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *The Journal of biological chemistry.* 275, 26458-26466

5. Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., and Thompson, C.B. (2009) ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science.* 324,

6. Xu, M., Nagati, J.S., Xie, J., Li, J., Walters, H., Moon, Y.A., Gerard, R.D., Huang, C.L., Comerford, S.A., Hammer, R.E., Horton, J.D., Chen, R., and Garcia, J.A. (2014) An acetate switch regulates stress erythropoiesis. *Nature medicine.* 20, 1018-1026

7. Ingram-Smith, C., Woods, B.I., and Smith, K.S. (2006) Characterization of the acyl substrate binding pocket of acetyl-CoA synthetase. *Biochemistry.* 45, 11482-11490

8. Reger, A.S., Carney, J.M., and Gulick, A.M. (2007) Biochemical and crystallographic analysis of substrate binding and conformational changes in acetyl-CoA synthetase. *Biochemistry.* 46, 6536-6546

9. Sone, H., Shimano, H., Sakakura, Y., Inoue, N., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Osawa, M., Suzuki, H., Yokoo, T., Takahashi, A., Iida, K., Toyoshima, H., Iwama, A., and Yamada, N. (2002) Acetyl-coenzyme A synthetase is a lipogenic enzyme controlled by SREBP-1 and energy status. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* 282, E222-230

10. Ellis, J.M., Bowman, C.E., and Wolfgang, M.J. (2015) Metabolic and tissue-specific regulation of acyl-CoA metabolism. *PLoS One.* 10, e0116587

Cross-Company Defect Prediction の評価法に関する調査

岡山県立大学 情報工学部 情報システム工学科

天寄 聡介

昨今、他のプロジェクトで収集されたデータを用いて不具合予測を行う研究（Cross-Project Defect Prediction, CPDP）が盛んである。評価実験では一般に公開されているデータセットが利用されているため、同じデータセットを利用すれば性能評価の結果を研究間で相互に比較可能となる。しかしながら、どの程度の研究で共通した評価方法が利用されているのか明らかでない。本研究では、評価に用いられる公開データセットの使用の観点から、CPDP に関する研究について文献調査を行った。その結果、多くの研究では異なるデータセットの組み合わせが用いられており、性能評価の結果を相互に比較することが困難であることが明らかとなった。また、データセットの組み合わせ方について明確な基準が述べられておらず、十分な知見が蓄積されていないことが明らかとなった。

1. はじめに

ソフトウェア不具合の予測に関する研究はソフトウェア工学分野で広く取り組まれている。近年の研究成果の一つに、対象プロジェクト以外のプロジェクトで収集されたメトリクス及び不具合の記録を用いて高精度の予測が可能であるという知見がある。このように他のプロジェクトで収集されたデータを用いてソフトウェア不具合を予測するアプローチを Cross-Project Defect Prediction (CPDP) と呼ぶ。プロジェクト内部のデータを用いる場合と同程度の予測精度が達成できることが Rahman ら[17]の研究などで示されている。

CPDP の性能評価には、従来のソフトウェア不具合予測の研究と同様に公開データセットが用いられる。公開データセットを利用する利点の一つは、複数の研究を相互に比較できる点である。同じ公開データセットを用いて同じ実験手順に従えば、先行研究と提案手法との性能を容易に比較できるようになる。この点は調査研究やメタ分析などにも有用である。

従来のソフトウェア不具合予測手法の評価では、交差検証法など個々の公開データセットを学習用と評価用に分割して用いる。このため、使用する公開

データセットの組み合わせが異なる研究同士でも、同じ公開データセットを用いた評価の部分については性能の比較が可能である。

一方、CPDP の評価では、学習用と評価用に異なる公開データセットを組み合わせる用いる。したがって、使用する公開データセットの組み合わせが異なる研究同士を直接比較することができない。

CPDP に関する研究を見ると、データセットの収集者が同じである複数の公開データセット（以下、公開データセットグループ）の一部を組み合わせる評価実験に用いていることがよくある。例えば、NASA による公開データセットグループは多くの研究で利用されているものの一つである。公開データセットの組み合わせ方が同じであれば、異なる研究同士でも性能評価の結果が比較可能である。しかしながら、実際に利用されている公開データセットの組み合わせが互いに異なる場合も散見される。

そこで本論文では、公開データセットの組み合わせの観点で、どの程度の研究同士で結果の比較が可能であるか調査を行った。具体的には、過去 5 年間に刊行された論文及びその参考文献から調査対象とする論文を選び、以下の 3 項目について調査した。

表 1. 公開データセットグループを利用した論文 (2009-2015) の一覧

ID & Ref.	S1 [21]	S2 [11]	S3 [10]	S4 [12]	S5 [6]	S6 [14]	S7 [1]	S8 [22]	S9 [5]	S10 [16]	S11 [7]	S12 [18]	S13 [15]	S14 [13]	S15 [9]	S16 [19]	S17 [2]	S18 [8]	#
AEEEM						x								x	x				3
ReLink						x								x	x				3
NASA	x	x		x				x				x		x	x			x	8
SOFTLAB	x			x				x				x		x	x				6
Jureckzo			x		x		x		x	x	x		x	x		x	x		11

調査項目 1 複数の研究間で共通して採用されている公開データセットグループは存在するか？

調査項目 2 複数の研究間で共通して採用されている公開データセットの組み合わせは存在するか？

調査項目 3 上記の調査から得られる知見は何か？

2. 調査対象文献の選定方法

本研究ではデータ公開リポジトリを通じて公開されているデータセットを用いた研究に焦点を当てる。独自に収集したデータセットを用いた研究（例えば、文献[17], [24]）は除外する。また、研究間での比較可能性に着目するため、ある程度広く用いられている公開データセットグループに関してのみ調査を行った。そのような公開データセットグループを特定するため、Empirical Software Engineering と Transactions on Software Engineering の 2 誌、及び、ICSE, ESEC/FSE, PROMISE, MSR, ESEM の予稿集に目を通した。Systematic Literature Review[4] のような厳密な手順には従っていないものの、主要な論文についてはほぼ網羅できていると考えている。

3. 調査結果

3.1. 調査対象文献及び公開データセットグループ
文献調査の結果、2009 年から 2015 年の間に刊行された 18 件の論文が得られた。また、比較的よく利用されている公開データセットグループとして、AEEEM[3], ReLink[23], SOFTLAB, NASA, そして Jureckzo[10] の 5 つを特定した。これらの公開データセットグループはメトリクスを収集したモジュールの単位が異なっている。AEEEM 及び Jureckzo はクラス単位、NASA 及び SOFTLAB は関数単位、ReLink はファイル単位である。

表 1 に各文献で使用された公開データセットグループの一覧を示す。文献は左側から年代順に並ん

表 2. NASA データセットグループの使用内訳

Data	S1	S2	S4	S8	S12	S14	S15	S18
pc1	x	x	x	x	x	x	x	x
pc2								
pc3							x	
pc4							x	
pc5								
kc1	x	x	x	x	x			x
kc2	x	x	x	x	x			
kc3	x	x	x	x	x			
cm1	x	x	x	x	x	x	x	x
mw1	x	x	x	x	x	x	x	
mc1								
mc2	x		x	x	x			
jm1		x						x

でおり、x マークが使用された公開データセットグループを表す。ちなみに、これらの論文は一覧に示した公開データセットグループ以外のデータセットを利用していない。

表 1 から、公開データセットグループを網羅的に利用した研究が少ないことが読み取れる。文献 S14 のみが 5 つ全ての公開データセットグループを利用している。全体では、Jureckzo らによる公開データセットグループのみ使用している研究が最も多い。使用頻度では、NASA 及び SOFTLAB がそれぞれ後に続く。この 2 つの公開データセットグループは同時に利用されることが多いのも特徴である。一方、AEEEM と ReLink は 3 件の研究でのみ用いられている。

4. 公開データセットグループの使用

4.1. AEEEM と ReLink

AEEEM と ReLink については、全ての公開データセットが評価実験に用いられていた。従って、使用しているデータセットの組み合わせの観点からは、全ての研究間で性能評価の結果を比較可能であると言える。

表 3. SOFTLAB データセットグループの使用内訳

Data	S1	S4	S8	S12	S14	S15
ar1					x	
ar3	x	x	x	x	x	x
ar4	x	x	x	x	x	x
ar5	x	x	x	x	x	x
ar6					x	

4.2. NASA

NASA による公開データセットグループの使用内訳を表 2 に示す. この公開データセットグループには 13 件のプロジェクトで収集されたデータセットが含まれるが, 全てのデータセットを利用した研究は存在しなかった.

表 2 に含まれる 8 件中 4 件の研究で同じ公開データセットを使用していた. この組み合わせで使用されているのは, pc1, kc1, kc2, kc3, cm1, mw1, mc2 である. 4 件のうち最も古い文献 S1 で使用された組み合わせに他の 3 件が従っていることが推測できる. 同時期の文献 S2 も mc2 以外は同じ組み合わせで行われていることから, 一定の影響を受けていると考えられるが, 異なるデータセットを使用した理由については述べられていない. 8 件中の残り 3 件は, これら 5 件より新しく, また, 異なる公開データセットの組み合わせで性能評価を行なっている. 先行研究は引用しているものの, 異なる組み合わせを利用した経緯については述べられていない.

以上より, 初期の研究では完全に同一ではないものの, ほぼ同じデータセットの組み合わせで研究が行われていたが, その慣習は近年の研究で失われていると言える. さらに, Shepperd ら[20]が指摘しているように, NASA の公開データセットグループは PROMISE Repository と MDP の 2 つのリポジトリで異なるバージョンが公開されている. これらは同じ名前のデータセットでも特徴やサンプルサイズが異なっており, 同じデータセットの組み合わせを用いた研究同士でも実際には性能評価の結果を比較することは困難である. 従って, データセットの組み合わせの観点から見て, NASA の公開データセットグループを用いた研究同士を直接比較することは困難であると言える.

4.3. SOFTLAB

SOFTLAB におけるデータセットの使用内訳を表 3 に示す. SOFTLAB には 5 件のプロジェクトから収集されたデータセットが含まれるが, 全てのデータセットを使用している研究は 1 件のみである. NASA の場合と同様に, 最も古い文献 S1 で使用された組み合わせがデファクトとして以降の研究で利用されていることが推測できる. また, NASA の場合と異なりデータセットにバージョン違いがない. 従って, 少なくともデータセットの組み合わせの観点からは, 6 件中 5 件の間で性能評価の結果を比較可能であると言える.

4.4. Jureczko

Jureczko におけるデータセットの使用内訳を表 4 に示す. 表の中央の水平線より上のデータセットは単一のバージョンのデータセットのみが含まれている. 水平線より下のデータセットは複数バージョンのデータセットが含まれている. 以下ではバージョンの違いについては詳細に立ち入らず分析を行う.

まず, 表 4 から分かるのは, 全てのデータセットを利用した研究が存在しない点, また, 使用しているデータセットの組み合わせが研究間で一切共有されていない点である. さらに, 先行研究への追従のような傾向やパターンが観察できない点で, 他の公開データセットグループと異なる.

全体的な傾向として観察できるのは, 複数バージョンのデータセットの使用頻度が高い点である. いずれの研究においても, 使用されているデータセットのうち少なくとも 5 プロジェクトは複数バージョンのデータセットであり, 2 プロジェクトは単一バージョンのデータセットである. S8 と S10 のみ単一バージョンのデータセットの使用頻度が高い.

複数バージョンのデータセットの利用頻度が高い一方で, それらの組み合わせに関して特徴的な傾向は見出すことができない. また, 全ての研究間で共通して使用されているデータセットは ant と camel の 2 つのみである. さらに, このようなデータセットの使用内訳について, 明確にデータセットの選択基準について述べた研究はほぼ存在しない.

以上より, Jureczko データセットグループを利用

表 4. Jureczko データセットグループの使用内訳

Data	Single/Multi	S3	S5	S7	S8	S9	S10	S11	S13	S14	S16	S17
arc					x		x	x		x	x	x
berek					x		x					
ckjm		x					x					
e-learning							x				x	x
intercafe							x					
kalkulator							x					
nieruchomosci					x		x					
pdftranslator					x		x					
redaktor					x					x		x
serapion	Single				x		x					
skarbonka	Version				x		x			x		
sklebagd					x		x					
systemdata											x	x
szybkafucha							x					
termoproject					x		x					
workflow					x		x					
wspomaganiepi					x		x					
zuzel							x					
tomcat		x		x	x			x	x	x	x	x
ant		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
camel		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
forrest		x			x		x					
ivy		x	x	x	x	x	x	x	x		x	
jedit		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x
log4j	Multiple	x		x	x		x	x	x		x	x
lucene	Versions	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x
pbeans		x			x		x					
poi		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
prop				x	x		x		x		x	x
synapse		x			x	x	x	x			x	x
velocity		x			x	x	x	x		x		
xalan		x		x	x	x	x	x		x	x	x
xerces		x			x	x	x	x	x	x	x	x

した研究において、研究間で共有されたデータセットの組み合わせは存在しないと言える。

5. 考察

5.1. 調査項目 1 について

個々のデータセットグループで見ると、表 1 が示すように、Jureczko が最もよく使用されているデータセットグループであった。Jureczko には複数のプロジェクトの複数のバージョンから収集されたデータセットが含まれており、CPDP の研究には利用しやすいためであると考えられる。NASA も頻繁に使用されているデータセットグループである。これは、初期の研究で使用されていたことが大きな理由であると考えられる。

一方、複数のデータセットグループの組み合わせで見ると、NASA と SOFTLAB が共通して使用される傾向にあった。これらは収集されているメトリクスが共通していること、初期の研究で共通に使用され

ていたために後の研究でも同様の実験設定を採用したことが理由として考えられる。AEEEM と Relink も共通して利用される傾向にあった。メトリクスの異なるデータセット間での CPDP に関する研究のみに用いられていた。

以上より、Jureczko は多くの研究で採用されているが、単体で用いられることが多い。また、複数のデータセットグループを使用している研究では、NASA と SOFTLAB の組み合わせを用いている場合が多い、と言える。

5.2. 調査項目 2 について

AEEEM と ReLink を使用した研究では、全てのデータセットが同時に使用されていたが、他のデータセットグループでは全てのデータセットを同時に使用した研究は存在しなかった。

SOFTLAB を使用した研究では、5 件中 3 件のデータセットが頻繁に組み合わせられていた。この 3 件のデータセットの組み合わせは初期の研究で用いられ

たものであり、他の研究はそれにならったと考えられる。

NASA を使用した研究では、組み合わせのパターンがより多かった。初期の研究では同じデータセットの組み合わせを利用したものが多かったが、直近の研究では異なる組み合わせを採用した研究が主であった。

Jureckzo を使用した研究は全体の大部分を占めているにも関わらず、データセットの組み合わせについて明確な傾向は観察できなかった。

以上より、AEEEM, ReLink, SOFTLAB ではほぼ一貫して採用されている組み合わせが存在するが、そのような組み合わせは NASA や Jureckzo には存在しないと言える。

5.3. 調査項目 3 について

調査項目 1 の結果より、多くの研究が一部の公開データセットグループのみ使用しており、異なるモジュール単位で収集されたデータセットに対する提案手法の有効性について十分な検討がなされていないと言える。今後の CPDP に関する研究では、この点を考慮した実験設定及び考察が必要であると考えられる。

次に、調査項目 1 及び 2 の結果より、多くの研究で使用されている公開データセットグループに対して、一貫した公開データセットの組み合わせが存在していないことが明らかである。また、使用した公開データセットの組み合わせについて明確に採用基準を述べている研究はほぼ存在しない。

このことは、データセットの特性と関連づけた提案手法の考察を困難にしていると考えられる。

今後の CPDP に関する研究では、公開データセットグループに含まれる全てのデータセットを使用した実験設定にすること、もしくは、データセットの選定基準について明確に述べる必要があると考えられる。前者については、全てのデータセットを利用することで、組み合わせが一意に定まる利点がある。後者については、選定基準それ自体が性能向上に関する有益な情報となりうる利点がある。

6. まとめ

本論文では、CPDP に関する研究で使用される評価データについて、研究間の相互比較性の観点から調査を行った。その結果、以下の点が明らかとなった。

- a. 異なるモジュール単位での評価実験が行われてない
- b. 一貫したデータセットの組み合わせが存在しない
- c. データセットの選定基準が明確でない

以上の調査結果から、今後の CPDP に関する研究で必要と思われるのは以下の点である。

- d. 異なるモジュール単位で収集された複数のデータセットグループを使用する
- e. 可能であればデータセットグループ内の全てのデータセットを使用する
- f. 一部のデータセットのみ使用する場合はデータセットの選定基準を明確に記述する

これらの対策によって、CPDP に関する研究の成果を相互に比較することが可能になると考えられる。

参考文献

- [1] G. Canfora, A. De Lucia, M. Di Penta, R. Oliveto, A. Panichella, and S. Panichella, “Multi-objective Cross-Project Defect Prediction,” in Proc. of ICST 2013, IEEE, 2013, pp. 252-261.
- [2] L. Chen, B. Fang, Z. Shang, and Y. Tang, “Negative samples reduction in cross-company software defects prediction,” Info. and Softw. Tech., vol. 62, no. C, pp. 67-77, 2015.
- [3] M. D’Ambros, M. Lanza, and R. Robbes, “Evaluating defect prediction approaches: a benchmark and an extensive comparison,” Empir. Softw. Eng., vol. 17, no. 4-5, pp. 531-577, 2011.
- [4] T. Dybå, B. A. Kitchenham, and M. Jørgensen, “Evidence-based software engineering for practitioners,” Software, vol. 22, no. 1, pp. 58-65, 2005.
- [5] Z. He, F. Peters, T. Menzies, and Y. Yang,

“Learning from Open-Source Projects: An Empirical Study on Defect Prediction,” in Proc. of ESEM ’ 13, IEEE, 2013, pp. 45-54.

[6] Z. He, F. Shu, Y. Yang, M. Li, and Q. Wang, “An investigation on the feasibility of cross-project defect prediction,” *Autom. Softw. Eng.*, vol. 19, no. 2, pp. 167-199, 2012.

[7] S. Herbold, “Training data selection for cross- project defect prediction,” in Proc. of PROMISE ’ 13, ACM, 2013, 6:1-6:10.

[8] J. Huang, H. Sun, Y. F. Li, and M. Xie, “An Empirical Study of Dynamic Incomplete-Case Nearest Neighbor Imputation in Software Quality Data,” in Proc. of QRS 2015, IEEE, 2015, pp. 37-42.

[9] X. Jing, F. Wu, X. Dong, F. Qi, and B. Xu, “Heterogeneous cross-company defect prediction by unified metric representation and CCA-based transfer learning,” in Proc. of ESEC/FSE ’ 15, ACM, 2015, pp. 496-507.

[10] M. Jureczko and L. Madeyski, “Towards identifying software project clusters with regard to defect prediction,” in Proc. of PROMISE ’ 10, ACM, 2010, 9:1-9:10.

[11] Y. Liu, T. M. Khoshgoftaar, and N. Seliya, “Evolutionary Optimization of Software Quality Modeling with Multiple Repositories,” *IEEE Trans. on Softw. Eng.*, vol. 36, no. 6, pp. 852-864, 2010.

[12] Y. Ma, G. Luo, X. Zeng, and A. Chen, “Transfer learning for cross-company software defect pre- diction,” *Info. and Softw. Technol.*, vol. 54, no. 3, pp. 248-256, 2012.

[13] J. Nam, “Heterogeneous defect prediction,” in Proc. of ESEC/FSE ’ 15, ACM, 2015, pp. 508-519.

[14] J. Nam, S. J. Pan, and S. Kim, “Transfer defect learning,” in Proc. of ICSE 2013, IEEE, 2013, pp. 382-391.

[15] A. Panichella, R. Oliveto, and A. De Lucia,

“Cross-project defect prediction models: L’ Union fait la force,” in Proc. of CSMR-WCRE:2014, IEEE, 2014, pp. 164-173.

[16] F. Peters, T. Menzies, and A. Marcus, “Better cross company defect prediction,” in Proc. of MSR 2013, IEEE, 2013, pp. 409-418.

[17] F. Rahman, D. Posnett, and P. Devanbu, “Recalling the “imprecision” of cross-project defect prediction,” in Proc. of ESEC/FSE ’ 12, ACM, 2012, 61:1-61:11.

[18] D. Ryu, O. Choi, and J. Baik, “Value-cognitive boosting with a support vector machine for cross- project defect prediction,” *Empir. Softw. Eng.*, pp. 1-29, Dec. 2014.

[19] D. Ryu, J.-I. Jang, and J. Baik, “A transfer cost- sensitive boosting approach for cross-project defect prediction,” *Softw. Qual. Journal*, pp. 1-38, Aug. 2015.

[20] M. J. Shepperd, Q. Song, Z. Sun, and C. Mair, “Data Quality: Some Comments on the NASA Software Defect Datasets,” *IEEE Trans. on Softw. Eng.*, vol. 39, no. 9, pp. 1208-1215, 2013.

[21] B. Turhan, T. Menzies, A. B. Bener, and J. Di Stefano, “On the relative value of cross-company and within-company data for defect prediction,” *Empir. Softw. Eng.*, vol. 14, no. 5, pp. 540-578, 2009.

[22] B. Turhan, A. T. Mısırlı, and A. B. Bener, “Empirical evaluation of the effects of mixed project data on learning defect predictors,” *Info. and Softw. Technol.*, vol. 55, no. 6, pp. 1101-1118, 2013.

[23] R. Wu, H. Zhang, S. Kim, and S.-C. Cheung, “ReLink: recovering links between bugs and changes,” in Proc. of ESEC/FSE ’ 11, ACM, 2011, pp. 15-25.

[24] F. Zhang, A. Mockus, I. Keivanloo, and Y. Zou, “Towards building a universal defect prediction model with rank transformed predictors,” *Empir. Softw. Eng.*, pp. 1-39, 2015.

ステートマシン図を用いた Web アプリケーションの自動テスト環境の開発

岡山県立大学 情報工学部 情報システム工学科

横川 智教

本研究では、Web アプリケーションのナビゲーション構造をステートマシン図でモデル化することで、モデル検査ツール sal-smc によりテスト生成を自動化する手法を開発した。Web アプリケーションの開発コストの大部分は、その検証を行うための工程によって占められているが、一般に、Web アプリケーションの検証では、静的解析とテストが個別に実施されるため、検証済みのパスや実行不可能なパスに対してもテストケースを生成してしまい、検証コストが大きくなる。そこで本研究では、静的解析において作成したモデルを用いてテストケースの生成を行い、検証コストの削減を試みた。本手法では静的解析技術の一種であるモデル検査を用いて Web アプリケーションの検証を行い、作成したモデルを用いてテストケースの生成を行っている。これにより、実行可能なパスのみに対してテストケースを作成することが可能となった。

1. 背景

Web アプリケーションは、Web ブラウザを通してユーザがビジネスロジックを実現するための枠組みであり、Web コンテンツ、ユーザインタフェース、そして Web ナビゲーションの 3 つによって実現される^[1]。その中でも Web ページ間の移動を制御する Web ナビゲーションの設計プロセスは、その構造の複雑さから開発に要するコストへ大きな影響を与えている。Web アプリケーションの開発コストの大部分は、その検証を行うための工程によって占められており、その自動化による開発コスト削減の試みはこれまでも数多く報告されている^{[2][3]}。しかしながら Web アプリケーションを検証するための従来の枠組みにおいては、静的解析とテストが個別に実施されるため、検証済みのパスや実行不可能なパスに対するテストケースが生成され、不要な検証コストが生じることとなる。そこで本研究では、静的解析において作成したモデルを用いてテストケースの生成を行うことで、検証コストを削減するための枠組みについて検討する。

これまでに著者らは、画面遷移図によって記述された Web ナビゲーションの設計を UML^[4]のステートマシン図によってモデル化することで、モデル検査^[5]による静的解析を行うための手法について開発を行っている。この手法では、ステートマシン図に

よってモデル化された Web ナビゲーションを遷移システムの統合解析環境 SAL (Symbolic Analysis Laboratory)^[6] の入力モデルへと変換することにより、SAL のモデル検査ツール sal-smc による静的解析を行っている^[7]。本研究では、sal-smc を用いてテストケースの生成を行うための手法について示す。静的解析と共通のモデルを用いることにより、実行可能なパスのみに対してテストケースを作成することが可能となる。本研究では、テストケースのカバレッジ基準として (1) Web ページ網羅、(2) ナビゲーション網羅、(3) Web ページペア網羅、(4) ナビゲーションペア網羅、(5) k-bound Web ページ網羅、(6) k-bound ナビゲーション網羅、の 6 種を想定し、それらの基準を満たすテストケースの生成手続きについて示す。

2. Web ナビゲーション

2.1 概要

Web アプリケーションは、Web コンテンツ、ユーザインタフェース、そして Web ナビゲーションの 3 つによって構成される。Web コンテンツは Web を通してユーザへと供給される文書や画像・音楽などのマルチメディアを指し、Web ナビゲーションは、Web ページ間のページ移動を制御するための枠組みのことを指す。ユーザインタフェースは、ユーザが Web ブラウザを通してアプリケーションに要求を送り、

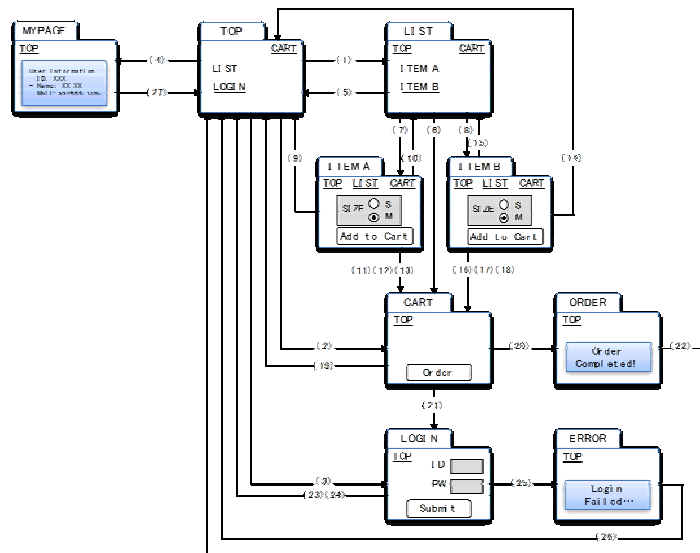


図1 exApp の画面遷移図

コンテンツの提供を受けるための枠組みである。

本研究でモデル化の対象とする Web ナビゲーションに関しては、従来はハイパーリンクに代表されるような静的なナビゲーションが主流として用いられてきたが、近年の Web 技術の発展に伴って、スクリプトによって制御される動的なナビゲーションの利用が進められている。静的ナビゲーションではユーザの操作に対して必ず同じページ移動が行われるが、動的ナビゲーションでは同じ操作であっても、それ以外の要因に従って移動先のページが異なる。ナビゲーションに影響を与える要因には様々なものが考えられるが、本研究ではユーザの認証状況および Web ページ上のフォーム部品に入力された値に依存するものとする。

2.2 例題アプリケーション

例題として、簡単なオンラインショッピングサイトを実現する Web アプリケーション exApp を示す。アプリケーションの動作の概要としては、まず商品リストへと遷移し、希望の商品を選択する。そして、商品のサイズを選択してカートへと追加する。最後にオーダーボタンを押し、注文を完了する。ここで、ユーザ認証(ログイン)を完了していなければ、注文を行うことはできない。

exApp の画面遷移図を図 1 に示す。このアプリケーションは、トップページ(TOP)、商品リストページ(LIST)、商品 A のページ(ITEM A)、商品 B のページ

(ITEM B)、カート表示ページ(CART)、オーダー完了ページ(ORDER)、ログインページ(LOGIN)、エラーページ(ERROR)、そして個人ページ(MYPAGE)の 9 つから構成される。ページ間のナビゲーションを表 1 に、想定するユーザ操作を表 2 に、各ページがもつフォーム部品を表 3 に、それぞれ示す。

ナビゲーション(12)(13)、(17)(18)、そして(24)(25)は、フォーム部品に入力された値に依存するナビゲーションである。ナビゲーション(12)(13)では、ボタン Add to Cart を押下するという操作に対して、ラジオボタンの値に依存してその後の処理が異なる。もしラジオボタン S がチェック済みであれば、商品 A(S)がカートへと追加され、M がチェック済みであれば、商品 A(M)がカートへと追加される。ナビゲーション(17)(18)も同様である。ナビゲーション(24)および(25)では、正しい ID・PASS が入力されているか否かによって処理および遷移先が変化する。一方、ナビゲーション(20)および(21)は認証状況に依存するナビゲーションである。ボタン Submit を押下するという操作に対して、ユーザがログイン

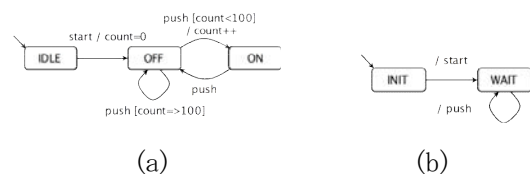


図2 ステートマシン図の例

表 1 exApp のナビゲーション

No.	遷移元	遷移先	操作	条件	認証
1	TOP	LIST	LIST をクリック		
2	TOP	CART	CART をクリック		
3	TOP	LOGIN	LOGIN をクリック	ログオフ状態	
4	TOP	MYPAGE	LOGIN をクリック	ログオン状態	
5	LIST	TOP	TOP をクリック		
6	LIST	CART	CART をクリック		
7	LIST	ITEM A	ITEM A をクリック		
8	LIST	ITEM B	ITEM B をクリック		
9	ITEM A	TOP	TOP をクリック		
10	ITEM A	LIST	LIST をクリック		
11	ITEM A	CART	CART をクリック		
12	ITEM A	CART	Add to Cart を押す	A SIZE が S	
13	ITEM A	CART	Add to Cart を押す	A SIZE が M	
14	ITEM B	TOP	TOP をクリック		
15	ITEM B	LIST	LIST をクリック		
16	ITEM B	CART	CART をクリック		
17	ITEM B	CART	Add to Cart を押す	B SIZE が S	
18	ITEM B	CART	Add to Cart を押す	B SIZE が M	
19	CART	TOP	TOP をクリック		
20	CART	ORDER	Order を押す	ログオン状態	
21	CART	LOGIN	Order を押す	ログオフ状態	
22	ORDER	TOP	TOP をクリック		
23	LOGIN	TOP	TOP をクリック		
24	LOGIN	TOP	Submit を押す	ID と PW が正しい	ログオン
25	LOGIN	ERROR	Submit を押す	ID か PW が誤り	
26	ERROR	TOP	TOP をクリック		
27	MYPAGE	TOP	TOP をクリック		

表 2 exApp のユーザ操作

No.	操作	ページ
1	TOP をクリック	LIST, ITEM A, ITEM B, CART, ORDER, LOGIN, ERROR, MYPAGE
2	LIST をクリック	TOP, ITEM A, ITEM B
3	ITEM A をクリック	LIST
4	ITEM B をクリック	LIST
5	CART をクリック	TOP, LIST, ITEM A, ITEM B
6	LOGIN をクリック	TOP
7	S をチェック	ITEM A, ITEM B
8	M をチェック	ITEM A, ITEM B
9	Submit を押す	LOGIN
10	Order を押す	CART
11	Add to Cart を押す	ITEM A, ITEM B
12	正しい ID を入力	LOGIN
13	正しい PW を入力	LOGIN
14	誤った ID を入力	LOGIN
15	誤った PW を入力	LOGIN

表 3 exApp のフォーム部品

No.	ページ	名前	型	定義域
1	ITEM A	A SIZE	ラジオボタン	S, M
2	ITEM B	B SIZE	ラジオボタン	S, M
3	LOGIN	ID	テキスト	正, 誤
4	LOGIN	PW	テキスト	正, 誤

状態であればオーダー完了ページへと移動するが、非ログイン状態であればログインページへと遷移する。

3. ステートマシン図を用いたモデル化

3.1 ステートマシン図

ステートマシン図は、UML で定義された図の 1 つであり、時間の経過やイベントの発生に伴うオブジェクトの状態変化を表現するために用いられる。ス

テートマシン図の例を図 2 に示す。このステートマシン図は、動作開始後にスイッチを押すことで ON と OFF が切り替わる装置の振る舞いを表している。また、装置が ON になるのは 99 回までで、100 回目からはスイッチを押しても何も起こらない。

ステートマシン図は状態とそれらを結ぶ遷移から構成される。遷移には「イベント[ガード条件]/アクション」という形式のラベルが付けられる。イベントは遷移のきっかけとなるメッセージ、ガード条件

は遷移が実行可能となる条件, そしてアクションは遷移の際に行われる処理である. ステートマシン図は, 他のステートマシン図からイベントとしてメッセージを受信し, アクションとして他のステートマシン図へとメッセージを送信することで遷移を実行し, 動作を行う.

3.2 モデル化の枠組み

ステートマシン図を用いて Web ナビゲーションをモデル化するためには, Web ナビゲーションを構成する要素であるページ移動, 認証管理とユーザ操作の振る舞いに加え, ナビゲーションの制御に用いられるユーザの認証状況とフォーム部品の値を表現する必要がある. そこで本手法では, ページ移動, 認証管理, そしてユーザ操作をそれぞれ個別にステートマシン図としてモデル化する.

ページ移動のステートマシン図では, 状態が Web ページを表し, 遷移がページ間の移動を表す. 認証管理のステートマシン図では, 状態がユーザの認証状況を表し, 遷移が認証状況の変化を表す. そして, ユーザ操作のステートマシン図では, 状態はユーザの状況を表し, 遷移はユーザによる操作の実行を表す. 提案するモデルでは, ユーザ操作をメッセージとして表す. その上で, ユーザ操作を表すメッセージをユーザ操作のステートマシン図からアクションとして送信し, ページ移動のステートマシン図でイベントとして受信することで, ユーザ操作に伴う Web ページ間の移動を表現する. ユーザの認証状況は, 前述の通り認証管理のステートマシン図におい

て表す. フォーム部品の値はフォームが所属する Web ページ内のみにおいて有効であるため, ページ移動のステートマシン図において, Web ページに対応する状態のサブ状態として表す.

得られるステートマシン図の一般形を図 3 に示す. ページ移動のステートマシン図では, 図 3(a) に示すように Web ページの一つ一つを状態で表し, それらを遷移で接続することでページ間の移動を表す. Web ページがフォーム部品をもつ場合, 図 3(b) に示すように状態をフォーム部品ごとに領域へと区切り, 領域内のサブ状態としてその値を表す. ユーザ操作のステートマシン図は, 図 3(c) に示すように, ユーザの状況を表す一つの状態と, 操作の実行を表す自身への遷移で構成される. また, 認証管理のステートマシン図は, 図 3(d) に示すように, ユーザの認証状況を表す 2 つの状態と, その変化を表す遷移で構成される.

4. SAL によるテストケース生成

4.1 SAL プログラムの作成

SAL^[6]は, SRI International Computer Science Laboratory で開発された, 遷移システムの解析のための統合環境である. SAL では専用の入力言語を用いて, 解析対象となるシステムの振る舞いと検証すべき特性を SAL プログラムとして記述する. 本実験では, 文献^[8]で示された手続きに基づいて, SAL プログラムを作成した. その際に, 反例に基づく画面遷移図の修正や生成されたテストケースとユーザ操作との対応付けを容易にするため, SAL プログラム生成の際に各ステートマシン図をそれぞれ 1 つのモジュールとして表現し, ユーザ操作に対応する変数をモジュールの入力変数として表現している.

作成した SAL プログラムの一部は文献^[9]にて示している. SAL プログラム内では, ページ移動のステートマシン図に対応したモジュールにおいて, 各ナビゲーションを 1 つの遷移として表現する. また, それぞれのナビゲーションに対して, テストケース生成のために用いるトラップ変数 $t1, \dots, t27$ を設ける. これらはそれぞれナビゲーション (1), $\dots$, (27) に対応しており, 各ナビゲーション

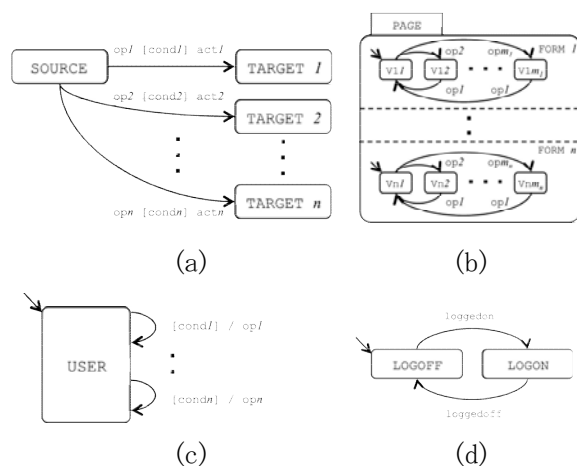


図 3 得られるステートマシン図の一般形

が初めて実行されたとき **FALSE** から **TRUE** へと値が変化する。

4.2 sal-smc によるテストケース生成

sal-smc では、THEOREM で定義されたアサーションを与えられたモデルが満たすか否かについて、記号モデル検査に基づいて検証を行う。アサーションは時相論理 LTL (Linear Time Logic) の演算子 G (Globally) および F (in Future) を用いて記述することができる。例えば、「ログオフ状態であるにもかかわらず ORDER ページに到達することはない」という性質であれば、

```
property1 : THEOREM system |-
```

```
G (NOT (state_navi = ORDER AND state_auth = LOGOFF));
```

のように記述できる。モデルがアサーションを満たさない場合は反例が出力される。本研究では、求めるカバレッジ基準を満たすテストケースを LTL 式として表現し、その否定をアサーションとして与えることにより、反例として求めるテストケースを得ることができる。

本研究では以下の 6 種のカバレッジ基準を想定して、テストケース生成を行う。

- (1) Web ページ網羅
- (2) ナビゲーション網羅
- (3) Web ページペア網羅
- (4) ナビゲーションペア網羅
- (5) k-bound Web ページ網羅
- (6) k-bound ナビゲーションペア網羅

それぞれについて以下に述べる。なお、対象となる Web ナビゲーションは Web ページ $P = \{p1, p2, \dots, pn\}$ およびナビゲーション $N = \{n1, n2, \dots, nm\}$ をもつものとし、 $t1, \dots, tm$ はナビゲーションに対応したトラップ変数とする。

(1) Web ページ網羅

Web ページ網羅では、生成されたテストケースを実行することにより、訪問可能な全ての Web ページが訪問される。この基準を満たすテストケースは、以下の LTL 式をアサーションとして与えることで得ることができる。

```
page_coverage1 : THEOREM system |-
  NOT F (state_navi = p1);
```

```
page_coverage2 : THEOREM system |-
  NOT F (state_navi = p2);
...
```

```
page_coveragen : THEOREM system |-
  NOT F (state_navi = pn);
```

(2) ナビゲーション網羅

ナビゲーション網羅では、生成されたテストケースを実行することにより、実行可能な全てのページ移動を実行できる。この基準を満たすテストケースは、以下の LTL 式をアサーションとして与えることで得ることができる。

```
navi_coverage1 : THEOREM system |-
  NOT F (t1 = TRUE);
navi_coverage2 : THEOREM system |-
  NOT F (t2 = TRUE);
...
navi_coveragem : THEOREM system |-
  NOT F (tm = TRUE);
```

(3) Web ページペア網羅

Web ページペア網羅では、生成されたテストケースを実行することにより、可能な全ての Web ページ間の組合せの移動が実行される。この基準を満たすテストケースは、以下の LTL 式をアサーションとして与えることで得ることができる。

```
pagepair_coverage12 : THEOREM system |-
  NOT F (state_navi = p1 AND F (state_navi = p2));
pagepair_coverage13 : THEOREM system |-
  NOT F (state_navi = p1 AND F (state_navi = p3));
...
```

```
pagepair_coveragen-1n : THEOREM system |-
  NOT F (state_navi = pn-1 AND F (state_navi = pn));
```

(4) ナビゲーションペア網羅

ナビゲーションペア網羅では、生成されたテストケースを実行することにより、可能な全ての ページ移動間の組合せが実行される。この基準を満たすテストケースは、以下の LTL 式をアサーションとして与えることで得ることができる。

```
navipair_coverage12 : THEOREM system |-
  NOT F (t1 = TRUE AND F (t2 = TRUE));
navipair_coverage13 : THEOREM system |-
```

```

NOT F (t1 = TRUE AND F (t3 = TRUE));
...
navipair_coveragen-1n : THEOREM system |-
  NOT F (tn-1 = TRUE AND F (tn = TRUE));

```

(5) k-bound Web ページ網羅

k-bound Web ページ網羅では、生成されたテストケースを実行することにより、k 回の遷移で訪問可能な全ての Web ページが訪問される。k=2 とすると、この基準を満たすテストケースは以下の LTL 式をアサーションとして与えることで得ることができる。

```

kpage_coverage1 : THEOREM system |-
  NOT (state_navi = p1 OR X (state_navi = p1)
    OR X (X (state_navi = p1))));
...

```

```

kpage_coveragen : THEOREM system |-

```

```

  NOT (state_navi = pn OR X (state_navi = pn)
    OR X (X (state_navi = pn))));

```

(6) k-bound ナビゲーション網羅

k-bound ナビゲーション網羅では、生成されたテストケースを実行することにより、k 回の遷移で実行可能な全てのページ移動を実行できる。k = 2 とすると、この基準を満たすテストケースは以下の LTL 式をアサーションとして与えることで得ることができる。

```

kpage_coverage1 : THEOREM system |-
  NOT (t1 = TRUE OR X (t1 = TRUE) OR X (X (t1 = TRUE))));
...

```

```

kpage_coveragem : THEOREM system |-

```

```

  NOT (tm = TRUE OR X (tm = TRUE) OR X (X (tm = TRUE))));

```

5. おわりに

本研究では、ステートマシン図によってモデル化、SAL プログラムとして記述された Web ナビゲーションを対象として、sal-smc を用いてテストケースの生成を行うための手法について示した。本研究では、6 つのテストケースのカバレッジ基準を想定し、それらの基準を満たすテストケースを生成するための LTL 式によるアサーションの記述法について示した。

現在の枠組みでは、静的にアサーションを生成した上でテストケース生成を行うため、それぞれのアサーションによって得られるテストケース間で重複が予想される。今後の課題として、動的なアサーション生成によるテストケース数の削減が挙げられる。また、本研究の成果を電子情報通信学会ディペンダブルコンピューティング研究会にて発表している^[9]。

参考文献

- [1] S.P. Christodoulou et al.: Web engineering: The developers' view and a practitioner's approach, Proc. of the 2nd ICSE Workshop on Web Eng., pp. 75-92, 2000.
- [2] F. Ricca and P. Tonella: Analysis and testing of web applications, Proc. of the 23rd Int'l Conf. on Soft. Eng. (ICSE 2001), pp. 25-34, 2001.
- [3] S. Halle et al.: Eliminating navigation errors in web applications via model checking and runtime enforcement of navigation state machines, Proc. of the IEEE/ACM Int'l Conf. on Automated Soft. Eng. (ASE 2010), pp. 235-244, 2010.
- [4] J. Rumbaugh et al.: Unified Modeling Language Reference Manual, The Pearson Higher Education, 2004.
- [5] E.M. Clarke et al.: Model checking, MIT press, 1999.
- [6] S. Bensalem et al.: An overview of SAL, Proc. of Fifth NASA Langley Formal Methods Workshop (LFM 2000), pp. 187-196, 2000.
- [7] 横川智教, 佐藤洋一郎, 有本和民: 検証およびテスト生成の自動化を指向したステートマシン図による web ナビゲーションのモデル化, 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌), vol.136, no. 3, pp. 423-433, 2016.
- [8] D. Varro: Towards symbolic analysis of visual modelling languages, Proc. of Int'l Workshop on Graph Transformation and Visual Modelling Techniques (GT-VMT 2002), pp. 57-70, 2002.
- [9] 笠原大和, 横川智教, 佐藤洋一郎, 有本和民: モデル検査を用いた Web アプリケーションのテストケース生成, 信学技報 DC2016-26, vol. 116, no. 278, pp. 37-42, 2016.

SiC ナノウiskの内部生成による C/C 複合材料の機械的特性向上

岡山県立大学 情報工学部

小武内 清貴

本研究の目的は、ガラス繊維を炭素前駆体樹脂に添加し、これを焼成することにより前駆体樹脂の炭化と改質を同時に行った SiC-C/C 複合材料を対象に、緻密化処理による緻密化挙動および機械的特性の変化を明らかにすることである。本研究では、ピッチ系炭素繊維を強化繊維、フェノール樹脂に固体改質源であるガラス繊維を添加したものを母材として、フィラメントワインディング法にて CFRP 体を作製し、これを、高温不活性雰囲気下にて焼成することによって SiC-C/C 複合材料を作製した。作製した SiC-C/C 複合材料の細孔分布は水銀ポロシメータによって測定し、緻密化は水を圧力媒体とした冷間等方圧加圧法によって行った。また緻密化した SiC-C/C 複合材料の機械的特性は 4 点曲げ試験によって評価した。その結果、SiC-C/C 複合材料内部に存在する細孔の体積は CIP 処理を繰り返すことによって減少するものの、5 回目以降の CIP 処理においては、空孔率の減少がほとんど見られなくなった。また CIP 処理を施すことによって、SiC-C/C 複合材料の曲げ強度の変動抑制が可能であることが分かった。

1. 緒 言

炭素繊維強化炭素複合材料（以下、C/C 複合材料）は強化材を炭素繊維、母材を炭素とする複合材料である。軽量かつ耐熱性が高く、不活性雰囲気下では 2000℃を超える高温条件下でも機械的特性に優れることから、高速車両のブレーキやロケットの部品などに使用されている。しかし酸化しやすく、高温大気中での使用は機械的特性が低下する¹⁾ため、これを補う手法として、耐酸化特性に優れ、高温時においても酸化を生じにくい SiC へと母材を改質する方法が試みられている²⁾。これらには含浸法や CVD 法などがあるが、改質時に発生する熱き裂³⁾や、改質処理に長時間を要するなどの問題がある。そこで申請者はこれらの方法に変わる改質法として、炭素前駆体樹脂に、改質材としてガラス繊維を添加し、これを焼成することにより前駆体樹脂の炭化と改質を同時に行う方法を提案した。提案法にて作製した SiC-C/C 複合材料の内部には、SiC ウィスカが生成され、この SiC ウィスカによって SiC-C/C 複合材料の摩擦特性が改善されることが明らかになっている⁴⁾。また SiC ウィスカの生成経路は気相反応⁵⁾であり、SiO₂ より遊離した O により母材 C が酸化され空孔が発生することが懸念される。しかし、提

案法にて作製した SiC-C/C 複合材料内部に存在する空孔の大きさや量については未だ明らかになっていない。また一般に、C/C 複合材料はその内部に存在する空孔を CVD や CIP, HIP 等の方法で充填する緻密化処理を経て実用に供される。提案法にて作製した SiC-C/C 複合材料においても同様の方法で緻密化可能であるかを明らかにする必要がある。そこで本研究では提案法にて作製した SiC-C/C 複合材料内部に存在する空孔の大きさや量について、水銀圧入法を用いて明らかにするとともに、CIP 法による緻密化処理を行い、その緻密化挙動を調査した。また緻密化処理を施した SiC-C/C 複合材料を対象にその機械的特性を評価した。

2. 材料および実験方法

2.1 供試材

C/C 複合材料の母材である炭素前駆体樹脂にはフェノール樹脂（PHENOLITE5010:DIC）を、強化繊維には 3K ピッチ系炭素繊維束（XN-20-30S:日本グラファイトファイバー）をそれぞれ用いた。また添加材として繊維径 11 μm 、長さ 100 μm のミドルファイバ（セントラルグラスファイバー製、EFH100-31）を用いた。

2.2 試験片作製方法

フィラメントウィンディング装置を用い、ガラス繊維を 5wt% 添加したフェノール樹脂からなる炭素前駆体にピッチ系炭素繊維束を含浸させフープ巻きにて巻取った。その際、巻取りピッチを 3.0 mm、巻取張力を 3.5 N とし、巻取層は 200 mm 角のボビンに 10 層とした。これを電気炉内で 80℃、24h にて予備硬化させた後、2 枚を重ね 20 層とし、ヒートプレスにて 150℃、15 MPa、1h の条件にて本硬化させ、CFRP 前駆体を作製した。この段階での炭素繊維の体積含有率 V_f は約 60% であった。CFRP 体をダイヤモンドカッタにて試験片形状に切り分け、アルゴン雰囲気下で最高温度 1000℃ の炭素化处理および 1500℃ の焼成処理を行い、C/C 複合材料を得た。昇温速度はそれぞれ 1.0、1.5℃/min、降温速度はそれぞれ 2.0、5.0℃/min とし、最高温度にて 1h 保持した。

2.3 CIP 処理

得られた C/C 複合材料に対し、冷間等方圧加圧法（以下、CIP 法）を用いて、焼成にてマトリクス中に発生した細孔を充填するため、以下の緻密化処理を試みた。まず試験片を真空梱包装置にて炭素前駆体樹脂とともに PP 製バッグに真空封入し、圧力容器に水と共に密閉した。その後、圧力容器内を 10 MPa、1h の条件にて加圧保持し、前駆体樹脂の含浸処理を行った。その後、前節と同様の条件にて予備硬化を行い、最高温度 1000℃ での炭素化处理を行った。この含浸、予備硬化、炭素化处理を所定の回数繰り返し行い、C/C 複合材料の緻密化を行った。得られた試験片の質量および体積を測定し、空孔率を算出した。以降ではガラス繊維無添加材の CIP 処理材を Unm_CIPn、ガラス繊維添加材を GF_CIPn と呼称する。それぞれ末尾の n は CIP の処理回数である。

2.4 細孔分布測定

水銀ポロシメータ (Micromeritics Instrument Corporation: MicroActive AutoPore V 9600) を用いて Unm_CIP0,1 および GF_CIP0,1 の細孔分布を測定した。水銀の入圧力は $20.5 \times 10^{-3} \sim 413$ MPa とした。本条件において、直径 $3 \times 10^{-3} \sim 120$ μm の開空孔に

ついて水銀が圧入されることになる。加圧圧力と、その圧力で流体を圧入可能な細孔直径の関係は以下の Washburn の式で求められる⁶⁾。

$$D = -4\gamma \cos \theta / P \quad (1)$$

ここで D は細孔直径、 γ は流体の表面張力、 θ は対象の細孔と流体との接触角、 P は加圧圧力である。ここで水銀の表面張力 γ および接触角 θ は 476 mN/m、130° を用いた。試験中の水銀の加圧圧力、(式 1) を用いて細孔の直径を求めた。

2.5 4 点曲げ試験

型卓上試験機(EZ-L:SHIMADZU)を用いて 4 点曲げ試験を行った。試験に用いた試験片形状および寸法を Fig. 1 に示す。上部支点間距離を 17 mm、下部支点間距離を 51 mm、試験速度を 1.0 mm/min とし、四点曲げ試験を行った。曲げ応力 σ_B とひずみ ε_B の値は次式により算出した。

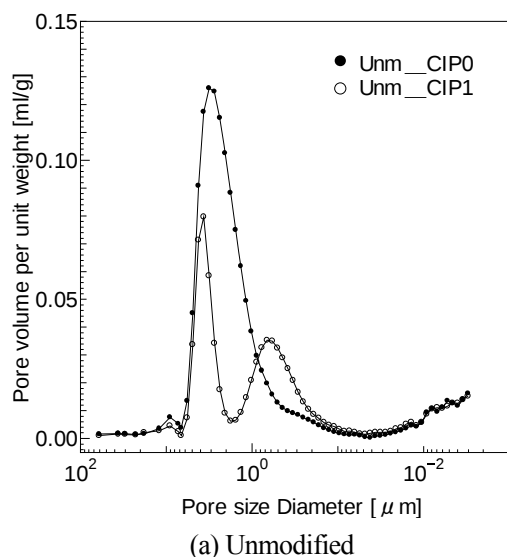
$$\sigma_B = \frac{PL}{Wt^2}, \quad \varepsilon_B = \frac{4.7\delta t}{L^2} \quad (4)$$

ここで P は荷重、 L は下部支点間距離、 W は試験片幅、 t は試験片厚さ、 δ は荷重点のたわみである。全ての条件において少なくとも 4 本の試験片を用いた。

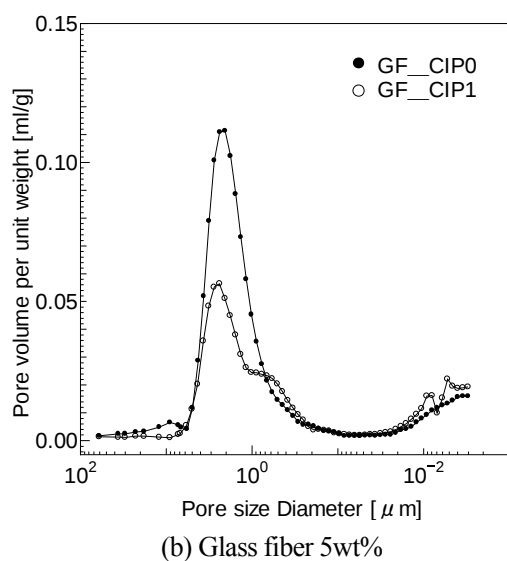
3. 結果および考察

3.1 細孔分布測定結果

図 1 に各条件での細孔分布測定結果を示す。図は横軸に、ある圧力で圧入可能な細孔直径を、縦軸にその圧力時に圧入した体積を示している。図 1(a) より、ガラス繊維未添加材である Unm_CIP0 と Unm_CIP1 とを比較すると、CIP 処理を施す前の Unm_CIP0 では直径 1~5 μm の細孔が主に存在していたのに対して、CIP 処理を 1 回施した Unm_CIP1 では直径 1~4 μm の細孔の体積が減少し、新たに直径約 0.1~1 μm 程度の細孔体積が増加した。同様に、ガラス繊維添加材である GF_CIP0、GF_CIP1 についても CIP 処理に起因する直径 1~5 μm 程度の細孔体積の減少と直径 0.1~1 μm 程度の細孔体積の増加が確認された。この細孔体積の増減は C/C 複合材料に存在していた空孔内部に CIP 処理によってフェノール樹脂が圧入され、焼成によって圧入された樹脂が細孔内で炭化することにより細孔径が減少し、その結果細孔分布に変化が生じたものと考えられる。ま



(a) Unmodified



(b) Glass fiber 5wt%

Fig.1 Comparison of pore distribution

たガラス繊維添加の有無による細孔分布の違いに着目すると、CIP 処理を施していない条件 (Unm_CIP0 と GF_CIP0) において、その内部に存在する細孔の分布に大きな違いは見られなかった。一方、CIP 処理を施した条件 (Unm_CIP1 と GF_CIP1) において、直径 1~3 μm 程度の細孔分布に違いが見られた。

3.2 緻密化挙動測定結果

図 2 に CIP 処理に伴う試験片質量の変化より算出した空孔率の変化を示す。図には比較としてガラス繊維を 1wt% 添加し作製した C/C 複合材料の値も示す。図より、CIP 処理を施す前の段階において (CIP0)、いずれの条件においても開空孔と閉空孔を併せて試験片体積に対し約 20~25vol% の空孔が存在していることが分かった。この空孔率は CIP 処理の回数を増加させることによって減少し、5 回以上の CIP 処

理において、空孔率の減少は殆ど確認出来なかった。ガラス繊維添加の有無による空孔率の違いに着目すると、ガラス繊維添加材では未添加材に比べ空孔率が高く、CIP 処理を繰り返してもその差はほとんど変化しなかった。一方、CIP 処理に伴う空孔率の減少挙動に着目すると、ガラス繊維添加の有無に起因する差はほとんど見られなかった。また、細孔分布測定の結果から試験片中に存在する開空孔の体積を算出すると、ガラス繊維の有無に関わらず約 13vol% ~14vol% の開空孔が存在していることがわかった。このことからガラス繊維未添加材には約 7%, ガラス繊維添加材には約 11% の閉空孔が存在していることになる。つまりガラス繊維を添加し焼成した SiC-C/C 複合材料はガラス繊維を添加していない C/C 複合材料に比べ、内部に存在する閉空孔の体積が増加していることが示唆された。

3.3 曲げ試験結果

図 3 にガラス繊維添加材とガラス繊維無添加材における、CIP 処理の回数に伴う 4 点曲げ強度の変化を示す。曲げ強度については、CIP 処理を行っていないものおよび、CIP 処理を 1, 5 回施したものを評価した。図内のエラーバーは試験片強度の最大値と最小値を示した。曲げ試験後の試験片の破壊形態はいずれの条件でも Mode II 層間せん断破壊であった。いずれの条件においても CIP 処理の回数増加にともなう曲げ強度の最大値には大きな変化がなかった。一方、曲げ試験の最小値については CIP 処理の回数

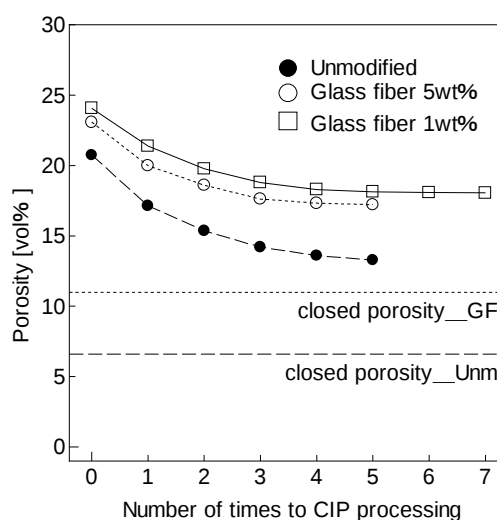


Fig.2 Porosity changes with respect to number of times to CIP processing.

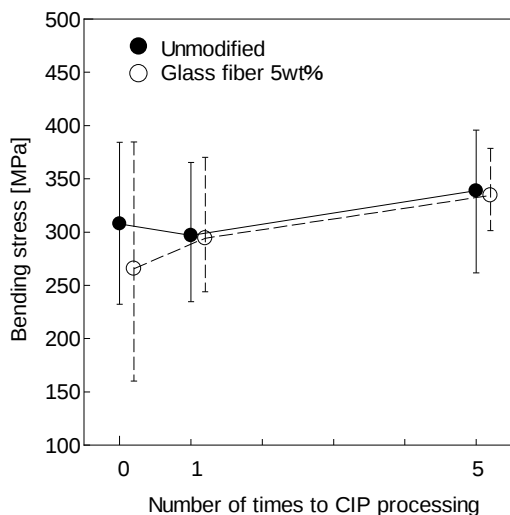


Fig.3 Bending strength with respect to number of times to CIP processing.

増加にともなって増加する傾向が見られた。これはガラス繊維無添加材よりもガラス繊維添加材においてより顕著であった。この結果、ガラス繊維添加材の平均強度はCIP回数の増加にともなって上昇した。ガラス繊維を添加することによって生じる強度の変動は、CIP処理による緻密化で抑制された。

3. 結 言

提案方法にて作製された SiC-C/C 複合材料に対して CIP 法を用いたマトリックスの緻密化を行い、その緻密化挙動と機械的特性を調査した結果、以下の結言を得た。

1. ガラス繊維無添加材とガラス繊維添加材の両者において、CIP 処理を起因とする細孔体積の減少と増加が確認された。
2. 作製した C/C 複合材料に対して 10 MPa の CIP 処理を施すことによって試験片中の空孔率が減少したが、5 回目以降の CIP 処理において、空孔率はほとんど減少しなかった。
3. CIP 処理を施すことによって、SiC-C/C 複合材料の曲げ強度の最小値は増加した。一方曲げ強度の最大値については CIP 処理に起因する変化は殆ど見られなかった。このことから、CIP 処理は提案法で作製した SiC-C/C 複合材料の曲げ強度の変動抑制に有効であることが分かった。

参考文献

- [1] Shuuichi ISHIZAWA and Takashi MACHIDA, “Effect of Oxidation Degradation on Elevated-Temperature Strength of C/C Composite”, 日本機械学会論文集 (A 編), Vol.63, pp.845-850 (1997).
- [2] (8) Kim, S. Y., Han, I. S., Woo, S. K., Lee, K. S. and Kim, D. K.: Wear-mechanical properties of filler-added liquid silicon infiltration C/C-SiC composites, Materials & Design, 44 (2013), 107-113
- [3] Chihiro KAWAI and Tadashi IGARASHI, “Oxidation Resistant Coating of TiC-SiC System On C/C Composite by Chemical Vapor Deposition”, The ceramic Society of Japan, 99, pp.390-394 (1991)
- [4] Masahiro Kimura¹, Kiyotaka Obunai, Kazuya Okubo and Toru Fujii. “Moderation of Dependence of Frictional Coefficient of C/C Composite on Temperature due to Addition of Glass Fibers into Carbon Precursor of Phenolic Resin”, CJCC-11, CD-ROM, OS1728, (2014)NTT-Electric Library Service
- [5] Toshio Shimoo, Fusago Mizutaki, Shigeru Ando and Hiroshi Kimura, “Mechanism of Formation of SiC by Reaction of SiO with Graphite and CO”, J. Japan Inst. Metals, 52 (3), pp.279-287 (1988).
- [6] Choji NAKAMURA, Yuya SAKAI and Toshiharu KISHI, “study on the effects of chemical and physical property of concrete on the behavior of water”, Cement Science and Concrete Technology, vol.66, pp.444-451(2012)

地域在住高齢者の自主的な介護予防、健康づくり活動を促進する支援プログラムの開発

1. 岡山県立大学, 2. 大阪体育大学, 3. 独立行政法人国立病院機構岡山医療センター

高戸 仁郎¹, 植木 章三², 大森 信彦³

本研究の目的は、自発的に高齢者の介護予防活動が発足し、その活動が順調に継続している地域のリーダーへのインタビューから、自主活動の設立過程とその継続要因を明らかにすることであった。

高齢者の介護予防を目的とした自主活動を主体的に発足させた2地区の自主活動リーダー7名を対象に、半構造化面接を行い、逐語録を整理し、テキストマイニングの手法を用いて分析した。

その結果、自主活動の発足から継続にいたる要因と今後の課題について①自主活動の運営は最初にスムーズな立ち上げが重要であること、②一人暮らしの高齢者に参加してもらう仕掛けによって継続を促進したこと、③地域住民に連帯感が生まれたこと、④参加を促すために様々なPR活動を展開したこと、⑤自主活動を通じて世代間交流も増えたこと、⑥自主活動の立ち上げ当初に直面した問題を社会資源の活用で解決したことが明らかになった。

本研究の対象地区において地域高齢者の自主的な活動は、関係機関の支援に依存することなく自律的に行われていた。今後は一般介護予防事業でも求められている開催頻度に加えてプログラムの更なる充実を実現する方策が重要と考えられた。

問題と目的

我が国では2025年には、後期高齢者が2000万人を越えると言われており、高齢化進展の「速さ」に加えて、高齢化率の「高さ」という新たな課題にも直面することになる。また、65歳以上の単独世帯または夫婦のみの世帯が全世帯の25%を占め、高齢者に対するイメージはこれまでの支えられる対象から、自らが生産的で、社会に貢献できる人材としての期待へと変貌している。そのような中、介護・医療・住まい・生活支援・介護予防が一体的に提供される「地域包括ケアシステム」の構築を実現することが求められ、高齢者の社会活動にはこれまで以上に期待が寄せられている。中でも介護予防は、費用対効果の面で見直しを余儀なくされ、平成23年の法改正に伴い、介護予防・日常生活総合支援事業（総合事業）が創設された。総合事業の中の一般介護予防事業は、「住民運営の通いの場を充実させ、人と人とのつながりを通じて、参加者や通いの場が継続的に拡大していくような地域づくりを推進する」[1]とされている。しかし、多くの自治体ではその具体的な取り組みは緒に就いたばかりである。現在、各地で自主的な活動が発足しているが、それらの多くは行

政や地域でリーダー的な役割の人が中心となり活動を立ち上げていて、そのリーダーシップに負うところが大きいことが明らかになっている。これらの活動が抱える問題として、リーダーが異動や役員改選などで一線を退くと、その活動の存続が危ぶまれるということが挙げられる。地域住民の協働による真に持続可能な自主活動を構築するための、人的、社会的資源は十分ではない。特に自主活動の発生から継続要因については、未だ明らかにされていない。持続可能な地域包括ケアシステムの構築に資するためには、地域で暮らす高齢者が互いに協働し、健康づくり、介護予防に関わる自主活動を立ち上げ、継続するために必要な要因を明らかにし、それらの要因を踏まえた自主活動支援プログラムを作成し、地域への波及効果とともに妥当性を検証することが必要である。

高齢者の介護予防活動への参加者が活動を継続するには、仲間の存在や安価な費用、歩いて行ける場所の重要性などが指摘されている[2]。一方で、それらの介護予防活動は前述の通り自主的な活動が推奨されているものの、その活動の自主グループ化には、支援者の立場で「最初から保健師が意図的に関

わること」,「独立してやっていく意識付けをすること」,「参加者と信頼関係を築くこと」 [3]の必要性が指摘されている。また,当事者の立場からは,募集段階から自主グループ活動を主体的に実施することを目指すリーダー養成講座の受講者を対象に,自主グループの設立要因を分析したものなどに限られており,地域住民の中から自発的に発生したグループ活動におけるリーダー自身の活動パターンやリーダーシップに関する報告はみられない。主体的に活動しているリーダーの活動パターンの傾向や環境条件を明らかにすることは,これから自主活動を立ち上げる地域において,スムーズかつ継続的に活動が実施されるための支援方策にとって必要と考えた。本研究の目的は,自発的に高齢者の介護予防活動が発足し,その活動が順調に継続している地域のリーダーへのインタビューから,自主活動の設立過程とその継続要因を明らかにすることである。

方法

対象

インタビュー対象者は,高齢者の介護予防を目的とした自主活動を主体的に発足させたリーダーとした。なお,本研究では「自主活動」を以下のように定義した。市町村社会福祉協議会が自主的なサロン活動の立ち上げを支援し,その後高齢者自らが地域で主体的・継続的に取り組んでいる介護予防,健康づくり活動。

対象者の選定

対象者の選定は,A県A市の社会福祉協議会に依頼し紹介を受け,著者らがA市内の自主活動の見学や資料の閲覧を通して情報収集を行った上で,本研究の趣旨を理解して協力の意思を表明した2地区の自主活動リーダーとした。調査対象者は7名(男性3名,女性4名)で,全員から調査に対する承諾が得られた。

調査方法

調査対象者に60~90分の半構造化されたグループインタビューを行うことでデータを収集した。調査期間は2017年1月13日から14日であった。インタビューには事前に作成したインタビューガイドを

用いた。インタビューガイドは1)自主活動の設立にいたるまでの経緯,2)自主活動立ち上げ当初から現在までの活動内容,3)自主活動が継続できている要因,4)自主活動が抱える課題であった。インタビュー内容は対象者の許可を得てICレコーダーに録音し,逐語録を作成し分析データとした。インタビューガイドをもとに,半構造化面接を行った。インタビューガイドは,1基本属性(グループの経緯,リーダーになった経緯と継続年数),2リーダーとしてどのような活動をしているのか,3リーダーとして活動する上での苦労や負担であった。インタビュー内容は対象者の了解を得てICレコーダーに録音した後,逐語録を作成し,分析データとした。

分析方法

テキストマイニングは,「質的データの中でも特に文章型すなわちテキスト型のデータを分析する方法」[4]で,様々な統計手法を用いて探索的な分析によって,パターンやルールを解明できるため,本研究の目的である,高齢者の自主活動に関するインタビューを通して,自主活動の発足から継続にいたる要因,今後の課題を捕捉する上で有効な分析ツールである。

まず,分析データから質問者の発言を除き,対象者ごとに発言が特定できるようにタグ付けした上で,1つのテキストファイルに保存して,樋口[4]のテキストマイニングソフトKH coderを用いて形態素解析を行い,構成要素を抽出した。形態素は意味を持つ最小単位の言葉であり,助詞や助動詞のような文の中にも出現する一般的な語を省き,名詞,動詞,形容詞,形容動詞を分析に用いた。その際,例えば「老人クラブ」や「介護予防」など1つの語として集出したいものについては,単語の単位(「老人」と「クラブ」,「介護」と「予防」)に区切らず1つの語として抽出できるようにした。

分析データ中に10回以上出現した構成要素を採用し共起ネットワーク分析を行った。

共起は「ある単語がある文章中に出了とき,その文章中に別の限られた単語が頻繁に出現すること」[4]であり,KH coderの共起分析機能は「出現パターンの似通った語,すなわち共起の程度が強い語を

線で結んだネットワークを描くことができる」[4] ため、構成要素同士の関係を視覚的に理解できることから採用した。

倫理的配慮

本研究対象者には、事前に調査の内容やプライバシー保護に関する説明を行い、書面にて参加の同意を得た。インタビュー調査実施時には対象者の体調に配慮し、疲労がみられた者に対しては適宜休憩を設けた。本研究は岡山県立大学倫理委員会の審査を受け実施した（受付番号：16-63，承認年月日：平成28年9月30日）。

結果

KH coder を用いた分析

(1) 構成要素の出現回数

総抽出語数は38,078語、異なり語数は2,359語であった。逐語録に頻出する単語を把握するために、10回以上出現した構成要素を一覧表にした（表1）。10回以上出現した構成要素は「人」169回、「サロン」（89回）、「今」（73回）、「皆さん」（64回）、「話」（53回）などの名詞56語、「言う」（215回）、「思う」（53回）などの動詞26語を含む合計93語であった。

（156回）、「来る」（75回）、「行く」（58回）、「出る」（52回）などの動詞26語を含む合計93語であった。

(2) 共起ネットワーク

10回以上出現した構成要素間の関係を見るために、出現パターンが類似している語（共起の程度が強い語）を線で結んだ共起ネットワーク分析を行った。共起ネットワークは、共起する語を線で結んだものであり、語の出現頻度や語と語の結びつきの程度に応じ、円の大きさや色、あるいは円を結ぶ線の大きさによって表される[5]（この図は「お互いに近くに付置されているというだけでは、それらの語の間に強い共起関係があることを意味しない」[4]。配置された位置ではなく、線で結ばれているかどうかによって意味があるため、本分析ではKH coderの共起ネットワーク図からサブグラフ（媒介）を選択した。KH coderでは比較的強くお互いに結びついている部分（サブグラフ）を自動的に抽出してグループ分けを行う。今回は各構成要素間の関連性を確認するため、サブグラフ（媒介）を選択し、描画する共起関係の数を60に絞り込み描画した（図1）。

表1 「自主活動を立ち上げてから継続するまでの経緯」についての構成要素の出現回数

順位	抽出語	出現回数	順位	抽出語	出現回数	順位	抽出語	出現回数	順位	抽出語	出現回数
1	言う	215	23	上げる	27	44	地域	18	63	他	13
2	人	169	25	帰る	25	48	取る	17	63	知る	13
3	思う	156	25	集まる	25	48	男性	17	63	買う	13
4	サロン	89	25	聞く	25	50	運営	16	63	名前	13
5	来る	75	28	形	24	50	考える	16	74	家	12
6	今	73	28	多い	24	50	情報	16	74	昔	12
7	皆さん	64	30	年	23	50	男	16	74	補助	12
8	行く	58	30	年寄り	23	50	町内会	16	77	お願い	11
9	話	53	32	作る	22	55	お父さん	15	77	一つ	11
10	出る	52	32	食べる	22	55	こないだ	15	77	掛ける	11
11	分かる	48	32	食事	22	55	行う	15	77	子ども	11
12	入る	40	32	地区	22	55	世代	15	77	主人	11
13	最初	39	36	本当	21	55	大体	15	77	住民会	11
14	立つ	36	36	良い	21	55	問題	15	83	サポート	10
15	お金	35	38	今度	20	61	体操	14	83	活動	10
16	持つ	34	38	若い	20	61	毎月	14	83	参加	10
17	スタッフ	32	40	一緒	19	63	お話	13	83	時間	10
17	感じ	32	40	結局	19	63	違う	13	83	自転車	10
19	見る	31	40	出す	19	63	栄養委員	13	83	土曜日	10
20	自分	30	40	助け隊	19	63	何とか	13	83	特に	10
20	入れる	30	44	会長	18	63	回る	13	83	本当に	10
22	前	29	44	今日	18	63	社協	13	83	連れる	10
23	一番	27	44	声	18	63	全部	13	83	老人クラブ	10

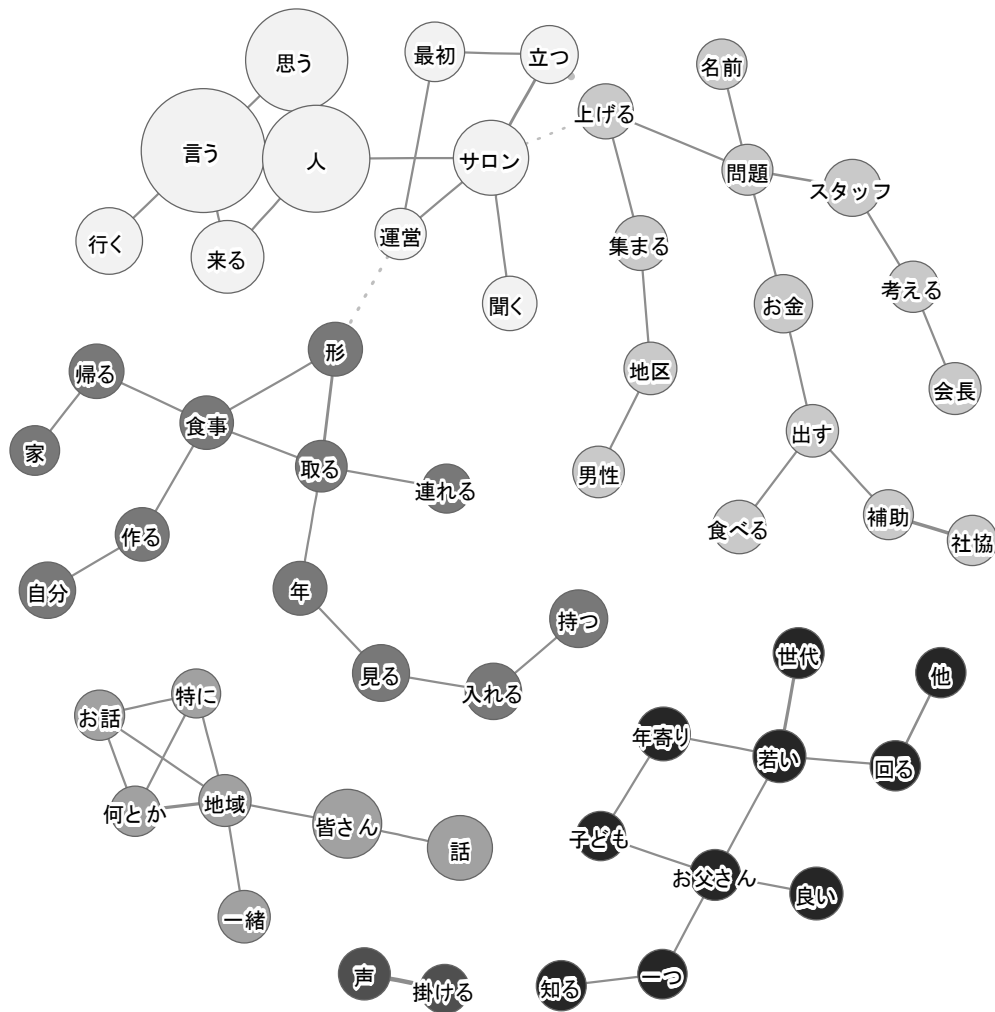


図1 「自主活動を立ち上げてから継続するまでの経緯」についての共起ネットワーク

各グループに含まれる語を整理し、それぞれの特徴付けを行った結果、次の6つが見出された。

①自主活動の運営は最初にスムーズな立ち上げが重要であったこと

U 地区では自主活動（「サロン」）の「立ち」上げに際して、「最初」は既存の有志で作る「お助け隊」が母体となって、2 年間の話し合いを経て十分な準備期間があったからこそ、スムーズに立ち上がったことが述べられた。K 地区では、幅広い年代で構成する準備委員会を設置し、自主活動の立ち上げについて地域住民の意見を「聞く」機会を設け、参加者の拡大を図る努力があったことが述べられた。

②一人暮らしの高齢者に参加してもらおう仕掛け作り

K 地区では「年を取った」者が「家」から出てきってもらう仕掛けとして、「食事を作って」それを提供していた。参加者の食事は無償で提供されているが、

自発的な申出により任意の代金を「入れる」手作りの箱が用意され、そこから材料費に充てるなど好循環が生まれていた。U 地区では参加者拡大のために「食事」を提供することは有効であると認識されているものの、実現するための環境が整っていないことがハードルとなっていた。O 市では嘱託の栄養委員を募集しているが、平日の養成講習は現役世代が受講できないことに対する矛盾を指摘する声もあった。

③地域住民に連帯感が生まれたこと

自主活動に参加するようになって、そこで「話」をすることで顔なじみになり、活動以外の場所でも会えば会話が弾むといったことや、小中学生などとも朝夕の登下校時に見守りボランティアを通して話ができ、「地域」全体の連帯感が増えたと述べられていた。

④参加を促すために様々なPR活動を展開したこと

参加者への「声掛け」を欠かさず、近隣住民との関係づくりができたことがこれまで継続している大きな要因であると認識されていた。K地区では市の広報紙と一緒に独自の新聞を各戸に配布し、自主活動の案内を周知していた。

⑤自主活動を通じて世代間交流も増えたこと

「年寄り」だけの自主活動では先細りがみえていたため、町内会、子供会、老人会などの組織を巻き込み、七夕や餅つきなどのイベントを開催していた。

「子ども」が参加すれば「お父さん」も一緒に参加するケースが多く、世代間の交流が促進され好循環が生まれているが、自主活動に参加する次世代との繋がりは今後の課題であった。

⑥自主活動の立ち上げ当初に直面した問題の解決

自主活動を始めたいという声が上がリ、そのための準備期間は1～2年を要したが、会の「名前」をどうするのか、に始まり「場所」はどこでやるのか、スタッフは「集まる」のか、料金（「お金」）はいくらにするのか、など「考え」なければならないことが山積していたが、社会福祉協議会（「社協」）の「補助」を活用するなど、社会資源を活用し時間をかけて解決したことが、結果的にスムーズな立ち上げと順調な継続に繋がっていることが明らかになった。

考察

高齢者の自主活動を立ち上げた背景と継続参加する要因を分析した先行研究の多くは、行政あるいは関係機関の支援が必要であるとしており[6][3][7]、本研究でも自主活動の立ち上げ時には社会福祉協議会の支援が認められた。しかし、立ち上げからある程度期間が経過した現段階では、行政に対する期待はどの調査協力者からも聞かれなかった。このことは、発足のきっかけから住民主体で行動してきたメンバーがまだ活動の中心的存在であり、必要以上に他者へ依存していなかったことの影響と考えられる。一方で、金ら[8]は学習活動が活発な中高年者ほど社会参加には行政支援の必要性を感じていたことを報告している。このことは、行政及び関係機関によって学習活動の多くが提供されている影響と

考えられているが、今回の調査対象者の学習活動に接する機会との関係は明らかにできなかった。

厚生労働省は、住民主体の介護予防活動は原則として週1回以上の開催とし、後期高齢者、要支援者でも可能なレベルの体操を実施することを求めている。今回の調査協力地域はK地区においては週1回以上の頻度で開催されていたが、U地区においては月に1度の開催で、当面はこのまま継続していく予定である。両地区のリーダーとも運動器の機能向上の必要性については充分認識しているものの、体操を週に1回以上実施することには負担が大きく抵抗を感じていた。大須賀[9]は、人間が最も生きがいを感じるの自分がしたいと思うことと義務感とが一致したときであると述べており、今回の対象者も自主活動を主体的に継続しているのは、役割を担うことによる自己効力感や社会参加意欲の充足が原動力になっていると考えられる。軽微な運動を定期的に実施するには、運動継続による効果や好奇心を喚起するような関係機関の積極的な関与が必要であると考えられた。

本研究の調査対象は2つの自主活動グループを対象としたきわめて限定的なものであるが、本研究で分析対象とした住民主体の自主活動の発足から継続にいたる要因と今後の課題については説明できたものとする。しかし、2つのグループ間においても実施頻度、実施プログラムなど異なる点がいくつか挙げられるため、今回の結果を他の地域に適応するには注意が必要である。

引用文献

- 安齋由貴子、都筑千景、横山梓. “地域看護活動におけるグループ形成のための理論・技術.” 看護研究 36.7 [2003]: 537-549.
- 蔭山正子. “グループの自主化のための理論・技術.” 看護研究 36.7 [2003]: 563-572.
- 遠藤和土. “自主グループ活動に対する支援のあり方に関する研究.” 大阪大学教育学年報 11 [2006]: 93-104.
- 河合恒、ほか. “地域住民の主体的な介護予防活動推進のための取り組み.” 日本公衆衛生雑誌 60.4

[2013]: 195-203.

金貞任, ほか. “地域中高年者の社会参加の現状とその関連要因 埼玉県鳩山町の調査から.” 日本公衆衛生雑誌 51.5 [2004]: 322-334.

介護予防・日常生活支援総合事業のガイドラインについて. 2015. 2017 年 4 月 30 日 <<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-12300000-Roukenkyoku/0000088520.pdf>>.

高比良祥子, 古川秀敏, 吉田恵理子. “高齢者筋力向上トレーニング事業の効果と運動継続を促す支援—事業参加者のインタビュー調査から—.” 県立長崎シーボルト大学看護栄養学部紀要 6 [2006]: 11-22.

植村直子, ほか. “高齢者が運動自主グループを立ち上げた背景と継続参加する要因 : 地域における自主グループ活動の意義.” 滋賀医科大学看護学ジャーナル 8.1 [2010]: 22-25.

植木章三ほか. “地域—大学—自治体の連携と世代間交流による介護予防運動プログラムの実践と評価 科学研究費補助金研究成果報告書 (研究種目: 基盤研究(B)).” 課題番号: 18300234, 研究代表者: 植木章三 [2009].

前馬理恵, ほか. “自主化に向けたグループ支援の方法.” 和歌山県立医科大学保健看護学部紀要 3 [2007]: 43-49.

早坂 玉緒, 張平平, 大塚 眞理子. “自主グループにおける高齢者リーダーの 継続的な役割遂行に関する要因 —介護予防(一次予防事業)の取り組みから—.” 千葉看会誌 21.2 [2016]: 17-23.

村瀬純子, 飯田澄美子. “中山間地域における自主グループの活動継続要因について.” 保健の科学 53.4 [2011]: 267-273.

村嶋幸代, ほか. “保健師によるグループ支援活動の理論および実証研究に関する課題.” 看護研究 36.7 [2003]: 609-613.

大橋純子. “戸建て住宅が立ち並ぶ超高齢ニュータウンにおける地域のつながりづくり計画-住民協働による心身の健康づくりをめざして.” 京都府立医科大学看護学科紀要 26 [2016]: 61-65.

大須賀政裕, 糸川 美紀, 堀田明裕. “高齢者の生きがい環境に関する研究 2.” デザイン学研究. 研究発

表大会概要集 49 [2002]: 254-255.

中山貴美子. “高齢者の自主グループづくりには保健師の支援が欠かせない.” 保健師ジャーナル 64.6 [2008]: 534-540.

田中京子. “KH Coder と R を用いたネットワーク分析.” 久留米大学コンピュータジャーナル 28 [2013]: 37-52.

島貫秀樹, ほか. “地域在宅高齢者の介護予防推進ボランティア活動と社会・身体的健康および QOL との関係.” 日本公衆衛生雑誌 54.11 [2007]: 49-759.

湯浅資之, 西田美佐, 中原俊隆. “ソーシャル・キャピタル概念のヘルスプロモーション活動への導入に関する検討.” 日本公衆衛生雑誌 53.7 [2006]: 465-470.

樋口耕一. 社会調査のための軽量テキスト分析—内容分析の継承と発展を目指して—. 東京: ナカニシヤ出版., 2014.

福嶋篤, ほか. “地域在住高齢者による自主グループ設立過程と関連要因.” 日本公衆衛生雑誌 61.1 [2014]: 30-40.

芳賀博, ほか. “地域における高齢者の転倒予防プログラムの実践と評価.” 厚生指標 50.4 [2003]: 20-26.

麻原きよみ, 加藤典子, 宮崎紀枝. “グループ活動が地域に発展するための理論・技術.” 看護研究 36.7 [2003]: 573-587.

林,志保, ほか. “住民主体の地域づくりと協働する行政のあり方 住民自主グループのエンパワメントの分析から.” 川医科大学看護学雑誌, 7.1 [2003]: 145-154.

高強度・高リサイクル性マグネシウム合金の開発

岡山県立大学 情報工学部 情報システム工学科

福田 忠生

熔融金属をスクリーンで攪拌するマグネシウム合金射出成形では、溶湯に粒子や短繊維などの強化材を予混合し、金型内に射出成形することが可能である。この強化材予混合金属射出成形法の利点は、複合材料化による成形品の機械的特性の向上のみならず、従来の半熔融成形の特徴であった凝固収縮量の減少による引け巣の軽減などを精密な温度制御を用いずに達成できることである。

本研究ではこの強化材にシリコンウェハー製造現場で廃棄されている切削屑であるシリコン微細粒を利用することで、リサイクル性と強度の向上を同時に実現する画期的な方法を提案すると共に、上述のプロセスで作成した粉末状廃シリコン強化マグネシウム合金射出成形品の強度特性を実験的に調査・検討した。この結果、シリコン粉末添加は結晶粒微細化を促し、強度の向上に有効であることを明らかにした。また、本手法において、機械的特性に及ぼすシリコン粉末添加の影響は、0.69mass% の添加量が最適だと判断した。

1. はじめに

Mg 合金の結晶粒微細化処理として、 $C_{2}C_{16}$ のホスホライザによる炭素添加法が工業的に使用されている[1]。しかし、近年になって、 $C_{2}C_{16}$ が環境負荷物質に指定されたこともあり、その使用は制限されている[2]。そこで、これに代わる微細化材として Mg と Si からなる Mg_2Si に着目した。 Mg_2Si は Mg との濡れ性が良好である[3]ことから、Mg 合金中において Mg_2Si が異質核生成物質となり結晶粒微細化に寄与すると考えられる。そこで、本研究では Mg 合金射出成形プロセスにおいて固体 Si 源を溶湯中に添加し、射出成形機内部にて Mg_2Si の生成を試みると共に、機械的特性と微細組織との関係を調査した。

2. 実験方法

2.1 供試材

供試材として、射出成形用にチップングされた AZ91D 合金粒子 (0.5×1×4 mm, STU 製) およびシリコンウェハー製造現場で廃棄されている切削屑であるシリコン微細粒 (粒径 0.2 - 40 μm , 新興製作所提供, 以下 Si と略) を用いた。これらをステンレス製ポットミルに 5 条件の異なる質量割合で投入し、乾式混合により AZ91D 合金粒子の表面に Si を付着させた。本研究では、AZ91D 合金粒子の表面に付着した Si の質量を別途測定し、これを射出成形品への

Si 添加量と定義した。なお、Si 添加量は 0.10 - 0.69 mass% の範囲で変化させた。以下本文では、得られた射出成形品を AZ91D (Si 無添加), Si10, Si19, Si31, Si49 および Si69 と呼称する。

2.2 成形条件および試験片形状

Mg 射出成形機 (JLM75MG, 日本製鋼所製) を用いて、2.5 mm 厚の平板を成形した。成形条件は、全条件においてバレル温度を 863 K, 金型温度および射出速度はそれぞれ 483 K, 1.0 m/sec とした。

引張試験においては図 1 (a) 中の網掛けにて示す部分 (JIS Z 2241, 14B 号 試験片に準拠) を、曲げ試験においては図 1 (b) 中の網掛けにて示す部分をそれぞれ成形品から切出し、試験片として用いた。

2.3 強度試験

引張試験は精密万能試験機 (Autograph AG-X plus, 島津製作所製) を用い、試験速度を 1.5 mm/min, 有

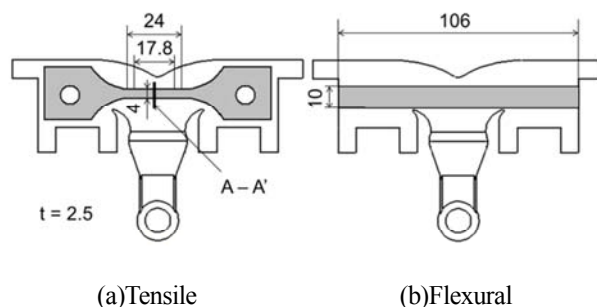


Fig.1 Configuration of specimens.

効試験片数 (n) は 3 以上とした。曲げ試験は小型卓上試験機 (EZ-Test EZ-L, 島津製作所製) を用いて押し曲げ法による 3 点曲げ試験を行った。支点間距離を 50 mm, 試験速度を 2.0 mm/min, 有効試験片数 (n) は 4 以上とした。

2.4 ダイナミック硬さ試験

引張試験片の平行部に相当する部位 (図 1 (a) 中 A-A' 断面) について, ダイナミック微小硬度計を用いて硬さを評価した。試験荷重は圧痕の大きさが平均結晶粒径 (5 μm) 以下となる条件 (0.3 gf) とした。

2.5 組織観察

引張試験片の平行部に相当する部位 (図 1 (a) 中 A-A' 断面) について, 組織観察および結晶粒度試験を行った。組織は光学顕微鏡および電子線マイクロアナライザ (Electron Probe Micro Analyzer: EPMA), 結晶粒は電子線後方散乱回折 (Electron Back Scatter Diffraction: EBSD) 法による結晶方位解析を用いて観察を行った。本研究で対象とする Mg 射出成形品の結晶粒度試験は JIS に規定がないため, 圧延板に関する規定 JIS H 0542 マグネシウム合金圧延板の結晶粒度試験法を参考に, 観察画像から結晶粒径を求めた。

3. 実験結果および考察

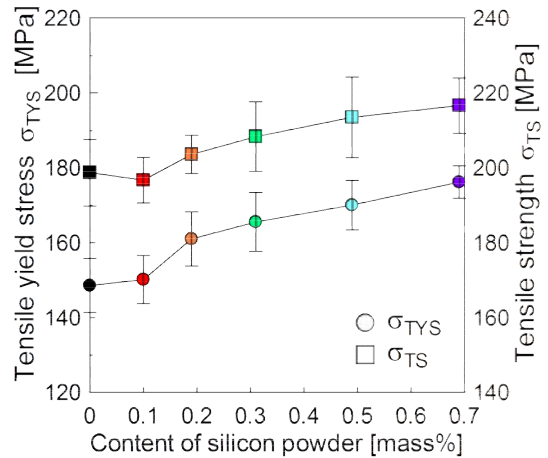
3.1 機械的特性

図 2 (a) および (b) に引張, 曲げ試験における降伏応力 σ_{TYS} , σ_{FYS} および最大強度 σ_{TS} , σ_{FS} と Si 添加量との関係を示す。図より, σ_{TYS} , σ_{FYS} および σ_{TS} , σ_{FS} は AZ91D と比較して Si19 以上の添加条件にて向上し, Si69 にて最大となった。また, 破断ひずみは全ての条件において同程度であり, Si 添加が延性に及ぼす影響は小さいと言える。

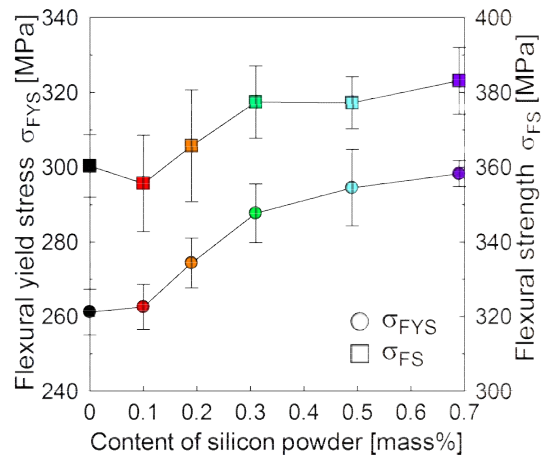
3.2 結晶粒径

図 3 に結晶粒径と Si 添加量との関係を示す。平均結晶粒径は中央部, 表面部ともに Si19 以上の添加条件において AZ91D と比較して急激に微細化したが, Si19 から Si69 にかけての微細化効果は緩慢であった。また, いずれの Si 添加条件においても中央部の粒径に対し表面部の粒径が細くなった。これは鑄造時の冷却速度に起因し, 金型と接する表

面部が中央部と比較して相対的に冷却速度が高く, 結晶核が多数発生するためである。



(a) Under tensile load



(b) Under flexural load

Fig.2 Yield stress and strength with respect to mass content of silicon powder, under tensile or flexural load.

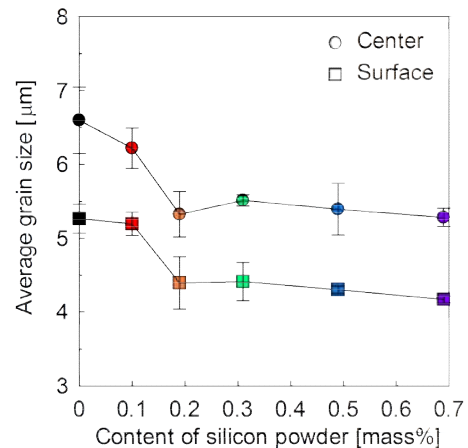


Fig.3 Average grain size with respect to mass content of silicon powder.

3.3 組織観察

試験片平行部に対して光学顕微鏡観察を行った結果, Si 添加材において AZ91D では見られなかった $1 - 6 \mu\text{m}$ の針状組織が観察された(図示略). そこで, 任意の針状組織に対して EPMA による元素分析を行った. 図 4 はその結果を示したものであり, 針状組織は Si 元素の検出強度が高いことが確認された. また, それらの箇所からは Mg 元素も多く検出された. 浅野らは, Si と Mg との反応は約 800 K でも生じるとし, 凝固過程において Mg_2Si が晶出することを報告している[4]. このことから, 863 K によって成形を行った本研究においても同様に, Mg_2Si が晶出したと考えられる. また, 図 5 に腐食液を用いて Mg_2Si を現出させた[5]電子顕微鏡組織および元素分析結果を示す. 図 4, 5 を合わせて考えると, 図 5 における黒く見える箇所が Mg_2Si であると判断できる. 多くの Mg_2Si は粒界に存在していたが, 図中破線で示すような比較的サイズの小さい Mg_2Si が粒内に存在していることが確認された.

以上のことから, Si 添加によって Mg_2Si が生成され, それが異質核生成物質となることによって微細な結晶粒が得られたと考えられる.

3.4 降伏応力の向上要因について

図 6 に降伏応力と平均結晶粒径との関係を示す. 図中破線は本実験により得られた Hall-Petch の関係式であり, 実線は AZ91 合金押出品の Hall-Petch の関係式 ($\sigma_y = 130 + 210 d^{-1/2}$) である[6]. 本研究で得られた関係式は, その絶対値に違いは見られるものの, AZ91 合金押出品と同様の結晶粒径依存性を有しており, 概ね Hall-Petch の関係に従うことが分かった. しかし, Si31 以上の添加条件では, 結晶粒径に大きな変化がなかったにもかかわらず, 降伏応力は向上していた. そこで, 粒内および粒界に対し, ダイナミック硬さ試験を行った ($n=20$). その結果, 粒内硬さは Si 添加の有無によらず, ほぼ一定 ($\text{DH} = 107$) であった. しかし, AZ91D での粒界硬さは $\text{DH} = 104$ であったのに対し, Si49 での Mg_2Si 近傍の粒界硬さは $\text{DH} = 111$ となった. このことから, 粒界に存在する Mg_2Si によって粒界の強度が向上したと判断した.

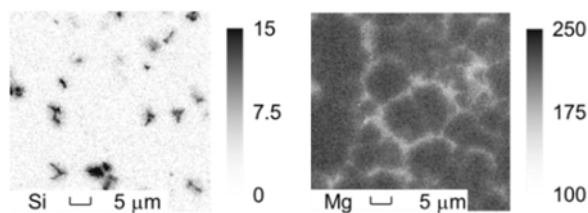


Fig.4 EPMA area analysis of acicular structure.

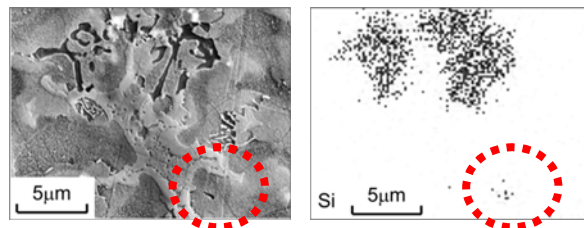


Fig.5 Microstructures observation of Mg_2Si .

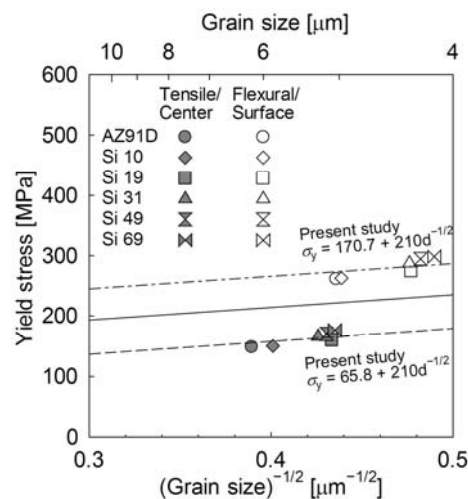


Fig.6 Yield stress with respect to average grain size.

4. おわりに

- (1) シリコン粉末添加により, Mg_2Si が生成され, その多くは粒界に分散したが, サイズの小さいものは粒内にも観察された.
- (2) シリコン粉末添加は結晶粒微細化を促し, 強度の向上に有効である.
- (3) 本手法において, 機械的特性に及ぼすシリコン粉末添加の影響は, $0.69\text{mass}\%$ の添加量が最適だと判断する.

(参考文献省略)

わが国との比較的視点で捉える台湾における武徳殿建設の経緯についての分析研究

岡山県立大学 デザイン学部 デザイン工学科 建築・都市デザイン領域

西川 博美

日本統治下の台湾において、街・庄に数多く建設されてきた武徳殿について、その建設経緯と建築の特徴について明らかにした。武徳殿は、1899年に京都・岡崎に建設された武道場である。最大の特徴は、近代の建築でありながら、日本の伝統的な寺院建築の意匠が使われていることである。その後、植民地も含め日本全国に、同様の意匠で大日本武徳会を通じて建設され、台湾においても同様に広く普及し、市区改正事業が進む中で各地に建設された。

台湾では大日本武徳会の「台湾本部」として、1906年に武徳会が設立され、日本本土よりも組織的に大量の武徳殿が建設された。そしてその意匠は、日本の武徳殿と同様に寺院の意匠が採用されているが、外観において武徳殿建築としての特徴を表すよりも、日本の伝統的な意匠を自由に表現するという傾向があり、地域ごとに異なるアレンジが加えられていることがわかった。また、台湾の武徳殿は、武道の演舞場だけでなくさまざまな用途に利用され、公共施設としての性格を合わせ持つものであったことが明らかになった。

1. はじめに

この研究では、日本統治下の台湾で、各地に数多く建設された武徳殿について、その建設経緯と役割について考察した。武徳殿は、1895年に創設された大日本武徳会が建設した武道場を中心とした施設である。「武徳」という名称は、794年に平安京に日本の都が移される際に、天皇が大内裏（御所）に、武道を奨励し、その「徳」を広めようとして建設した武徳殿から由来する。そうした精神の普及も目的としていた武徳殿は、1899年に京都・岡崎に最初に建設され、その後、植民地も含め日本全国に数多く建設された。日本統治下の台湾でも同様に武徳殿は広く普及し、市区改正事業が進む中でさまざまな公共施設が整備されたが、その中でも、武徳殿は重要な施設として積極的に建設された。

そして、日本の統治が終わった戦後にも、そのまま残され、今でも使われているものが多い。その中のいくつかの武徳殿は、保存・修復が進んでおり、その過程で、台湾全島での所在調査などが行われてきた。最も網羅的な研究としては、陳信安による論文がある^{*1)}。これによれば、武徳殿として建設され今も残るものは、16棟あり、現存していないものは55棟あるとされる。また、これ以外にも30棟以上

の武徳殿が建設された記録もあるが、いずれにしても台湾において多くの武徳殿が建設されたのである。ただし、こうした台湾における調査では、データの集積とその分析に留まっており、その施設の役割や意義、あるいは計画的な側面の分析は、十分には行われていない。

研究が進展できない理由は、そもそも日本における武徳殿を扱った研究がほとんどないことだ。台湾における武徳殿の建設経緯や施設の役割を明らかにするためには、日本における状況との比較検証が必要だが、それができない状況が続いた。しかし、近年に矢野慎介による研究が修士論文としてまとめられた^{*2)}。これは、日本における武徳殿建設を網羅的に扱い、その建設経緯から建築計画、意匠などの特徴に至るまで論じたものだ。しかし、植民地にも大量に建設された武徳殿については、分析の対象とはなっていない。

本研究は、この成果と台湾での成果を合わせ、比較検証を行った。さらにその上で、当時の新聞紙上の記事などから、台湾での武徳殿建設が持ち得た役割を明らかにした。とりわけ、その中で注目したのが、建設をめぐる課題とその解決の経緯である。武徳殿とは、武道の「徳」を広める目的を持つという

特異な施設である。それが植民地に建設されるにあたっては、内地と異なる課題も抱えることになる。その解決には、日本による植民地支配の仕組みの実態が明らかになると考えられる。とりわけ、武徳殿が建設された地方都市においては、武徳殿建設をめぐって、住民、地方行政、警察などの関係を見いだすことができる。

2. 建設の経緯をめぐって

この武徳殿という施設がどのような経緯で建設され、それがどのようにして台湾でも建設されていったのかを確認する。

まず、日本において武徳殿は、1895年に創設された大日本武徳会により建設が進められたものだ。この大日本武徳会は、平安遷都 1100 年記念祭を契機として、明治維新の欧化政策で廃れていた日本の武道を再興し、その「徳」を広めることを目的に、皇族（小松宮彰仁親王）を総裁に据え、京都府知事を会長とし、さらに平安遷都 1100 年記念として京都・岡崎に創建された平安神宮宮司を副会長として、京都を拠点として発足した会である^{*3)}。ここで言う武道とは、明治維新後に衰退した剣道を中心にした武家社会のスポーツ文化のことをさし、柔道や弓道も含まれていた。同会は設立当初から、その規則の中に、平安神宮境内に武徳殿を造営することが決められ、実際に 1899 年に最初の武徳殿が平安神宮に隣接した場所に建設された（図 1）。



図 1. 京都市岡崎の武徳殿

その後、大日本武徳会は、各府県知事を支部長として、警察組織を利用して全国で会員を獲得し、1900 年頃には全国的な支部組織が整った。そして、その府県ごとに設置された支部を単位として、1940

年に至るまで、それぞれの支部に武道場としての武徳殿が建設されていった。府県の支部には必ず 1 つの武徳殿が建設されたようだが、支部の下に設けられた支所や、その下に設けられた分会にも武徳殿がつくられたケースもあった。しかし、その数は矢野慎介の調査によれば、43 棟にとどまっている^{*4)}。

台湾も同様に、台湾支部が設置され、それにより武徳殿建設が進んだ。この間の経緯は、『台湾警察協会雑誌』に掲載された記録が詳しい^{*5)}。それによれば台湾支部の設置は、日本による台湾統治が始まってから 11 年後の 1906 年だった。しかし、それ以前にも大日本武徳会の地方委員会が置かれていた。すでに京都の武徳殿が建設された翌年の 1900 年には、台北、台中、台南の 3 県には委員部なるものが設置されていた。しかし、それらは統一組織としては機能していなかった。そのため、改めて総督府警察がリードし、台湾総督府長官を支部長とする支部が結成された。そして、内地と同様に、各地に支所が設置されたのである。

その後、何度かの行政区分の変更が行われた。1920 年の地方制度の変更の時点で、それ以前の県と庁が、5 州 2 庁に整理されたが、そのそれぞれに支所が置かれ、その下の郡に分会が置かれた。この経緯からは、台湾における大日本武徳会の活動の活発さをうかがうことができる。

実際に、大日本武徳会設立から 46 年後の 1941 年の時点で、台湾支部（この時点では台湾本部とされていた）の会員数は、272,400 人であった。これは総会員数 3,178,070 人の 8%を超えるもので、内地のすべての府県単位の支部の中で最も多い会員数であった^{*6)}。『台湾警察協会雑誌』の記録では、1912 年ごろ最も会員が増えた時期で、毎年 2～3 万人の増化となったとしている。

こうした状況の中で、台湾各地に次々と武徳殿が建設されていった。最初に建設されたのは 1898 年に台北に竣工した、警察官と監獄士官用の演武場であったようだ。そしてその後、先述のとおり、少なくとも、現存しないものも含め約 100 棟の武徳殿が建設されたことが確認できるが、これは日本内地での棟数（矢野慎介の調査により 46 棟）よりも多

い。では、それらはどのように建設されていったのか。そこには、以下のように台湾総督府による支援があったことがうかがえるのである。

武徳殿建設にあたり、最初に確保しなければならないのは、その用地である。台湾総督府による「台湾地理例規」で、5州2庁の支所が整理された1920年に「在郷軍人会武徳会等ノ官有地土地払下又ハ貸渡出現処理方ノ件」という例規が発布されている。そこでは、在郷軍人会や武徳会が「其の財源充当」を目的として、官有地の払い下げや、貸し渡たしを出願することが増えている。だが、本来は官有地の払い下げ貸し渡たしは、未墾地の開拓に限られているので、これを認めることはできない。しかし、特にこれを許可する必要もあるので、それを配慮して処理すること、としている^{*7)}。つまり、武徳会による官有地の払い下げや貸し渡たしの申請は特別に配慮するとしている。ここでの武徳会の「財源充当」が、武徳殿建設の用地確保であったと考えられる。

このことから、武徳会が総督府にとっても、特別に「保護奨励」する団体として位置づけられていたことがわかる。それは同時に、武徳会が台湾において、総督府がそのように認識するまでの有力な組織になっていた状況もわかる。

そして実際に、台湾総督府文書では、1930年に武徳会台中支所に官有地無料貸下、1933年には台湾地方本部新竹支部へ官有地一部無償継続貸下の許可が下りていることが確認できる^{*8)} (図2)。そこでは、いずれも使用目的として「演舞場(武徳殿)及附属施設物敷地」とされている。こうした総督府からの支援もあり、台湾の武徳会による武徳殿の建設は、一時期に数多く実現されていったと考えられる。

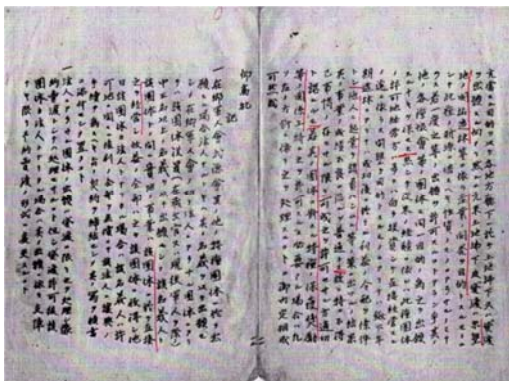


図2.『台湾総督府檔案』, 1930年

3. 工費について

武徳殿建設において、次に課題は、その建設費の確保である。「保護奨励」すべき公益性は認められても、大日本武徳会は行政組織ではない。したがって、その建設費は会が自ら工面する必要がある。後述するように、武徳殿は伝統的な武道の演舞場であるため、その建築には日本の伝統的な意匠が施された。そのために、建設費も高額となるし、地方ごとの武徳殿でその立派さを競うような傾向も見られた。では、その高額の工費をどのように工面したのか。それを統計的に明らかにすることは難しいが、当時の新聞報道から、以下のような例を示すことができる。

上記のとおり、1930年に武徳会台中支所に官有地の無料貸下が決定されているが、この土地での武徳殿の建設計画は、その前年から確認できる。報道によれば、その工事費は35,000円であり、その武徳殿建築は、「全島一」のものとなるだろうとされている^{*9)}。同じ時期に、内地でも山梨支部武徳殿(1933年)、会津若松支所武徳殿(1934年)が建設されていて、その工費はそれぞれ29,000円、20,000円であり、この台中支所武徳殿の建設費はかなり高額なものであったと考えることができる。そして、その工費はすべて寄付金で賄われたとしている。

その寄付者が誰であるのかは、この記事からは不明だが、1933年の報道で紹介されている台南支所の武徳殿の建設計画では、寄付者は製糖会社と一般寄付であるとされている^{*10)}。台南の武徳殿は古くからのものに加えて、この時にさらに規模の大きなものが計画され、その工費は55,000円にのぼった。その額を賄うのに、個人の寄付だけではなく、台湾における当時の産業振興政策で奨励され大きな利益をあげていた製糖会社が含まれていた。

さらに、新竹支所の武徳殿の建設では、その工費は80,000円にまで達したが、その寄付金を集めるにあたり、1933年の時点での寄付申し込みの企業名が報道されている。それによれば、帝国製糖が1,000円、台湾銀行が500円、台湾電灯が500円、商工銀行が300円、日東商船が100円、昭和自動車が100円などとなっている^{*11)}。当時を代表する企業が寄

付を申し出ている状況がわかる。もちろん、これに加えて個人からの寄付金の申し出が相当額あったようだ。

それでも、この時点のこれらの寄付金を合わせても、80,000 円の工費には届いていないが、2年後の報道では、その「浄財」がようやく集まったとされている^{*12)}。他の武徳殿建設についても、工費が足りないで、さらなる寄付金を呼びかける記事なども多く見ることができる。大規模で壮麗な武徳殿を建設しようとするにしがたい、工費の工面が困難となっていた状況がうかがえる。武徳会台湾支部では、自ら塩田の経営に乗り出し、利潤を上げようとする計画があった^{*13)}。これも、そうした状況を受けた事業計画であったと考えることができる。各地での武徳殿の建設は、こうした工費を集める困難の中で続けられることとなったのである。

4. 建築について

では、そうした困難な状況で建設されていった各地の武徳殿は、どのような建築であったのか。1899年に最初に建設された京都の武徳殿は、日本の社寺建築の伝統的な型式を使いながらも独自のスタイルで作られたものであった。そして、矢野慎介の調査によれば、その後全国に建設されていった武徳殿は、この京都の武徳殿に倣ったものが多かったことがわかっている。

まず平面の構成であるが、武道の演舞場を中心に据え、その周りを囲むように廊下状の観覧席が設置される。その上で武徳殿という施設の最大の特徴とも言える、神殿が中央正面に設置されることになる。平安京の大内裏（御所）に建設された武徳殿とは、武道等を演舞する場ではなく、天皇がそれを観覧する建物であった。神殿とは、それを継承するものとして設けられた貴賓席にあたるものだ。

陳信安の調査成果からは、台湾で建設が進んだ武徳殿も、多くのものでこの型式は守られていることがわかる。1917年に完成した台北武徳殿の工事のようすを伝える 1913年の新聞報道でも、演舞場の周囲に廊下を廻らし、入り口正面の奥に神殿を設けていることが伝えられている^{*14)}。1936年に竣工した

花蓮港の武徳殿でも、1935年の報道で同様に演舞場の正面に「荘厳なる神殿」を設けることが伝えられている^{*15)}。

しかし一方で外観と内観を最も特徴づけていた型式は、あまり守られていなかったことがわかる。京都の武徳殿では、演舞場の採光を確保するために、演舞場と周囲の廊下（観覧席）の間に高窓を設けている。そして、屋根を二重の型式とすることで、その屋根の間に高窓を確保するという方法が採られている。この型式は、日本内地に普及した多くの武徳殿で採用されていた。設計者が異なるために、完全に同じ形態ではないものの、屋根を二重にする構成が同じとなっているものが多い。

それに対して、台湾で建設された武徳殿には、この屋根の二重構成がほとんど見られない。そのために、日本の伝統的な社寺建築の型式がそのままストレートに外観に表れていると判断できるものが多い（図3）。もちろん、日本内地の武徳殿の特徴とも言える、千鳥破風や唐破風を設けるものも多いが、中には、そうした意匠を持たず、神社の流れ造りの型式がそのまま使われているようなケースもある。概して、台湾に建設された武徳殿は、外観において武徳殿建築としての特徴を表すよりも、日本の伝統的な意匠を自由に表現するという傾向を指摘することができる。

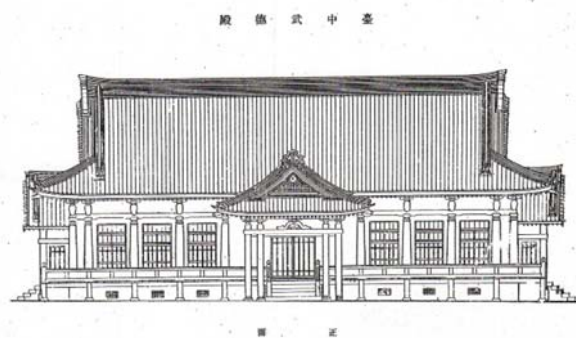


図3. 台中武徳殿立面図（台湾建築会誌 1931年9月）

では、こうした武徳殿の建築は誰によって設計されたのだろうか。矢野慎介の調査によれば、日本内地での武徳殿では、府県の建築技師が設計したケースが多かったようだが、その地域で活躍していた建築家が設計を担うものも見られた。台湾においては、そうした建築家の存在が少なかったと考えられる。

さらに、日本の伝統的なスタイルの建築を設計できるとなると、行政の建築設計業務を担う日本人の土木技師に依頼するしかなかったのではないだろうか。

実際に、武徳殿は形式的には行政による公共建築ではないものの、その設計の多くは州や庁を中心とした土木技師が担ったことがうかがえる。例えば、前出の工費が 80,000 円に達した新竹支所の武徳殿の設計は、州の日本人土木技師の設計であることが報じられている。また、台中や台南の武徳殿の設計は州・庁の日本人土木技師であった^{*16)}。彼らにとって、植民地において日本の武道の「徳」を広めるための施設とは、日本の意匠を発信するものであっただろう。日本内地のように、他に日本の伝統様式による建築物が多数あるわけではない。そこでは、武徳殿特有の意匠は求められず、比較的自由に日本の伝統意匠が採用されたと考えられる。

5. 果たした役割

では、そうして台湾の地に多数建設された武徳殿は、どのように利用されたのであろうか。もちろん、本来は武道の演舞場であるから、そのための利用が主となることは当然であるが、新聞の報道などからは、他の利用の実態もうかがうことができる。

新聞報道では武徳殿は、イベントや催事の開催会場として数多く利用されていたことがわかる^{*17)}。大日本武徳会が主催する武術や武道の大会、あるいは武徳祭などはもちろんだが、それ以外の用途として目立ったのが、各種の日露戦争祝勝委員会、陸軍の記念祭、警察招魂祭、偕行社（陸軍の親睦組織）祝賀会などであった。日本内地でもそうであるように、武徳会による武徳殿の普及は、警察組織が主導したものであり、そのために警察および軍が関係するイベントの会場として利用されたと考えられる。このことは、武徳殿が単なる武術の演舞場を超え、植民地支配を徹底させる役割を持つ存在であったことをうかがわせる。実際に報道でも、武徳殿とは「武士的精神」を涵養し、その存在が武道の精神を高めるものだと言及されている。

しかしそれだけでなく、商工談話会、民政長官の訓辞、衛生講話会などの行政的イベントや、学術協

会の共進会、写真協会協議会などの各種趣味団体によるイベントなどにも頻繁に利用されていた。つまり、公民館や公会堂としての機能も果たすものであったと言える^{*18)}。

ただし、武徳殿の建設が続いた時期には、同時に公会堂の建設も数多く見られた。例えば、嘉義では既存の武徳殿を改築する計画が進んでいた。しかし 1917 年に、民間有力者の多くが武徳殿より先に公会堂を建設すべきだとし、その改築費を寄付する予定だった製糖会社に公会堂建設の寄付金を要請するという事態があったことが報道されている^{*19)}。あるいは、台東街では 1919 年にすでに武徳殿が建設されていたが、1937 年に鉄筋コンクリート造で洋館の公会堂の建設が計画され、敷地が武徳殿前に決まったことが報じられている^{*20)}。

武徳殿は、あくまで武道の「徳」を広める施設として普及していったものであるから、公会堂などの公共施設としての文化施設の建設の方が、本来は優先されるものであっただろう。しかし、こうした実例からうかがえるのは、実際には武徳殿の建設が、そうした施設より早く進んでいき、それを追いかけるように公会堂などの建設が進んでいった実態である。しかも、台東街の例では、役所（所庁）の前に、和風の武徳殿と洋館の公会堂が対峙するという構成となったと考えられ、武徳殿が公共施設の中核施設として位置づけられるものであったことがうかがえる。武徳殿が、こうして公共施設の一つとして位置づけられるような事態は、日本内地ではほとんど見られないもので、台湾の武徳殿の特徴であると考えられることができる。

6. おわりに

以上、日本統治下の台湾において、各地に数多く建設されてきた武徳殿の建設経緯と役割について考察した。そこで明らかにできたことは、以下のよう

- 1) 武徳殿は、大日本武徳会の府県単位の支部が中心となり建設が進んでいくが、台湾においても、1906 年に設立された台湾支部が中心となり、各地に支所や分会が設けられ、それを単位として

多くの武徳殿が建設されていった。

- 2) 大日本武徳会は、台湾総督府から保護奨励する組織として見なされ、武徳殿の用地が特別に官有地の払下げで確保できるなど総督府からの支援を受けた。
- 3) 武徳殿は、台湾各地で競うように建設が進んだが、その工費は、地域の企業および個人による寄付金により工面された。
- 4) 台湾の武徳殿建築は、日本内地で建てられたものと同様に、演舞場の周囲に廊下をめぐらし中央に神殿を設ける平面構成だったが、日本内地の武徳殿の特徴であった二重の屋根により高窓を設ける構成はほとんど見られなかった。
- 5) 台湾の武徳殿は、武道の演舞場だけでなくさまざまな集会やイベントに利用され、公共施設としての性格を合わせ持つものであった。
- 6) 急速に建設が進んだ台湾の武徳殿は、公共の文化施設のさきがけとしての役割も果たしたとも考えられる。

最後の6)については、さらに多くの事例を検証し、さらなる考究が求められるが、その際には、同時期に台湾各地に進んだ市区改正事業との関係についての考察も必要となる。それについては、今後の課題としたい。

参考文献

- 1) 陳信安、『台湾日治時期武徳殿建築之研究』, 1997年, 国立成功大学修士論文, 陳信安『武徳会與武徳殿』歴史地景など
- 2) 矢野慎介,『武徳殿の成立と建築的特徴に関する歴史的研究』, 2007年, 平成18年度京都工芸繊維大学修士論文。
- 3) 中村民雄編,『大日本武徳会研究資料集成第四巻』, 2005年, 本の友社。
- 4) 前掲, 矢野慎介。
- 5) 「武徳会台湾支部の事業一斑沿革」,『台湾警察協会雑誌30年記念号』, 1924年, 台湾警察協会史, pp.44-45
- 6) 渡辺一郎『武道綜合団体大日本武徳会の設立とその解散』, 1981年, 武道論総合演習資料 筑波

大学体育科学系

- 7) 『台湾地理例規集 別冊』, 1929年, 000114680000003号, 000114680030010号
- 8) 『台湾総督府檔案』, 1930年, 台湾総督府, 冊号07391、文件号004
- 9) 『台湾日日新報』, 1929年2月2日, 第5版
- 10) 『台湾日日新報』, 1933年7月27日, 第4版
- 11) 『台湾日日新報』, 1935年10月3日, 第5版
- 12) 『台湾日日新報』, 1935年11月21日, 第9版
- 13) 『台湾日日新報』, 1909年8月29日, 第3版
- 14) 『台湾日日新報』, 1913年6月8日, 第7版
- 15) 『台湾日日新報』, 1935年4月6日, 第3版
- 16) 『台湾日日新報』, 1912年4月5日, 第2版
- 17) 『台湾日日新報』, 1903年3月15日,
『台湾日日新報』, 1903年7月18日,
『台湾日日新報』, 1907年3月10日,
『台湾日日新報』, 1908年11月10日,
『台湾日日新報』, 1909年9月23日,
『台湾日日新報』, 1911年1月7日,
『台湾日日新報』, 1935年11月21日,
- 18) 『台湾日日新報』, 1912年5月3日, 第2版
- 19) 『台湾日日新報』, 1917年9月17日, 第2版
- 20) 『台湾日日新報』, 1937年3月7日, 第5版

共同研究「現代日本陶芸のデザインと技法」

岡山県立大学 デザイン学部

久保田 厚子

本共同研究は陶芸家が作品性の向上を目指して協働し、その成果をウェブサイトにて公開して陶芸への理解と興味を喚起し文化振興に寄与することが目的です。岡山県立大学のガス炉を協働する場とし、発表する場がウェブサイト「現代日本陶芸のデザインと技法」です。前衛・伝統工芸・クラフトデザイン・産業デザインというジャンルを超えて現代日本陶芸のモダンデザインを集積する為に、モダンデザインの陶芸家で構成されています。平成30年度にウェブサイトを図録とした初の特別展を瀬戸内市立美術館で開催します。

今日の日本陶芸は文化に対する価値観の変化によって、美術史・陶磁史をベースにした造形研究が廃れ、作品表現の弱体化が進行しています。同時に国内陶磁器産業の衰退から設備と技術と人材が失われて久しく、原材料の入手すら困難になってきました。このような状況を踏まえ、本共同研究は孤立した陶芸家を触発し、日本陶芸の独自性とモダンデザインを発表する場として2015年4月に発足しました。ウェブサイトに集積された陶芸家のデザインと技法は、陶芸に対する興味と理解を深めて文化の振興に寄与します。

1. 研究の目的

陶芸家が作品性の向上を目指して協働し、ウェブサイトにて公開して文化振興に寄与することが目的です。

2. 研究の特色

陶芸家の多くは作品発表だけを行っています。陶芸家のデザインと技法の情報は、伝承されないのが陶芸文化の底上げが進みません。陶芸家には自作について記録する術がなく美術評論家の評価以外に発信力がない状況です。

本共同研究の特色は、陶芸家が自作のデザインと技法について記録し公開することで、日本陶芸全体を触発できることです。

3. 研究方法

外部資金で大学設備を学外の陶芸家と連携して運転し研究効率を高めます。大型LPGガス炉で岡山県立大学学生作品と学外の陶芸家の作品を合わせて焼成します。年間2回の作品撮影会に陶芸家が新作を持ち寄り、フォトグラファー斎城卓がポジフィルムで撮影します。撮影までにそれぞれの制作工程を記録し、斎城卓が撮影した作品写真を使った創作ノートをウェブサイトに掲載します。

ウェブサイト「現代日本陶芸のデザインと技法2017」のURLは以下です。

<http://cdatoma.tumblr.com>

4. 研究の効果

共同研究のウェブサイトはインターネット検索にヒットするようになりました。閲覧頻度が反映しています。ウェブサイトを閲覧した反応は大変好意的です。ウェブサイトにデザインと技法を公開したことの問題点は現在まで確認しません。

5. 平成28年度スケジュール

1) 作品焼成

岡山県立大学ガス炉で5回焼成しました。

①2016年6月5日～6日 ②7月10日～11日 ③10月12日～13日 ④12月19日～20日 ⑤2017年1月16日～17日

2) 作品撮影

斎城卓の撮影を2回実施しました。

①2016年7月16日(土) ②12月26日(月)

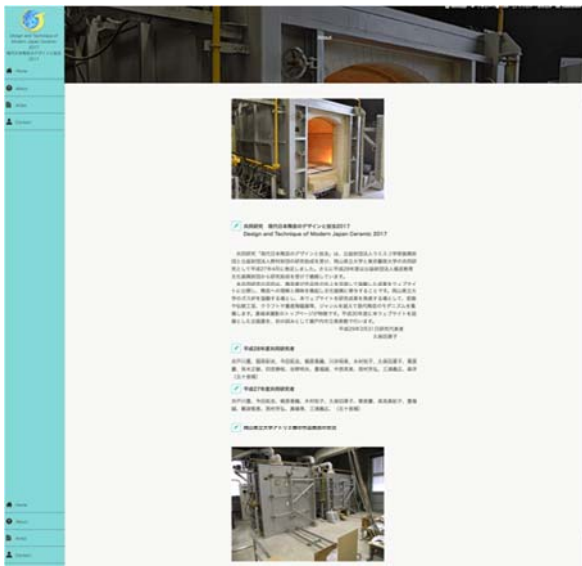
3) 創作ノート掲載

2017年3月31日に創作ノート14本をウェブサイトに公開しました。

6 共同研究「現代日本陶芸のデザインと技法2017

トップページのabout(図1)は、温かみのある点火の炎が映える写真に変更し、挨拶文には助成をいただいた各財団名を挙げて謝意と、最後に各財団と瀬戸内市立美術館のロゴマークを掲載しました。

目次の Home (図 2) は明度を暗くして文字を読みやすくした作品画像上に、陶芸作家名とタイトルが並び、自由に開いて閲覧できます。



(中略)

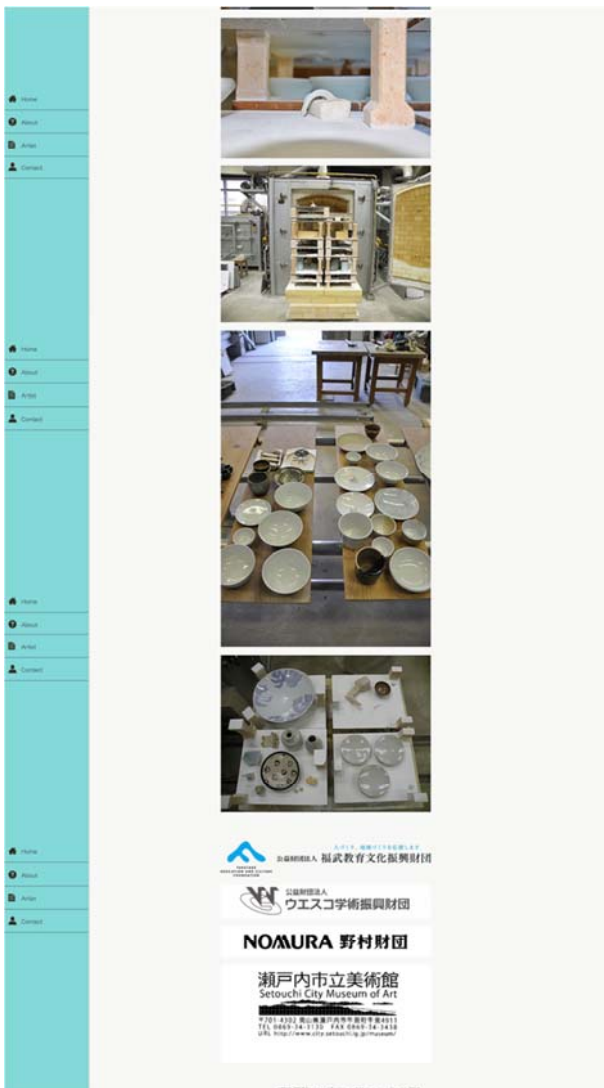


図1 ウェブサイト About

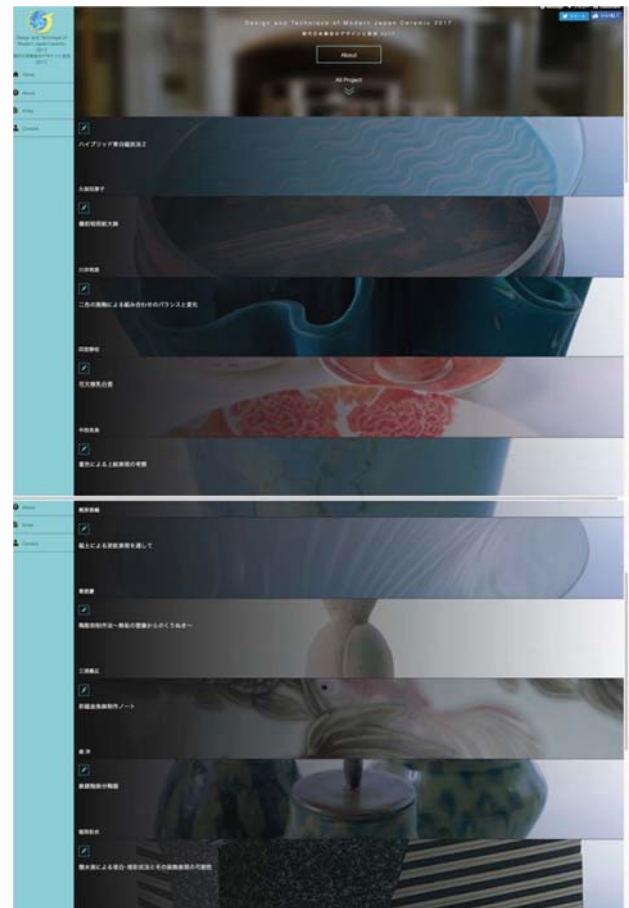


図2 ウェブサイト Home (抜粋)

7 ウェブサイト掲載創作ノート

1. 久保田厚子

ハイブリッド青白磁技法 2

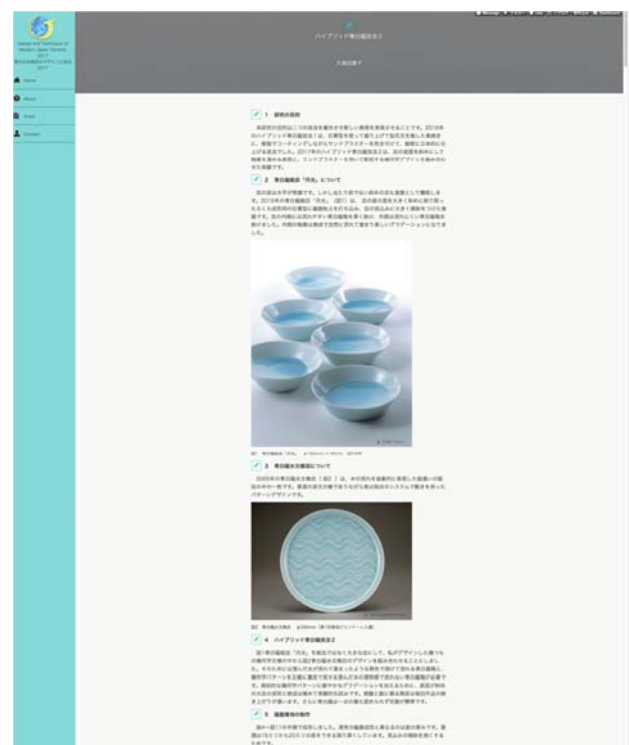


図3 久保田厚子「ハイブリッド青白磁技法2」



図4 青白磁漣文皿 φ347mm×h77mm

斜めの底面の大皿に流れやすい青白磁釉と流れにくい青白磁釉を使い分け、漣文の幾何学パターンに青色グラデーションを加えました。

2. 栄木正敏

表面張力シリーズ

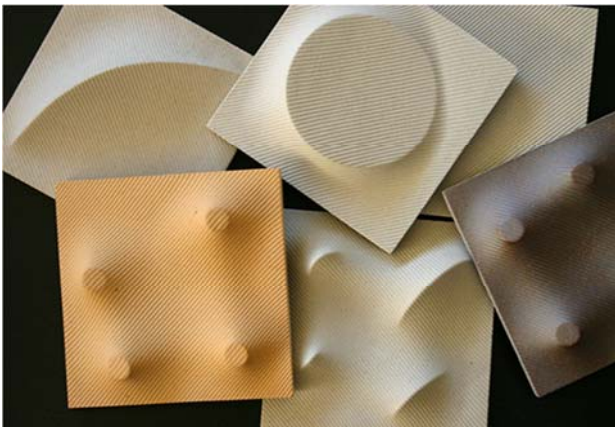


図5 TOTO「ブラーレ」レリーフタイル

1992年から始めた本シリーズは、今までにない原型制作法です。丸棒、石膏板、ピアノ線、合板などをカットし、板状の台に組み立てて布を張ってから石膏を流して、張力と偶然性のある有機的な形と表情の作品です。

3. 中西芙美

花文様乳白瓷

花びらの軽やかさや生命力を感じる力強いハリや

重量感、花の前後関係など、スケッチで留意しながらエアブラシで着色しました。



図6 花文様乳白瓷

4. 森洋

彩磁金魚鉢制作ノート



図7 彩磁金魚鉢

塩化金、塩化コバルト等の塩化金属は水で希釈して、濃度の濃いものと薄いものを2種類使います。塩化金属の混合で色彩の変化を研究して色調を増や

します。下絵付では塩化金属溶液は透の為、濃い塩化金属には墨汁を濃く、薄い塩化金属には薄い墨汁を混ぜて描いて、下絵の濃淡と完成作品の濃淡が一致して目に見えるようにします。

5. 谷野明夫

撥水液による堆白・堆彩技法とその装飾表現の可能性



図8 堆白・堆彩陶匣

35、36年前に撥水液を塗った素地の古い擦傷面に、偶然飛んだ釉薬飛沫が細い線状に吸い込まれた結果から、硬質な細線を用いた装飾の試みとして、この撥水液の技法が生まれました。

6. 木村朋子

くりぬき磁器陶箱制作



図9 磁器陶匣

磁器くりぬきの技法の蓋物制作についての研究。

7. 三浦義弘

陶彫刻制作法 一無垢の塑像からのくりぬき



図10 無題

無垢の塑像を制作し輪切りにしてくりぬく方法の紹介。

8. 梶原香織

重色による上絵表現の考察



図11 「無題」 φ180×h165(mm)

二色のカラーフィルムを重ねた色彩表現を、ラスターカラーを用いて実験した。

9. 栗原慶

磁土による波紋表現を通して



図12 青白磁波紋鉢 460×450×150

水をテーマに内側の波紋の表現を素地が乾燥した段階で文様を削り出す方法で実験した。

10. 今田拓志「電動轆轤成型における「かたち」について」



図13 隔壁の陶

電動轆轤成形は感覚的に水挽きし、最小限の手跡が残ることで定型が存在します。

11. 川井明美

備前短冊紋大鉢

鉢を湖面に見立て、短冊を浮かべた様や八つ橋の景色を長方形のボタと火襷で表現しました。



図14 備前短冊紋大鉢

12. 四宮静枝

二色の施釉による組み合わせのバランスと変化



図15 青釉花器 Passion

花束のラッピングからヒントを得た形態に、落ち着いた深い青緑とベージュの2種類の色釉薬で、本体の凹凸を考慮しながら流線文様を表した。

13. 稲荷彩衣

鉄錆釉掛分陶器

鉄錆釉と錫白釉を掛け合わせ、釉色を対比させる効果を食器で実験している。



図 16 鉄錆釉掛分陶器

14. 豊福誠

銀彩色絵壺 辛夷（こぶし）



図 17 銀彩色絵壺「辛夷（こぶし）」

ガス炉で還元焰焼成したマット白磁の壺全面に、銀彩泥を焼き付けてから、上絵具で絵付けします。上絵具の下に銀彩する事で、辛夷（こぶし）の背景の空間に広がりを感じさせると共に、上絵具の発色に潤みを増します。絵画的な具象モチーフが器の立体空間を表現します。

8 平成 28 年度共同研究の特徴

ウェブサイト「現代日本陶芸のデザインと技法

2017」で共同研究 2 年目が終了し、4 年継続計画の折り返し地点を迎えました。

多くの陶芸家は自作のデザインと技法について文章を執筆することが困難です。その対応策として斎城卓の作品画像を用いることにしました。視覚的に明快なウェブサイト画面は、文章表現の拙さをカバーします。陶芸家が撮影会に集合してお互いに作品講評して触発され、執筆したデザインと技法を陶芸家自身がコンピューターでアップロードする体験は、旧態依然の陶芸家世界のルネッサンスです。斎城卓のフォトグラフは陶芸の作品力を究極まで引き出した視覚情報です。本共同研究の作品撮影を経験して触発されこれからの作品に反映します。

本共同研究は、全ての現代日本の著名な陶芸家が網羅されているものではありません。閉塞状況を打ち破りたい一部の陶芸家の小さな試みですが、モダニズムの必要性を理解する端緒になったことは確かです。

9 今後の展開

4 年継続の最終年度は来年平成 30 年度です。当初の計画どおり瀬戸内市立美術館で「現代日陶芸のデザインと技法」特別展を行います。すでに本年 4 月から展示企画が始まっています。

2015 年からウェブサイト公開した陶芸作品を、瀬戸内市立美術館全館を使って一同に会し、期間は 1 ヶ月を予定しています。来館者はスマートフォンで展示台の QR コードを使ってウェブサイト掲載作品にアクセスしながら実作品を鑑賞します。

瀬戸内市の協力をいただきながら、さらに公益財団法人と連携し、文化の振興に寄与できる展示にします。

10 結語

研究計画の出発点の一つの私のアイデアでした。そのアイデアイメージを一人一人陶芸家に説明していく中で、次第に参加者と協力者が集まり、3 つの学術文化振興財団と瀬戸内市立美術館の協力が得られるまでになりました。他に類例がない陶芸家によるアカデミックな研究計画が 2 年間実現できたことは、文化の振興を欲する日本社会からの賜物と感謝しています。

総社商店街通りの空き家と空き地の利活用のための住民参加を促す手法に関する研究

岡山県立大学デザイン学部

福濱 嘉宏

表題の商店街通りに面する空き家と空き地の実態調査や、住民の意識調査をおこなったうえで、試験的な利活用を通し、それらの有効利用の方策をさぐることを最終的な目的とするが、本年度はそのための基礎的な調査とした。調査は空き地を対象から除外し空き家に限定して、地区を特定したうえで1次調査と2次調査の2回にわけておこなった。1次調査は対象地区内の全住棟について利用状況を外観から確認した。2次調査は道路に面する店舗に限定し利用状況を確認した。

また、空き家の活用の参考事例として、「たいとう歴史都市研究会」理事の椎原晶子氏から経験談をうかがった。

研究の背景

調査対象の地区としてあげた「総社商店街通り」は、住居表示では西から、駅前1丁目、中央2丁目、総社1丁目、総社2丁目を東西に貫通する商店街である。かつては江戸時代から続く市域の中心市街地であったが、昭和後半期に市域が拡張し、大型店舗が近隣に進出するにつれて商店街は衰退し、空き店舗や空き家が増加するにいたった。しかしながら、こうした歴史的背景によって、この商店街は生活の場・観光の場として、以下にあげるいくつかの特長を有している。

- ・駅からの徒歩による利便性。
- ・近世と近代、あるいは現代までを含んだ歴史性に富んだ建築物の残存。
- ・周辺に医療・商業施設が多いこと。

など

このように再び活性化する可能性の高い地域であるが、それを阻害する要因のひとつが「空き家」である。本調査中に、ある空き店舗についてその周囲の住人から「ここは使用していないが管理されている。だから空き家ではない。」と調査を拒否された経験をした。こうしたことから、空き家についてはいくつかのグレーディングを設定する必要があるだろうと考えた。また同一敷地内でも複数あるうちのひとつの家屋棟が空き家である場合、状況によっては地域の活気に影響がでるので、個々の家屋棟について

調査する必要があると考えられた。以下に空き家のグレーディングを示す。

- 1) 管理も利用もされていない家屋
- 2) 所有者以外の人によって管理されているが人の利用していない家屋
- 3) 所有者（他所）によって管理されているが人の利用していない家屋
- 4) 所有者（同所）によって管理されているが人の利用していない家屋

上記の1)から4)の順に空き家としての深刻さは低減する。ただし、ここでは管理の内容や度合いについての議論はしない。要するに利用されているか否かが問題であり、1)から4)は再利用の可能性の高さに関係してくると思われる。

調査の概要

総社商店街通りが貫通する地区のうち、本調査では、総社1丁目と2丁目の通り沿いにおいて明らかに空き家が目立つため（駅前と中央はそれほどではない）、調査対象をこの地区に絞り込んだ。さらに、同地を商店街通りの南北でわけ、4つの地区とした。

1次調査は2016年10月から平成2017年2月の間に4人の調査員がそれぞれの地区を担当し、全家屋棟について、外観の目視から利用状況を判断することでおこなわれた。利用状況については外観から判別することは容易でないため、「(明らかに) 利用し

ている」「利用しているようだ」「利用していないようだ」「(明らかに) 利用していない」の中間域を設けた4段階に分類した。なお、今回の調査で『ゼンリン住宅地図』を使用した。2009年版のため、滅失や改築された家屋については補正をしている。

1 次調査の結果

1 次調査の結果を表 1、図 1、図 2～5 に示す。全家屋棟数 467 に対して全域では明らかに空き家と思われるものが 19%、空き家の可能性のあるものを含めると 24% となり、全国の空き家率 13.5% (2013 年) や総社市全域の空き家率 (約 16%) よりも上回っている結果となった。

さらに地区ごとに比較すると、西側の 1 丁目よりも東側の 2 丁目のほうに空き家が多いという結果になった。ただし、南北間では大差がなく、先述のように総社駅から遠くなるにつれて、空き家率が高くなる傾向がある。ただし、それが駅からの距離が原因かどうかは調査をしていないので特定することはできない。

表1 総社商店街通り両側の地区における家屋の利用状況 単位: 家屋数

利用状況	凡例記号	総社 1丁目南	総社 1丁目北	総社 2丁目南	総社 2丁目北	総計
利用している	■ 1	55 (65%)	94 (75%)	79 (56%)	67 (59%)	295 (63%)
利用しているかも	■ 2	12 (14%)	6 (5%)	29 (20%)	14 (12%)	61 (13%)
利用していないかも	■ 3	6 (7%)	10 (8%)	0 (0%)	7 (6%)	23 (5%)
利用していない	■ 4	12 (14%)	16 (13%)	34 (24%)	26 (23%)	88 (19%)
合計		85	126	142	114	467

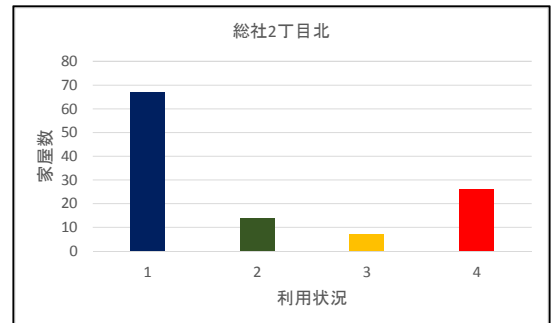
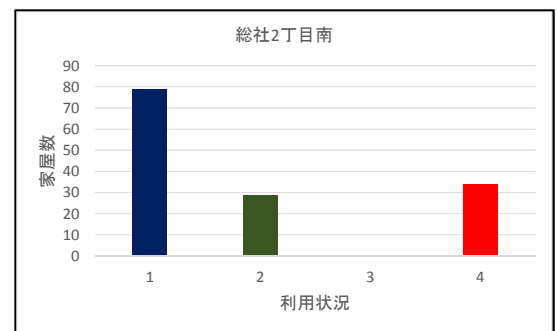
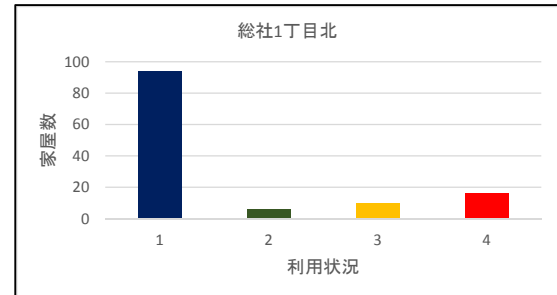
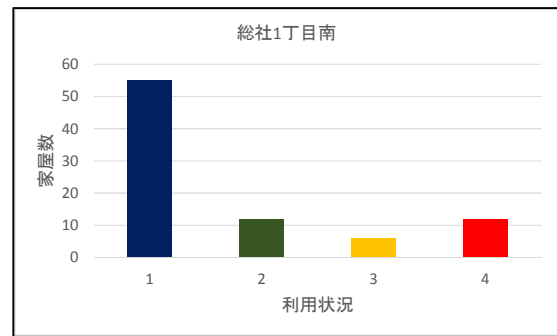


図2～5 4つの地区における全家屋の利用状況

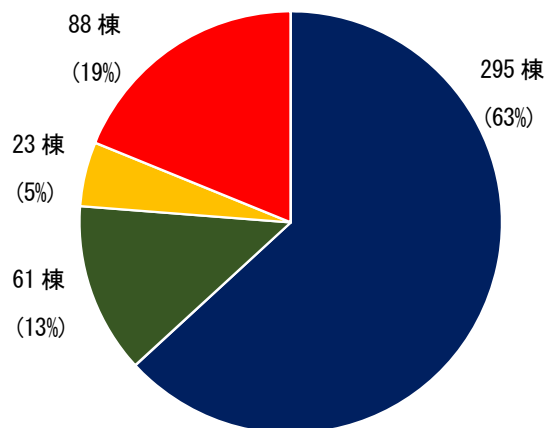


図1 対象地域全体の利用状況
(凡例は表1 参照)

2 次調査の結果

商店街通りの閑散とした、あるいは活気のある印象は、店舗型の家屋の利用率によるところが大きいと考えられるので、2 次調査は店舗型の家屋の店舗としての利用率を調査した。1 次調査と異なり利用状況は明らかなので「利用している」「利用していない」の2項目で判断した。その結果を表 2、図 6 に示す。店舗としての利用なので1 次調査の結果と若干異なる結果となった。商店街としてみた場合、通りの活性状況は著しく低いことがわかる。

表2 総社商店街通りに面する商店構えの家屋の利用状況 単位:家屋数

利用状況	凡例記号	総社 1丁目南	総社 1丁目北	総社 2丁目南	総社 2丁目北	総計
利用している	■ 1	11 (55%)	4 (29%)	6 (40%)	13 (62%)	34 (49%)
利用していない	■ 2	9 (45%)	10 (71%)	9 (60%)	8 (38%)	36 (51%)
合計		20	14	15	21	70

参考事例の講演会

たいとう歴史都市研究会理事の椎原晶子氏の講演会を2017年2月21日の夕方におこなった。案内は図7のチラシを総社市役所の商工観光課、文化課、管財課(人数不明)、岡山県立大学の建築系の学生(30人)、福濱嘉宏研究室のfacebookにつながっている者(約100人)、岡山建築士会のヘリテージマネージャーの受講生(人数不明)に配布した。聴講者は19人であった。その内訳を表3に示す。図8のアンケート用紙を会場で配布し、所属、聴講の動機などをたずねた。回答数は13(6名は提出せず)であったが、表3のように、配布先の関係で聴講者は建築に関わっている者が多く、動機も実際に民家の再利用に関わっているという者が多く占めた。

空き家の活用をまじめに考えるための講演会

よみがえる民家 —東京下町の暮らしの保存—



東京の下町、谷中・上野桜木で20年にわたり
明治・大正・昭和の民家の活用に奔走した地域プランナーから
お話をうかがいます。

講師：椎原晶子 NPOたいとう歴史都市研究所 副理事長

日時：2017年2月21日(火)
17:20～18:20(開場 17:00)

場所：総社中央公民館 第5会議室
無料



問合せ先 岡山県立大学 デザイン学部デザイン工学科 福濱嘉宏
Tel. 0866(94)2057 E-mail. hukuhamo@dg.uoka-pu.ac.jp

図7 椎原晶子氏の講演会案内

空き家の活用をまじめに考えるための講演会

よみがえる民家—東京下町の暮らしの保存 椎原晶子

主催：岡山県立大学 福濱 嘉宏

☐ 椎原さんに尋ねたいことや詳しく聞きたいことをお書きください

☐ あなたの職業や立場な何でしょうか？お聞かせください。(複数可)

1) まちづくりの仕事 2) 建築の仕事 3) 学生 4) 教員

5) 公務員・準公務員

6) 古い民家の所有者 7) 古い民家で活動している

8) その他 _____

☐ この講演会に参加した動機はなんですか？

☐ あなたの連絡先を差し支えなければ教えてください。

お名前 _____

電話 _____

メールアドレス _____

ありがとうございました

図8 聴講者に配布したアンケート

表3 アンケートの回答(13件)

まちづくりの仕事	1
建築の仕事	4
学生	4
教員	0
公務員・準公務員	1
古い民家の所有者	0
古い民家で活動している	1
その他(デザイナー)	1
記入なし	1
古民家の具体的な活用に関わっているため	4
古民家の活用に興味があるため	4
主催者の紹介	3
谷中の話を聞いてみたかったため	1
記入なし	1

まとめ

総社の商店街通りはこれまでも活性化の試みがなされてきたが、効果はあがっていないことは明らかである。民間による再利用事例として、総社1丁目8-15のアニメスタジオ「えかきや」、総社2丁目-5-20の「旧堀和平邸」の活動が、マスコミなどにも取り上げられるほど目立っている。後者は市所有の建築物を無断で大規模に改築するなど、貴重な江戸時代の建物の文化財的価値を著しく下げる結果となっておりモラル的に問題のある活動であるが、それはさておいても、両者とも構造の安全性の検討や設備の更新がなされた形跡はなく、行政等によるさらなる制度の整備が必要である。

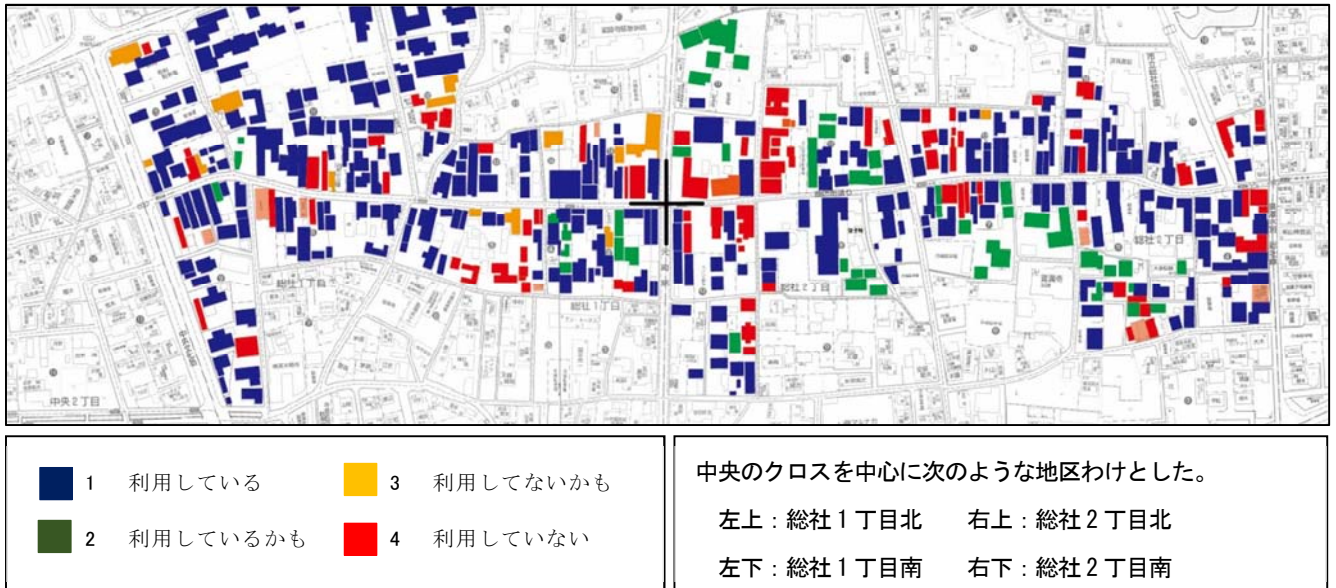


図1 総社商店街通りの家屋の利用状況（2017）

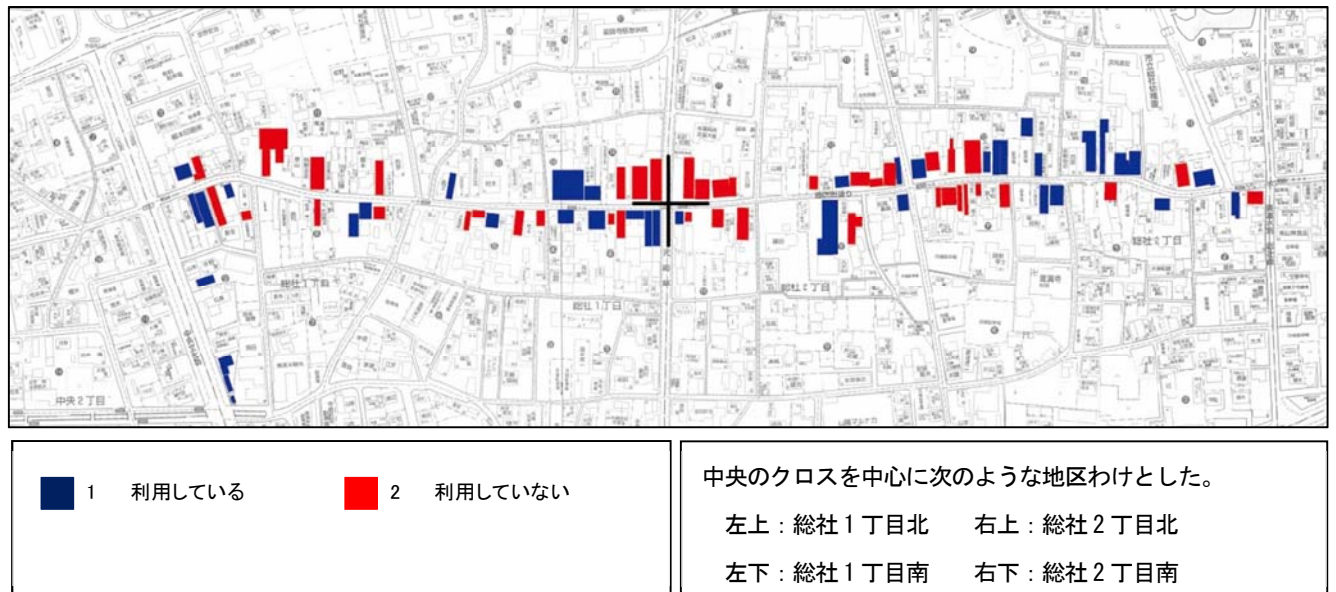


図6 総社商店街通りの店舗としての利用状況（2017）

以上

電子分極で駆動する有機強誘電体研究のための反射型旋光分光顕微鏡開発

岡山理科大学 理学部 応用物理学科

山本 薫

有機電荷移動錯体は超伝導を始めとする興味深い伝導特性を示す物質群である。我々はこれらの物質の一つが特異な強誘電性転移をしめすことを明らかにしその性質に注目している。この転移は、水分子が氷に凍結するように、伝導を担っていた電子が結晶化する電子の結晶化現象であると考えられており、本質的に電子と電子の相互作用だけで発現する電子相転移である。本研究では電子によって引き起こされるこの強誘電性転移によって結晶の反転非対称性が破れる様子を観測するために、微小な旋光性を感度良く検出する顕微分光装置を構築することを目的としている。本年度は、典型的な分子性強誘電体である硫酸トリグリシンを参照試料として旋光性の顕微観測を試行し、微小な試料サイズ、成形性、温度制御等、目的物質の観測に要される条件の確認を行った。さらにこの結果を踏まえ、光位相変調型の高感度旋光顕微鏡の設計を行い試作機の構築を行った。

1. はじめに

鏡像が実像に重なる構造を鏡像対称であるという。鏡像対称性を欠く分子の物理的性質は実像の分子とほとんどの面で等価であるが、光を入射すると偏光面が反対方向に回転することが知られている。旋光性とよばれるこの現象は、その発生によって直ちに分子が鏡像対称性を欠いていること(キラリティー)を確認できるため、化学合成後の生成物の純度確認や、果物の糖分濃度などのプローブとして活用されている。また、この現象は集合体の鏡像非対称でも発現するので、液晶のような分子集合体の立体構造の分析や、それを利用したディスプレイへの応用など身の回りでも広く利用されている。

このように旋光性は極めて基本的で重要な光学現象であるが、意外なことにこの現象に関して固体結晶が登場する例は少ない。その主な理由は、大多数の結晶は旋光性の有無にかかわらず複屈折により偏光回転をしめすことにありと考えられる。結晶媒質で偏光制御したい場合にも、旋光性を利用するまでもなく、大抵の物質で観測される複屈折で事足りてしまうのである。

このように、あまり日が当たっていない固体の旋光性であるが、結晶構造の空間対称性を確認する強い手がかりであることに違いはない。我々は最近、一部の有機伝導体が強誘電的な相転移を示すことを

発見し[1]その性質について研究する過程で、転移による空間対称性低下の確認にこの光学効果測定が有効なのではと期待するようになった。ただし、実際に測定を試みても、なるほどやはりその検出は難しく装置作製に試行錯誤を強いられている。昨年度は新建屋への引っ越しによる中断もあり想定よりも研究進行に時間を要しているが、光学現象の理解にも適した教育的課題でもあり学生の実力養成も兼ねつつ着実に進展させているところである。以降では、強誘電体の旋光性測定における課題点を述べた上で、構築中の偏光顕微鏡装置の観測原理について述べていく。

2. 有機伝導体と電子型強誘電相転移

緒言では主に旋光性について述べたが、我々の主たる興味は観測対象として念頭に置いている有機結晶の性質にある。ここではその特徴について簡単に述べておこう。

図1は注目している有機結晶 α -(BEDT-TTF) $2I_3$ の結晶構造の模式図である。この物質はドナーとなる有機分子2つに対し1価の対アニオンが1つの2:1で構成されており、ドナー分子2つあたり1個の割合でドーピングされたホールにより伝導性を発現する。この有機錯体は常温では金属として振る舞い圧力を加えると超伝導を発現する非常に興味深い物

質であるが[2],我々は常圧のまま冷却すると発生する絶縁転移の方に注目している。

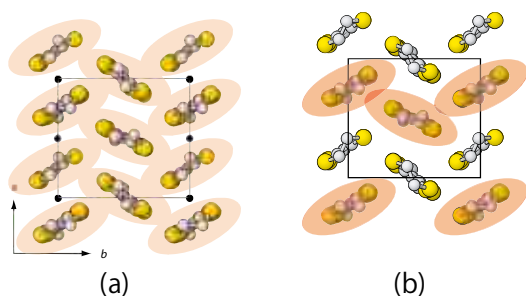


図1 α -(BEDT-TTF) $_2$ I $_3$ 結晶におけるドナー分子の配列と電荷分布 (a)金属相 (空間群: $P\bar{1}$), (b)電荷秩序(強誘電)相(P1)

この金属-絶縁体転移は、伝導電子間のクーロン反発による電荷秩序現象であると考えられており、絶縁相では電子粗密が発生していることが報告されていた[3, 4]。我々はこの転移によって結晶の巨視的反転対称性が破れることを光学第2高調波観測によって明らかにし、この転移が強誘電体転移であることを指摘した[1]。金属相から発現する強誘電転移は極めて特殊でありその性質は大変興味深い。この不思議な転移と強誘電相の理解に向け、本研究では転移による対称性低下で発生すると期待される旋光性の観測に取り組んでいる。

3. 旋光性測定の実理

単色光の偏光状態は直交2成分に分解した電場の強度比と楕円軸の角度および位相差 δ で記述される。これらは通常の偏光顕微鏡でも決定可能であるので、本研究ではまず典型的な分子性強誘電体である硫酸トリグリシン (TGS) を試料として透過偏光観測を試行した。

試料の TGS 結晶は硫酸とグリシンを化学当量で混合した飽和溶液から成長させ、厚さ約 1 mm に劈開して使用した。この面は電気分極方位に垂直の ac 面とされており、偏光測定はこの面に垂直に入射光を照射して行った。

旋光性は偏光面の角度に依存せず発生するので複屈折が最小となるように試料を回転しても直交ニコル状態の偏光子から有限の光が透過するはずである。

実験で用いた波長 632.8 nm における TGS の旋光度は室温に置いて約 0.65°/mm とされており[5], 複屈折を抑えた状態での出射光は楕円率が約1%の円偏光となっていると期待される。この程度の楕円光率であれば偏光顕微鏡観測で問題なく測定できると見込んでいたが、試料冷却のための冷却器を使用し未整形試料を扱わざるを得ない等、我々の実験では入射偏光と試料の位置制御の精度に限界があり、定量観測が困難であることが分かった。さらに、有機伝導体を用いた本測定では入射光と試料の相互作用距離が短い反射配置での測定、あるいはミクロンレベルの薄片試料を用いての透過実験とならざるを得ないので観測精度の大幅な向上が求められる。

4. 光位相変調法による偏光計測

そこで本研究ではモーター等による物理的な光学素子調整なしで測定が行える光位相変調素子(光弾性変調器: PEM)を用いる交流測定を試すこととした。以下にこの交流法の原理について説明する。

偏光の状態は下の4つの変数で表すことができる。

$$S_0 = I_{0^\circ} + I_{90^\circ}$$

$$S_1 = I_{0^\circ} - I_{90^\circ}$$

$$S_2 = I_{45^\circ} - I_{135^\circ}$$

$$S_3 = I_R - I_L$$

ここで I_{0° は観測光に対し直線偏光子を x 軸に平行に配置して測定した部分光の強度, $I_{45^\circ}, I_{90^\circ}, I_{135^\circ}$ はそれぞれ x 軸から $45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ 傾けて偏光子を配置した場合, I_R, I_L は直線偏光子の前に $1/4\pi$ 波長板を配置して正, 負の位相差を与えて測定した光強度である。

4つのパラメータを1組のベクトル $^t[S_0 S_1 S_2 S_3]$ と見なすことで偏光子や波長板の効果は4行4列の1次変換として表すことができる。例えば、単色平面波が z 軸方向に進行しているとするとき、電場の x, y 成分に位相差 δ を与える波長版の効果は

$$M_{wp}(\delta) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \cos \delta & \sin \delta \\ 0 & 0 & -\sin \delta & \cos \delta \end{bmatrix},$$

x 軸から角度 θ の偏光光を透過するように配置した直線偏光子の効果は

$$M_{LP}(\theta) = \begin{bmatrix} 1 & \cos 2\theta & \sin 2\theta & 0 \\ \cos 2\theta & \cos^2 2\theta & \cos 2\theta & 0 \\ \sin 2\theta & \cos 2\theta & \sin^2 2\theta & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix},$$

座標軸を ρ だけ回転する操作は

$$R(\rho) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos 2\rho & -\sin 2\rho & 0 \\ 0 & \sin 2\rho & \cos 2\rho & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix},$$

とそれぞれ表現される。

これらの行列により透明媒体の複屈折および旋光現象はすべて表現できる。例えば、位相変化 δ の複屈折を持ち、屈折率の高速軸が x 軸から角度 ρ だけ傾いている光学媒体に x 軸偏光を入射した際の透過光の偏光は

$$R(\rho)M_{wp}(\delta)R(-\rho)^t [1\ 0\ 0\ 0]$$

と表される。

PEM は位相差が動的に変化する位相板なので、その効果は時間に依存して変化する位相差を Δ と置くことで

$$M_{PEM}(\Delta) = M_{wp}(\Delta)$$

と記述できる。例えば、光学軸を x, y 軸にそろえて配置した PEM に強度が 1 の無偏光光を直線偏光子によって x から 45° 傾けて入射したときの透過光の偏光は

$$M_{PEM}(\Delta)M_{LP}(\theta = 45^\circ)^t [1\ 0\ 0\ 0]$$

と表される。未知の試料にこの変調光を入射すると、試料による複屈折と旋光性による効果も同期して変調されるので、その変化をロックイン検出することで試料の複屈折と旋光性を見積もることが出来る。

複屈折媒体の場合決定すべきパラメータは複屈折による δ と光学軸の傾き ρ の 2 つなので、見積もりには独立な 2 つの実験値が必要となる。文献[5]では、試料の下流に直線偏光子を 0° および 45° で配置し、それぞれ 1 回微分成分の変調信号 $V_{0^\circ}(1F)$ および $V_{45^\circ}(1F)$ をロックイン検出する測定について議論されている。例えば $M_{wp}(\delta)$ の複屈折媒体に対し 0° の実験を行うと、偏光を表すベクトル $S_{0^\circ}(\Delta)$ が

$$\begin{aligned} S_{0^\circ}(\Delta) &= M_{LP}(\theta = 0^\circ) [R(\rho)M_{wp}(\delta)R(-\rho)] M_{PEM}(\Delta) \\ &\times M_{LP}(\theta = 45^\circ)^t [1\ 0\ 0\ 0] \end{aligned}$$

であることから、透過光強度の解析解

$$I_{0^\circ}(\Delta) = \frac{1}{2} \left(1 + \cos 4\rho \sin^2 \frac{\delta}{2} \cos \Delta - \cos^2 \frac{\delta}{2} \cos \Delta + \cos 2\rho \sin \delta \sin \Delta \right)$$

が得られ、 Δ に関する 1 回微分成分 $V_{0^\circ}(1F)$ および $V_{45^\circ}(1F)$ から δ および ρ が

$$\delta = \sqrt{(V_{0^\circ}(1F))^2 + (V_{45^\circ}(1F))^2}$$

$$\rho = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{V_{45^\circ}(1F)}{V_{0^\circ}(1F)} \right)$$

によって見積もることができる。

一方、我々は、光学素子を移動させての実験を回避するため直線偏光子を傾ける代わりに 2 位相ロックイン検出により参照信号と透過信号との間の位相差を検出することで同等の情報を得ることを計画している。

4. 高感度旋光性測定の原理と装置開発

上記の測定においても、複屈折と旋光性を区別するためには試料の光学軸の傾きを調整して複屈折の効果を極小化しておく必要がある。有機伝導体試料に対する本実験では冷却器を用いる必要があるため、通常の偏光顕微鏡のように試料ステージによって自由に試料回転することができない。そこで本研究では、試料を回転させる代わりに入射および検出光学系を回転できる顕微光学系を構築した。図 2 はその外観写真である。本装置では、ヘリウム冷却器の下部から偏光子で制御した直線偏光光を入射し、冷却器上部に配置した大型の回転ステージによって PEM ヘッドと検出系を一体で自由回転させることで通常の偏光顕微鏡における試料回転と等価な回転制御を行う。入射偏光の代わりに透過光を PEM で変調することになるが行列計算における一次変換の順序が変わるだけなので同等な結果が得られることは明らかである。

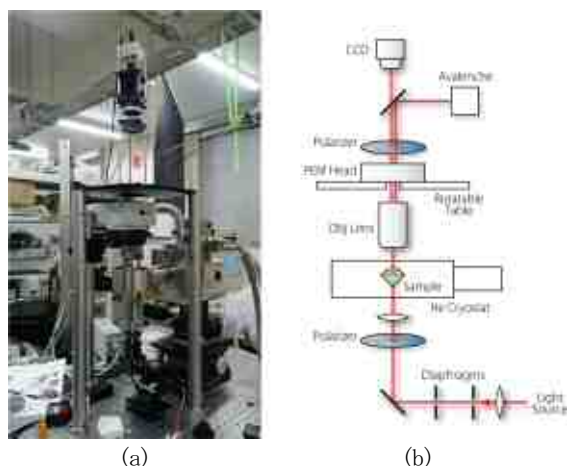


図2 (a)光位相変調偏光顕微鏡の外観写真, および(b)光学系のブロックダイアグラム

5. まとめ

本研究では特異な強誘電性転移を示す有機伝導体の対称性変化を調べる目的で、入射および観測光の偏光方位を自由に回転出来る旋光顕微鏡と、光の作製を、現在、上記の装置がほぼ完成し、TGS 結晶を用いた試運転を準備している段階である。旋光性の分離観測を成功させた後、目的である強誘電性有機伝導体の旋光性測定を行い、さらにマッピング測定が行えるよう装置を改造して分極ドメインの観測へと研究を進行させる予定である。

6. 参考文献

- [1] K. Yamamoto et al., *J. Phys. Soc. Jpn.*, 77 (2008) 074709.
- [2] N. Tajima et al., *J. Phys. Soc. Jpn.*, 71 (2002) 1832.
- [3] H. Seo, C. Hotta, H. Fukuyama, *Chem. Rev.*, 104 (2004) 5005.
- [4] R. Wojciechowski et al., *Phys Rev. B*, 67 (2003) 224105.
- [5] J. Etxebarria, J. Ortega and T. Brezweski, *J. Phys: Cond. Matt.*, 4 (1992) 6851.
- [6] B. Wang and T. C. Oakberg, *Rev. Sci. Instr.*, 70 (1999) 3847.

RNA による DNA トポイソメラーゼ II α 制御機構の解析

岡山理科大学 理学部 生物化学科

河野 真二

本研究では、細胞分裂過程で必須の酵素である DNA トポイソメラーゼ II α (トポ II α) の細胞核内での制御機構を明らかにするために、トポ II α の C 末端領域 (CTD) と RNA との相互作用に着目して解析を行った。まず、ヒト継代培養細胞由来の RNA 存在下で、全長トポ II α (WT) と CTD を欠質させた変異体 (Δ CTD) の酵素活性を比較した。WT の活性は抑制されたが Δ CTD の活性は抑制されなかった。次に、RNA がトポ II α の CTD の有する DNA 結合活性に影響するか検討した。WT では RNA の量に依存した DNA 結合量の低下が認められたのに対し、 Δ CTD では DNA 結合量の低下は認められなかった。これらの結果から、RNA はトポ II α の CTD を介した DNA 結合を抑制することによって、酵素活性を調節している可能性が示唆された。分裂期染色体上で RNA による酵素活性の調節が起きていることを期待して RNA の分布パターンの解析を行ったが、はっきりとした結果を得ることができなかった。条件を検討し直す必要がある。

1. はじめに

染色体は、細胞が分裂する際、複製されたゲノム DNA が正確に娘細胞へと分配されるための重要な構造体である。分裂期の染色体は、染色体スキャフォールド (足場) とよばれる構造を中心に、DNA とタンパク質の複合体であるクロマチンが放射状に束ねられた構造をとっているとされている。この染色体スキャフォールドを構成する主要な因子の一つとして、DNA トポイソメラーゼ II α (トポ II α) が知られている。トポ II α は、結合した DNA を一過的に切断した後、生じた DNA の切れ目の間に別の DNA を通過させる反応を触媒する酵素である。トポ II α の遺伝子を欠いたノックアウトマウスでは、染色体分離が正常に行われなかったために、胚発生初期段階の 4~8 細胞期で発生が停止したことから (文献 1)、この酵素は細胞分裂過程における染色体分離に必須であると考えられている。しかしながら、一過的であってもトポ II α の有する DNA に切れ目を生じる活性は、染色体を正常に維持するという観点からは好ましくない。そのため、トポ II α の酵素活性は細胞核内において厳密に制御されていることが考えられるが、その詳細な機構については不明な点が残されている。

試験管内におけるトポ II α の酵素反応が、塩基配列の偏った合成オリゴヌクレオチドによって阻害

されることが報告されているが (文献 2)、我々は細胞由来の RNA によっても酵素反応が阻害されることを見出した。最近、分裂期染色体の周りにも RNA が分布していることが示唆されていることから、細胞分裂時におけるトポ II α の酵素活性の調節に RNA が関わっている可能性が考えられた。本研究では、RNA によるトポ II α の酵素活性の調節機構の解析と分裂期染色体への局在、ならびにトポ II α に相互作用する RNA の同定することを目的として解析を行った。

2. 方法と結果

(1) RNA によるトポ II α の酵素活性調節機構

トポ II α の酵素活性に対する RNA の影響の解析には、FLAG タグを N 末端に融合させた全長のトポ II α (WT) と CTD を欠質させた変異体 (Δ CTD) を用いた。超らせん型 DNA を基質とした弛緩反応において、 Δ CTD は RNA によって酵素反応が阻害されないことをこれまでに明らかにしている。今回はさらに、*Crithidia fasciculata* 由来のキネトプラスト DNA を基質として用いた脱連環反応について解析した。弛緩反応と同様に、WT では酵素反応が阻害されたのに対し、 Δ CTD では阻害されなかった。磁性ビーズに抗 FLAG タグ抗体を介して固定してタンパク質を用

いて、RNA 結合反応を行ったところ、WT に比べて Δ CTD の RNA 結合量が低下していることが明らかになった。同様の実験系を使ってトポ II α の超らせん型 DNA への結合に対する RNA の影響を解析したところ、WT において RNA の量に依存した DNA 結合量の低下が観察された。これらの結果から、トポ II α の CTD に RNA が相互作用することにより、DNA への結合が抑制され、それに起因して酵素活性が抑制されている可能性が示唆された。

(2) 分裂期細胞における RNA 分布パターン

SYTO® RNASelect™ Green Fluorescent cell Stain (Invitrogen) で染色した HEK293 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。分裂期細胞における RNA 由来の蛍光シグナルは、凝縮した染色体と重なるように分布していた。凝縮した分裂期染色体に対する蛍光色素の非特異的な吸着の有無を検討するため、4%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を 0.3%の Triton X-100 を含む緩衝液で処理し、DNA 分解酵素と RNA 分解酵素それぞれで処理した後、蛍光シグナルを観察した。DNA 分解酵素で処理した細胞では蛍光シグナルが残り、RNA 分解酵素で処理した細胞では蛍光シグナルが消失することを期待したが、両方の細胞で同様の蛍光シグナルが認められた。

(3) トポ II α に相互作用する RNA の解析

ヒト継代培養細胞の細胞核から調製した RNA と磁性ビーズに固定したタンパク質を混合し、トポ II α に相互作用する RNA を解析した。電気泳動で展開して観察したところ、WT と Δ CTD の間に顕著な差は認められなかった。

3. 考察

本研究の結果から、細胞由来の RNA でトポ II α の酵素反応が阻害されることが明確になった。RNA の作用機序として、CTD を介した DNA への結合を競合的に阻害していることが示唆された。トポ II α のアイソフォームであるトポ II β では既に RNA による酵素反応の調節機構について報告がされている（文献 3）。今回得られた結果から、RNA による酵素反応調

節機構は α と β に共通した制御機構である可能性が考えられる。

分裂期細胞では凝縮した染色体上に RNA 由来と考えられる蛍光シグナルが重なって観察された。このことから、分裂期染色体上でトポ II α と RNA が相互作用している可能性が示唆された。しかしながら、観察された蛍光シグナルが真に RNA に由来するかどうかの検証が完全ではないため、今後、透過性処理した生細胞に DNA 分解酵素と RNA 分解酵素を作用させて蛍光観察を行うことや、分裂期の細胞から生化学的に RNA を分離するなどして明確にする必要がある。

相互作用する RNA の同定を試験管内での結合反応によって明らかにすることは困難であることが今回の結果から明らかになった。おそらく、CTD を除いた WT と Δ CTD の共通領域にも強い RNA 相互作用領域が存在することが原因であると考えられる。細胞内でタンパク質と RNA の間を化学的に架橋するなどした後、単離して解析するなどの工夫が今後の解析には必要である。

4. 謝辞

本研究の遂行するにあたり多大なご支援をいただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に心から感謝申し上げます。

5. 参考文献

- (1) Akimitsu N., *et al.* (2003) Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic cells depleting the activity of DNA topoisomerase II α . *Genes to Cells* **8**, 393-402.
- (2) Park, S., *et al.* (2008) Regulation of the catalytic function of topoisomerase II α through association with RNA. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6080-6090.
- (3) Onoda, A., *et al.* (2014) Nuclear dynamics of topoisomerase II β reflects its catalytic activity that is regulated by binding of RNA to the C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* **42**, 9005-9020.

微量の水を用いた高分子/疎水性イオン液体の相挙動の制御と機構解明

岡山理科大学 理学部 化学科

大坂 昇

昨年度に引き続き、微量の水が高分子と疎水性イオン液体の混合溶液の相挙動に与える影響を、相分離温度の変化から評価することを行った。水が3 wt%程度存在することでLCST型の相分離温度が約50℃も上昇し、高分子の相溶領域が高温側へ大きく拡大することを昨年度に明らかにしたが、脱水直後の水分量を正確に評価できていない問題があった。そこで本年度はカール・フィッシャー水分計を導入し、脱水直後の高分子/疎水性イオン液体の相図を作成することを試みた。高分子濃度の増加と共に相分離温度は低下したが、高分子濃度が50 vol%を超えると均一な混合試料を得ることができず、臨界温度を求めることはできなかった。一方、水が十分に存在する試料では高分子濃度が50 vol%を超えた条件でも容易に混合試料を調整できることが明らかにされた。

1. はじめに

イオン液体は陽イオンと陰イオンからなり、100℃以下で液体となる塩の総称である。不揮発性や不燃性、高いイオン導電性や優れた熱安定性などの性質をもつだけでなく、イオンの組み合わせによる高い構造デザイン性を有している。このため、電気化学デバイス用電解液や新規反応溶媒、各種材料など様々な用途への展開が精力的に行われている。しかし、各々の用途に向けた適切なイオン液体を新規に合成することは決して容易ではない。そのため、イオン液体を他の分子性液体と混合することで、溶媒の機能・物性を連続的に変化させる試みが行われている [1, 2]。

昨年度の研究課題において、本申請者は疎水性イオン液体においても微量の水が溶解することに着想を得て、代表的な疎水性イオン液体であるイミダゾリウム塩 ($[\text{C}_2\text{mIm}^+][\text{TFSA}^-]$) 中で下限臨界共溶温度 (LCST) 型の相分離を示す Poly(propylene glycol) (PPG) の溶液に微量の水 (H_2O) を添加すると、相分離温度が上昇することを報告した [3]。特に、3 wt%の水の添加で、相分離温度が約50℃も上昇した。この結果は、微量の水が相溶領域を高温側へ大きく拡大させて PPG の溶解性を向上させていることを意味している。

しかし、脱水して調整した試料の水分量を正確に評価できていない問題があったため、本年度はカー

ル・フィッシャー水分計を導入して水分量を評価し、十分に脱水した $\text{PPG}/[\text{C}_2\text{mIm}^+][\text{TFSA}^-]$ 溶液の相図を作成することを試みた。

2. 試料と実験操作

PPG は Aldrich 製の $M_w = 3.4 \times 10^3 \text{ g/mol}$ 、 $M_w/M_n = 1.01$ のものを用いた。 $[\text{C}_2\text{mIm}^+][\text{TFSA}^-]$ は Merck 製で、純度99%のものを用いた。それぞれの試料は、グローブボックス内にて65℃で1日真空乾燥させた後、活性化させたモレキュラーシーブ 3Å (Aldrich 製) を入れ真空下にて一日以上静置した。それぞれの試料の水分率の評価にはカール・フィッシャー水分計 (AQ-2200A、平沼産業製) を用いて行い、100 ppm 以下になったことを確認した後に、窒素雰囲気下にあるグローブボックス内にて混合し溶液試料を調整した。脱水操作自体は昨年度と同様である。

透過率の測定は、水冷ペルチェセルホルダーを設置した紫外可視分光光度計 (V-730BIO、日本分光製) を用いて、波長630 nm、昇温1℃/min の条件で行った。測定は溶液試料をグローブボックス内にてスクリー付きキャップセルに封入後、直ぐに行った。セル内の溶液試料は1日放置後に数十 ppm 程度の水の増加しか観測されなかったため、本測定の範囲内ではセル封入後の変化はほとんど無視できると考えられる。

3. 結果と考察

PPG の体積分率 (ϕ_{PPG}) -温度相図を作成するために、 ϕ_{PPG} に依存した透過率の変化を調べた。Figure 1 に、昇温過程における真空乾燥直後の PPG/[C₂mIm⁺][TFSA⁻] 溶液の透過率の変化を示す。この時の水の体積分率 ($\phi_{\text{H}_2\text{O}}$) は約 0.01 vol% (100 ppm) であった。低温での昇温時に透過率は変化しないが、ある温度を境に透過率が急激に減少する。この減少し始める温度を相分離温度と決定した。また、 ϕ_{PPG} が増加するに従い、相分離温度は低下した。

Figure 2 に、昇温過程における PPG/[C₂mIm⁺][TFSA⁻] 溶液 ($\phi_{\text{PPG}} = 20 \text{ vol}\%$) の $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ に依存した透過率の変化を示す。昨年の報告時と同様に、微量の $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ の増加により、相分離温度が大きく増加した。また、相分離温度より低温でも透過率が連続的に減少することが確認された。

Figure 3 に、 $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ に依存した PPG/[C₂mIm⁺][TFSA⁻] 溶液の ϕ_{PPG} -温度相図を示す。十分に脱水を行い、 $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ を約 0.01 vol% (100 ppm) とした場合には ϕ_{PPG} が増加するに従い、相分離温度は低下した。興味深いことに、 ϕ_{PPG} が 50 vol% を超える濃度では、0 °C 近傍まで冷却し 24 時間静置しても PPG と [C₂mIm⁺][TFSA⁻] が混合した均一な試料溶液を調整することはできなかった。 $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ が 0.4 vol% では、8 °C 程度の相分離温度の上昇が観測されたが、明確な ϕ_{PPG} 依存性は確認することができなかった。 $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ が 1.2 vol% においても相分離温度の上昇は観測された。また、 ϕ_{PPG} が 50 vol% を超える 60 vol% においては均

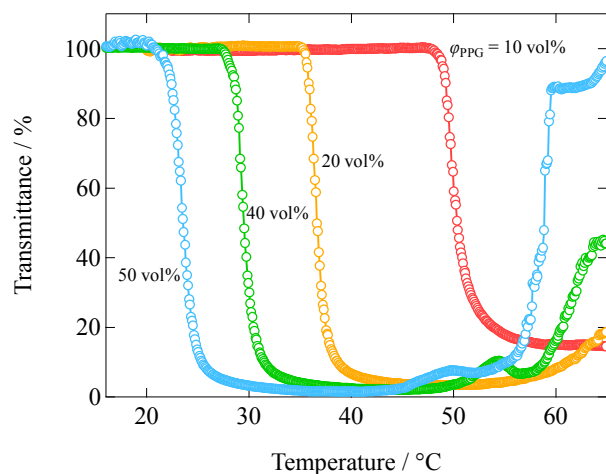


Figure 1 : 昇温過程における PPG/[C₂mIm⁺][TFSA⁻] 溶液 ($\phi_{\text{H}_2\text{O}} = 0.01 \text{ vol}\%$) の温度-透過率曲線

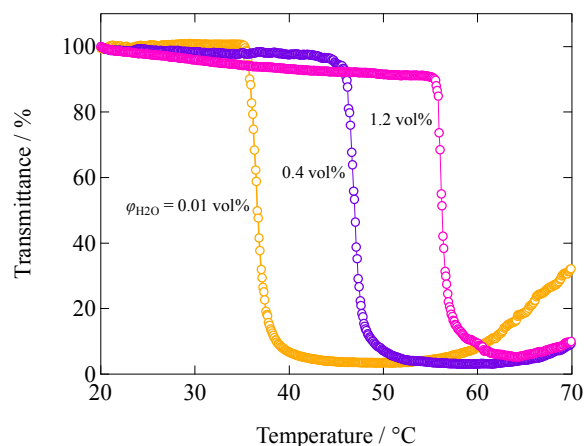


Figure 2 : 水分率に依存した、昇温過程における PPG/[C₂mIm⁺][TFSA⁻] 溶液 ($\phi_{\text{PPG}} = 20 \text{ vol}\%$) の温度-透過率曲線

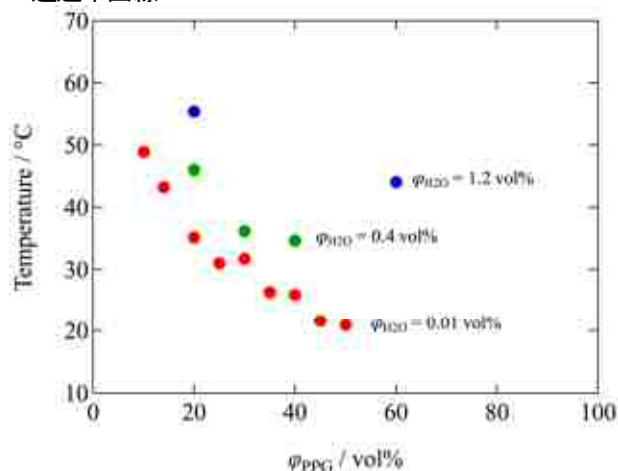


Figure 3 : 水の体積分率に依存した PPG/[C₂mIm⁺][TFSA⁻] 溶液の PPG 体積分率-温度相図

一に混合した試料を調整することができた。

今後は実験系の確認とより詳細な相図の作成、二次元相関赤外分光法を交えて、微量の水による相分離温度の変化の分子論的機構を解明する予定である。

4. 参考文献

- [1] Fujita, K., Ohno, H., *Biopolymers*, **93**, 1093 (2010).
- [2] Nayak, P. K., et. al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 1806 (2013).
- [3] 大坂昇, 平成 27 年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団研究成果報告書集, pp.116-119.

5. 謝辞

本研究は公益財団法人ウエスコ学術振興財団から多大なご支援を頂くことで遂行することができました。心より感謝を申し上げます。

細胞内エネルギー代謝シフトを利用した iPS 由来肝細胞成熟化の検討

岡山理科大学 工学部 生命医療工学科

神吉 けい太

多能性幹細胞（ES 細胞、間葉系幹細胞、iPS 細胞など）から分化誘導された肝細胞は再生医療における有力な細胞材料として期待されるが、得られる肝細胞様細胞（hepatocyte-like cells）の機能面は成体肝細胞に及ばず、むしろ未成熟な胎児性肝細胞に近い。したがってより肝機能を成熟させるための分化誘導法の工夫が必要である。一般的に分化した細胞ではミトコンドリアにおける酸化的リン酸化によるエネルギー生産が活発に働き、細胞機能発揮に必要なエネルギーを供給している。そこでミトコンドリア生合成を誘導することで、肝細胞分化を促進させ、肝機能を高める試みを行っている。今回、ミトコンドリア生合成時に働く転写因子 TFAM のプロモーター配列を用い、ルシフェラーゼレポーターを構築した。このレポーターはミトコンドリア生合成シグナルに応答し活性化することが確かめられた。肝臓由来細胞 HepG2 にこのレポーターを導入し、ミトコンドリア生合成刺激である Resveratrol 処理および低グルコース濃度処理を検討したところ、Resveratrol 20 μ M 以上、グルコース濃度 0.1mg/ml でミトコンドリア生合成シグナルが活性化されることを見出した。これらの刺激条件が iPS 由来肝細胞分化誘導に与える影響について今後検討を進める。

研究背景・目的

多能性幹細胞は分化多能性を有し、様々な細胞に分化できることから再生医療への利用が期待できる。実用化に向けた課題として、材料になる幹細胞の供給、細胞材料の安全性の確保、高機能な細胞への分化誘導などが挙げられる。特に機能的な体細胞への分化誘導はいまだ課題が多く、より高い機能を持つ細胞を分化誘導するための工夫が求められている。これまで多能性幹細胞（ES 細胞、iPS 細胞、間葉系幹細胞など）から機能性肝細胞を分化誘導する試みが多数なされてきた。これらは初期発生における肝分化過程の環境をサイトカインや細胞外マトリクス等を用いて模倣し、段階的に分化誘導させる手法である。しかしながら得られた肝細胞様細胞（hepatocyte-like cells）の機能面は成体肝細胞に及ばず、むしろ未成熟な胎児性肝細胞に近い。したがってより高い治療効果を生み出すため、肝細胞分化をより促進し機能面の成熟を促すような工夫がさらに必要であることが示唆される。肝細胞分化を促進し、機能を成熟させるためにはそれに必要なエネルギー代謝機構を備えることが重要と

考えられる。一般的に、未分化な細胞は増殖に特化し解糖系を中心としたエネルギー代謝を行っているが、分化した細胞ではミトコンドリアにおける酸化的リン酸化によるエネルギー代謝が働いている。実際に胎児肝から成体肝への分化において、解糖系からミトコンドリアへのエネルギー代謝シフト（好氣的なエネルギー生産）が起ることが報告されている（文献1）。すなわち細胞内のミトコンドリア量と活性を高めること（ミトコンドリア生合成）により、成体肝細胞の機能発揮に必要なエネルギーを作る能力が備わる。本研究では、従来の分化誘導法に加え細胞内エネルギー代謝機構を幹細胞型（解糖系）から分化型（酸化的リン酸化）に積極的にシフトさせることによって、肝細胞分化を促進させ、より成熟した iPS 由来肝細胞を得ることが目的である。

研究方法と結果

ミトコンドリア生合成は細胞のエネルギー不足に応じて活性化される。具体的には運動やカロリー制限などにより細胞内の ATP 量が低下することで、細胞内

エネルギーセンサーである AMPK が活性化し、ミトコンドリア生合成に重要な転写コファクターである PGC-1 やミトコンドリア転写因子 TFAM が順次活性化される（文献 2）。またカロリー制限と似た作用を示すポリフェノール Resveratrol は、ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 を活性化し、PGC-1 活性化に関わりミトコンドリア生合成を促進することが知られる。そこでミトコンドリア生合成を評価するレポーターアッセイ系の確立を行った。

ミトコンドリア生合成のシグナル伝達に重要な TFAM 遺伝子のプロモーター配列（文献3）を用い、pGL3 ルシフェラーゼベクターに挿入してレポーターベクターを構築した（図1）。このレポーターはミトコンドリア生合成シグナルに応答してルシフェラーゼ遺伝子を発現する。

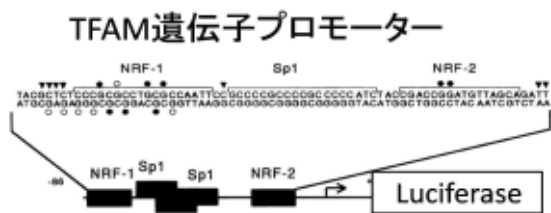


図 1. TFAM 遺伝子プロモーターを挿入したルシフェラーゼレポーターベクター

次に肝臓由来細胞 HepG2 を用いたミトコンドリア生合成誘導刺激の検討を行った。HepG2 はヒト肝芽腫由来の細胞株でアルブミン、AFP などの肝細胞マーカーを発現し、肝細胞モデルとして広く使われている細胞である。上記のレポーターベクターをリポフェクション法により細胞に導入して、ミトコンドリア生合成刺激を検討した。今回、Resveratrol および低グルコースによるミトコンドリア生合成への影響をそれぞれ検討した。レスベラトロール刺激では対照群 (DMSO) と比べ、 $10\mu\text{M}$ 以上で有意差が見られ、 $20\mu\text{M}$ 以上では約 4 倍のプロモーター活性の上昇が見られた (図 2 A)。また低グルコース刺激検討では対照群 (4.5mg/ml) に比べ、 0.1mg/ml 群において有意なプロモーター活性の上昇が見られた (図 2 B)。これらの結果から

Resveratrol 20 μ M 以上、グルコース濃度 0.1mg/ml でミトコンドリア生合成を促進させることが可能と考えられた。

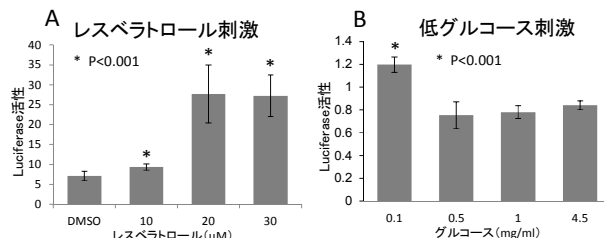


図 2. Resveratrol (A) およびグルコース濃度 (B) のミトコンドリア生合成シグナルへの影響

考察とまとめ

TFAM プロモーターはミトコンドリア生合成のシグナルに関わる転写因子と結合する応答配列を有している (図 1、文献 3)。このプロモーターに制御されたルシフェラーゼレポーターは、Resveratrol や低グルコース濃度刺激に応じて活性化がみられたことからミトコンドリア生合成シグナルを評価できると考えられた。今回、Resveratrol とグルコース濃度のそれぞれ単独条件を検討したが、併用によりさらに高い効果が得られるかどうか、今後の検討課題である。今後はミトコンドリア生合成誘導条件を iPS 細胞の肝細胞分化誘導プロトコルに応用し、iPS 由来肝細胞の分化、機能成熟の到達度について評価したいと考えている。その際平面培養だけでなく、立体培養を用いることでより肝細胞機能を高められると考えられる。

参考文献

1. J. Biol. Chem. 1988 263: 7767-7775.
2. Br J Pharmacol. 2014 171: 1818-1836.
3. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 91: 1309-1313

MMS で取得した大規模全球画像群による高精度な空間検索

岡山理科大学 工学部

太田寛志, 島田英之, 島田恭宏, 大倉 充

MMS（移動計測システム）は、道路周辺の 3D 計測および全球画像取得を連続的に行える。一方で、近年ポータブルかつ廉価な全周カメラが普及し、一般ユーザが容易に全球画像を撮影することが可能となった。これらを活用すれば、ユーザが撮影した画像と MMS による全球画像群とのマッチングを図ることで、画像のみを用いて自らの位置を推定するという空間検索が可能となる。また、大規模全球画像群の冗長性を利用した補間による高精度化も可能と思われる。そこで本研究は、全球画像群からユーザの撮影位置を推定することを目的に、全周囲を正距円筒図法と舟型多円錐図法の二つの方法によって 2 次元平面に展開した全球画像同士を照合し、その類似性を判定する手法を開発した。評価実験の結果、MMS による全球画像群の中からユーザの撮影位置と同じである画像を正しく検出できることが確認された。

1. はじめに

MMS（Mobile Mapping System; 移動計測システム）は、道路周辺の 3D 計測を行うことができる計測用車両である。また、全周カメラを搭載して走行することで、走行経路に沿った全球画像を連続的に取得できる（これを大規模全球画像群と呼ぶ）。この大規模全球画像群は、拡大して細部を確認できるほどの解像度はなく、実際の業務では周囲の概況を確認する程度にしか使われない。しかし大規模全球画像群は、時間的、空間的に連続して撮影されていることから、冗長ながらも広大な空間の画像情報を切り取ったものといえる。一方、近年はポータブルかつ廉価な全周カメラが普及し、現場にて容易に全球画像を撮影することが可能となった。これらを活用すれば、ユーザが撮影した全球画像と、前述の大規模全球画像群とのマッチングを図ることで、画像のみを用いて自らの位置を推定するという空間検索が可能となる。また、大規模全球画像群の冗長性を利用した補間による高精度化も可能と思われる。そこで本研究は、大規模全球画像群からユーザの撮影位置を推定することを目的に、MMS で撮影された全球画像とユーザが撮影した全球画像とを照合して、その類似性を判定する手法を開発する。

全周カメラで撮影した空間を 2 次元平面の画像に変換するには、正距円筒図法（パノラマ展開）による方法、舟型多円錐図法による方法、正射方位図法



(a) 正距円筒図法（パノラマ展開）



(b) 舟型多円錐図法



(c) 正射方位図法

図 1 全周囲の 2 次元画像表現方法

による方法などがある（図 1）。本研究では、全周が 1 枚の画像に収まっていること、また、撮影の方位角の変化が画像の平行移動で容易に表されることの原因から、正距円筒図法と舟型多円錐図法を採用する。本稿では、これら 2 種の方法において考案した画像マッチング方法について述べ、評価実験を行った結果を示す。

2. 全球画像の撮影と画像マッチングの方法

画像マッチングのデータベースとなる大規模全球画像群の撮影には、Point Grey Research 社製の Ladybug3 を用いる。これを株式会社ウエスコが保有する三菱電機株式会社製の MMS 車両のルーフに取り付け、車両の移動距離 2 m ごとに撮影を行う。Ladybug3 では撮影場所一箇所につき 7 方向の画像

が個別に得られるため、これらの画像をパノラマ合成して全球画像を生成する。これをデータベース画像と呼ぶ。他方、ユーザによる任意地点の撮影には RICOH 社製の THETA を用いる。THETA では一箇所につき 2 枚の魚眼カメラ画像が得られるため、これらもパノラマ合成して全球画像を生成する。これをクエリ画像と呼ぶ。

平面に展開した全球画像には一般的なカメラ画像には存在しない大きな幾何学的歪みが存在する。また、データベース画像とクエリ画像の撮影時間が異なるため両画像間で明るさが異なる場合がある。そこで、画像マッチングには特徴点検出法を用いることで画像の回転、拡大縮小、照明の変化の影響を受けにくくする。

画像マッチングは次の手順で処理する。

- (1) クエリ画像の特徴点を検出し、特徴点座標群と各特徴点の特徴量を求める。
 - (2) データベース画像 1 枚の特徴点群の各特徴量と、(1)の特徴量との特徴量距離計算を行い、距離が最小となる特徴点同士の対応付けを行う。ただし、特徴量距離が非常に大きい特徴点对は誤対応である可能性が高いため排除する。
 - (3) 特徴点对の個数を数え、これをマッチング得点とする。マッチング得点が高いほど、クエリ画像とデータベース画像が同一の撮影場所である可能性が高い。
- (1)から(3)の処理をデータベース画像すべてについて行い、最もマッチング得点が高いデータベース画像を検出する。

3. 正距円筒図法による画像を用いる方法

3.1. 処理方法

正距円筒図法によって得られたパノラマ画像は緯度線と経度線が直交している。緯度が大きいほど画像の上端あるいは下端に近くなり画像の歪みが大きくなる問題があるが、画素の連結性が保たれ、また、画像全体が長方形であるために一般的な画像に用いられるマッチング手法が適用しやすい利点がある。

本研究では、特徴点検出法に SURF (Speeded Up Robust Feature) を用いる。図 2 に SURF による特



図 2 SURF による特徴点の検出結果例



(a) 地点 A



(b) 地点 A で(a)とは異なる方向で撮影



(c) 地点 A と異なる位置で撮影

図 3 撮影方向と場所の違いによる画像上の違い

特徴点検出結果の例を示す。青円は特徴点の特徴量記述に用いられる範囲であり、特徴点周辺の画素値分散に応じて最適な範囲が自動的に検出される。この範囲の大きさをスケールと呼ぶ。撮影解像度の異なる 2 枚の画像を照合するときスケールを正規化することで正しく照合を行うことができるが、本研究では次のような問題が生じる。同じ地点で撮影した 2 枚の画像は撮影方位角が異なっても画像上では被写体は同じ大きさになるが (図 3 (a), (b)), 異なる位置では違う大きさになる (図 3 (a), (c))。このとき、画像マッチングでスケールを正規化すると、図 3 (a)と(c)の照合の結果、高いマッチング得点になり、(a)と同じ撮影位置を(b)でなく(c)と誤る可能性がある。そこで、対応付けられた特徴点のスケール

差が大きいときには正しい対応であるが撮影位置が異なる, もしくは, 誤対応であると見なしして排除する. 本研究では, スケール量同士の差の割合が 10% 以上の特徴点を排除する.

3.2. 評価実験

実際の画像を用いて画像マッチング得点を計算し, 撮影位置を推定できるか検証を行った. データベース画像には全球画像 679 枚を使用した.

実験で使用したクエリ画像の 2 例を図 4 に示す. 実験の結果得られたマッチング得点を図 5, 6 のグラフに示す. 図 5 (a) および図 6 (a) はスケールによる特徴点对の排除を行わない場合の結果であり, 図 5 (b) および図 6 (b) は特徴点对の排除を行った場合の結果である. いずれの結果も正しい撮影場所のデータベース画像で最大得点が得られており, 検出が成功している. 表 1 にマッチング得点の最高点と 2 番目に高い点との差の割合を示す. 特徴点の排除を行わない場合は, 高いマッチング得点で値が近い箇所が複数あり, 撮影位置の推定を誤る可能性が見て取れる. 一方, 特徴点对の排除を行った場合は, マッチング得点が全体的に小さくなるものの, 最高得点と 2 番目の得点との差の割合が大きく, 撮影位置推定の精度が高められていることが確認できる.



(a) 撮影場所 A

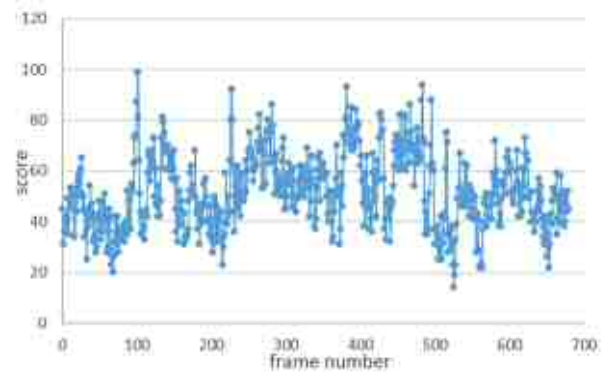


(b) 撮影場所 B

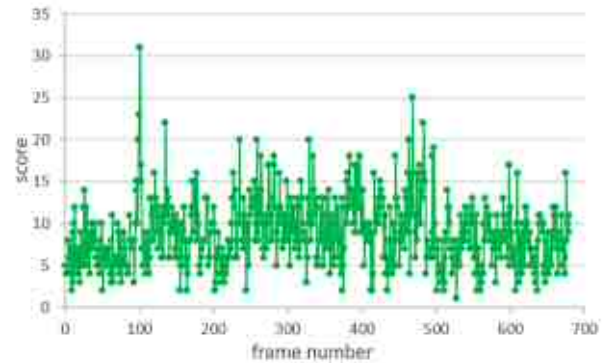
図 4 クエリ画像

表 1 マッチング得点の最高点と 2 番目の点の差の割合

	撮影場所 A	撮影場所 B
特徴点对の排除を行わない場合	5.05%	2.40%
特徴点对の排除を行った場合	19.35%	11.42%

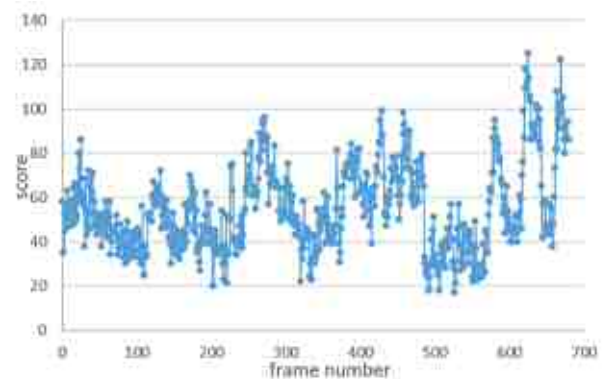


(a) 特徴点对の排除を行わない場合

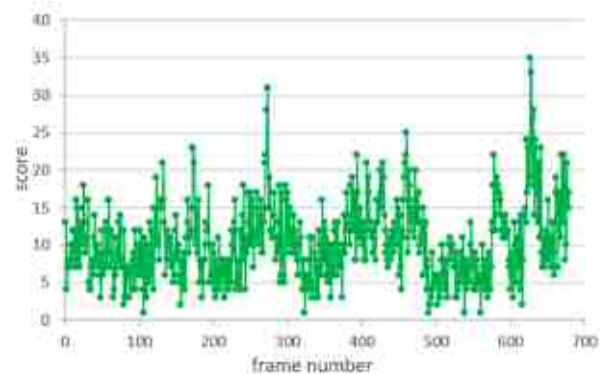


(b) 特徴点对の排除を行う場合 (提案手法)

図 5 撮影場所 A のマッチング得点結果



(a) 特徴点对の排除を行わない場合



(b) 特徴点对の排除を行う場合 (提案手法)

図 6 撮影場所 A のマッチング得点結果

4. 舟型多円錐図法による画像を用いる方法

4.1. 処理方法

前述の正距円筒図法で得たパノラマ画像では、画像の上端および下端の領域に大きな歪みが生じるために、この領域から検出された特徴点は対応付けが正しく行われないことがある。そこで、図 1 (b) に示した舟型多円錐図法を用いることによって上端と下端の歪みを軽減した画像を生成し、特徴点検出および特徴量記述を行う。ただし、画像の輪郭部分で画素の連結性が失われてしまうため、特徴点検出後に画像と背景の境界上に現れる特徴点は除外する。特徴点検出法には、SIFT (Scale Invariant Feature Transform) を使用する。

4.2. 評価実験

データベース画像 30 枚のうち、ターゲット画像 25 番と同一地点において撮影した全球画像をクエリ画像とし、撮影位置推定の実験を行った。使用したクエリ画像を図 7 に示す。舟型多円錐図法の分割数を D ，対応点の特徴空間における距離の閾値を T として、 $D = 12$ のとき、 T を 70, 80, 90 にそれぞれ変化させてマッチング得点を求めた。実験結果を図 8 に示す。 $T \geq 80$ において、正解である画像番号 25 でマッチング得点に最大となり、撮影位置推定に成功している。



図 7 クエリ画像（画像変換前）

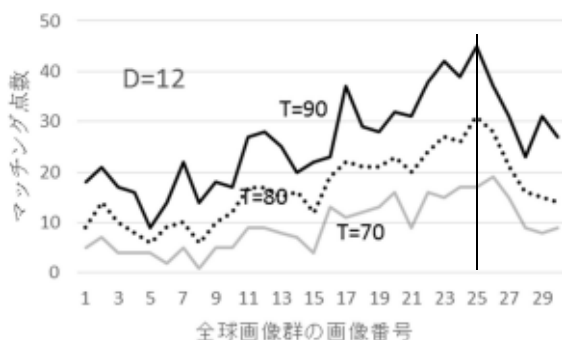


図 8 全球画像群とのマッチング結果

5. まとめ

本研究ではMMSによって取得した大規模全球画像群とユーザが撮影した全球画像との画像マッチングによって、撮影位置を推定する手法を提案した。全周を2次元平面に展開する方法として、正距円筒図法による方法と舟型多円錐図法による方法の2種を検討した。評価実験の結果、いずれの方法も撮影位置と同じデータベース画像でマッチング得点最大になり、撮影位置推定に成功していることが確認された。今後の課題として、画像の歪みを完全に無くし、かつ、画素の連結性を保つ方法として、全周囲を3次元の球面にマッピングした状態で特徴点抽出と特徴量記述を行う方法を検討し、より高精度に画像マッチングを行う手法の開発に取り組む。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご助成いただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に深く感謝致します。

参考文献

- [1] 多田裕貴, 太田寛志, 道西博行, “全球画像列を使用した撮影位置の推定,” 情報処理学会第 79 回全国大会講演予稿集, vol.2, pp.451-452, 2017.
- [2] 多田裕貴, 太田寛志, 道西博行, “全周囲画像群を用いたカメラ位置推定,” 平成 28 年度電気・情報関連学会中国史部連合大会講演予稿集, R16-22-03, 2016.
- [3] 島田英之, 黒島和弥, 太田寛志, 島田恭宏, 大倉充, 株式会社ウエスコ, “大規模全球画像群を用いた画像マッチングの試み,” OUS フォーラム 2016 アブストラクト集, p.34, 2016.
- [4] 太田寛志, 多田裕貴, 島田英之, 島田恭宏, 大倉充, 株式会社ウエスコ, “撮影角度によらない全球画像照合法,” OUS フォーラム 2016 アブストラクト集, p.35, 2016.

人のバイタル・モニタリングによる寒冷ストレス評価

—冷たい局地風「肱川あらし」の事例—

岡山理科大学 生物地球学部 生物地球学科

大橋 唯太

本研究では、国内外でも珍しい局地的な強風現象「肱川あらし」による寒冷ストレスの実態を調査した。肱川あらしは寒候期に愛媛県大洲市長浜地域で発生する、風速 10m/s をしばしば超える寒冷風として知られる。2016 年 11～12 月の期間、現地において被験者最大 11 名で歩行または静止による気象およびバイタル要素を測定した。測定した 10 日間は、肱川あらしの発生しなかった 2 日間、弱い肱川あらしの発生した 4 日間（10m/s 未満）、強い肱川あらしの発生した 4 日間（10m/s 以上）に分類され、それぞれの特徴が比較された。体感温度を表す UTCI（Universal Thermal Climate Index）は、肱川あらしに曝露される赤橋や河川敷で -30°C まで達することもあり、肱川あらしの影響を受けない街路との差が顕著であった。ルート観測の終了後に測定した収縮期血圧は、強い肱川あらしの日に 10～15mmHg の上昇が非発生や弱い日に比べてみられた。ルート観測でリアルタイムに測定された心拍変動からは、強い肱川あらし曝露からその後の街路までの区間で心拍数が減少する被験者が多くみられた。これは、肱川あらしの寒冷ストレスが血圧を急上昇させた結果として現れた調節反応と考えられる。

1. はじめに

愛媛県大洲市の瀬戸内海沿岸部、長浜地域では 10 月下旬から 1 月の寒候期において、風速 10m/s を超える強風現象がしばしば出現することで知られる（重田ほか, 2014; 大洲市ほか, 2015; Ohashi et al., 2016）。この強風は霧を伴うことが多く、幻想的な風景をみせる反面、冷風として人々に強く吹きつける。

肱川あらしは夜半すぎから徐々に発達し、ちょうど地域住民が活動しはじめる朝の 7 時から 8 時には最盛期をむかえる。肱川あらしの地上最強部は肱川河口上にあり、歩行が困難なほど強風となることが多い。この肱川にかかる長浜大橋（通称、赤橋）は長浜地域住民の重要な生活道路であると同時に、肱川あらしを見学に来る観光客の名所にもなっている。

肱川あらしの最盛期と通勤・通学の時間帯が重なることもあって、長浜大橋を往来する人々の辛そうな表情がみられる。肱川あらしの光景はとても美しく（図 1）、先述したようにその様子を見物に訪れる観光客も多い。しかし、美しい蒸気霧に強風も加わって、寒冷感は一層増す。

急激な温度変化は、血圧や体温など人体の温熱生理機能を不安定にさせる。このことはヒートショッ



図 1 肱川あらしが出現したときの光景。一級河川の肱川にかかる長浜大橋（通称、赤橋）がみえる。

ク現象に代表されるような、急性の脳卒中や心筋梗塞などの発症リスクを高めることにつながる。本研究では、肱川あらしの強冷風が人体にどの程度の寒冷ストレスを与えているか、実際にバイタル変動をリアルタイムに測定して明らかにする。その結果から、地域住民や観光客が曝露される寒冷ストレスの対策につながることを期待する。



図2 歩行観測ルート。数字の順に歩行した。ただし、③は5分間静止して測定した。□は血圧、○は寒冷申告をおこなった場所を表す。

2. 観測方法

図2に、フィールドである愛媛県大洲市長浜地域の歩行観測ルートを示す。地域住民が往来する生活道路を選び、長浜地域の街路からスタートして赤橋へと向かう。この橋を往復したあと、肱川の河川敷に下りて5分間の静止測定をおこなった。この場所は、観光客や肱川あらしの光景を撮影するカメラマンの姿が多くみられる。そして再び街路のスタート地点へと戻るといふ、40分前後の観測ルートとした。歩行速度は、ややゆっくりした3~4km/hで一定となるように調整した。これ以降、観測区間を表す名称として、スタートしてから順に、街路(往路)・赤橋(往復)・河川敷・街路(復路)と呼称していく。

バイタル測定を対象とした被験者は11名(20歳代9名、40歳代2名)で、心拍数・自律神経活動・体表面温度・鼓膜温度をモニタリングした。これに加えて、ルート観測の直前と直後に座位姿勢で2回、収縮期血圧と拡張期血圧を測定した。

2016年11月8~10日と12月3~12日の期間に、早朝7時30分ごろからルート観測を開始した。ただし12月4日と11日は天候不順のため、測定を中止している。

この歩行状態で、気温・湿度・風速・黒球温度の気象要素も連続測定した。被験者のうち2名が、こ



図3 測定の様子。図2の①~④での写真。

れらの測器を持って歩行する(図3)。測定した気象要素からは、体感温度指標 UTCI (Universal Thermal Climate Index) を計算した。この UTCI は現在、世界で最も広く使われている体感温度指標で、人体生理モデルを用いて数理的な計算がおこなわれた信頼性と汎用性の高いものである (International Society of Biometeorology)。

また被験者からは、実際の寒冷感覚レベルを歩行中に申告してもらった。申告を記録した地点は、図3に示している。この申告値と UTCI を比較することによって、気象要素から推定される寒冷ストレスの妥当性や適用範囲を検討する。

3. 結果と考察

3-1 気象モニタリングの一例

測定期間中に肱川あらしを確認できたのは10日間で8日あり、このうち半分の4日間で特に強い(典型的な)肱川あらしとなった。ここでは、肱川あらしが発生しなかった2016年11月9日(図4)と、強い肱川あらしが確認された同年12月9日(図5)の測定結果を示す。肱川あらしが出現しなかったときの歩行ルート上の風速は概ね5m/s以下で、気温も13.3~14.6℃と場所による違いも小さかった。計算された体感温度 UTCI も気温と等しくなる場所が多く平均で10℃ほどであり、実際の被験者申告(寒さレベル)ともよく対応していた。

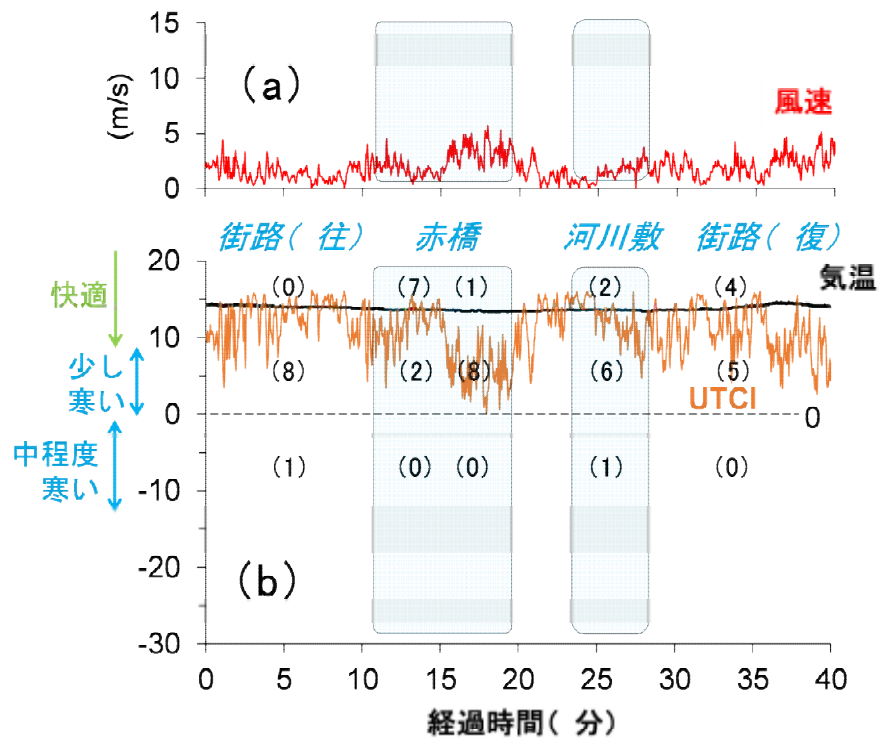


図4 肱川あらしが発生しなかった2016年11月9日の測定結果。歩行ルート上での(a)風速、(b)気温とUTCIのリアルタイム変化を示す。括弧の数字は、図2で示した地点での寒さレベルの申告人数(被験者9名中)を示している。

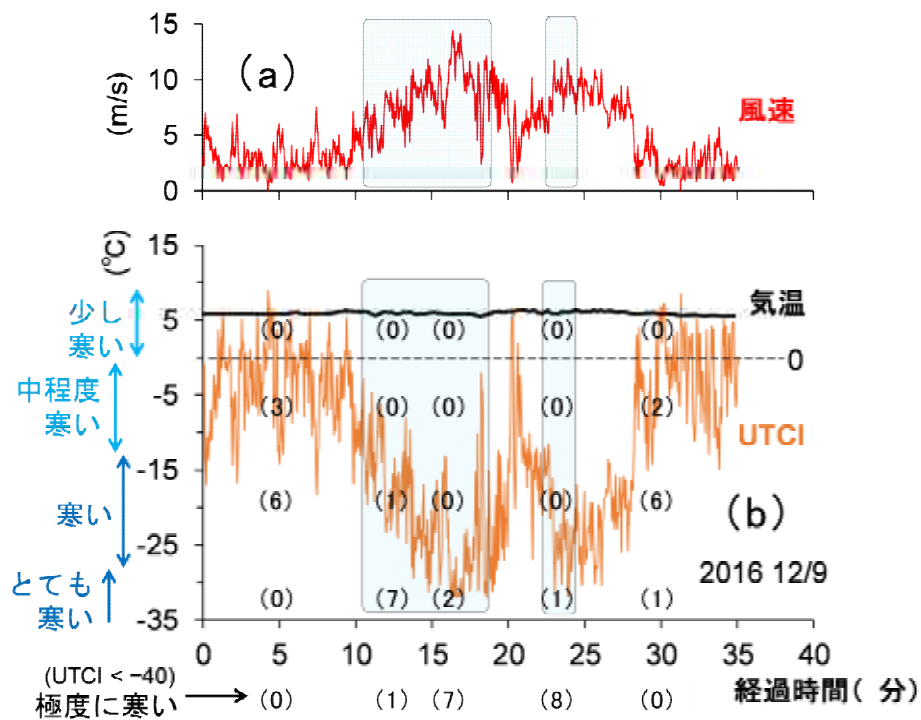


図5 図4と同じ。ただし、強い肱川あらしが出現した2016年12月9日の測定結果。

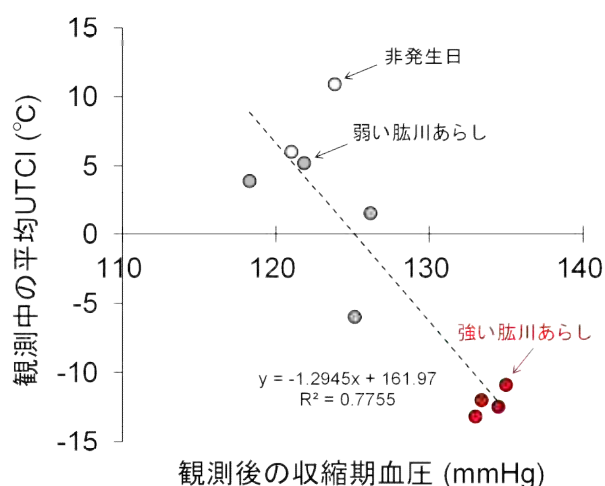


図6 測定ルート上の平均 UTCI と測定終了後の収縮期血圧の関係。血圧は全被験者の平均値を示す。

強い肱川あらしが出現したときは、赤橋と河川敷で風速 10m/s を超えて歩行はもちろん直立静止さえも困難に感じられた。このとき気温は歩行ルート上で 5.5～6.4℃と変化が小さいにもかかわらず、体感温度 (UTCI) は赤橋と河川敷で -30℃にも達した。一方、実際の被験者の寒さ申告は、これらの場所で UTCI から推定される寒さレベルよりも 1 ランク強い「極度に寒い」レベルを訴える被験者が多かった。UTCI は欧米人の体格をモデル化した指標であるため、本研究のような強い寒冷条件で日本人に適用させようとする、体感温度が過小評価される恐れがある。

3-2 バイタル・モニタリングの一例

(1) 血圧への影響

観測ルート全体で平均した UTCI と、終了直後に測定した収縮期血圧の関係を図 6 に示す。各プロットが 1 日の数値を表し、血圧はその日の全被験者の平均値とした。図から明らかなように、強い肱川あらしが観測された日とそれ以外の日のあいだで血圧の値に大きな違いが現れている。その日の体感温度 (UTCI の値) が低いほど血圧は高くなっていることから、寒冷ストレスによって皮膚血管が収縮することで血管抵抗が増加し、血圧が上昇したと考えられる。強い肱川あらしの出現日には、被験者平均でも 10～15mmHg の血圧上昇がみられる。

測定された体表面温度も強い肱川あらしの日には顕著に低くなっていたため、皮膚血管収縮の亢進が予想される。

一方、歩行ルート上での血圧変動は測定できなかったもので明らかなでないが、ルート観測の開始前と終了後の血圧変化は得られている。図 7 には、弱い肱川あらし (11 月 10 日 ; 図 7a) と強い肱川あらしの出現日 (12 月 12 日 ; 図 7b) にそれぞれ測定された平均血圧「=拡張期 + (収縮期 - 拡張期) / 3」を示した。この 2 日間を比べてみると、強い肱川あらしの低い体感温度を経験したときのほうが、ルート観測終了後の血圧低下が認められない点である。この傾向は、他の日についてもみられた。また、肱川あらしの発生しない日や弱い日は、被験者の着衣量 c_{lo} 値 (着衣の総熱抵抗) が小さいほどルート観測後の血圧低下が大きくなる特徴もみられる。ところが強い肱川あらしの出現日は、逆に c_{lo} 値の小さな被験者ほど血圧の上昇が現れやすい傾向がみられた。

これらの結果から、体感温度を著しく低下させる強い肱川あらしの長時間曝露は、血圧を上昇させる恐れがあるが、着衣量を増やすことで安定化できると考えられる。

(2) 心拍変動への影響

街路 (往路)・赤橋 (往復)・河川敷・街路 (復路) の区間別に平均された心拍数 (bpm) の数値と、そのときの UTCI を比較した結果を図 8 に示す。被験者 A (20 代男性) のモニタリング結果を例に、測定した 10 日間が区間ごとにプロットされている。いずれの区間でも、心拍数は体感温度 (UTCI) の低い日ほど多くなる特徴がわかる。街路 (往) における回帰直線の傾きからは $-0.78\text{bpm}/^{\circ}\text{C_UTCI}$ という値が得られ、体感温度を表す UTCI が 10°C 下がると 7.8bpm 心拍数が増加するという関係がここからわかる。有意な相関が得られた被験者でまとめてみると、街路 (往) で UTCI が 10°C 下がると 7.8～9.8bpm、赤橋では 5.1～9.3bpm、河川敷で (ただし直立静止状態) 6.0～7.9bpm、街路 (復) 5.1～6.6bpm の心拍数増加となっている。これらは、 c_{lo} 値の低い被験者で特に現れやすかった。

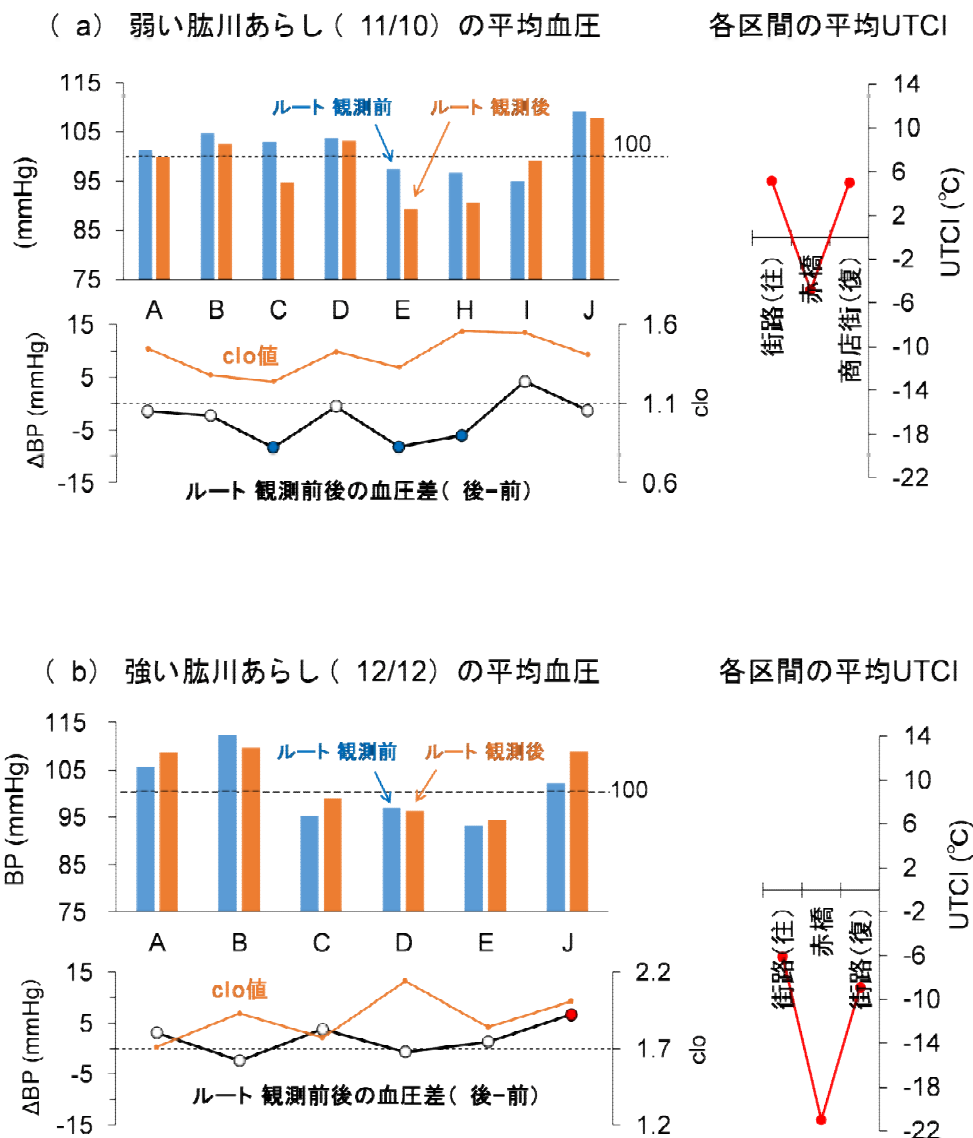


図7 ルート測定前後の被験者ごとの平均血圧とその差、被験者ごとの着衣量 clo 値、区間ごとの平均体感温度 UTCI。
(a) 弱い肱川あらしが出現した11月10日と (b) 強い肱川あらしが出現した12月12日の結果。ルート測定前後の血圧差のグラフ (左下) で赤色または青色に示された○は、 $\pm 5\text{mmHg}$ 以上の血圧変化がみられた被験者を表している。

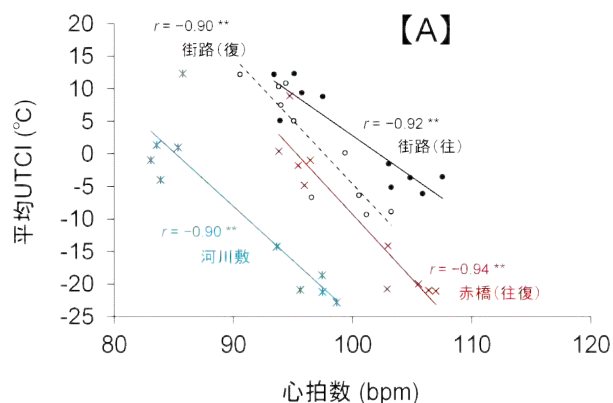


図8 各区間で観測された平均 UTCI と平均心拍数の関係。被験者Aの結果。**は、相関係数の検定で危険率1%で有意となったことをあらわす。

次に、歩行ルート観測中の心拍変動のリアルタイム変化を分析してみた (図9)。ここでは例として、被験者Aで測定された心拍数・交感神経活動度 (LF/HF)・副交感神経活動度 (HF) の結果を示す。ここでは、街路 (往)・赤橋 (往復)・街路 (復) の歩行区間に対してこれらの平均値を算出し、肱川あらし曝露前の街路 (往) からの変化である「赤橋ー街路 (往)」と「街路 (復)ー街路 (往)」のそれぞれの値を表している。

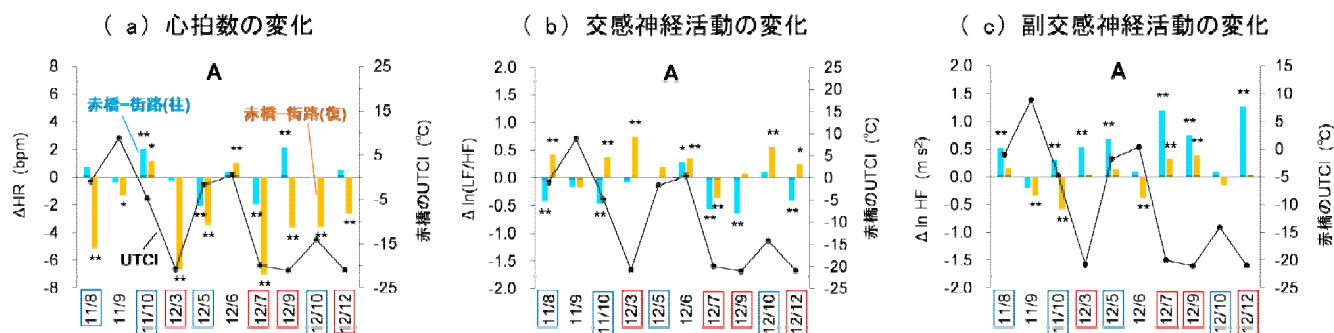


図9 被験者Aで測定された赤橋と街路（往）、街路（復）と街路（往）の（a）心拍数差・（b）交感神経活動度（ $\ln LF/HF$ ）差・（c）副交感神経活動（ $\ln HF$ ）差。いずれも区間平均した値。測定実施日10日間の結果を比較している。また、 LF/HF と HF は、サンプルデータを正規分布化させるために自然対数をとっている。この他、赤橋で観測された平均 $UTCI$ も示している。赤枠の日付は強い肱川あらし、青枠の日付は弱い肱川あらしの出現日をあらわす。

赤橋での心拍数は（図9a）肱川あらしの暴露によって上昇する日と減少する日があり、強い肱川あらしのときは不安定であった。ところが暴露後の街路（復）を歩行したときには、特に強い肱川あらしで心拍数に顕著な減少がみられる。このとき副交感神経活動の亢進が出現しているため（図9c）、肱川あらしの区間から街路への移動に伴う体感温度の急激な上昇が皮膚血管の拡張と末梢血液循環の回復をもたらしたと考えられる。

4. 得られた研究成果

（1） $UTCI$ の値から推定される肱川あらしの体感温度は瞬間的に -30°C にも達することがあり、非常に強い寒冷ストレスであるとわかった。

（2）推定された $UTCI$ の体感温度レベルよりも実際の被験者申告の寒冷感レベルのほうが低かった。

（3）日ごとにみた場合、 $UTCI$ の低い日ほど血圧は高く、心拍数は多い傾向がみられた。これは肱川あらしの暴露に限らない、その日の寒冷ストレスの結果といえる。

（4）強い肱川あらしが発生しているとき、5～10分程度の暴露後に血圧上昇がみられた。このとき、この血圧上昇を抑制しようと心拍数は減少したと考えられる（道広ら、1996）。

謝 辞

測定の被験者に参加いただきました方々に心より御

礼申し上げます。観測ならびにデータ解析では、岡山理科大学生物地球学部4年生の勝田匠氏と谷美佳氏に協力いただきました。心拍データの測定は、いであ株式会社の宮下良治氏並びに宮原啓氏、公立鳥取環境大学の重田祥範講師にご支援いただきました。心より感謝申し上げます。なお、本研究実施の前後においては、岡山理科大学研究倫理審査委員会による審査ならびに承認を得ました。

引 用 文 献

- 道弘和美・丹羽哲也・松波晴人・河原林幹治・柴田憲・竹森利和（1996）浴室温度変化と血圧変動．生理心理，Vol. 14，No. 2，pp. 69-76.
- Yukitaka OHASHI, Makoto SUIDO, Yukihiro KIKEGAWA, Tomohiko IHARA, Yoshinori SHIGETA, and Minako NABESHIMA（2016）：Impact of seasonal variations in weekday electricity use on urban air temperature observed in Osaka, Japan. Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society, Vol. 142, Issue 695 (January), pp. 971-982.
- 大洲市・名越利幸・松本浩司（2015）Great Nature Story 肱川あらし これでキミも“あらし”予報士！！エス・ピー・シー，95pp.
- 重田祥範・大橋唯太・寺尾徹・大澤輝夫（2014）愛媛県大洲市沿岸部で発生する局地風“肱川あらし”の鉛直構造．天気，Vol. 61，No. 2，pp. 91-96.

体力が低い中学生・高校生の生活習慣と生活の質(Quality of Life)を解明する基礎的研究

岡山理科大学 教育学部

笹山 健作

(概要)

本研究課題では中学生・高校生を対象に、体力、QOL および生活習慣を調査することによって、体力が低い中学生・高校生のQOL、生活習慣を明らかにすることを目的とした。本研究の対象者は岡山県の中学校1校に在籍する中学1年生から3年生男女150名とした。調査項目として、形態、体力、生活習慣、QOLを調査した。その結果、男女の体力とQOLとの関連はほとんどの項目において有意な関連が認められなかった。本研究では対象者数が少ないことに加え、男子では体力が全国平均と比べ低く、女子では全国平均と比べ高い傾向であった。これらのことが本研究の結果に影響を与えている可能性がある。今後においては、高校生を対象に加えて検討するとともに、対象者数を増やして調査を行うことが必要である。その上で、体力が低い中学生・高校生のQOLと生活習慣を検討していく必要がある。

1. 背景

世界保健機関によると、生活の質(Quality of life:以下、QOL)は「個人が生活する文化や価値観の中で、生きることの目標や期待、基準、関心に関連した自分自身の人生の状況に対する認識」と定義されている。近年では国内外で子どものQOLが評価されているけれども、成人に比べるとエビデンスは乏しい状況である。子どものQOLを評価する尺度はいくつかあり、本研究で用いたKINDL^{RI})は27カ国語に翻訳され、その日本語版も妥当性・信頼性が確認されている。国内外で評価された子どものQOLは、その実態や疾病との関連を検討した報告が大部分であり、体力との関連を検討した報告は、著者が知る限り存在しない。

体力は先行研究によって、心身との関連に加え様々な自己概念との多面的な関連が報告されている。したがって、体力はQOLの下位領域である身体的健康だけでなく、精神的健康や自尊感情などとも関連のある可能性が考えられる。本研究課題では体力が低い中学生・高校生のQOLや生活習慣を検討することによって、体力の意義や体力づくりに関する重要な知見が得られることが考えられる。そこで本研究では中学生を対象に、体力、QOL および生活習慣を調査することによって、体力が低い中学生・高校生のQOL、生活習慣を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

(1) 対象者

本研究の対象者は岡山県の中学校1校に在籍する中学1年生から3年生男女150名とした。すべての調査・測定は2016年の4月から8月にかけて行った。なお、研究を行うにあたり、対象者と保護者には調査の内容を説明した上で同意を得た。また、本研究は岡山理科大学倫理審査委員会の承認を得て行った。

(2) 調査項目

1) 形態

対象者の身長・体重を調査し、体重(kg)/身長²(m)によってBody mass index(BMI)を算出した。

2) 体力

体力は文部科学省の新体力テスト実施要項(12歳～19歳対象)²⁾に基づいて行った。調査項目は握力、上体起こし、長座体前屈、反復横跳び、50m走、20mシャトルラン、立ち幅とび、ハンドボール投げとした。

握力はスメドレー式握力計を用いて、左右交互に2回ずつ実施し、左右おのおののよい方の記録を平均し、kg未満は四捨五入した。

上体起こしは30秒間の上体起こし(両肘と両大腿部がついた)回数を記録した。ただし、仰臥姿勢に戻した時、背中がマットにつかない場合は、回数とせず行い、テストの実施は1回とした。

長座体前屈は長座姿勢から最大前屈時の移動距離を計測し、2回実施してよい方の記録をとった。

反復横跳びは中央ラインから両側に幅 100cm のラインを用いて、それぞれのラインを通過ごとに1点を与え 20 秒間計測し、テストを2回実施してよい方の記録をとった。

20m シャトルランは20m 間隔の2本の平行線を往復し、折り返しの総回数を記録した。対象者はCDによって設定された速度を維持できなくなり、走るのをやめたとき、または、2回続けてどちらかの足で線に触れることができなくなった時にテストを終了した。

50m 走はクラウチングスタートの要領で行い、記録は1/10 秒単位とし、1/10 秒未満は切り上げ、テストの実施は1回とした。

立ち幅とびは両足で同時に踏み切って前方へとび、身体が砂場（マット）に触れた位置のうち、最も踏み切り線に近い位置と、踏み切り前の両足の中央の位置とを結ぶ直線の距離を計測した。テストは2回実施してよい方の記録をとった。

ハンドボール投げはハンドボール2号を用い、直径2mの円からの投球とした。記録はメートル単位とし、メートル未満は切り捨て、2回実施してよい方の記録をとった。また、新体力テスト実施要項²⁾に基づき総合得点を算出した。

3) 生活習慣

質問紙によって生活習慣に関する調査を行った。質問項目は「今朝は、何時ごろ起きましたか。」「昨日は何時ごろ寝ましたか。」「日頃、朝食をしますか。」「昨日はすぐに眠れましたか。」「今朝起きたときは、目覚めはどうでしたか。」「最近、睡眠不足を感じていますか。」「大便是、毎日どのように出ますか。」とした。質問項目は、日本学校保健会による児童生徒の健康状態サーベイランス事業報告書³⁾と同様とした。

4) QOL

QOLは質問紙によって調査し、中学生版 QOL 尺度⁴⁾を用いた。中学生版 QOL⁴⁾は KINDL^{R1)}を日本語に翻訳したもので、信頼性・妥当性が確認されている⁴⁾。KINDL^{R1)}は6つの下位領域(身体的健康、精神的健康、

自尊感情、家族、友だち、学校生活)で構成されており、それぞれ4項目の合計24項目で構成されている。本研究では6つの下位項目と QOL 総得点を中学生版 QOL⁴⁾の方法に準じて0～100 点に換算して算出した。

(3) 統計処理

体力の各項目と QOL との関連は相関分析によって検討した。統計処理には IBM SPSS Statistics Version 20 を用い、有意水準は 5 %未満とした。

3. 結果

(1) 対象者の身体的特徴

対象者の身体的特徴を表1に示した。文部科学省の平成28年度学校保健統計調査報告書⁵⁾によると、1年生から3年生の身長は、それぞれ男子で152.7cm±8.0、159.9cm±7.6、165.2cm±6.7、女子で151.9cm±5.9、154.8cm±5.4、156.5cm±5.3であった。また、体重は44.0kg±9.7、48.8kg±9.8、53.9kg±9.7、女子では43.7kg±8.0、47.2kg±7.6、50.0kg±7.5であった。これらのことから、本研究の対象者における身長と体重は、全国平均値と比べて、男子ではやや低く、女子では高い結果であった。

表1 身長、体重、BMIの結果							
		1年		2年		3年	
男子							
身長	(cm)	150.2	(6.6)	159.9	(7.8)	161.5	(6.6)
体重	(kg)	41.9	(8.4)	50.8	(10.5)	51.2	(9.1)
BMI	(kg/m ²)	18.5	(2.7)	19.7	(3.0)	19.5	(2.4)
女子							
身長	(cm)	154.8	(7.6)	160.1	(6.3)	159.0	(6.1)
体重	(kg)	45.5	(8.3)	51.8	(8.4)	54.0	(11.4)
BMI	(kg/m ²)	18.9	(2.3)	20.2	(3.2)	21.3	(3.7)
数値: 平均値(標準偏差)							

(2) 体力

体力の結果を男女別、学年別に表2に示した。平成27年度体力・運動能力調査報告書と比較すると、男子1年、2年、3年生の総合得点は全国平均値と比べて低かった。女子の1年、2年の総合得点は全国平均値と比べて高く、3年生の総合得点は全国平均値と比べて同等であった。

(3) 生活習慣

表3に対象者の起床、就寝時刻を示した。平成26年度児童生徒の健康状態サーベイランス事業報告書³⁾の調査では、男女(1～3年生の平均値)の起床、就寝時刻はそれぞれ6時37分、23時12分、6時32分、23時21分であった。このことから、本研究の対象者は先行研究と比べて男女ともに起床時刻が早く、就寝時刻はほぼ同等であった。

次に図1から図5までに、「日頃、朝食をしますか」、「昨日はすぐに眠れましたか」、「今朝起きたときは、目覚めはどうでしたか」、「最近、睡眠不足を感じていますか」、「大便是、毎日どのように出ますか」についての結果を示した。平成26年度児童生徒の健康状態サーベイランス事業報告書³⁾と比較した。

その結果、「日頃、朝食をしますか」について、本研究の男子では、朝食を食べない割合が高く、女子では朝食を食べない割合が低かった。「昨日はすぐに眠れましたか」について、本研究の男子では先行研究と比べてほぼ同等で、女子ではなかなか眠れなかったという回答が低かった。「今朝起きたときは、目覚めはどうでしたか」について、先行研究と比べて本研究の男女ではともに眠くてなかなかおきられなかったという割合が低かった。「最近、睡眠不足を感じていますか」について、先行研究と比べて本研究の男子ではほぼ同等で、女子では感じていないという割合が高かった。「大便是、毎日どのように出ますか」について、先行研究と比べて本研究の男女では出ないことがあるという割合が低かった。

表2 体力の結果

		本研究の結果			全国平均値 ⁶⁾		
		1年	2年	3年	1年	2年	3年
男子							
握力	(kg)	21.1 (5.6)	26.4 (7.6)	30.6 (6.2)	23.9 (6.1)	29.7 (7.2)	35.1 (7.2)
上体起こし	(回)	21.0 (8.3)	24.0 (6.0)	27.9 (7.5)	24.4 (5.6)	28.1 (5.7)	30.3 (5.7)
長座体前屈	(cm)	38.1 (9.7)	40.9 (9.6)	47.6 (9.2)	39.5 (9.1)	43.8 (9.8)	46.6 (10.6)
反復横跳び	(回)	46.7 (6.4)	51.1 (6.8)	50.2 (7.0)	49.8 (6.3)	53.3 (6.4)	56.0 (6.4)
20mシャトルラン	(秒)	49.0 (25.3)	59.6 (18.9)	65.6 (20.5)	72.2 (22.7)	90.3 (21.7)	96.0 (23.2)
50m走	(秒)	8.7 (0.7)	8.3 (1.1)	8.0 (0.6)	8.5 (0.7)	7.8 (0.7)	7.5 (0.6)
立ち幅跳び	(cm)	170.8 (27.1)	182.2 (30.6)	198.5 (26.4)	179.8 (23.2)	197.0 (19.7)	214.0 (23.2)
ハンドボール投げ	(m)	15.5 (5.5)	16.5 (4.9)	19.3 (5.8)	18.5 (4.8)	21.3 (5.2)	24.2 (5.7)
総合得点	(点)	30.4 (9.4)	36.0 (10.0)	41.5 (9.5)	34.8 (7.6)	43.4 (8.3)	51.0 (9.3)
女子							
握力	(kg)	22.9 (5.4)	28.4 (4.0)	27.0 (5.9)	21.6 (4.3)	24.0 (4.5)	25.5 (4.3)
上体起こし	(回)	29.5 (8.4)	37.7 (5.0)	29.1 (5.7)	21.2 (5.2)	24.0 (5.4)	25.2 (5.3)
長座体前屈	(cm)	49.4 (6.3)	49.2 (5.4)	45.2 (7.8)	43.1 (8.9)	45.4 (9.6)	48.0 (9.4)
反復横跳び	(回)	48.9 (8.0)	60.7 (3.9)	47.1 (12.4)	45.7 (5.4)	47.4 (6.1)	48.8 (6.0)
20mシャトルラン	(秒)	76.5 (28.9)	87.3 (17.7)	65.2 (23.6)	52.7 (17.8)	61.1 (19.5)	61.3 (20.0)
50m走	(秒)	8.4 (0.8)	8.1 (0.5)	9.1 (1.8)	9.0 (0.7)	8.7 (0.7)	8.6 (0.7)
立ち幅跳び	(cm)	169.1 (23.7)	179.9 (21.3)	164.9 (23.8)	164.5 (20.2)	171.3 (22.0)	175.7 (22.3)
ハンドボール投げ	(m)	17.9 (5.0)	17.0 (5.3)	15.3 (4.4)	12.0 (3.5)	13.4 (4.2)	14.5 (4.5)
総合得点	(点)	57.1 (14.1)	64.4 (7.1)	55.5 (12.9)	45.1 (9.0)	50.8 (10.3)	54.5 (10.1)

数値：平均値(標準偏差)

表3 就寝・起床時刻と勉強時間の結果

		1年	2年	3年	全体
男子					
起床時刻	(時：分)	6:05 (0:30)	6:05 (0:47)	6:20 (0:30)	6:10 (0:38)
就寝時刻	(時：分)	23:04 (1:20)	23:03 (0:56)	23:39 (1:31)	23:15 (1:16)
女子					
起床時刻	(時：分)	6:10 (0:27)	5:54 (0:30)	6:16 (0:36)	6:09 (0:33)
就寝時刻	(時：分)	22:27 (0:50)	23:26 (0:33)	23:50 (1:03)	23:17 (1:04)

数値：平均値(標準偏差)

図1 日頃、朝食をしますか

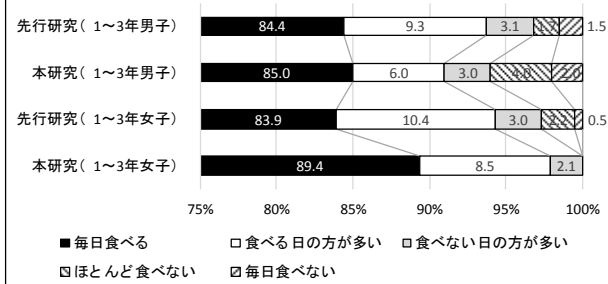


図4 最近、睡眠不足を感じていますか

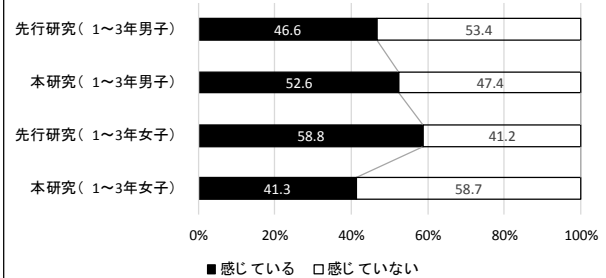


図2 昨日はすぐに眠れましたか

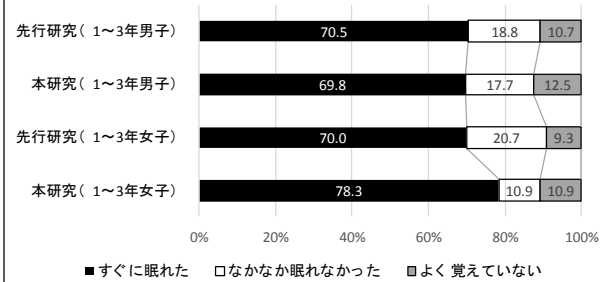


図5 大便是、毎日どのように出ますか

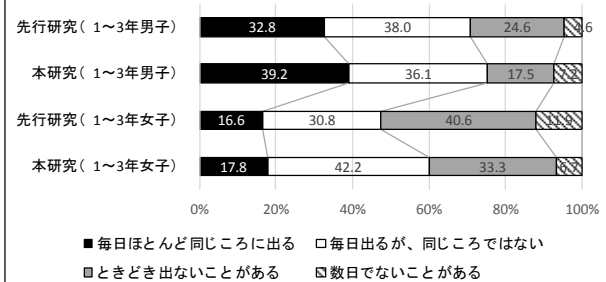
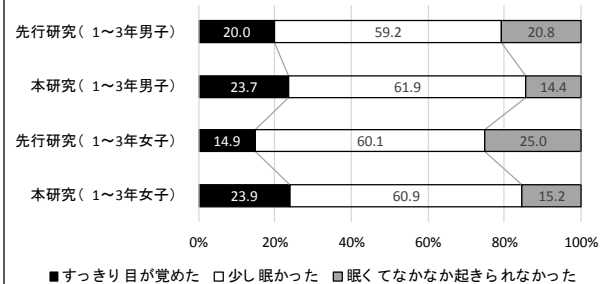


図3 今朝起きたときは、目覚めはどうでしたか



(4) QOL の結果

表4にQOLの結果を示した。QOL総得点の結果は先行研究⁴⁾と比べてほぼ同等か若干低い結果であった。

表4 QOLの結果

		1年	2年	3年	全体
男子					
身体的健康	(点)	59.0 (23.4)	56.3 (35.2)	59.4 (20.9)	58.0 (27.9)
精神的健康	(点)	70.4 (26.1)	68.3 (36.3)	74.2 (16.2)	70.7 (28.3)
自尊感情	(点)	42.9 (29.3)	32.5 (32.0)	37.1 (21.8)	37.0 (28.5)
家族	(点)	67.5 (22.8)	63.1 (36.7)	72.9 (20.6)	67.4 (28.7)
友だち	(点)	65.2 (22.2)	59.2 (33.8)	64.2 (22.1)	62.5 (27.3)
学校生活	(点)	54.0 (17.1)	45.5 (30.1)	44.0 (18.2)	47.6 (23.6)
QOL総得点	(点)	59.8 (17.6)	54.1 (29.6)	58.6 (12.8)	57.2 (22.1)
女子					
身体的健康	(点)	72.3 (18.5)	63.6 (22.5)	56.0 (32.4)	63.0 (26.9)
精神的健康	(点)	76.2 (26.5)	75.0 (21.7)	67.0 (33.8)	71.8 (28.9)
自尊感情	(点)	32.8 (16.8)	43.8 (29.8)	30.4 (25.4)	34.2 (24.2)
家族	(点)	71.5 (21.3)	71.6 (20.6)	62.5 (34.1)	67.5 (27.6)
友だち	(点)	62.1 (26.2)	69.9 (14.2)	59.1 (33.1)	62.5 (27.4)
学校生活	(点)	48.8 (19.9)	43.8 (15.6)	40.9 (27.7)	44.1 (22.8)
QOL総得点	(点)	60.6 (16.1)	61.3 (17.3)	52.7 (27.8)	57.2 (22.3)

数値：平均値(標準偏差)

(5) 体力と QOL との関連

表 5 に体力と QOL との関連を男女別に示した。体力と有意な関連があった QOL は女子の 20m シャトル

ランと身体的健康のみで、その他の体力項目と各 QOL 項目との有意な関連は認められなかった。

表5 体力とQOLとの関連

	身体的健康	精神的健康	自尊感情	家族	友だち	学校生活	QOL総得点
	r	r	r	r	r	r	r
男子							
握力	-0.219	-0.020	-0.068	-0.080	0.032	-0.082	-0.092
上体起こし	-0.030	0.063	0.120	0.033	0.091	0.165	0.090
長座体前屈	-0.087	-0.061	-0.150	-0.124	-0.029	0.039	-0.090
反復横跳び	-0.209	-0.021	0.002	-0.028	0.090	-0.016	-0.039
20mシャトルラン	-0.181	-0.049	0.044	-0.091	0.041	-0.175	-0.083
50m走	0.158	-0.090	-0.050	-0.092	-0.185	0.036	-0.047
立ち幅跳び	-0.233	0.001	-0.011	-0.134	-0.010	-0.219	-0.124
ハンドボール投げ	-0.073	0.038	-0.023	-0.043	0.075	-0.022	-0.010
総合得点	-0.176	-0.005	-0.037	-0.129	-0.032	0.021	-0.078
女子							
握力	0.040	-0.035	0.081	0.118	0.024	-0.267	0.002
上体起こし	0.256	0.122	0.259	0.320	0.190	0.068	0.248
長座体前屈	0.173	0.070	-0.118	0.218	0.249	-0.003	0.127
反復横跳び	0.032	0.015	0.073	0.078	0.077	0.046	0.064
20mシャトルラン	0.359*	0.185	0.241	0.310	0.333	0.085	0.311
50m走	-0.253	-0.104	-0.069	-0.262	-0.155	0.060	-0.166
立ち幅跳び	0.204	0.081	-0.058	0.154	0.035	-0.167	0.060
ハンドボール投げ	0.286	0.071	-0.047	0.221	0.051	0.030	0.127
総合得点	0.249	0.125	0.088	0.164	0.049	0.198	0.173

*: $p < 0.05$ r: 相関係数 学年を調整

4. 今後について

本研究において、体力と QOL との関連は女子の 20m シャトルランと身体的健康のみで有意な関連が認められたがそれ以外では有意な関連が認められなかった。本研究では対象者数が少ないことに加え、男子では全国平均と比べ体力が低く、女子では高い傾向であった。これらのことが本研究の結果に影響を与えている可能性がある。今後においては、対象者数を増やして調査を行うことや高校生を対象に検討することも必要である。その上で、体力、QOL、生活習慣との関連を検討していく必要がある。

5. 謝辞

本研究は、公益財団法人ウエスコ学術振興財団より研究費の助成を受けて行った。ここに記して感謝申し上げます。

6. 引用文献

- 1) Ravens-Sieberger and Bullinger. <https://www.kindl.org/>
- 2) 文部科学省. 新体力テスト 有意義な活用のために. ぎょうせい. 2000.
- 3) 日本学校保健会. 平成 26 年度児童生徒の健康状態サーベイランス事業報告書. 勝美印刷. 2016.
- 4) 古壮純一, 柴田玲子, 根本芳子, 松寄くみ子. 子どもの QOL 尺度その理解と活用—心身の健康を評価する日本語版 KINDL^R. 診断と治療社. 2014.
- 5) 文部科学省. 平成 28 年度学校保健統計調査報告書. <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?bid=000001081418&cycode=0>
- 6) 文部科学省. 平成 27 年度学校保健統計調査報告書. <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?bid=000001077238&cycode=0>

複数の振動フィンを組み合わせた二次元推力偏向機構に関する実験的研究

津山工業高等専門学校 細谷 和範
広島大学大学院工学研究科 尾形 陽一

本研究では往復振動する弾性ヒレを持つヒレ推進機を並列及び千鳥状に接続し、各ヒレが作り出す流れの干渉による推力の偏向や推力の向上が可能かどうか水理実験により調べた。長さ 30 cm の魚型ヒレ推進機を製作して推進速度と推力の比較を行った結果、二体の推進機を千鳥状に配置することで $1.5^\circ/\text{s}$ 程度の推力偏向が見られたほか、ヒレ後流に帯状の流れが発達するとともに推進効率も向上することがわかった。また三体の推進機を千鳥状に接続した場合は前方 2 体、後方 1 体のケースよりも前方 1 体、後方 2 体の配置で推力が向上しやすいことがわかった。ヒレ後流のパターンは前方 1 後方 2 の配置ケースで後方に伸びる帯状の流れパターンが確認されたのに対し、前方 2 後方 1 のケースでは左右に流れが拡散するパターンが見られた。このような配置にともなう推力向上のメカニズムはこの流れパターンが大きく影響しているものと考えられる。三体接続時の推力偏向については魚体を不等間隔に配置することで可能とみられるが、コンパクトな推進機を実現するためには三つのヒレのうち一つを停止する等の工夫も効果的と考えられる。

1. はじめに

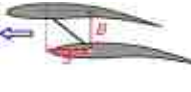
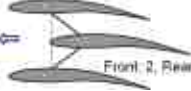
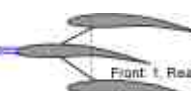
水深が 1m 未満の極浅海域や河川などで小型船舶や ROV (Remotely-Operated Vehicle) を運用する場合、推進機が水底面と接触する恐れがある他、底泥の巻き上げ、繁茂する植物等の巻き込みや水生生物の殺傷が心配される。現在水中推進機はスクリュープローペラが多く用いられているがこれに代わる安全な推進方法の一つとして弾性振動翼（ヒレ）を持つ推進機構がこれまでに数多く研究されている。しかしながらヒレ推進機の推進効率は低く、魚型ロボットを例にとるとわずか数%であり^[1]、70%前後の推進効率を有するスクリュープローペラに遠く及ばない。このヒレ推進機の推進効率を向上させる手法として、複数魚体を接続し後流を干渉させて推進効率を向上される試みが行われている。群れをなして遊泳する魚群の遊泳形態と推進効率の関係の解明についてはいくつかの研究がなされており、水路内に生きた魚とロボット魚を泳がせる実験^[2]では魚がロボット魚に対して千鳥状の位置を維持することが報告されている。また並列に配置された魚群が発生する推力を数値シミュレーション (CFD) や水理模型実験により評価する試みも行われている。Dong ら^[3]は二次元モデルを用いて二体と三体の魚体モデルによる並列配置の魚体運動の推算を行い、各魚体に同期した動き

を与えたケースでは消費エネルギーは抑えられるものの抗力が大きくなり、逆位相の動きを与えたケースでは消費エネルギーが増大するものの推力向上が見込めることを報告している。田中ら^[4]は二次元及び三次元の二魚体モデルを用いて並列配置と千鳥配置における流れと推力・抗力係数を推算し、並列配置よりも千鳥配置の方が大きな推力を発生しやすく、魚体間隔 S を体長 L で割った無次元数 S/L が 1、取り付け幅 B を体長 L で割った無次元数 B/L が 0.3 の条件で単独のケースに比べ運動効率が向上することを示した。一方で S/L が 0 (並行) のケースでは逆に推力は減少し、単独魚に比べ 10%ほど低下する結果を示している。Deng ら^[5]は Dong らが行った並列三体の魚モデルを前方 2 匹、後方 1 匹の千鳥状に配置して数値実験を行い、上流側の魚体からの流れと渦により後流側の魚体への投入エネルギーが減じ、ある範囲の間隔に設定することで推進効率が向上することを示している (ただし推算された推進効率は単一魚体の推進効率と大きく変わらないようである)。細谷ら^[6]は弾性ヒレによる水理実験を行い、二体の推進機を水槽内に並列及び千鳥状に固定して推力測定と PIV 計測を行い、千鳥状に配置することで推力が向上することを示した。この千鳥配置の流れ場は前方のヒレが作り出す速い流れが後流側のヒレを介

して帯状に発達する特徴が見られ、数値シミュレーションによる結果^[3]と整合している。以上の配置と推力の特徴を大雑把に整理した表を表 1 に示す。並列配置は単体魚体に比べて大きな推力向上は見込めず、ヒレ同士の動きが半周期ずれたものは推力が低下する傾向にある。一方で千鳥状に配置した場合、二体のケースでは帯状の速い流れとともに大きな推力が発生する。しかしながら、三体のケース（前 2・後 1）では特段大きな推力が得られないようである。なお三体のケースでは前 1・後 2 の配置については十分に調査がされておらず、流れの干渉による推力特性や推力偏向については不明である。このように魚型のヒレ推進機は魚体間隔や各推進機の駆動周期の位相差を調整することで大きな推力が得られる可能性があり、極浅海域で運用できる効率の良い推進機の実現が期待できる。

本研究では推力特性が不明な千鳥配置（前 1・後 2）を含め、三体のヒレ推進機の推力特性ならびに後流パターンを実験的に調べ、推進効率の向上が期待できる配置を把握したのち推力偏向方法を考察した。さらに本研究では二次元または三次元モデルで計算される CFD と水理模型実験との整合性を向上させるために 2D モデルに近い平面翼形状のヒレ推進機と魚を模した流線形のヒレ推進機を試作し、二体による推力について CFD 結果と水理実験を比較した。

Table 1 Estimated propulsive performance

	Parallel		Staggered
	 Dong et al.[2], Tanaka et al.[4], Hosotani et al.[3]		 Dong et al.[2], Tanaka et al.[4], Hosotani et al.[3]
	 Dong et al.[2]		 Front: 2, Rear: 1 Deng et al.[1]
	 Dong et al.[2]		 Front: 1, Rear: 2

2. 実験装置と実験方法

往復振動する弾性ヒレ推進機の外観と配置パラメータを図 1 に駆動条件を表 2 にそれぞれ示す。ヒレ

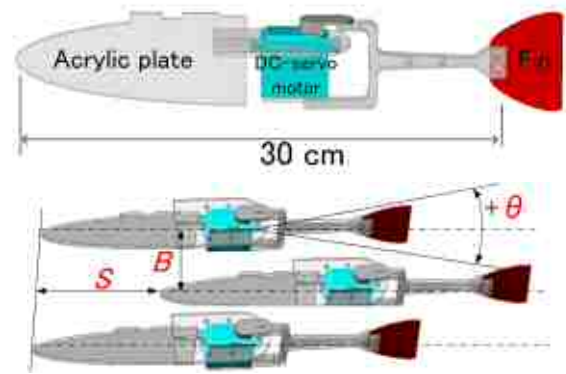


Fig. 1 Developed fish-like fin propulsor and arrangement

Table 2 Experimental setting

Swinging angle θ	± 15 degree
Rotating speed V_θ	6.16 rad/s,
Wagging Frequency f	1.7 Hz (Synchronized)
Swimming Number S_w	0.3
Gap space S	0mm, 20mm, 40mm
Width B	50 mm
Tested Fin	PP plate (t :1mm, A : 3.43cm ²)

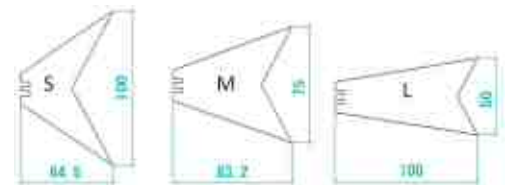


Fig. 2 Tested fins

は DC サーボモーターによって駆動され、胴体（整流板）から尾部までの長さは 30 cm であり、図 2 の各形状の尾ヒレをつけると 37 cm～40 cm の長さとなる。推進機はウレタンフォーム製のフロートに固定される。この実験ではサーボモーターは $\theta = \pm 15^\circ$ の間で往復運動させた。遊泳速度は長さ 2m、推進 15cm の水槽内に設けた 30cm の標点間距離を通過する時間から求められ、推力はバネ秤を用いて目視により測定した。また電力計による消費電力と推進にかかる仕事量から推進効率を求めた。後流の PIV 計測はヒレ後方の水平断面（8cm × 11cm の範囲）を 300fps の高速カメラで撮影した。トレーサは $\phi 0.1\text{mm}$ のセルローズ粒子を用い、カメラを斜め上方に設置して後方散乱光による高輝度の粒子画像を撮影した。

3. 結果と考察

3.1 ヒレ形状の違いによる推進速度

単体の推進機に図 2 のヒレを取り付けて推進速度

を比較した。この結果、最も長いヒレ（L タイプ）が 15 cm/s と大きい結果を得たことから以後の実験では L タイプのヒレを用いた。

3.2 複数の推進機を組み合わせた場合の推進性能

二体及び三体のヒレ推進機を接続し、 $S=0$ mm（並列）、 $S=20$ mm、40 mm（千鳥配置）に配置し、標点間距離を進む平均速度と推力を測定した。実験の様子を図 3 に、平均速度およびバネ秤で測定した推力と推進効率を図 4 に示す。平均速度が最も大きいのは二体では魚体間隔 $S=40$ mm の千鳥配置のケースで約 7 cm/s の速度を示し、三体では前 1 後 2 の千鳥状に配置した $S=40$ mm の間隔を取ったケースで約 19 cm/s の速度を示した。二体のケースでは並列配置 ($S=0$ mm) と比較して 7.6%，三体では前 1 後 2 のケースで 14.8% 推進速度が向上したが同じ三体でも前 2 後 1 の千鳥配置のケースは並列配置に比べて 5.6% の速度増加に留まった。三体のケースでは船体は直進したが、二体では千鳥配置のケースで推力偏向により 1.5° /s 程度で旋回しながら進行した。図 4 の推力について、二体のケースでは魚体間隔に伴う推力差は見られず、三体のケースでは千鳥配置に伴い、平均推力の増加が見られたが、前後の魚体数に伴う差は見られなかった。ただし本実験では値が激しく変動する魚体の推力はバネ秤を用いて測定したために目測の誤差も大きいことから魚体配置に伴う推力差が十分に現れなかった可能性もある。推力と速度、消費電力量から求められる推進効率についてみると単一魚体の推進効率は 0.32% であり、二体及び三体の最大推進効率は魚体間隔 $S=40$ mm で 1.35% および 2.88%（前 1・後 2 のケース）を示し、並列時 ($S=0$ mm) に比べて二体で約 8%，三体で約 27% 向上した。このように千鳥状の配置が速度と推力の向上に寄与することが確認された。

ここまでの実験結果はヒレ推進機をウレタン製のフロートに付けて遊泳させながら実験を行ったもので魚体間隔を大きく取れない。そこで魚体をアルミフレームに固定して水槽壁面に懸架し、フォースゲージで平均推力を測定した結果を図 5 に示す。この実験では魚体間隔を魚体長さ ($L=30$ cm) で除した S/L を 0.1～0.5 に幅 B/L を 0.1～0.3 に変化させた。こ



Fig. 3 Test scene

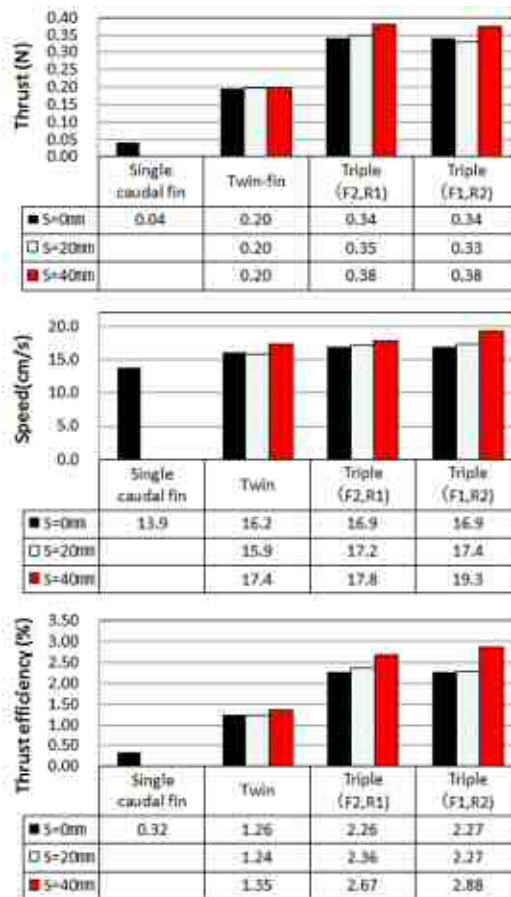


Fig. 4 Averaged thrust of schooling fish model

の結果、前 1・後 2 の配置で S/L は 0.25 までの小さい範囲で推力が大きく、前 2・後 1 の配置では $S/L=1$ 付近で推力が向上することがわかった。これらの結果に対し、図 6 に示す三次元の数値シミュレーションで得られた流れのパターン（圧力及び第二不変量のコンター）と図 7 に示す推力の程度を示す抗力係数（小さい程推力が大きい）を見ると、前方魚体の抗力係数は間隔 S/L が小さいと単魚体よりも大きく、後方の魚体の抗力係数は単魚体時と比較して減少し、トータルで見ると単一魚体よりも抗力係数が小さい（推力が大きい）のは S/L が 1 の時であり水理実験結果と異なる。ただし、CFD では水理模型実験で推力が大きかった $S/L=0.1$ 付近の計算を行っていない

ことから今後検証が必要である。複数魚モデルはヒレの駆動周期に依存する放出渦の干渉が影響するが、これらの実験では周期や魚体形状が一致していないことも今後の課題である。

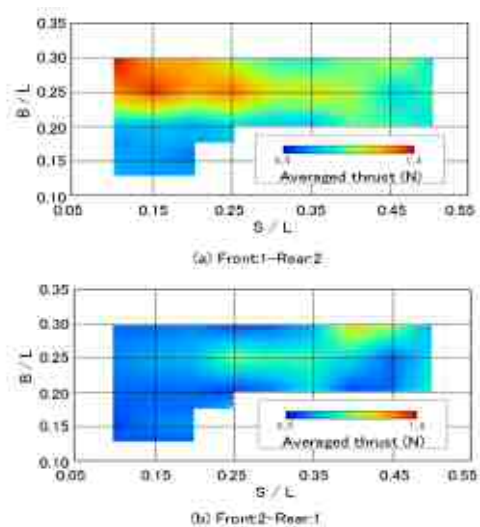


Fig. 5 Thrust distribution on staggered arrange

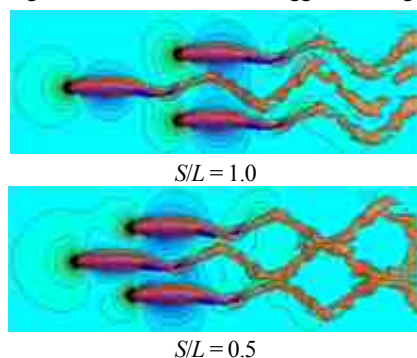


Fig. 6 Simulated flow around the fish school^[7]

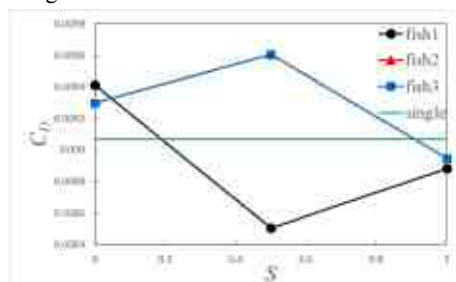


Fig. 7 Drag coefficient C_D vs Distance

3.2 PIV によるヒレ後流の流れ場

PIV 計測によって得られたヒレ後流の 10 周期平均の流速分布を図 8 に示す。ここで PIV 計測は斜め 45° から撮影した画像を用いて解析を行ったが、原図の台形補正は行っていないため、図の下側（手前側）の流速が大きくなる傾向を示すことに留意する必要がある。図 8(a) の単一魚体のケースでは 60 cm/s 程の流速を示す領域が二方向に広がっていることがわ

かる。これはヒレが往復運動する際に発する強い流れが左右に広がるように移流していることを示す。一方、図 8(b) に示される二魚体では $S = 40 \text{ mm}$ ($S/L = 0.13$) で帯状の流れが見られ前方のヒレから発せられる速い流れが後方のヒレを介して後方に続いている。三体による図 8(c) と図 8(d) は両者とも千鳥配置 ($S = 40 \text{ mm}$) の結果であるが、前後のヒレの配置数に伴って流れ場が大きく異なり、前 2 後 1 のケースでは単一魚体と同様に早い流れが二方向に拡散しているのに対して前 1 後 2 のケースでは二体のケースに類似した帯状の流れパターンが確認できる。この帯状のパターンは推力向上に寄与しているものと考えられ、前方のヒレ周囲から後方にかけて負圧場が発達しているものと推測される。負圧場の形成は渦の干渉状況を見ることで推測が可能であるが、本 PIV 実験においては時間・空間分解能の不足から十

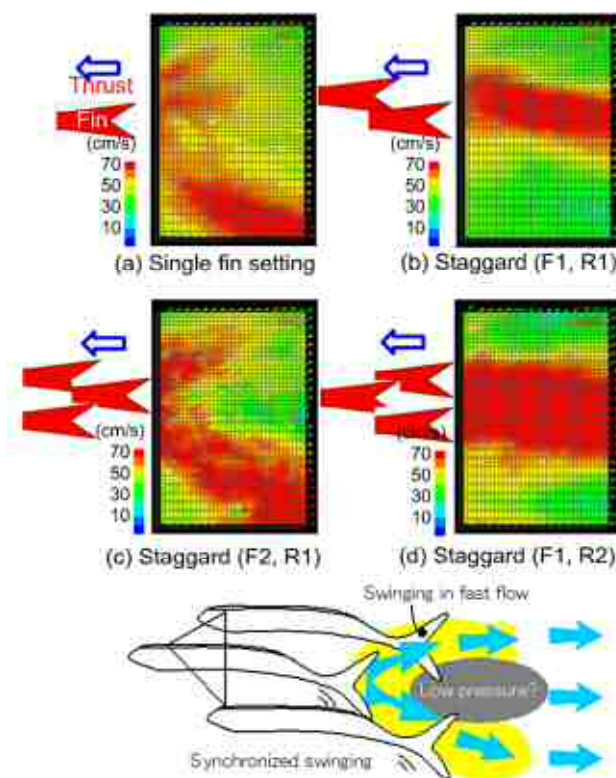


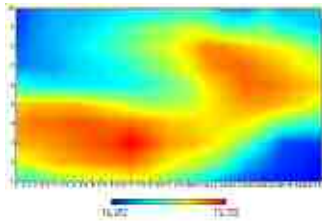
Fig. 8 Propulsion of schooling fish model

分に把握することができなかった。

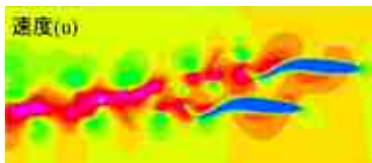
4. 推進効率の向上と推力偏向

これまでの研究から二体のヒレ推進機を千鳥状に配置することで推進効率の向上に加えて推進方向が

偏向することがわかった^[4,6] (図9)。しかしながら三体の推進機の場合、推進効率の向上を図りながらの推力偏向は難しく、CFDにより三体の推進機を不等間隔に配置することで推力が二体接続時と同程度の偏向が確認された^[7]。しかしながら図1の試験推進機は魚体間隔 S/L を大きくとることができないことや水槽の大きさの制限から不等間隔に伴う推力の変化を水理実験により把握することはできなかった。船舶の推進機に三体のヒレ推進機を搭載する場合は魚体間隔 S/L をあまり大きく設定できないことから、推力偏向の制御は千鳥状に配置されたヒレ推進機（前1・後2）のうち後方の1体を停止して推力方向を制御する方法が適しているかもしれない。



PIV result (PCA detected dominant flow pattern)



Numerical simulated flow pattern (Two-fin model)
Fig. 9 Flow pattern which performs thrust deflection

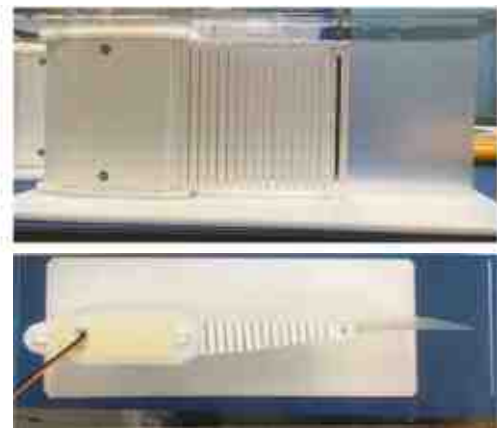
5. 数値実験との整合を目指した魚型ヒレ推進機

本研究では弾性フィンを持つ魚型推進機を用いて魚体間隔と推力との比較や後流の可視化を行ったが大きな課題の一つとして水理実験用の推進機とCFDの魚体モデルの形状や動きに違いがあり、推力向上の法則性やメカニズムの解明が十分に行えていないことが挙げられる。移動格子を用いたCFDモデルは魚体の正弦波状の動き作りだすことができる一方で流れに受動的に変形する弾性ヒレの運動を再現することは容易でない。過去に行われた数値シミュレーションでは計算にかかる負荷等の理由から従来は二次元計算による報告が多かったが二次元計算と三次元計算の違いが水理実験ではどの程度の違いがあるか不明であった。そこで本研究では数値シミュレーションと整合をとりやすいコンパクトな水理実

験用ヒレ推進機として剛体フィンを有し、胴体がしなやかに動作する三次元形状の魚体と、平面翼形状の推進機を試作し、これらの推力の違いを調べた。

5.1 実験装置と実験条件

製作した三次元形状モデルと平面翼形モデルの仕様と概観を表3と図10に示す。長さはどちらもおよそ30cmであり、三次元モデルのヒレとして図2の三種類を与えた。胴体の駆動モーターは1個で行い、ワイヤーで尾部を引くことで胴体の揺動させる。ヒレは流れに対して受動的に変形しないよう弾性率の低いポリプロピレン製とすることでヒレ角は流体抵抗に応じて受動的に変化するが、しなることはない。ヒレの取付け部には角度を制限するストッパーを設けており、ヒレは中心軸に対して $\pm 15^\circ$ の範囲で可動である。平面翼モデルの翼幅は10cmであり翼端には平板状の整流板を設けている。水理実験は長さ1mの水槽内に設置したスライドルール上に推進機を取り付け、フォースゲージにて推力を測定した。推進機は単体及び二体接続したものをを用いた。尾部をワ



Plane wing type



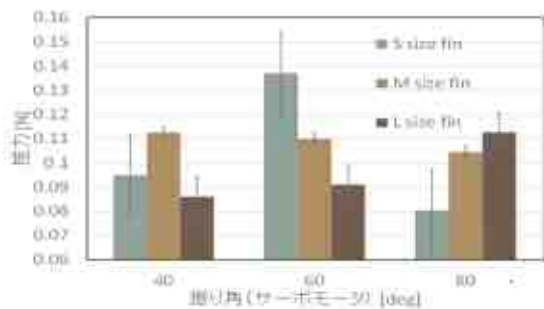
3D fish type

Fig. 10 Developed fish type fin propulsor

Table 3 Specification

Servo motor angle θ_s	$\pm 40^\circ \pm 60^\circ \pm 80^\circ$
Rotating speed V_θ	5.82 rad/s,
Swinging cycle f	0.5
Length L	288 mm

イヤーで牽引するサーボモーターの振り角は $\theta = \pm 40^\circ, \pm 60^\circ, \pm 80^\circ$ で駆動周期は約 2 秒（尾部を振り切ってから 0.8 秒の待ち時間を設けた）とした。二体接続時の取付幅 B/L は 0.4 とし、魚体間隔 S/L は 0（並行）～1.0 とした。なお三次元モデル用のヒレ形状は単体の推力が振り角によって大きく変化しなかった M タイプを使用した（図 11）。



5.2 実験結果

サーボモーターの回転角 80° （尾部振り角はおよそ 45° ）における 10 サイクルの平均推力を図 12 に示す（図では平面翼モデルを 2D モデルと記述）。概して三次元モデルの推力が大きく、魚体間隔 S/L が 0.8～1 で推力が大きいが、平面翼モデルでは $S/L=0.2$ で三次元モデルと同程度の 0.15N の推力を発揮している。数値シミュレーションによる間隔と推力の関係は二次元モデル、三次元モデルとも S/L が 1 に近づくにつれて抗力係数が小さく（推力が大きくなる）なり水理実験結果と整合するが、数値シミュレーションでは二次元モデルの推力が大きくなる傾向を示したのに対して本実験では逆の傾向を示した。

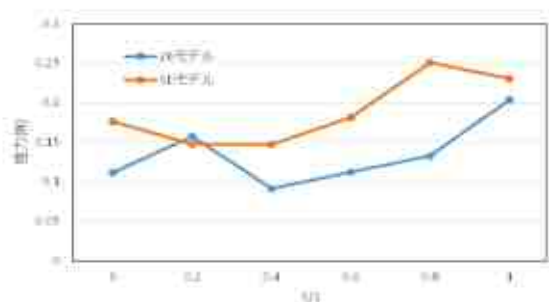


Fig. 12 Comparison of 2D model and 3D model

6. おわりに

弾性板のヒレを有する二体及び三体のヒレ型推進

機を並列及び千鳥状に配置し、推進速度と推力の比較を行った結果、三体の前 1・後 2 のケース ($S=40$ mm, $S/L=0.13$) で推進速度が最大となり、推力実験でも千鳥配置のケースで大きな推力が得られた。PIV 計測によるヒレ後流の流れパターン千鳥状配置のケースにおいて前方のヒレから後方のヒレを介して後方に伸びる帯状の流れパターンが確認された。一方で三体接続の場合は前 1・後 2 で帯状の流れであったのに対して前 2・後 1 のケースでは左右に流れが拡散するパターンが得られ、流速分布が推力と関係していることを示唆する結果を得た。推力偏向については二体のケースで $1.5^\circ/s$ 程度の偏向が見られたが三体のケースでは魚体を不等間隔に変更するなどの工夫が必要であることが CFD により推算された。しかしながら水理実験では実験装置の限界により確認はできなかった。小型船舶などの実用上は前 1・後 2 の配置のヒレのうち 1 つを停止することで推力方向を制御する方法が適しているかもしれない。本研究ではさらに二次元または三次元で行われる CFD と水理実験との整合性を評価するため、三次元形状の魚体モデルと平面翼状の魚体モデルによる推力特性を評価した。この結果、水理実験においても数値シミュレーションと同様に魚体間隔が大きくなるにつれて推力が向上するが、CFD では二次元モデルの方が三次元モデルよりも推力が大きくなる傾向を示しているのに対して水理実験は逆の傾向を示した。

文 献

- [1] 池田洋平, 田尻智紀, 高田洋吾, 各アクチュエータの位相差と尾ひれの素材が魚ロボットの推進に及ぼす影響, ロボティクス・メカトロニクス講演会(ROBOMECH2013), 1A1-B06, 2013.
- [2] Stefano Marras, Maurizio Porfiri, Fish and robots swimming together: attraction towards the robot demands biomimetic locomotion, J. The Royal Society Interface 9 (73), 1856-1868, 2012.
- [3] Gen-Jin Dong, Xi-Yun Lu, Characteristics of flow over traveling wavy foils in a side-by-side arrangement, Physics Fluids, 19057107, 2007.
- [4] 田中千智, 尾形陽一, 西田恵哉, 群魚推進に及ぼす後流渦列挙動の数値的考察, 機械学会中国四国支部第51期総会・講演会, 1106, 2013.
- [5] Deng Jian, Shao Xue-ming, HYDRODYNAMICS IN DIAMOND-SHAPED FISH SCHOOL, Conference of Global Chinese Scholars on Hydrodynamics, 2006.
- [6] 細谷和範, 石井貴之, 小林大輝, 並列に配置された弾性振動翼の推力特性に関する実験的研究, ロボティクス・メカトロニクス講演会2013 (ROBOMECH2013, 京都), 2S1-C06(1)-(4), 2013.
- [7] 松原聡汰, 尾形陽一, 安藤祥汰, 細谷和範, 泳動魚群周りの流れ場と流体力の相関に関する数値解析および実験的研究, 第30回数値流体力学シンポジウム, 2016.

I C Tを活用した有害野生獣の捕獲システムの開発

津山工業高等専門学校

鳥家 秀昭

(概要)

有害野生獣による農林業の被害対策として、猟友会メンバー（捕獲従事者）の作業負担の軽減を目的として I C Tを活用した有害野生獣の捕獲システムを構築し、遠隔監視・制御装置を使用して捕獲実験を実施している。本研究では、新たに製作したゲート閉鎖情報送信装置を檻に設置し、猟友会メンバーの協力により野生獣の捕獲実験を行って有用性を検証したので報告する。

(本文) 1. 背景・目的

全国各地で有害野生獣による生活環境、森林の生態系あるいは農作物の被害が深刻化し、農家の意欲減退や耕作放棄地の増加などの問題が顕著になっている。また、猟友会メンバーの（捕獲従事者）の減少や高齢化とあいまって被害地域は年々広域化しており、有害野生獣の駆除・対策は容易ではない。複数頭捕獲を狙って I Tを活用した檻のゲート制御装置が市販されている⁽¹⁾が、高価で操作方法も複雑であるため普及し難いと思われる。

2. I C Tを活用した有害野生獣の捕獲システム

本研究はイノシシの捕獲従事者の作業負担を軽減し有害野生獣の駆除を促進することを目的とする。

捕獲従事者は20～30カ所に檻を設置する。このため、多数の檻の管理や捕獲成功した檻の特定が煩雑である。また、捕獲した野生獣は速やかに仕留め（「止めさし」）および処分の作業が不可欠である。そこで、図1に示すような I C Tを活用した有害野生獣の捕獲システムを構築し、猟友会の協力を得て研究を遂行している⁽²⁾。具体的には下記のとおり。

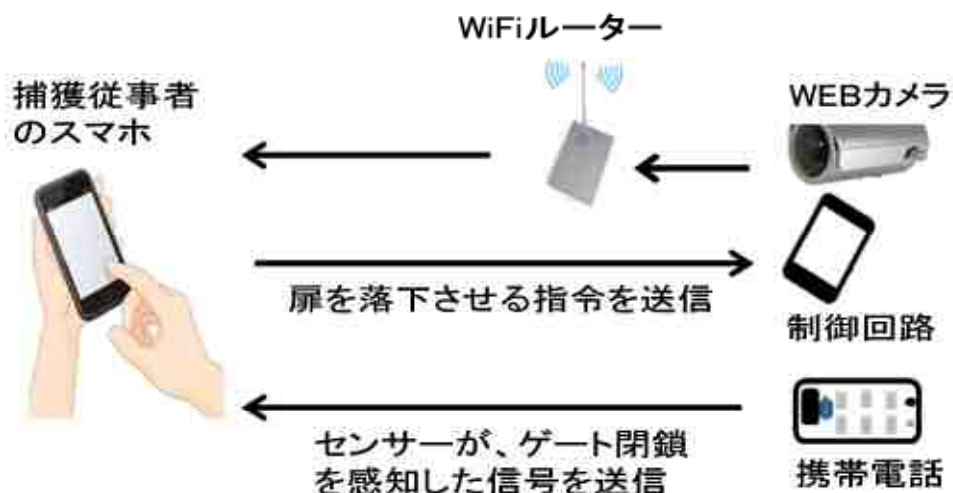


図1. I C Tを活用した有害野生獣の捕獲システムの概念図

- (1) 檻の設置場所から遠隔地にいる捕獲従事者の携帯電話等の情報端末に檻のゲートが閉鎖した情報を送信して捕獲した檻を特定する。
- (2) WEBカメラで撮影した画像を捕獲従事者の情報端末に送信して捕獲成功した有害野生獣の種類・頭数を確認する。

3. 有害野生獣の捕獲実験

有害野生獣の捕獲実験に使用した装置（機器）と実験方法について述べる。WEBカメラ、携帯電話、制御回路（蓄電池）およびソーラーパネルを捕獲檻に設置する。WEBカメラの画像を遠隔地の捕獲従事者に伝送するために、インターネット環境（Wi-Fiルーター）を構築する。

一方、猟友会メンバーに、有害野生獣の捕獲檻の設置、あるいは、「捕獲」、「止めさし」および「廃棄処分」等の作業について、協力していただいた。

(1) 有害野生獣の捕獲檻（囲いさく）

図2に有害野生獣の捕獲檻を示す。檻の概略サイズは縦×横×高さが400×400×250 [cm]で、檻のゲートは幅が95 [cm]、高さが60 [cm]である。

(2) 遠隔監視・制御装置⁽³⁾

檻の設置場所には商用交流電源がないため、電源としてソーラー発電と蓄電池を使用した。光電センサを使用して、蓄電池の節電を図った。

図3に制御回路を示す。遠隔監視を行うために、WEBカメラで撮影した画像を遠隔地に伝送する。そこで、Wi-Fiルーターをレンタル契約⁽⁴⁾して無線インターネット環境を構築した。

図4に檻のゲートをワイヤで吊上げて開閉する器具を示す。有害野生獣の「捕獲」は、WEBカメラの画像を見て檻内を確認した後、遠隔制御用の情報端末を用いてゲート閉鎖指令を送信する。



図3. 制御回路（蓄電池，Wi-Fiルーター）



図2. 有害野生獣の捕獲檻



図4. ゲートの開閉器具



図5 (b) ゲート閉鎖情報の送信装置

(3) ゲート閉鎖情報送信装置

檻の設置場所から遠隔地にいる捕獲従事者の携帯電話に捕獲檻のゲートが閉鎖したことを通知することにより捕獲従事者の作業負担を軽減する。図5(a)にゲートが閉鎖した情報送信装置の構成(ブロック図)を示す。

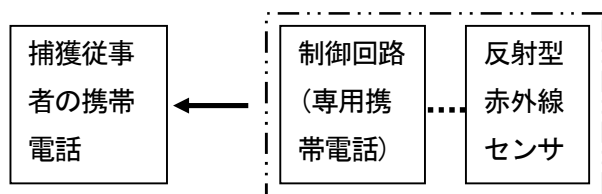


図5 (a) ゲート閉鎖情報送信装置の構成

反射型赤外線センサがゲートの閉鎖を検知すると、この装置の内部に収納している携帯電話から捕獲従事者の携帯電話に通知する。具体的には、反射型赤外線センサの出力をリレー回路の入力信号として用い、約1分程度で携帯電話に登録した番号にDTL信号を送信する。

図5(b)に捕獲檻に設置したゲート閉鎖情報の送信装置を示す。概略サイズは、縦×横×厚さが20×16×5[cm]である。捕獲実験の初期段階でゲート閉鎖情報の送信装置に不具合が発生して捕獲従事者の携帯電話にゲート閉鎖情報が誤送信された。

この原因を調査した結果、捕獲檻のゲートを開放した状態でクモが巣をつくり、これを反射型赤外線センサが検知してゲートが閉鎖したと認識したと推

測した。

そこで、檻の設置場所に行き、捕獲従事者と対策を協議し、ゲート閉鎖情報の送信装置を、クモが巣を作り難い所に移動して改善した。

(4) 捕獲実験の結果

降雪期になると野生獣が檻に近づくようになったので檻内に餌を置いて捕獲を開始した。

図6(a)に捕獲した野生獣のWEBカメラの画像を示す。その後、WEBカメラの画像で檻に進入した野生のシカを確認した。そこで、遠隔制御装置を用いて檻のゲートの閉鎖指令を送信すると、捕獲従事者の携帯電話に着信があった。捕獲従事者はゲートが閉鎖したと判断して檻の設置場所に行き、「止めさし」の作業を行った。

図6(b)に「止めさし」の作業を実施した後の檻内の様子を示す。



図6 (a) 捕獲した野生のシカの画像



図6（b）「止めさし」作業後の檻内の様子

4. まとめと今後の課題

農山村地域の有害野生獣による被害対策のためにICTを活用した有害野生獣の捕獲システムの開発に取組み、猟友会メンバー（捕獲従事者）の協力により野生のシカの捕獲実験を行っている。

本研究では、「捕獲」作業あるいは檻の管理の負担軽減を目的としてゲート閉鎖情報の送信装置を製作し、これを設置した檻を用いて野生獣の捕獲実験により有用性を検証した。

今後は、捕獲従事者の作業負担をより軽減するために自動捕獲装置の開発に展開する。これにより猟友会メンバーの意欲向上ならびに有害野生獣の駆除数の増加に貢献したい。

参考文献

- (1) 例えば、(株) 一成
- (2) 鳥家他，平成 26 年度（財）ウエスコ財団研究成果報告書
- (3) 鳥家他，平成 28 年度（社）電気設備学会全国大会講演論論文（平成 28 年 9 月 6 日）
- (4) 例えば，UQ コミュニケーションズ（株）

謝辞

本研究の遂行において、研究費を助成していただいた（財）ウエスコ学術振興財団に深く感謝いたします。

青枯病菌エフェクターを利用したトウガラシ育種技術の開発

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

中野 真人

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) はナス科作物を中心に様々な植物に病気を引き起こす土壌伝染性の植物病原細菌である。本菌は宿主への感染を成立させるために、エフェクターと呼ばれる分泌タンパク質を植物細胞内に注入し、免疫応答を攪乱する。青枯病に対して有効な防除方法は確立されておらず、農薬を用いた化学的防除や輪作による耕種的防除の効果が限定的であることから、抵抗性品種の開発が求められている。そこで、青枯病抵抗性をもつトウガラシを探索したところ、宿主範囲の異なる複数の青枯病菌株に対して抵抗性を示すトウガラシ野生系統を見出した。本トウガラシの抵抗性は植物ホルモンの一種であるサリチル酸情報伝達経路を介して誘導された。また、青枯病菌の全エフェクターレパートリーの中から当該トウガラシに過敏感細胞死を誘導するエフェクターを特定した。

1. はじめに

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) はナスやトマトをはじめ、200 種以上の植物に病気を引き起こす植物病原細菌である。本菌は土壌深部や水中で生存し、根の自然開口部や傷口から植物内に侵入すると維管束内で増殖しながら全身に広がり、最終的に植物を枯死させる。

植物は病原微生物の感染から身を守るために高度な免疫系を発達させている。植物は細胞膜上の受容体により微生物の構成成分を感知し、活性酸素種の生成、MAP キナーゼの活性化、カロースの蓄積などの一連の防御応答を誘導する (Couto and Zipfel, 2016)。一方、病原菌は宿主の防御反応を乗り越えて感染を成立させるために、特殊な分泌装置により自身のタンパク質を宿主の細胞内に注入する。このような分泌タンパク質はエフェクターと総称されており、病原細菌の主要な病原因子として機能する。日本で分離された青枯病菌 RS1000 株は約 70 種類のエフェクターを植物細胞内に注入することが報告されている (Mukaihara *et al.*, 2010)。青枯病菌のエフェクターは Rip (*Ralstonia injected protein*) と呼ばれており、その多くが既知の機能ドメインをもたないことから、病原性機構における役割は未解明である。

エフェクターは病原菌の病原因子として機能する

だけでなく、抵抗性植物において非病原因子 (Avr) としても機能する。植物は抵抗性タンパク質と呼ばれる細胞内受容体により Avr エフェクターを感知し、細胞死をとまう非常に強い防御反応 (過敏感反応) を誘導する。この反応は抵抗性遺伝子の存在を示す指標となるため、Avr エフェクターを利用して抵抗性育種選抜を実施できると考えられる。本研究では、青枯病抵抗性をもつトウガラシを探索するとともに、見出した抵抗性植物が認識する青枯病菌の Avr エフェクターを同定したので報告する。

2. 結果と考察

トウガラシ野生系統が有する強度青枯病抵抗性の解析

青枯病抵抗性を有するトウガラシを探索するために、国内外から入手したトウガラシ系統に青枯病菌を接種し、青枯病菌の感染時に誘導される萎凋症状の進展を観察した。国内で食用に栽培されているトウガラシ系統 S1~S3 は青枯病菌接種 7 日後に枯死し、青枯病抵抗性が認められなかった (図 1)。一方、東南アジア由来のトウガラシ野生系統 R では萎凋症状の進展が顕著に遅延し、青枯病菌に対して非常に強い抵抗性を示した。また、本トウガラシ野生系統 R は我々が所有している全ての青枯病菌株に対して強度抵抗性を示したことから、青枯病抵抗性遺伝子資

源として利用価値が高いと考えられる。



図1. 各種トウガラシ系統の青枯病抵抗性
トウガラシ栽培系統S1～S3および東南アジア野生系統Rに青枯病菌を接種し、7日後に病徴を観察した。

本トウガラシ野生系統 R が有する抵抗性メカニズムを明らかにするために、青枯病菌を接種した栽培系統 S1 と野生系統 R から継時的に mRNA を単離し、リアルタイム PCR を用いて防御関連遺伝子の発現パターンを解析した。野生系統 R では、栽培系統 S1 と比較して解析した全ての防御関連遺伝子が速やかに発現するとともに、長く持続することが明らかになった (図 2)。野生系統 R において発現量が増加した防御関連遺伝子、*CaPR1*、*CaPR10* および *CaSAR8.2A* はいずれもサリチル酸情報伝達経路のマーカー遺伝子であることから、野生系統 R の強度青枯病抵抗性にサリチル酸が関与すると考えられた。そこで、ウイルス誘導ジーンサイレンシング法を用いてサリチル酸生合成遺伝子をノックダウンした野生系統 R を作出し、青枯病菌に対する抵抗性を調べた。本ノックダウントウガラシは青枯病菌接種 5 日後に全ての個体が枯死し、強度青枯病抵抗性を示さなかった (データ不掲載)。これらの結果から、野生系統 R の強度青枯病抵抗性はサリチル酸情報伝達経路を介して誘導されることが明らかになった。抵抗性遺伝子 *RRS1-R* による青枯病抵抗性はサリチル酸の蓄積を必要とすることが知られている (Deslandes *et al.*, 2002)。従って、野生系統 R の強度青枯病抵抗性がサリチル酸情報伝達経路に依存するという結果は、強度抵抗性に関わる抵抗性遺伝子が本トウガラシに存在するという可能性を示唆している。

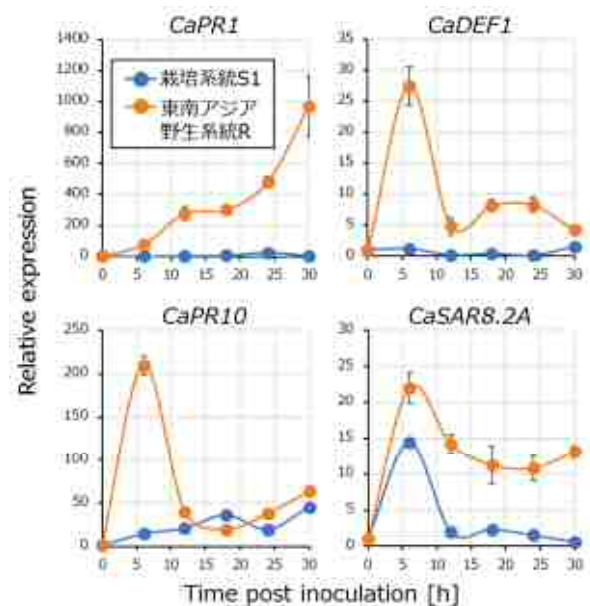


図2. 防御関連遺伝子の発現パターン

トウガラシ栽培系統S1および東南アジア野生系統Rに青枯病菌を接種し、防御関連遺伝子の発現を継時的に解析した。

トウガラシ野生系統が認識する青枯病菌エフェクターの同定

トウガラシ野生系統 R の本葉に青枯病菌を接種すると細胞死を伴う過敏感反応が誘導された。この反応はエフェクターを注入できない青枯病菌変異株の接種では認められないことから、青枯病菌が分泌するエフェクタータンパク質によって誘導されると考えられた (データ不掲載)。そこで、過敏感反応を誘導する青枯病菌のエフェクターを同定するために、アグロバクテリウムを用いて野生系統 R の本葉で各エフェクターを発現させ、過敏感反応の有無を観察した。青枯病菌 RS1000 株の全エフェクターレポーター約 70 種類について調べたところ、過敏感反応を誘導するエフェクター (AvrC) を 1 種類見出した (図 3)。AvrC はタバコやナスなど、他のナス科植物において過敏感反応を誘導しないことから、トウガラシ特異的な Avr エフェクターであると考えられる。青枯病菌のエフェクター RipP1 および RipAA はタバコの本葉で過敏感反応を誘導することが報告されている (Poueymire *et al.*, 2009)。また、RipAX2 はナスが認識する Avr エフェクターとして同定されている (Nahar *et al.*, 2014)。しかしながら、これらのエフェクターを野生系統 R の本葉で発現させても過敏

感応は誘導されないことから、野生系統 R は新規の抵抗性タンパク質を有すると考えられる。



図3. エフェクター発現時の過敏感細胞死
東南アジア野生系統Rで空ベクター (EV) と青枯病菌エフェクターAvrCを発現させた。

3. まとめ

本研究により、強度青枯病抵抗性を有するトウガラシ野生系統 R を見出すとともに、この抵抗性がサリチル酸の蓄積を必要とすることを明らかにした。また、青枯病菌がもつ約 70 種類のエフェクターの中から、当該トウガラシに過敏感反応を誘導する Avr エフェクターを同定した。今後、このエフェクターを利用してトウガラシ野生系統 R の交配後代において強度抵抗性遺伝子を特定する。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人ウエスコ学術振興財団の支援を賜った。ここに記して感謝の意を表する。

5. 参考文献

- Couto and Zipfel (2016) Nat Rev Immunol. 16(9): 537-52.
- Mukaihara *et al.* (2010) Mol Plant Microbe Interact. 23(3):251-62.
- Deslandes *et al.* (2002) Proc Natl Acad Sci U S A. 99(4):2404-9.
- Poueymiro *et al.* (2009) Mol Plant Microbe Interact. 22(5):538-50.
- Nahar *et al.* (2014) Mol Plant Pathol. 15(3):297-303.

細胞内グルタチオン上昇活性に着目した酒粕加水分解物の肝障害抑制作用と そのメカニズムの解明

就実大学 薬学部

川上 賀代子

グルタチオンは生体内で産生される抗酸化物質であり、酸化ストレスに対する防御をはじめ、毒物や薬物の解毒など様々な生理作用を有している。よって、グルタチオンの細胞内濃度を上昇させることにより、酸化ストレスを軽減し、さまざまな疾病の予防することができると考えられる。本研究では、酒粕の有効活用方法として、細胞内グルタチオン上昇活性を指標に、肝障害抑制作用をもつ機能性食品素材の開発を目的として研究を行った。ヒト肝ガン由来 HepG2 細胞において、酒粕加水分解物を添加することにより濃度依存的に上昇がみられた。さらに、グルタチオン合成の律速酵素である γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) だけでなく、 γ -GCS と同様に転写因子である Nrf2 の制御下にある抗酸化酵素 hemeoxygenase-1 (HO-1) の発現の誘導や、Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) の発現誘導がみられた。また、あらかじめ酒粕加水分解物処理することで、過酸化水素による細胞傷害が抑制された。以上の結果より、酒粕加水分解物は細胞内グルタチオンを上昇させるだけでなく、抗酸化系を誘導することにより、酸化ストレスによる細胞傷害を抑制していることが示唆された。

1. はじめに

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドであり、生体が有する主要な抗酸化物質である¹⁾。その細胞内濃度は比較的高く維持されており、抗酸化作用だけでなく、薬物などの解毒にも大きく関わっている。グルタチオンの恒常性が変化により酸化ストレスを誘引し、様々な疾病につながる事が報告されている²⁾。よって、細胞内グルタチオンを制御することにより様々な疾病の予防に有効であると考えられる。

グルタチオンは、 γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) および glutathione synthetase の2つの酵素によって生合成され、このうち γ -GCS はグルタチオン生合成過程での律速酵素である³⁾。 γ -GCS の発現調節は転写因子 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) によって制御されていることが報告されている⁴⁾。細胞が活性酸素などのストレスに晒されると Nrf2 は細胞質から核内へ移行し、 γ -GCSをはじめ、ヘムを分解して強い抗酸化作用を持つビルベルジンを産生する酵素である

hemeoxygenase-1 (HO-1)などの抗酸化系を誘導する。

我々はこれまでに、細胞内グルタチオンを上昇させる食品成分の探索を行い、米タンパク加水分解物が細胞内グルタチオン量を上昇させることを明らかにした⁵⁾。これまでに細胞内のグルタチオン濃度を増加させる化合物として、合成化合物である β -ナフトフラボン⁶⁾や天然物由来の化合物であるシリマリリン⁷⁾、 β -carotene⁸⁾などがすでに知られているが、酒粕の細胞内のグルタチオン濃度を増加させる作用についてはこれまで知られていない。本研究では、酒粕加水分解物の細胞内グルタチオン上昇活性について検討を行った。また、 γ -GCS や HO-1 のタンパク発現への影響や Nrf2 の関与についても調べた。

2. 実験方法

酒粕加水分解物の調製

雄町米酒粕（室町酒造）をデナチーム AP（ナガセケムテックス）で処理し、遠心分離後に上清を凍結乾燥して酒粕加水分解物を調製した。

細胞内グルタチオン量の測定

ヒト肝がん細胞 HepG2 を 1.5×10^5 / 2 mL / 6 well plate で播種し、48 時間培養した。その後、酒粕加水分解物を添加し 1、3、8、24 時間後に細胞を回収した。細胞をホモジナイズし、上清を過塩素酸で除タンパクした後、DTNB 法を用いてグルタチオン量を測定した。

γ-GCS タンパク発現量の測定

回収した細胞に RIPA buffer を添加してタンパク抽出液を調製した。抽出したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、PVDF 膜に転写した。一次抗体は anti-γ-GCS heavy subunit (γ-GCS_h)、anti-γ-GCS light subunit (γ-GCS_l)、anti-HO-1、anti-Nrf2、anti-β-actin を用いた。二次抗体は anti-rabbit 又は anti-mouse IgG HRP conjugated antibody を用いた。ECL Prime Western Blotting Detection を用いて目的タンパク質を検出した。各バンドは画像解析ソフト Image-J により定量化し、β-actin で補正した。

細胞傷害の測定

酸化ストレスによる細胞傷害抑制効果については、細胞膜傷害の指標である乳酸脱水素酵素(LDH)の細胞外漏出を測定することにより評価した。HepG2 細胞を 1.5×10^4 / 100 μL / 96 well plate で播種し、24 時間培養した。酒粕加水分解物を添加した培地で細胞を 24 時間培養後、過酸化水素で 24 時間処理し、培養上清中の LDH を Cytotoxicity Detection Kit (ロシュ) を用いて測定した。

3. 結果と考察

細胞内グルタチオン量に対する影響を調べた結果、酒粕加水分解物を添加することにより濃度依存的に上昇し、終濃度 20 mg/mL でコントロールに比べ 1.9 倍に有意に上昇した(図 1A)。また、細胞内グルタチオン量の経時変化を調べた結果、1 時間、3 時間後では減少が見られたが、24 時間後で上昇することが分かった(図 1B)。

γ-GCS は触媒作用を有する γ-GCS_h と調節作用を有する γ-GCS_l からなる二量体であり、活性発現には両方のサブユニットが必要である。そこで、γ-GCS 両サブユニットのタンパク発現量を調べた。

その結果、酒粕加水分解物を添加することにより 24 時間後にコントロールに比べて γ-GCS_h と γ-GCS_l

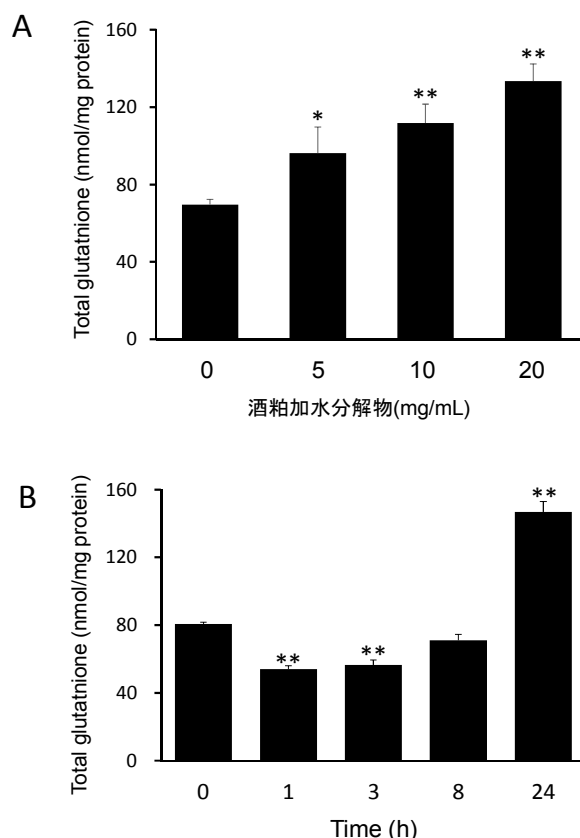


図 1 酒粕加水分解物による細胞内グルタチオン量への影響 (平均±SE、n = 3、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. 0 mg/mL)

A : 濃度による影響、B : 時間による影響

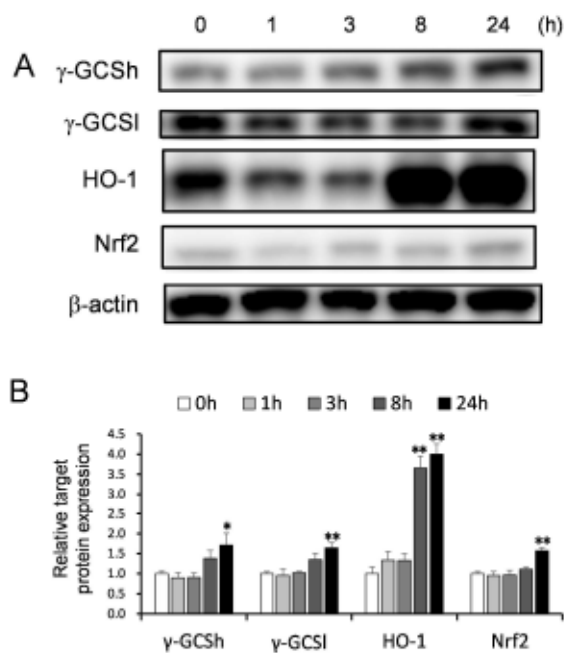


図 2 酒粕加水分解物によるタンパク発現への影響(平

均±SE、n = 4、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. 0 h)

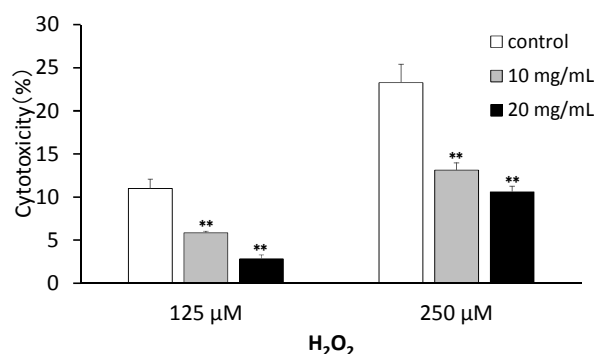


図 3 酒粕加水分解物の細胞傷害に対する影響 (平均±SE、n = 6、** $p < 0.01$ vs. control)

のタンパク発現量が有意に増加していた (図 2A)。γ-GCS のタンパク発現は細胞内グルタチオン量と相関が見られた。一方、HO-1 は 8 時間後から上昇し、24 時間後ではコントロールと比較して 4 倍に上昇した。さらに、γ-GCS や HO-1 の発現を制御している Nrf2 のタンパク発現を調べた結果、24 時間後に上昇していることが明らかとなった。HO-1 は Nrf2 だけでなく転写因子である nuclear factor-κB (NF-κB)によっても制御されてという報告がある⁹⁾。HO-1 は 8 時間後から上昇がみられたことから酒粕加水分解物は NF-κB も誘導する可能性が示唆された。

細胞内グルタチオン上昇作用が明らかとなったので、過酸化水素による酸化ストレスによる細胞傷害抑制効果について検討を行った。過酸化水素を添加することにより濃度依存的に細胞傷害率が上昇した (図 3)。一方、酒粕加水分解物をあらかじめ細胞に添加することで、濃度依存的に細胞障害の抑制がみられた。

以上の結果から、酒粕加水分解物は細胞内グルタチオンを上昇させるだけでなく、抗酸化系を誘導することにより、酸化ストレスによる細胞傷害の抑制効果があることが示唆された。酸化ストレスは糖尿病、高血圧、がんなど多くの病気の発症や進展に関与していることが明らかとなっている。例えば、アセトアミノフェンは解熱鎮痛剤として市販薬にも含まれている成分であるが、過剰に摂

取すると肝臓中のグルタチオンが枯渇し、急性肝障害を引き起こすことが分かっている。今後は酒粕加水分解物中の細胞内グルタチオン上昇活性をもつ成分の同定とアセトアミノフェン誘導肝障害モデルマウスを用いて酒粕加水分解物の肝障害抑制作用を評価する予定である。

4. 謝辞

本研究は公益財団法人ウエスコ学術振興財団学術助成事業の助成を受けて実施しました。心より感謝申し上げます。酒粕を提供していただいた室町酒造株式会社様に感謝申し上げます。

5. 参考文献

- 1) Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* **52**, 711-760 (1983).
- 2) Reid M, Jahoor F. Glutathione in disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **4**, 65-71 (2001).
- 3) Seelig GF, Simondsen RP, Meister A. Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem.* **259**, 9345-9347 (1984).
- 4) Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol.* **85**, 705-717 (2013).
- 5) Kawakami K, Moritani C, Uraji M et al. Hepatoprotective effects of rice-derived peptides against acetaminophen-induced damage in mice. *J Clin Biochem Nutr.* **60**, 115-120 (2017).
- 6) Moinova HR, Mulcahy RT. An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J Biol Chem.* **273**, 14683-14689 (1998).
- 7) Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat.

Planta med. **55**, 420-422 (1989).

8) Akaboshi T, Yamanishi R. Certain carotenoids enhance the intracellular glutathione level in a murine cultured macrophage cell line by inducing glutamate-cysteine-ligase. *Molecul Nutr Food Res.* **58**, 1291-1300 (2014).

9) Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NFκB. *Mech Ageing Dev.* **114**, 49-60 (2000).

ヒトシトクロム P450 分子種の基質特異性の予測

就実大学 薬学部

丹羽 俊朗

各種ヒトシトクロム P450 (CYP、P450) サブファミリー内の三次元構造と触媒機能の関連を明らかにすることを目的とし、初年度である本年度は、種々の化合物を用いて CYP2C サブファミリーである CYP2C8、CYP2C9 及び CYP2C19 の酵素反応速度論的パラメータ（最大速度、Michaelis 定数など）及び阻害定数を算出した。*p*-チラミンからドパミン生成反応ではいずれの CYP2C サブファミリーも活性を示さなかったが、アミノピリン *N*-脱メチル化活性及びトルブタミド水酸化活性では CYP2C サブファミリー間で基質特異性の相違が確認された。また、各種化合物の CYP2C サブファミリーに対する阻害活性を比較したところ、ペニシリン系抗菌薬は CYP2C8 によるアミノピリン *N*-脱メチル化活性を阻害したが、CYP2C9 によるトルブタミド水酸化活性の阻害は認められず、アゾール系抗真菌薬のケトコナゾール及びミコナゾールは、CYP2C8 に対して CYP2C9 における報告値と同程度以上の阻害効果を示した。このように、新たな基質においても基質特異性が異なることを示し、阻害剤による阻害の受けやすさにおいても CYP2C サブファミリー間で相違が認められた。

1. はじめに

体内に投与された薬物はヒト肝臓などの薬物代謝酵素によって代謝され、体外に排泄される。また、ステロイドホルモンを含む内在性の化合物も肝臓、副腎などの各種代謝酵素によって代謝されて生成する。ヒト肝臓ミクロゾーム画分に存在する薬物代謝型シトクロム P450 (P450 又は CYP) は、多くの薬物の代謝に関与する最も重要な酵素の 1 つであるが、その一次構造の相同性からさまざまな分子種に分類されており、一般的に基質特異性が低いとされている^{1,2)}。また、同一のサブファミリー（アミノ酸配列の相同性が 55%以上）であっても基質特異性が異なっており、多くの P450 で遺伝子多型があることが知られている。例えば、肝臓の総 P450 含量の約 25% を占め、医薬品代謝の約 30% に関与している CYP2C サブファミリーである CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18 及び CYP2C19 は 77% 以上のアミノ酸相同性を示すが、その基質特異性は CYP2C サブファミリー内で大きく異なっている³⁾。さらに、CYP2C9 及び CYP2C19 には遺伝子多型があることが知られており、CYP2C9 の変異体では野生型と異なった薬物代謝活性を示すことが報告されている³⁾。しかし、このようなサブファミリー内での基質特異性の相違の原因は、立体構造と機

能の観点で詳細に解明されていない。そこで、この原因の解明のため、各種化合物を用いた代謝実験からの酵素反応速度論的パラメータを集積し、三次元構造解析で得られた解析結果と比較することにより、各種 P450 サブファミリー内の三次元構造と触媒機能の関連を明らかにする。初年度である本年度は、種々の化合物を用いた代謝実験からの酵素反応速度論的パラメータを算出した。

2. 方法

1. 材料

大腸菌に発現した CYP2C8、CYP2C9 及び CYP2C19 (Bactosomes) は、Cypex 社 (Dundee、英国) より入手した。

2. 薬物代謝酵素活性及び阻害活性の測定

アミノピリン *N*-脱メチル化活性は既報⁴⁾の Nash 法で測定し、トルブタミド水酸化活性及び *p*-チラミンからドパミン生成活性は既報^{5,6)}の HPLC 法で測定した。アミノピリン *N*-脱メチル化活性及びトルブタミド水酸化活性では、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP2C19 における最大速度 (V_{max})、Michaelis 定数 (K_m) 及び V_{max}/K_m を算出した。また、阻害活性の比較におい

では、各種濃度の3種ペニシリン系抗菌薬（アモキシシリン、アンピシリン及びピペラシリン）及び5種アゾール系抗真菌薬（フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ミコナゾール及びボリコナゾール）を添加した時のアミノピリン *N*-脱メチル化活性を、添加しない時の代謝活性と比較することにより、阻害様式、50%阻害濃度（ IC_{50} ）又は阻害定数（ K_i ）を算出した。

3. 結果

まず、酵素活性に対する CYP2C サブファミリーの相違を比較した。アミノピリン *N*-脱メチル化活性における CYP2C サブファミリーの酵素反応速度論的パラメータを比較した（表1）。 K_m 値は CYP2C9 > CYP2C8 > CYP2C19 であり、 V_{max} は CYP2C8 > CYP2C9 > CYP2C19 であった。したがって、 V_{max}/K_m は CYP2C8 > CYP2C19 > CYP2C9 であった。また、CYP2C8 の K_m 値は 3.0 mM であり、我々⁴⁾は以前に 5.3 mM であったと報告していることも勘案して、阻害試験で IC_{50} を検討する際の基質濃度は 5 mM に設定した。

表1. CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2C19 によるアミノピリン *N*-脱メチル化活性

	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/nmol)	V_{max}/K_m (μ l/min/nmol)
CYP2C8	3.0	185.6	62.8
CYP2C9	10.9	75.0	6.9
CYP2C19	1.3	32.6	26.0
CYP2C8 ^{a)}	5.3 ⁴⁾	188 ⁴⁾	36 ⁴⁾
CYP2C19 ^{b)}	0.31 ⁴⁾	105 ⁴⁾	333 ⁴⁾

a) 酵母に発現

トルブタミド水酸化活性においては、CYP2C19 による K_m は 346 μ M、 V_{max} は 13.7 nmol/min/nmol P450、 V_{max}/K_m は 39 μ L/min/nmol P450 であり（表2）、CYP2C19 における K_m 、 V_{max} 及び V_{max}/K_m 値は CYP2C9 より大きいことが示された。一方、CYP2C8 では基質濃度を 100 μ M で検討したが、トルブタミド水酸化活性は認められなかった。

表2. CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2C19 によるトルブタミド水酸化活性

	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/nmol)	V_{max}/K_m (μ l/min/nmol)
CYP2C8	—	—	ND
CYP2C9	98.1	2.1	21
CYP2C19	346	13.7	39

ND：検出限界値未満

p-チラミンからドパミン生成反応においては、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP2C19 のいずれも活性を示さなかった。

次に、CYP2C サブファミリーに対する各種化合物の阻害活性の相違を比較した。ペニシリン系抗菌薬のうち、アンピシリンは 1 mM の濃度でわずかに CYP2C8 によるアミノピリン *N*-脱メチル化活性を阻害したのみであったが、アモキシシリン及びピペラシリンの IC_{50} はそれぞれ 0.83 mM 及び 1.14 mM であった（図1）。また、いずれの抗菌薬も 0.1~1 mM の濃度で検討したが、CYP2C9 によるトルブタミド水酸化活性の阻害は認められなかった。

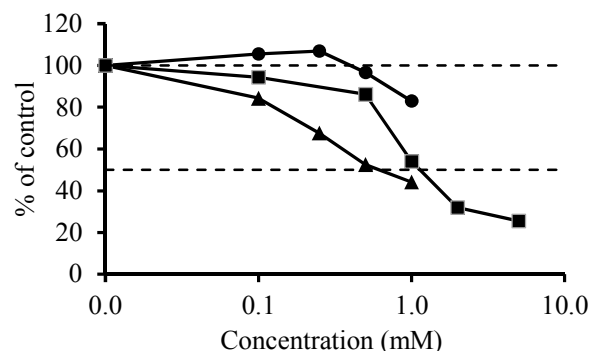


図1. CYP2C8 によるアミノピリン *N*-脱メチル化活性に対するペニシリン系抗菌薬の阻害活性

▲：アモキシシリン、●：アンピシリン、■：ピペラシリン。

アゾール系抗真菌薬では、フルコナゾール、イトラコナゾール及びボリコナゾールでは2~10 μ M の濃度で阻害を示さなかったが、ケトコナゾール及びミコナゾールは 10 μ M の濃度で、それぞれ 61.2%及び 76.2%阻害した（図2）。ケトコナゾール及びミコナ

ゾールの阻害様式及び K_i 値を種々の基質濃度及び阻害剤濃度を用いて検討したところ、いずれも非競合阻害を示し、 K_i はそれぞれ 1.98 μM 及び 0.86 μM であった (図3)。

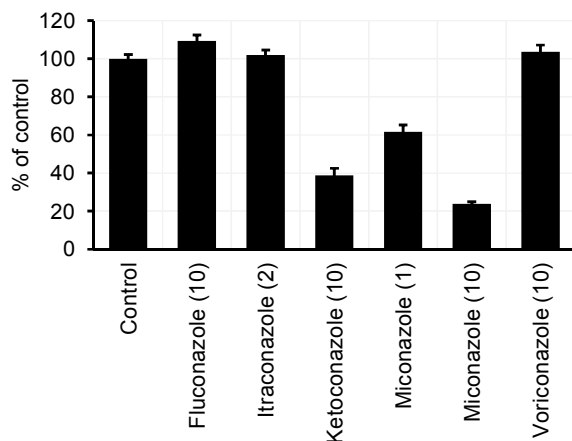


図2. CYP2C8 によるアミノピリン N -脱メチル化活性に対する各種抗真菌薬の阻害活性
平均 $\pm$ S.D. (n=3). 括弧内の数値: 反応混合液中の抗真菌薬濃度 (μM).

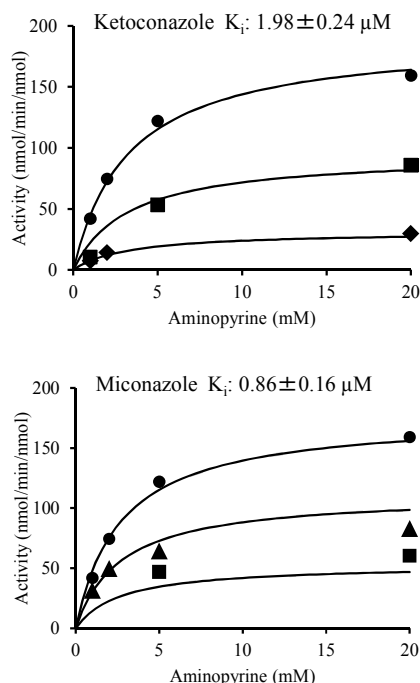


図3. CYP2C8 によるアミノピリン N -脱メチル化活性に対するケトコナゾール及びミコナゾールの阻害活性

● : 0 μM 、▲ : 0.5 μM 、■ : 2 μM 、◆ : 10 μM .

4. 考察

活性発現における CYP2C サブファミリー間の相違を3種類の基質 (アミノピリン、トルブタミド及び p -チラミン) を用いて検討したところ、アミノピリン N -脱メチル化活性における K_m 値は CYP2C9 > CYP2C8 > CYP2C19、 V_{max} は CYP2C8 > CYP2C9 > CYP2C19 であり、 V_{max}/K_m は CYP2C8 > CYP2C19 > CYP2C9 であった (表1)。一方、CYP2C19 における K_m 、 V_{max} 及び V_{max}/K_m 値は CYP2C9 より大きく、CYP2C8 では活性が認められなかった。さらに、 p -チラミンからドパミンの生成活性は CYP2D6 が強いことが報告されているが⁶⁾、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP2C19 のいずれにおいても活性は認められなかった。このように、基質によって基質親和性 (K_m) 及び活性 (V_{max}) に相異が認められたが、今後、さらに多くに基質を用いて検討し、この原因をドッキングシミュレーション法⁷⁾を含む三次元構造解析などを実施して解明していく必要があると考えられる。

一方、阻害活性に関しては、阻害活性の報告が少ない CYP2C8 を中心に検討した。ペニシリン系抗菌薬のうち、アンピシリンは 1 mM の濃度でわずかに CYP2C8 によるアミノピリン N -脱メチル化活性を阻害したのみであったが、アモキシシリン及びピペラシリンの IC_{50} はそれぞれ 0.83 mM 及び 1.14 mM であった (図1)。一方、CYP2C9 によるトルブタミド水酸化活性の阻害は認められず、CYP2C8 と CYP2C9 の間に相違が認められた。

臨床的な薬物相互作用の有無の予測という観点では、基質濃度が K_m より低いとき、阻害剤存在下及び非存在下の肝固有クリアランス (CL_{int}) の比は下記の式で示される^{8, 9)}。

$$\frac{\text{CL}_{int} (\text{阻害剤添加時})}{\text{CL}_{int} (\text{阻害剤非添加時})} = 1 / (1 + I_u/K_i)$$

I_u : 阻害剤の非結合型濃度、 K_i : 阻害定数
競合阻害及び非競合阻害における K_i 値は、それぞれ $\text{IC}_{50}/2$ 及び IC_{50} に相当する。3種のペニシリン系抗菌薬のうち、経口抗菌薬であるアモキシシリン (サワシリン®) 250 mg を健康成人に投与後の最高血中濃度は 3.68 $\mu\text{g/mL}$ (8.8 μM) と報告されているため¹⁰⁾、肝臓に流入する阻害剤の最高濃度は 46 μM と予

測され、アンピシリン 1 g をスルバクタム/アンピシリン (ユナシン®) として健康成人に静脈内投与後の最高血中濃度は 78.80 µg/mL (0.21 mM)¹¹⁾、ピペラシリン 4 g をタゾバクタム/ピペラシリン (ゾシン®) として健康成人に 30 分間点滴静脈内投与後の最高血中濃度は 286 µg/mL (0.53 mM)¹²⁾ と報告されている。今回算出された IC₅₀ 値は、予測されるペニシリン系抗菌薬の肝臓に流入する阻害剤の最高濃度や報告されている最高血中濃度に比べて高かった。したがって、3 種のペニシリン系抗菌薬は、臨床において CYP2C8 で代謝される薬物と併用した時に、その薬物動態に大きな影響を及ぼさないことが推察された。

アゾール系抗真菌薬は CYP3A4、CYP2C19 などの P450 で代謝される多くの薬物に対して薬物相互作用を起こすことが報告されている¹³⁾。今回の研究で算出された CYP2C8 に対するケトコナゾール及びミコナゾールの K_i 値 (0.86–1.98 µM、図 3) は CYP2C19 での報告値 (0.33–28 µM)¹³⁾ と同程度かそれより低い値であり、これらの抗真菌薬は臨床において CYP2C19 の基質となる薬物との薬物相互作用が報告されている^{13–15)}。したがって、ケトコナゾール及びミコナゾールは、臨床において CYP2C8 で代謝される薬物の薬物動態に対しても影響を及ぼす可能性が示唆された。

本研究において、新たに 3 種の化合物に対する CYP2C サブファミリーの基質特異性を検討した。また、CYP2C サブファミリーに対する種々の抗菌薬及びアゾール系抗真菌薬の阻害活性を比較した。今後、さらに多くの薬物を基質及び阻害剤として用いて検討し、Docking simulation 法¹⁶⁾などの三次元構造解析を組み合わせることにより、CYP2C サブファミリーの基質特異性の相違の原因を解明していく必要がある。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人ウエスコ学術振興財団による研究助成を賜りましたことを、深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 29:413–580 (1997).
- 2) Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab. Rev.* 34: 83–448 (2002).
- 3) Niwa T, Yamazaki H. Comparison of cytochrome P450 2C subfamily members in terms of drug oxidation rates and substrate inhibition. *Curr Drug Metab.* 13: 1145–1159 (2012).
- 4) Niwa T, Sato R, Yabusaki Y, Ishibashi F, Katagiri M. Contribution of human hepatic cytochrome P450s and steroidogenic CYP17 to the *N*-demethylation of aminopyrine. *Xenobiotica*, 29: 187–193 (1999).
- 5) Niwa T, Inoue S, Shiraga T, Takagi A. No inhibition of cytochrome P450 activities in human liver microsomes by sulpiride, an antipsychotic drug. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 188–191 (2005).
- 6) Hiroi T, Imaoka S, Funae Y. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun.* 49:838–843 (1998).
- 7) Niwa T, Yasumura M, Murayama N, Yamazaki H. Comparison of catalytic properties of cytochromes P450 3A4 and 3A5 by molecular docking simulation. *Drug Metab Lett.* 8: 43–50 (2014).
- 8) Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug–drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev.* 50: 387–412 (1998).
- 9) Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Nakajima Y, Sugiyama Y. Quantitative prediction of *in vivo* drug clearance and drug interactions from *in vitro* data on metabolism, together with

binding and transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38: 461-499 (1998).

- 10) サワシリン インタビューフォーム, アステラス製薬株式会社 (2015).
- 11) ユナシン静注用添付文書, ファイザー株式会社 (2015).
- 12) ゴシン静注用 インタビューフォーム, 大正富山医薬品株式会社 (2016).
- 13) Niwa T, Imagawa Y, Yamazaki H. Drug interactions between nine antifungal agents and drugs metabolized by human cytochromes P450. *Curr Drug Metab*, 15: 651-679 (2014).
- 14) O'Reilly RA, Goulart DA, Kunze KL, Neal J, Gibaldi M, Eddy AC, Trager WF. Mechanisms of the stereoselective interaction between miconazole and racemic warfarin in human subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 51: 656-667 (1992).
- 15) Böttiger Y, Tybring G, Götharson E, Bertilsson L. Inhibition of the sulfoxidation of omeprazole by ketoconazole in poor and extensive metabolizers of S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther*, 62: 384-391 (1997).
- 16) Niwa T, Yasumura M, Murayama N, Yamazaki H. Comparison of catalytic properties of cytochromes P450 3A4 and 3A5 by molecular docking simulation. *Drug Metab Lett*. 8:43-50 (2014).

含ケイ素小員環化合物の合成とその反応性の解明

倉敷芸術科学大学 生命科学部 生命科学科

仲 章伸

本研究では、1,2-ビス(エチルシリル)チオフェンの合成法を確立し、その白金錯体触媒存在下でのアルキン類との反応を行い、その反応性を明らかにした。反応機構としては、まず白金錯体によるヒドロシリル基からの脱水素が起こり、プラチナジシラシクロペンテン誘導体が生成し、その後アルキン類の白金上への配位、白金-ケイ素結合への挿入、白金の還元的脱離を経て、最終生成物が得られるものと考えられる。

1、はじめに

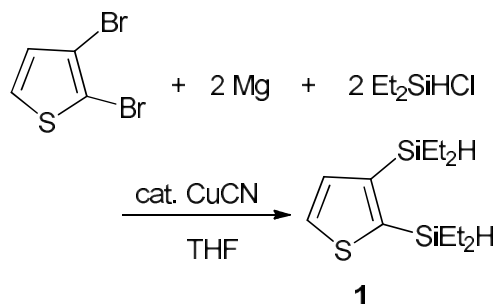
近年、ポリシラン類あるいはジシラニレン- π -電子系ポリマーなど主鎖にケイ素原子を含む有機ケイ素ポリマーの感光性、導電性などの特異な性質に注目が集められており、これらを利用した新しい機能を持つ材料の開発が行われている[1, 2]。また、ケイ素などの典型元素の個性を生かした分子設計による光、電子機能性材料の創製も検討されてきている。当研究室においても、ケイ素-ケイ素結合と様々な π -電子系を有する星型化合物に関する研究を行ってきており、合成した含ケイ素星型化合物を色素増感太陽電池の酸化チタンナノ粒子電極に化学的に接着させることができることを明らかにした。また、作成した色素増感太陽電池の光電変換効率を測定し、報告してきた[3]。しかし、有機ケイ素化合物の性質はまだ未知の部分が多く、幅広い基礎研究が必要であると考えられる。これまで申請者は、ベンゾジシラシクロブテン類と様々な不飽和化合物との反応を行い、その反応機構を明らかにしてきた[4]。最近では、ベンゾジシラシクロブテン類とアセチレン

の熱反応における立体化学を検討したところ、シス体からはシスの付加体得られ、トランス体からはトランス付加体が生成していることが明らかとなった。この反応の理論計算を行ったところケイ素-ケイ素結合の σ 軌道とアセチレンの π^* 軌道が相互作用して、反応が進行していることが明らかとなった[5]。このような反応機構を提唱するのは世界的にも初めてであった。本研究では、ベンゼンよりも電子が豊富であるチオフェンを有する含ケイ素小員環化合物を合成しアルキン類との反応を行い、反応の機構および遷移状態を明らかにすることを目的とした。

2、結果と考察

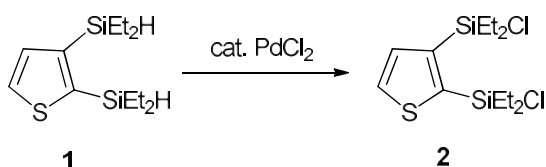
まず、チエノジシラシクロブテンの合成を目指し、次のような実験を行った。窒素気流下で2,3-ジブromoチオフェンをTHF溶液中、マグネシウムおよび触媒量のシアン化銅の存在下、クロロジエチルシランと反応させ、2,3-ビス(ジエチルシリル)チオフェン(1)を得た(Scheme 1)。

Scheme 1



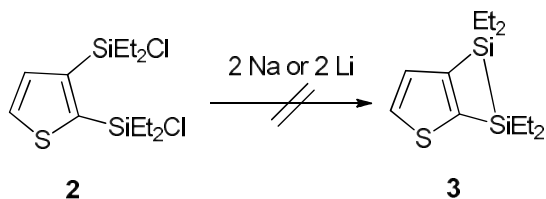
四塩化炭素溶液中、化合物(1)をパラジウム錯体触媒存在下でクロロ化反応を行い、2,3-ビス(クロロジエチルシリル)チオフエン(2)を得た(Scheme 2)。

Scheme 2



化合物(2)をTHF溶液中でナトリウムと反応させたが、化合物(3)を得ることは出来ず、構造のはっきりしないオリゴマーが得られた。リチウムを用いて同様の反応を行ったが、目的生成物 3 を得ることは出来なかった(Scheme 3)。

Scheme 3

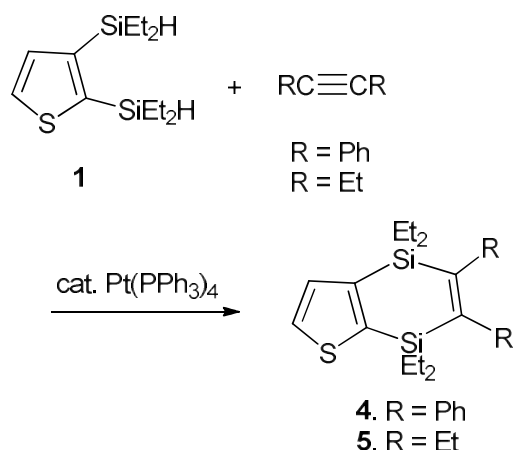


チエノジシラシクロブテンの合成は、困難であると判断し、化合物 1 を原料として反応を行うことにした。

化合物 1 をテトラキス(トリフェニルホスフィン)白金錯体触媒存在下、ジフェニルアセチレンとベンゼン還流下で反応させたところ、1,1,4,4-テトラエチル-2,3-ジフェニル-1,4-ジヒドロ-[1,4]ジシリノ

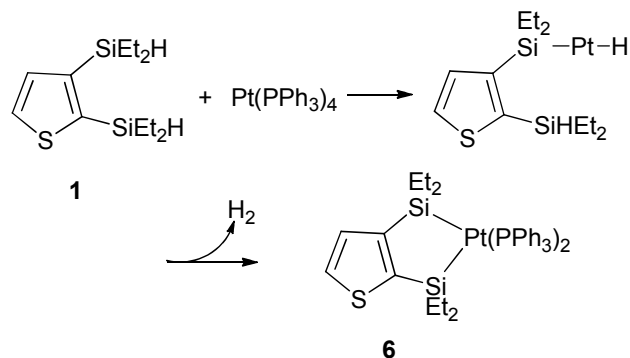
[2,3-*b*]チオフエン(4)が定量的に得られた(Scheme 4)。また、同様の条件下、化合物 1 と 3-ヘキシンの反応を行うと、1,1,2,3,4,4-ヘキサエチル-1,4-ジヒドロ[1,4]-ジシリノ[2,3-*b*]チオフエン(5)が 89%の収率で得られた(Scheme 4)。

Scheme 4



化合物 4 および 5 の生成機構は次のように考えている。まず、白金種が化合物 1 のケイ素-水素結合に酸化的付加を行う。続いて、脱水素反応が起こり、ビスシリル白金錯体(6)を中間体として生成する(Scheme 5)。

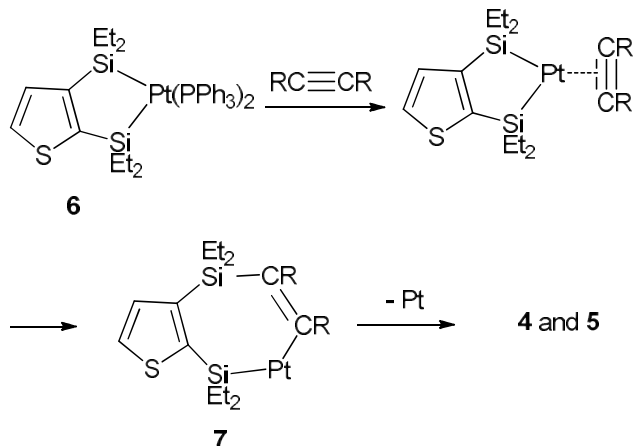
Scheme 5



中間体 6 の白金原子上にアルキンが配位し、その後アルキンの炭素-炭素三重結合が中間体 6 の白金-ケイ素結合へ挿入し、七員環中間体(7)が生成する。最終的に中間体 7 から白金種が還元的脱離し、化合物 4

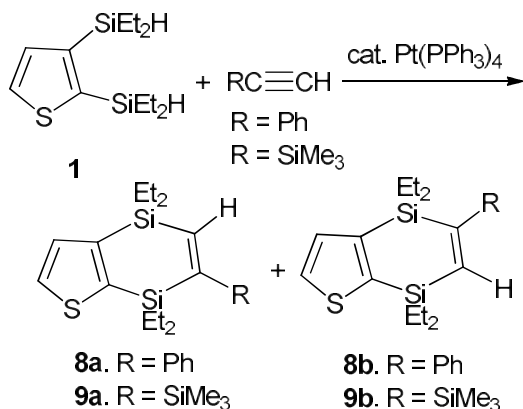
および **5** が得られる (Scheme 6)。

Scheme 6



次に、白金錯体触媒存在下、化合物 **1** と末端アセチレンとの反応を行った。化合物 **1** を、テトラキス(トリフェニルホスフィン)白金錯体触媒存在下、フェニルアセチレンとベンゼン還流下で反応させたところ、二種類の化合物 (**8a**) および (**8b**) を定量的に得た (Scheme 7)。化合物 **8a** および **8b** の分離には成功しなかったが、**8a** および **8b** の生成比は、3:1 であることが 1H NMR により明らかにすることができた。化合物 **1** とトリメチルシリルアセチレンを同条件下反応

Scheme 7

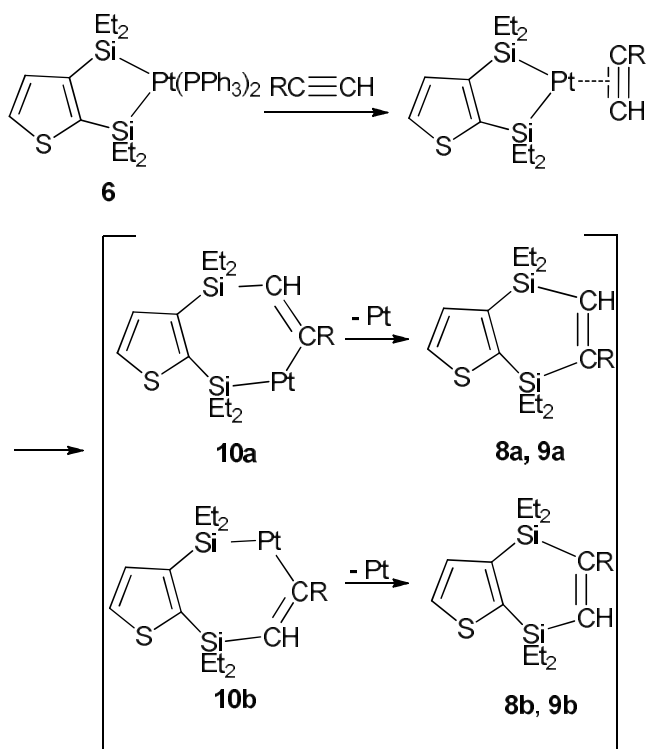


させたところ、二種類の化合物 (**9a**) および (**9b**) が 3:1 の生成比で 96% の収率で得られた (Scheme 7)。化

合物 **9a** および **9b** も分離することは出来なかったもので、混合物のまま MS および 1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^{29}Si NMR によりその構造を決定した。

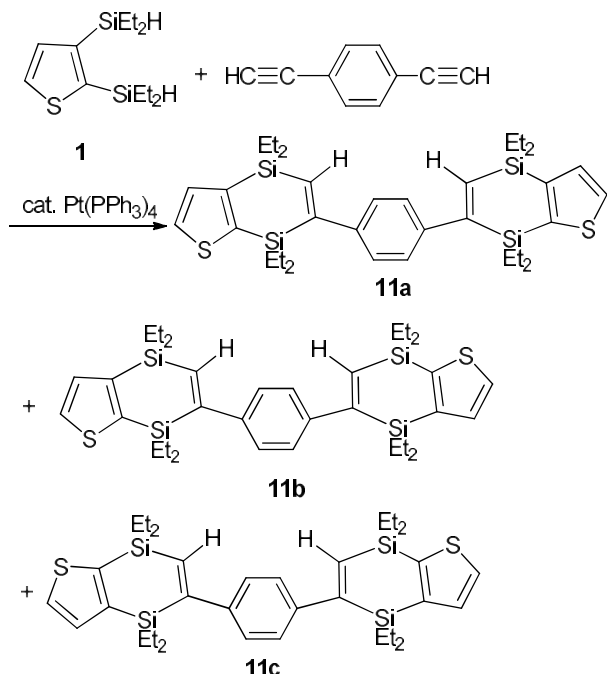
化合物 **8a** および **8b**, **9a** および **9b** の生成は、Scheme 8 に示す反応機構で進行しているものと考えている。

Scheme 8



白金-ケイ素結合を有する錯体においては、ケイ素原子上の電子吸引性置換基が白金-ケイ素結合を強くするということが報告されている。今回の反応においては、炭素と硫黄の電気陰性度の比較（硫黄は炭素より高い電気陰性度を有する）により、Pt-Si-C-C 側の Pt-Si 結合の方が、Pt-Si-C-S 側の Pt-Si 結合よりも弱いと考えられる。よって Pt-Si-C-C 側の Pt-Si 結合が、末端アセチレンの立体的に小さい側に転位することにより、七員環中間体 (**10a**) が優勢的に生成するものと考えている。

Scheme 9



次に同条件下、化合物 **1** と 1,4-ビス(エチニル)ベンゼンとの反応を行い、化合物(**11a**)、(**11b**)、(**11c**)の混合物を定量的に得た(Scheme 9)。化合物 **11a**、**11b**、**11c** をそれぞれ分離することは出来なかった。しかし、Pt-Si-C-C 側の Pt-Si 結合が、末端アセチレンの立体的に小さい側に転位した化合物である **11a** が主生成物であると考えている。

以上、述べてきたように本研究においては、2,3-ビス(ジエチルシリル)チオフェン(**1**)を合成し、その白金錯体触媒反応を行った。反応中間体として白金を含む五員環化合物であるプラチナジシラシクロペンテン誘導体 **6**、**10a**、**10b** が重要な役割を果たしていることを明らかにすることが出来た。

今後は、化合物 **1** とアルキン類以外の不飽和化合物との反応や、フランなど他の π -電子系を有する原

料の合成にも挑戦したいと考えている。これらに関連する研究で得られた知見を活かし、エネルギー分野で使用できる材料や医薬品開発への応用に展開していきたいと考えている。

謝辞

本研究は、ウエスコ学術振興財団の助成により実施されたものである。ここに謝意を表します。

参考文献

- [1] R. West, A title, in: Z. Rappoport, Y. Apeloig (Eds.), *The Chemistry of Organic Silicon Compounds*, vol. 3, Wiley, New York, 2001 (chapter 9).
- [2] D.Y. Son, A title, in: Z. Rappoport, Y. Apeloig (Eds.), *The Chemistry of Organic Silicon Compounds*, vol. 3, Wiley, New York, 2001 (chapter 13).
- [3] A. Naka, K. Fujishima, E. Okada, M. Noguchi, J. Ohshita, Y. Adachi, Y. Ooyama, M. Ishikawa, J. Organomet. Chem. 825-826 (2016) 63-68.
- [4] M. Ishikawa, A. Naka, K. Yoshizawa, Dalton Trans. 45 (2016) 3210-3235.
- [5] (a) A. Naka, J. Ikada, J. Sakata, M. Ishikawa, Y. Hayashi, L. Antonov, S. Kawauchi, T. Yamabe, *Organometallics* 32 (2013) 6476-6487. (b) Y. Hayashi, T. Natsumeda, S. Otsu, R. Yamada, A. Naka, M. Ishikawa, T. Yamabe, S. Kawauchi, *Organometallics* 33 (2014) 763-770.

がん細胞のK⁺チャネル過剰発現を利用した クモ毒ペプチド発現ウイルスベクターの選択的抗がん作用

倉敷芸術科学大学 生命科学部

岡田 誠剛

(概要)

がん細胞は正常細胞と比較してK⁺チャネルタンパクを過剰発現する。我々は、K⁺チャネルと緑色蛍光タンパク (GFP) を共発現させ、毒性の有無によって GFP 蛍光が変化する high-through-put アッセイを開発した。そして、多数のクモ、サソリ毒液からペプチドを HPLC で分画し、本アッセイでスクリーニングし、K⁺チャネル発現細胞選択的に取り込まれ、細胞毒性を示すクモ毒ペプチド (LaFr26) を見出した。LaFr26 とその類縁体 Oxyopinin-2b は正の電荷をもつため、K⁺チャネル発現によって膜電位が負の細胞選択的に取り込まれ毒性を示した。次に、ペプチドでは通常の薬物投与、送達方法ではがん患部に到達させることは困難であるため、これらのペプチドの cDNA を合成し、レンチウイルスベクターに組み込み、がん細胞に感染させ、がん細胞自身にペプチドを合成・分泌させ、毒性を示すかを検討した。その結果、ウイルスベクターは対照細胞には影響を与えずに、K⁺チャネル発現細胞選択的な毒性を示し、本方法の有効性が示唆された。

(本文)

近年がん細胞が周囲の正常細胞と比較してK⁺チャネルタンパクを過剰発現することが報告されている (Huang and Jan, 2014; Comes et al., 2015)。我々は、K⁺チャネルと緑色蛍光タンパク (GFP) を培養細胞に共発現させ、毒性の有無によって GFP 蛍光が変化する high-through-put アッセイを開発した。そして、イオンチャネルに作用するペプチドがクモ・サソリ毒から発見されていることから、クモ・サソリ毒ペプチド研究の権威であるメキシコの Possani 教授と共同研究し、多数のクモ、サソリ毒液からペプチドを HPLC で分画した。それらを上記のアッセイでスクリーニングし、K⁺チャネル発現細胞選択的に取り込まれ、細胞毒性を示すクモ毒ペプチド (LaFr26) を見出した。このペプチドは、塩基性であり正の電荷をもつため、K⁺チャネル発現によってK⁺イオンが流出し負の電荷を帯びた細胞選択的に取り込まれ、会合しイオノフォアを形成し毒性をきたすことを明らかにした (Okada et al., 2015)。

本研究では、これをがん治療に応用することを念頭に、化学合成したクモ毒ペプチド LaFr26 とその類縁体 Oxyopinin-2b が、K⁺チャネルを発現した細胞選択的に細胞死をきたすかを、生細胞中の脱水素酵素活性を指標に計測した。293T 細胞に内向き整流

性K⁺チャネル (Kir2.1) の遺伝子を導入し、ペプチドを添加すると濃度依存的に生細胞数の減少が認められ、毒性が確認された (図1、Control)。この減少がKir2.1電流に依存していることを確認するため、同チャネル選択的な遮断薬 BaCl₂ を培地に添加すると、毒性の減弱が認められ (図1、BaCl₂) K⁺チャネル電流依存性が確認された。

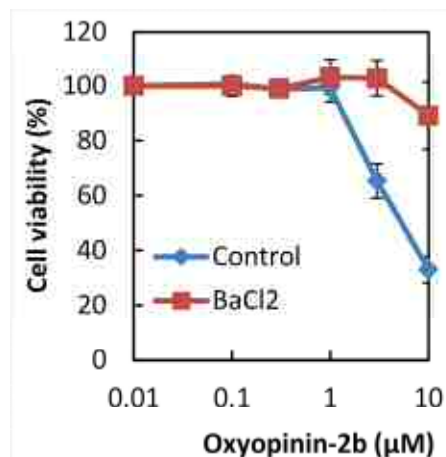


図1. K⁺チャネル電流に依存したクモ毒の毒性。Kir2.1チャネルの遺伝子を導入し多細胞にクモ毒を添加し生細胞数を検討した。K⁺チャネルの遮断薬(BaCl₂)の存在下では毒性の減弱が認められた。

この毒性の K^+ チャネル電流依存性をさらに検討するため、2 ポアドメイン型 K^+ チャネル (TREK-1)、ヒト ether-a-go-go-related-gene (HERG) チャネルを発現する 293T 細胞の培地にペプチドを添加し生細胞の数を測定すると、両チャネル発現細胞の膜電位と相関した細胞毒性が認められ、電流依存性が確認できた。この K^+ チャネル電流に依存した細胞毒性は LaFr26 でも同等かそれ以上に認められた (data not shown)。

次に、 K^+ チャネルを内在性に発現する肺がん細胞 LX22、神経膠腫細胞 U343 に LaFr26 と oxyopinin-2b のペプチドを添加すると、 K^+ チャネル電流依存性の毒性を示した (図 2)。

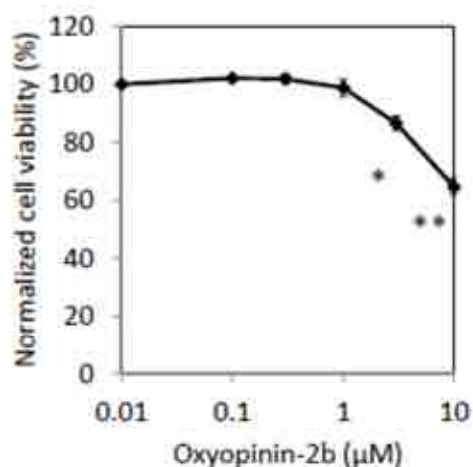


図 2. LX22 細胞に対する oxyopinin-2b の毒性。内在性に K^+ チャネルを発現する肺小細胞がん LX22 細胞にもクモ毒ペプチドは毒性を示した。

以上の結果から、クモ毒ペプチドはがん治療への応用の可能性が示唆される。しかし、ペプチド医薬品は経口投与では消化管で分解され、静脈注射では全身性に広がり K^+ チャネルを発現する正常な細胞に毒性をきたすことが考えられる。したがって、がん患部に直接注入する必要があるが、患部への頻回の投与は患者への大きい負担になる。そこで、我々はクモ毒ペプチドを発現するウイルスベクターを作成し、患部への注射でがん細胞に感染させ、がん細胞自身にペプチドを合成・分泌させ、がん細胞自らを傷害することができるかを検討した。まず、LaFr26 とその類縁体 Oxyopinin-2b の cDNA を合成し、ベクターに組み込み、レンチウイルスベクターを調製した。そして、毒性を検討したところ、予想通りに対照の細胞の生存には影響を与えずに、 K^+ チャネル (Kir2.1) を発現する細胞のみに毒性を示した (図 3)。この結果は、我々の方法

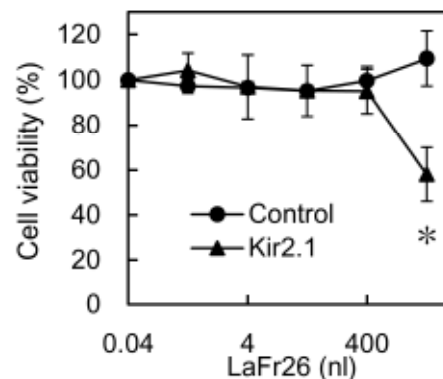


図 3. クモ毒ペプチド発現ウイルスベクターの K^+ チャネル発現に依存した毒性。縦軸は対照 (Control) と K^+ チャネル発現細胞 (Kir2.1) の生存率、横軸は添加した LaFr26 発現ウイルスベクター量を示す。

が有望であることを示している。

今後の課題として、クモ毒ペプチド発現ウイルスベクターの作用は期待よりも弱く、細胞 1 個に対して複数個のウイルスベクターの感染を必要とした。したがって、将来の臨床応用に向け、ウイルスベクターのペプチド発現効率を高めることが必要である。

また、本ウイルスベクターが *in vitro* だけでなく *in situ*、*in vivo* で作用を確かめることが必要である。

参考文献

- Xi Huang, Lily Yeh Jan, 2014, Targeting potassium channels in cancer, The Journal of Cell Biology, 206 (2) 151. DOI: 10.1083/jcb.201404136
- Nuria Comes, Antonio Serrano-Albarrás, Jesusa Capera, Clara Serrano-Novillo, Enric Condom, Santiago Ramón y Cajal, Joan Carles Ferreres, Antonio Felipe, 2015, Involvement of potassium channels in the progression of cancer to a more malignant phenotype, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1848 (10) 2477. DOI: org/10.1016/j.bbamem.2014.12.008
- Masayoshi Okada, Gerardo Corzo, Gustavo A. Romero-Perez, Fredy Coronas, Hiroko Matsuda, Lourival D. Possani, 2015, A pore forming peptide

from spider *Lachesana* sp. venom induced neuronal depolarization and pain. *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA) – General Subjects, 1850 (4) 657. DOI: [org/10.1016/j.bbagen.2014.11.022](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.022).

ヒト姿勢制御におけるフィードフォワード制御の役割に関する研究

倉敷芸術科学大学

枝松 千尋

（概要）本研究ではヒトの姿勢制御において予測性と考えられるフィードフォワード制御が姿勢の安定性に強く影響している可能性について検討することを目的とした。具体的には、視覚情報を左右反転させた時に姿勢制御がどのような影響を受けるかを、時系列データの動的解析手法を用いて検討した。被験者は健常な成人男性9名であった。30秒間の静止立位時の床反力を100Hzにて計測した。実験条件は開眼（OPEN）条件、閉眼（CLOSE）条件と逆さメガネ（LENS）条件であった。解析は、SFA法からFFratio（フィードフォワード制御時のCOP変化量）とFBratio（フィードバック制御時のCOP変化量）を算出した。その結果、FFratioはOPEN条件に対してCLOSE条件・LENS条件で有意に小さくなった。FBratioは3条件間に差は見られなかった。Naganoらの解析方法による方向変化も、フィードフォワード期間のみに有意差がみられ、OPEN条件に対してCLOSE条件・LENS条件で方向変化が小さくなった。これらのことから、左右反転した視覚情報の入力フィードフォワード制御に影響を及ぼしており、フィードフォワード制御が姿勢の安定性に強く影響している可能性が示された。

【緒言】

ヒトの静止立位は、二足立位である。高い位置にある身体重心を、狭い支持面上に保つ必要があり、その制御は容易ではない。姿勢制御系は、視覚系、前庭感覚系、体性感覚系の3つの感覚器により構成される。視覚系は周囲の物体に対する頭部の位置関係、身体の鉛直などを検知していると考えられる。また、前庭系は中耳奥にある前庭迷路感覚であり、重力または慣性力に対する頭部の位置と動きを検知する。体性感覚系は、支持面に対する身体各セグメントの位置と動きを検知している¹⁾。それらの感覚情報はneural storeにおいて統合され²⁾、身体図式（ボディースキーマ）を作り上げていると考えられる。

姿勢制御能力を評価する方法として重心動揺検査がある。重心動揺検査は、フォースプレートから得られる圧力中心（COP）を用いて、姿勢制御を評価するもので、その評価指標としては外周面積と総軌跡長を用いるのが一般的である。しかしながら、これら「どの程度揺れたか」を扱う要約統計量では、連続する重心動揺時系列データの移動の大きさと方向変化の時間的順番等の動的特性、つまり「どのように揺れたか」を評価できない³⁾。そこで、近年、重心動揺時系列データに対して統計力学に基づく確率論的手法を用いて「どのように揺れたか」について

論じる手法が数報、報告された。collins et al.は現在の位置に対する一定時間間隔後の拡散距離を求めるSDA法を提案し、これにより開ループ制御でコントロールされるフィードフォワード期間と閉ループ制御でコントロールされるフィードバック期間について論じた⁴⁾。一方、nagano et al.はSDA法は距離情報しか扱っておらず方向に関する情報が論じられていないことを指摘し新規手法としてNagano法を提案した。この手法は現在のベクトルに対する一定時間間隔後の方向変化(cos値)を求める手法であり、時間間隔が0秒付近では現在の速度ベクトルと同じ方向を持ち、0.2～0.7秒付近でフィードバック制御により逆方向になることを報告した⁵⁾。しかし、従来の評価指標やSDA法、Nagano法では重心動揺の経時的な移動距離と方向変化を同時に一変数で評価できないため、我々は、COP速度ベクトルの大きさ変化と方向変化を用いて扇形面積を算出し、その面積をCOP変化量とするSFA法を提案した⁶⁾。

一般的に、閉眼条件に対して開眼条件では外周面積や総軌跡長は小さい値を示すことが知られている。開眼条件と閉眼条件のCOP動揺をSFA法で解析した結果、時間間隔0.1秒までのフィードフォワード期間のCOP変化量を示すFFratioには有意な差がみられたが、時間間隔0.2～0.7秒までのフィードバック

期間の COP 変化量を示す FBratio には有意な差がみられなかった。つまり、重心動揺においてはフィードバック制御よりもフィードフォワード制御が姿勢の安定性により強く影響している可能性が示唆された。これまでは、姿勢制御においてフィードバック制御の重要性が取り上げられていたが、近年、姿勢戦略として予測的なフィードフォワード制御が重要な役割を演じているという考え方が台頭してきた⁷⁾⁸⁾。我々も姿勢制御において、過去のボディースキーマの履歴から現在と未来の姿勢動揺を予測し、現在の姿勢制御を実行しているのではないかと考えている。

本研究では、姿勢制御能力の構成要素のうちのひとつである視覚系に刺激を与えたときの姿勢制御について検討する。具体的には、開眼条件・閉眼条件に加えて、逆さメガネによる左右反転した視覚情報を与える。逆さメガネに関する研究としては、長期間着用した時の日常生活への適応過程を調査したもの⁹⁾はあるものの、逆さメガネを着用した時の重心動揺検査を行った研究はない。そこで、本研究では、SFA 法・Nagano 法を用いて、左右反転した視覚情報が姿勢制御に及ぼす動的な影響を明らかにし、ヒトの姿勢制御において予測性と考えられるフィードフォワード制御が姿勢の安定性に強く影響している可能性について検討することを目的とした。

【方法】

1) 被験者

被験者は健康な男性 9 名（年齢 21.3 ± 1.2 歳、身長 171.5 ± 7.9 cm、体重 68.6 ± 12.6 kg）であった。実験の目的及び方法を十分に説明した後、全ての被験者から実験の参加同意を得た。本研究は倉敷芸術科学大学倫理審査（15-15）を受けて行った。

2) 測定方法

重心動揺検査はフォースプレート (kistler 社, 9286A) を用いて行った。30 秒間の静止立位中の COP 動揺をサンプリング周波数 100 Hz にて PC に取り込んだ (DKH 社, TRIAS)。被験者に素足で両足を接するように直立させ、目の高さに合わせた 2 メートル前方の指標を見るように指示した。実験条件は開眼条件

(OPEN 条件)・閉眼 (CLOSE 条件) 条件・逆さメガネ条件 (LENS 条件) をランダムにそれぞれ 5 回ずつ測定した。

3) 解析方法

MATLAB を使用し解析プログラムを作成した。重心動揺解析に先立ち、得られた時系列データに 20 Hz のバターワース型デジタルローパスフィルターをかけた。SFA 法は、基準速度ベクトルから一定時間間隔後の速度ベクトルへの差 (変化ベクトル) を求め、その変化ベクトルと基準速度ベクトルの単位ベクトルで作られる扇形面積 (扇形の半径は、変化ベクトルの大きさ) を COP 変化量とした (図 1)。本研究では時間間隔 3 秒間の COP 変化量の総和に対する時間間隔 0.1 秒以下の短い時間間隔の COP 変化量の総和の比率のことを FFratio としてあらわした。これはフィードフォワード (FF) 期間にどのぐらい COP が変化したかをあらわす。さらに、時間間隔 3 秒間の COP 変化量の総和に対する時間間隔 0.2 秒～0.7 秒の COP 変化量の総和の比率のことを FBratio としてあらわした。これは、フィードバック (FB) 期間にどのぐらい COP が変化したかをあらわす。

統計処理は対応のある一元配置分散分析を行った。有意水準は 5% とした。

【結果と考察】

逆さメガネを着用した被験者の感想として、「直立で前を見ている場合には影響をあまり感じなかった」という意見が多かった。しかしながら、重心動揺検査の結果を見ると、OPEN 条件に比べて CLOSE 条件と同様に LENS 条件では総軌跡長が有意に長くなった。外周面積も OPEN 条件に比べ LENS 条件で大きくなる傾向にあった (図 2)。

SFA 法を用いて、OPEN 条件、CLOSE 条件、LENS 条件の COP 変化量を比較した。図 3、4 は FFratio と FBratio をそれぞれ OPEN 条件、CLOSE 条件、LENS 条件で比較したものである。FFratio においては、OPEN 条件に対して CLOSE 条件と LENS 条件が有意に小さい値を示した (図 3)。FBratio については条件間に有意な差は見られなかった (図 4)。

一方、Nagano 法による方向変化は、基準の速度ベ

クトルに対する一定時間間隔後の方向変化 (cos 値) をあらわしている。本研究においても、先行研究通り、短い時間間隔では cos 値が 1.0 に近く、これはフィードフォワード期間では基準速度ベクトルと同じ方向を向いていることを示しており、0.2~0.7 秒の時間間隔では cos 値が負の値となり、これはフィードバック制御によって基準速度ベクトルに対して反対方向を向いていることを示している⁵⁾。Nagano 法を用いてフィードフォワード期間とフィードバック期間における方向変化を OPEN 条件、CLOSE 条件、LENS 条件間で比較した (図 5、6)。フィードフォワード局面の方向変化は OPEN 条件に対して CLOSE 条件、LENS 条件で優位に小さかった (cos 値が大きい) (図 5)。一方、フィードバック局面では有意な差は見られなかった (図 6)。

これらのことから、逆さメガネによる左右反転した視覚情報によってボディースキーマが歪められ、その結果、CLOSE 条件と同様の結果を示したと考えられた。逆さメガネによる視覚情報は、反転した視界であるため頭部の揺れを反転して捉えてしまうことで、フィードバック制御に CLOSE 条件以上の負の影響を及ぼすことが予想されたが、フィードバック期間の方向変化や FBratio に OPEN 条件・CLOSE 条件・LENS 条件で有意な変化はなかった。逆さメガネによる影響としては、フィードバック制御ではなく、むしろフィードフォワード制御において CLOSE 条件と同様の負の影響を受けた。静止立位時の姿勢制御においては、視覚情報、前庭感覚情報、体性感覚情報の 3 つの感覚情報が neural store において統合される²⁾ことで正確なボディースキーマが得られ、それを使って予測的な姿勢制御を行っていると考えられる。CLOSE 条件では、視覚情報が得られないため正確なボディースキーマが得られず、予測的な姿勢制御が行えないために、フィードフォワード期間の方向変化が少なく、身体の動揺が大きくなったと考えられる。LENS 条件においては、被験者によっては違和感を感じないほどの視覚情報が得られているものの反転した情報であるために正確なボディースキーマを得ることができず、被験者の感想とは異なり、CLOSE 条件と同様に予測的な姿勢制御が行えていな

いと考えられた。

つまり、ヒトの姿勢制御において視覚情報を用いた予測性と考えられるフィードフォワード制御が姿勢の安定性に大きく貢献していると考えられた。

【結論】

本研究ではヒトの姿勢制御において予測性と考えられるフィードフォワード制御が姿勢の安定性に強く影響している可能性について検討することを目的とした。その結果、OPEN 条件に対して CLOSE 条件・LENS 条件で総軌跡長が有意に長く、外周面積も大きくなる傾向にあった。

FRatio は OPEN 条件に対して CLOSE 条件・LENS 条件で有意に小さくなった。FBratio は 3 条件間に差は見られなかった。Nagano らの解析方法による方向変化も、フィードフォワード期間のみに有意差がみられ、OPEN 条件に対して CLOSE 条件・LENS 条件で方向変化が小さくなった。これらのことから、左右反転した視覚情報の入力フィードバック制御ではなく、むしろフィードフォワード制御に影響を及ぼしており、視覚情報を用いた予測性と考えられるフィードフォワード制御が姿勢の安定性に強く影響している可能性が示された。

【参考文献】

- 1) 大築立志・鈴木三央・柳原大；姿勢の脳・神経科学—その基礎から臨床まで—, 市村出版, 36-50, 2011
- 2) 肥塚泉;感覚器の老化と抗加齢医学—平衡感覚—, 日本耳鼻咽喉科学会会報 119(2), 87-93, 2016
- 3) 政二慶・阿部・匡樹：バイオメカニクス的手法を用いた静止立位制御機構の解析, バイオメカニクス研究 9(1), 10-17, 2005
- 4) Collins JJ, De Luca CJ : Open - loop and closed - loop of posture, A random - walk analysis of center - of - pressure trajectories. Exp Brain Res. 95(2), 308-318, 1993
- 5) Nagano A, Noritake H, Luo ZW: An analysis

- of directional changes in the center of pressure trajectory during stance. *Gait Posture* 31(3), 400-402, 2010
- 6) Edamatsu C, Yamano C, Takahashi K, Kusumoto K, Kanda A, Yamamoto M, Yamaguchi H, Miyakawa T, Onodera S: A method for representing the magnitude and direction of the COP trajectory with one variable. American College of Sports Medicine 62nd Annual Meeting, San Diego(USA), 2015
- 7) Massion J, et al.: Why and how are posture and movement coordinated? *Prog Brain Res* 143, 13-27, 2004
- 8) Schepens B and Drew T: Independent and convergent signals from the pontomedullary reticular formation contribute to the control of posture and movement during reaching in the cat. *J Neurophysiol* 92, 2217-2238, 2004
- 9) 吉村浩一:左右反転めがね連続着用時の空間認知と空間行動一大阪市立大学 (1985/4) と中京大学 (1985/6) でのテスト結果の検討一, 金沢大学文学部論集 行動科学科篇 6, 1-14, 1986

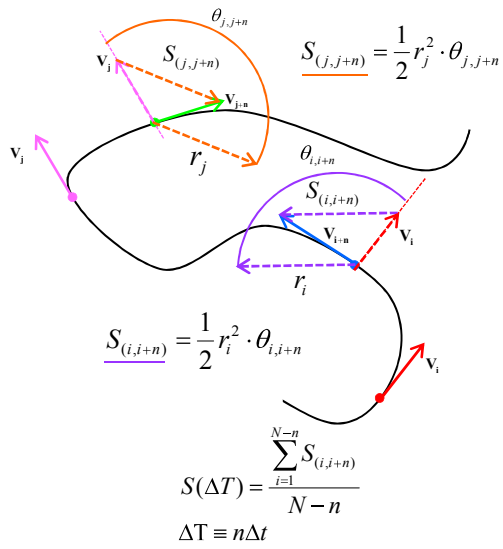


図1 SFAの計算方法

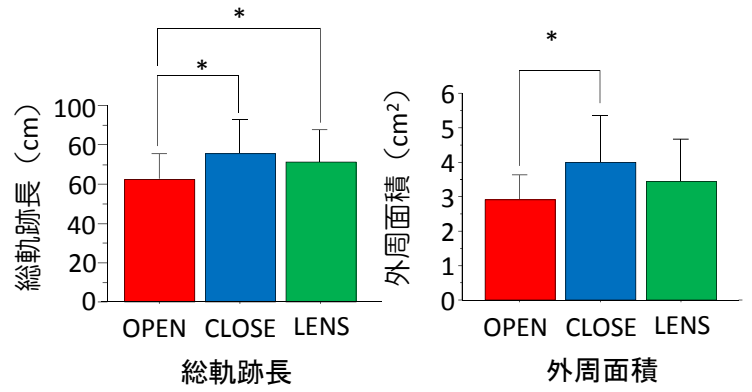


図2 総軌跡長と外周面積

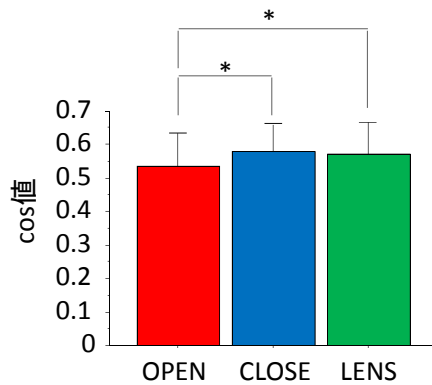


図3 フィードフォワード期間の方向変化

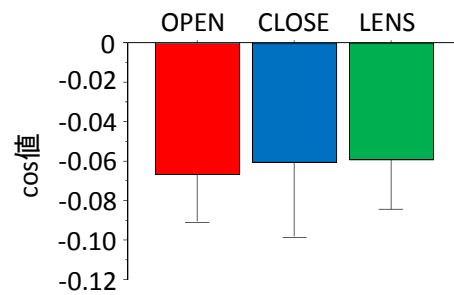


図4 フィードバック期間の方向変化

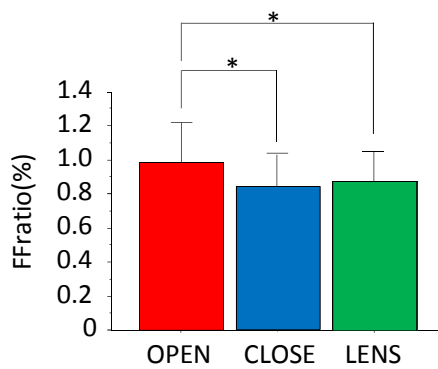


図5 FFratio

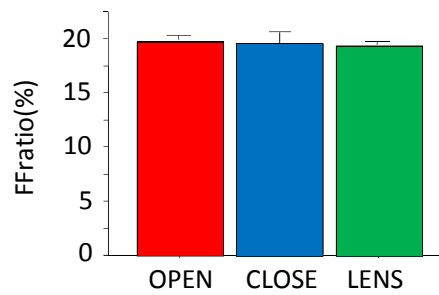


図6 FBratio

DKK3 遺伝子をターゲットとした頭頸部扁平上皮癌制御

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 口腔病理学分野（旧所属：川崎医科大学 分子生物学）

片瀬 直樹

（概要）

本研究では頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) において特異的に発現が高い DKK3 遺伝子について解析し、HNSCC 細胞で DKK3 を過剰発現させると細胞の増殖、遊走、浸潤が有意に上昇する現象に関して、そのメカニズムを検討した。HNSCC 細胞で DKK3 遺伝子過剰発現系を構築し、microarray による網羅的遺伝子発現解析と、western blotting によるシグナル分子の発現およびリン酸化解析を組み合わせ、DKK3 によって活性化されるシグナルの候補を同定した。さらに、低分子化合物を作用させることで、DKK3 過剰発現細胞の増殖、遊走の増加を抑制することに成功した。結果からは、DKK3 には未知のレセプターを介したシグナル伝達機構が存在することが明らかになり、HNSCC 特異的に oncogenic function を発揮することが強く示唆された。これらから、DKK3 が HNSCC の制御の有望なターゲットとなりうる可能性が考えられた。

1. 緒言

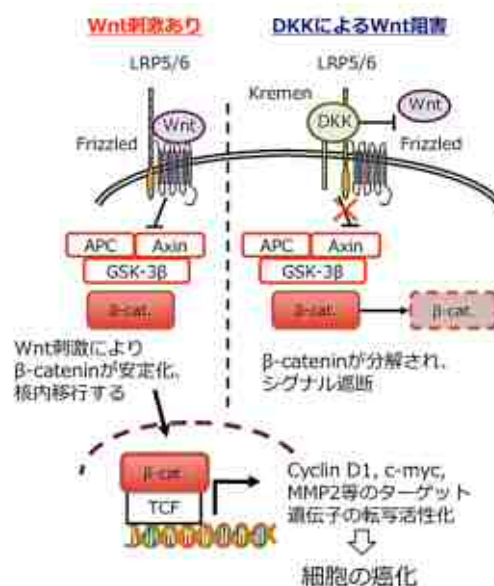
頭頸部・口腔領域の癌は 95%以上が扁平上皮癌であり、頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) とよばれる。HNSCC は全癌の中で 8 番目に発生頻度が高く、リンパ節転移や遠隔転移を伴う場合には 5 年生存率は 40%程度にまで低下する¹⁾。このように、HNSCC は比較的発生頻度が高く、かつ制御が難しい腫瘍であり、転移があると特に予後不良となる癌であると言える。

HNSCC の発生と進展に関わる癌関連遺伝子については理解が進んでおらず、HNSCC の key となる遺伝子の検索と、それに基づく分子病理学的アプローチが求められている。

申請者らは、HNSCC に特異的な癌関連遺伝子を検索し、DKK3 遺伝子に着目した。DKK3 は細胞の癌化に関連する Wnt signaling の抑制因子である Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor (DKK) family に属する遺伝子で、cysteine rich domain を 2 つ有する分泌型タンパクをコードする。Wnt signal では、Wnt リガンドがレセプターである Frizzled-LRP5/6 に結合すると細胞内の β -catenin のリン酸化を抑制してその安定化と核内移行を促進する。その結果、転写因子の TCF/LEF を活性化し、発癌の標的遺伝子である

Cyclin D1 や Myc の発現が増加する²⁾。DKK タンパクは LRP5/6 に競合的に結合するアンタゴニストとして機能し、Wnt signal を阻害する（図 1）。消化管の腺癌などでは DKK や sFRP などの Wnt antagonist の発現低下と Wnt signal の亢進が生じていることが知られている³⁾。

<図 1 : Wnt signaling と DKK>



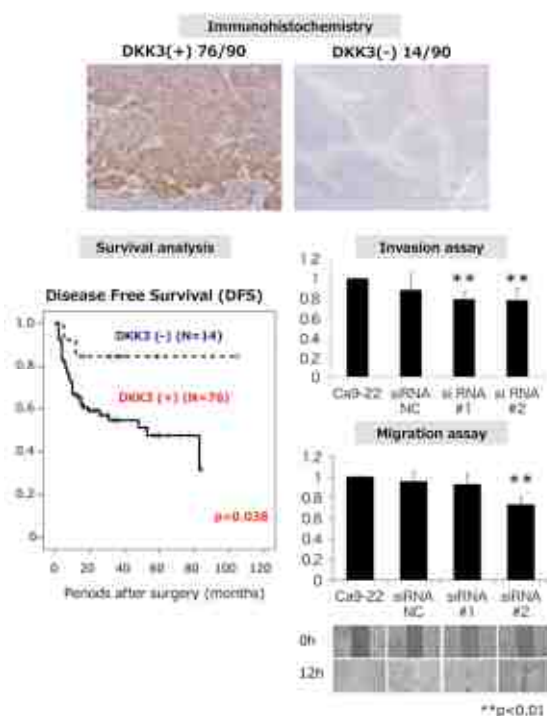
DKK family には DKK1~4 のメンバーがあり、DKK1, DKK2, DKK4 には Wnt signal を抑制するが、DKK3 だけはこれらとは異なり、Wnt signal の抑制機能を有さない。しかし、種々の癌で発

現が低下していることから Reduced expression in immortalized cells (REIC)の別名でも知られ、やはり癌抑制遺伝子として機能すると考えられている。DKK3 発現低下を示す腺癌などで DKK3 を強制発現させると細胞にアポトーシスを起こすことから、遺伝子治療のターゲットとして注目されている⁴⁾。

申請者らは HNSCC でも DKK3 が癌抑制遺伝子として機能すると仮定して検討を重ねたが、驚くべきことに、以下のような結果が得られた。

- (1) HNSCC では DKK3 遺伝子およびタンパク発現率は高く、DKK3 発現群は予後不良であったが、DKK3 非発現群は転移を示さなかった⁵⁾。
- (2) HNSCC 由来細胞株で DKK3 遺伝子の発現をノックダウンすると、細胞の浸潤性、遊走性が有意に低下した⁶⁾ (図2)。

<図2：HNSCC での DKK3 発現と機能>

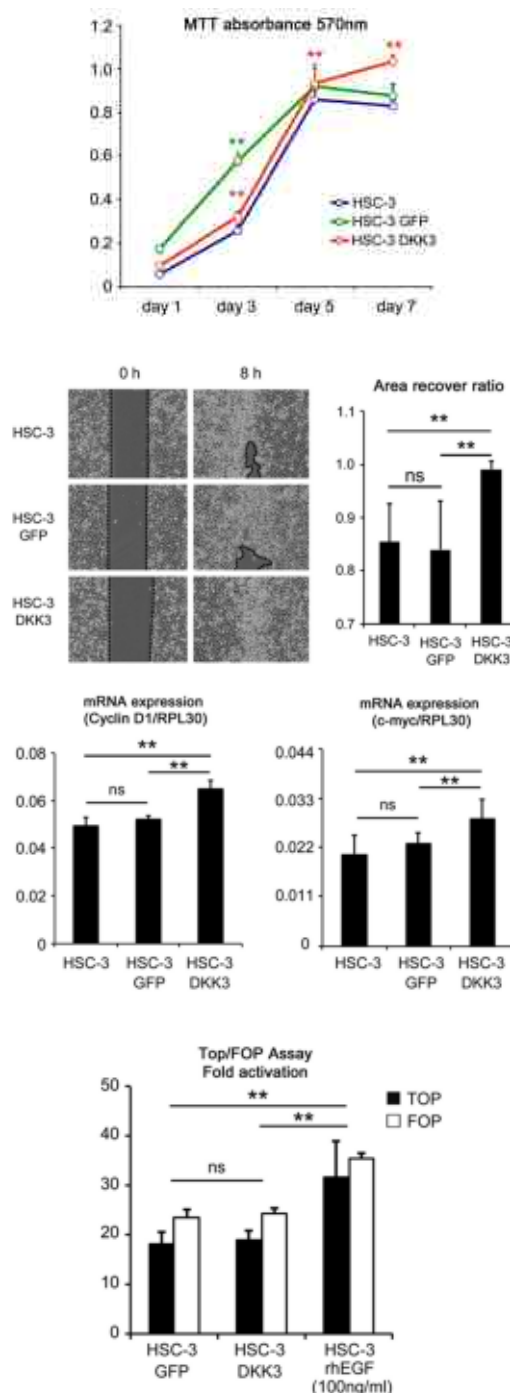


これらから、申請者は「DKK3 遺伝子は HNSCC 特異的に oncogenic な作用を示す」との仮説を提唱した。この仮説を検証するため HNSCC 由来細胞で DKK3 を過剰発現させる系を構築し、さらなる検討を加えたところ、DKK3 過剰発現細胞では cyclin D1 や c-myc の発現増加

とともに細胞の遊走性、浸潤性、増殖が増加し、ヌードマウスへの移植でも腫瘍径が増大するという結果が得られ、仮説が強く支持された。

しかし、DKK3 過剰発現細胞では、一見 DKK3 が Wnt signal の活性化しているかのような挙動を示すにもかかわらず、TCF/LEF 活性が上昇しておらず、Wnt signal とは別のシグナルを介したメカニズムの存在が示唆されている (図3)。

<図3：DKK3 過剰発現による影響>



そこで、本学術研究費助成対象研究では、HNSCC において DKK3 が関与するシグナル分子の同定を目指し、DKK3 過剰発現細胞で microarray 解析を行うとともに、western blotting による関連シグナルの解析を行った。

その結果、DKK3 によって変動するシグナル分子の候補を絞り込み、その阻害剤によって腫瘍が制御される可能性を示した。

2. 材料と方法

(1) 細胞株とマイクロアレイ解析

HNSCC 由来細胞株として、ヒト舌癌由来の HSC-3 細胞 (RIKEN BRC) を使用した。この細胞に対し、DKK3 発現プラスミドを Turbofectin 8.0 (Origene) にてトランスフェクションすることで DKK3 過剰発現細胞 (HSC-3 DKK3) を作製した (図 3)。Control としては GFP をトランスフェクションした細胞 (HSC-3 GFP) を用いた。DKK 遺伝子発現の変化は Real time PCR、western blotting によって確認した。Real time PCR は Total RNA を ISOGEN (NIPPON GENE) で抽出し、ReverTra Ace (TOYOBO) で合成した cDNA を使用し、Thunderbird qPCR mix (TOYOBO) を用いて StepOne plus (Thermo Fisher Scientific) で行った。遺伝子発現は housekeeping gene の RPL30 でノーマライズして評価し、発現上昇を確認した。

HSC-3、HSC-3 GFP、HSC-3 DKK3 の各細胞を confluent になるまで培養した後、total RNA を ISOGEN (NIPPON GENE) で抽出した。Total RNA は 3D-gene 全遺伝子型 DNA チップ受託解析 (東レ) に提出し、遺伝子発現を解析した。遺伝子発現の変化は、HSC-3 DKK3 での遺伝子発現を HSC-3、HSC-3 GFP のそれと比較した。

(2) DKK3 過剰発現でのシグナル分子の解析

DKK3 過剰発現系での Wnt signal 関連分子のリン酸化の状態を western blotting で検討した。抗体には、DKK3 (abcam)、 β -catenin、active β -catenin、phospho- β -catenin、GSK-3 β 、phospho-GSK-3 β (CST) などを用いた。Control には β -actin (CST) を用いた。

(3) 阻害薬による影響の検討

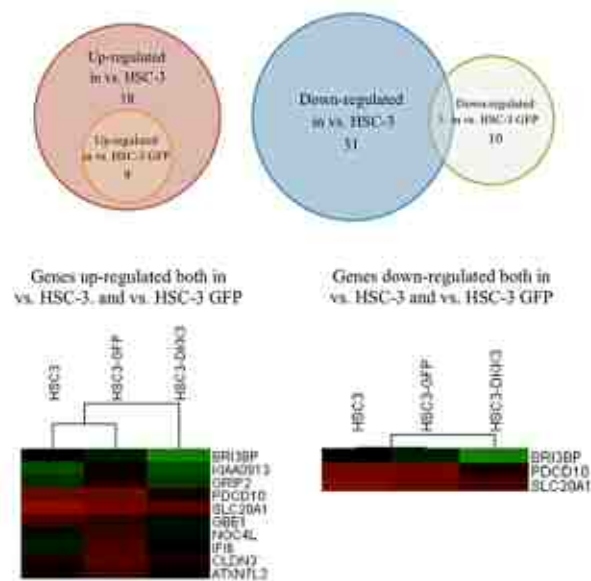
(1)、(2) で絞り込んだ DKK3 関連シグナル分子の阻害薬である低分子化合物 (以下、化合物 A) を HSC-3 DKK3 細胞に作用させ、細胞の増殖性、遊走性について検討した。細胞増殖には TACS MTT Cell proliferation Assays (TREVIGEN) を用いた。細胞の遊走性については、Culture-Insert (Ibidi) による wound healing assay で行った。

3. 結果

(1) DKK3 過剰発現系での遺伝子発現変化

Microarray 解析の結果、DKK3 過剰発現系では HSC-3 DKK3 vs. HSC-3 では 89 up-regulated genes, 173 down-regulated genes が、HSC-3 DKK3 vs. HSC-3 GFP では 54 up-regulated genes, 75 down-regulated genes が同定された。このうち、非特異的な増幅を除外するため、発現量の低い遺伝子を除き、HSC-3 DKK3 において HSC-3、HSC-3 GFP と比較して共通して発現が増加している 9 genes (NAB2, NAV3, ABHD14B, SMG6, DYRK4, AGR2, EPN3, RAD17, RTKN)、低下している 3 genes (BRI3BP, PDCD10, SLC20A1) を同定した (図 4)。

<図 4 : DKK3 過剰発現による遺伝子発現変化>

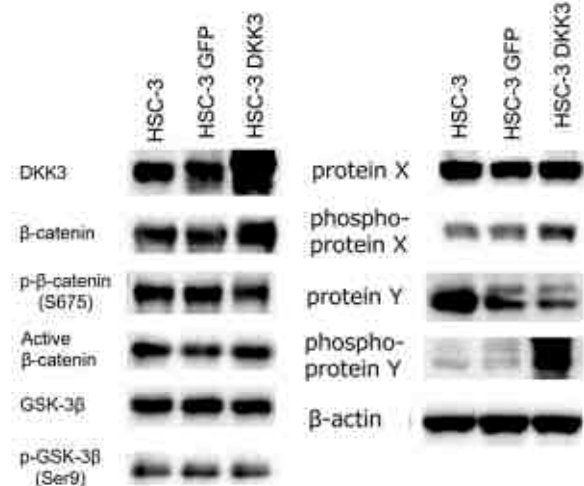


(2) DKK3 過剰発現系でのシグナル分子の変化

DKK3 過剰発現系での具体的なシグナル分子の解

析を western blotting にて行った。その結果、DKK3 過剰発現では β -catenin や GSK-3 β の発現とリン酸化には影響が認められなかった。しかし、protein X と protein Y のリン酸化が上昇しており、これらが DKK3 を介した腫瘍の増殖、遊走性、浸潤性の増加に関与している可能性が強く示唆された (図 5)。

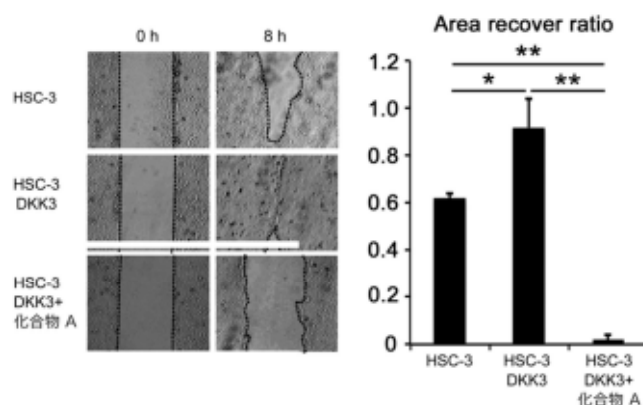
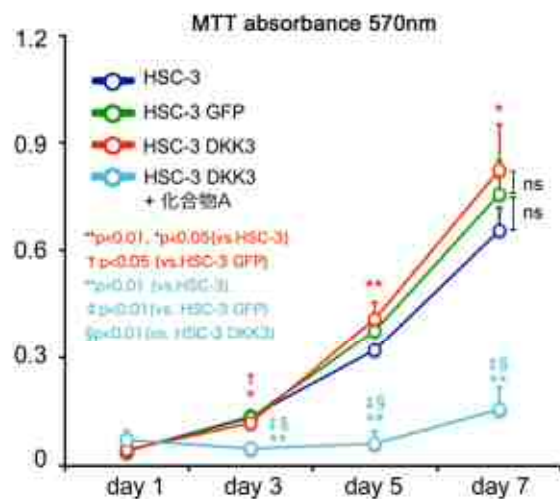
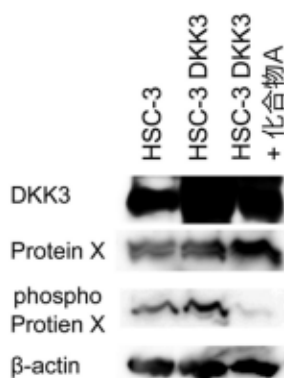
<図 5 : DKK3 過剰発現とシグナル分子の変化>



(3) Protein X の阻害剤 化合物 A による HSC-3 DKK3 細胞への影響

HSC-3 DKK3 細胞においてあるシグナルの抑制剤として用いられる低分子化合物 A を作用させ、DKK3 による細胞の増殖、遊走性の増加が抑制されるかどうかを検討したところ、化合物 A は HSC-3 DKK3 細胞において、DKK3 発現には影響せず protein X のリン酸化を抑制した。さらに、腫瘍細胞の増殖と遊走性を有意に低下させた (図 6)。

<図 6 : HSC-3 DKK3 への化合物 A の作用>



4. 考察

これまでの研究成果では、「DKK3 遺伝子は HNSCC では他の臓器の癌 (特に腺癌) とは異なり、癌抑制遺伝子としては機能せず、むしろ腫瘍の増殖や浸潤、転移を促進する」という可能性が強く示唆されており、HNSCC 細胞での DKK3 過剰発現系でもこれを支持する結果が得られていた。しかし、この作用が発現するメカニズムについては不明な点が多く、Wnt signal とは別のシグナル分子が関与していると考えられた。

そこで本学術研究費助成対象研究では、HNSCC 由来細胞で DKK3 遺伝子の過剰発現を行った上で、網羅的な遺伝子発現 profile を比較し、「DKK3 がどのようなメカニズムで HNSCC 細胞の悪性度を増加させているか」を明らかにすることを目的に解析を行った。

結果からは、(1) DKK3 遺伝子発現が増加することで、転移の形成に関わる遺伝子やテロメラーゼの活性化に関わる遺伝子発現が上昇する一方、アポトー

シスを調節する遺伝子の発現低下がみられることが明らかになったほか、(2)DKK3 過剰発現では、Wnt signal 以外の重要なシグナル分子である protein X, protein Y のリン酸化が亢進しており、細胞の浸潤や増殖を増加させている可能性が示唆された。さらに、(3) DKK3 過剰発現細胞であるシグナルの阻害剤である低分子化合物（化合物 A）を作用させると、protein X のリン酸化が抑制されるとともに、腫瘍細胞の増殖と遊走性が有意に低下することが示された。

結果(1)について

今回はDKK3 発現増加によって上昇する遺伝子を9 種類同定したが、そのうちの AGR2 (Anterior gradient protein 2)は、両生類の発生において背側外胚葉の前方に発現する遺伝子の human homolog であり、種々の悪性腫瘍で発現が増加している。AGR2 は Her2/Her3, MAPK, Akt signal を介して転移の形成に関与すると考えられている⁷⁾。HNSCC における AGR2 発現についても cancer cell self-renewal や上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) に寄与するという報告がある⁸⁾。また、SMG6 (EST1A) 遺伝子はテロメラーゼの活性化に寄与する遺伝子であり、HNSCC においてもその活性化が報告されている⁹⁾。一方で、DKK3 過剰発現で低下する遺伝子では3 種類が同定された。その中でも PDCD10 遺伝子は、細胞にアポトーシスを惹起する機能を有する¹⁰⁾。ここから、DKK3 の過剰発現細胞がアポトーシスを回避している可能性が考えられる。

このように、DKK3 過剰発現により細胞の浸潤や増殖、生存に有利になる条件が提供される可能性が示唆された。

結果(2), (3)について

これまでの研究で既に、「DKK3 過剰発現による細胞の悪性度の増加は Wnt signal とは無関係である」ことが示唆されていたが、本研究により、初めて HNSCC における DKK3 を介したシグナルの一端が明らかとなった。

Protein X, protein Y のリン酸化はこれまでも種々の癌で報告されており、pro-apoptotic resistance や cell

cycle の亢進、細胞の生存の亢進に重要であることが報告されており、HNSCC においてもその活性化が細胞の悪性度に関与する可能性が示唆されている。

化合物 A は protein X を介したシグナルを遮断し、その結果として DKK3 過剰発現細胞の増殖や遊走性を有意に低下させた。このことから、DKK3 は Wnt signal ではなく、直接的ないし間接的に protein X を介したシグナルを作動させ、細胞の悪性度を高める oncogenic function を発揮することが明らかになった。

ここからは、DKK3 が HNSCC の増殖および転移抑制のターゲットとして有望であることが示される。また、これらのシグナルの挙動は、DKK3 には未知の細胞表面レセプターが存在している可能性を暗示している点でも重要である。今後は別の方法を用いて DKK3 の特異的レセプターを同定する予定である。

5. 結論

DKK3 は HNSCC 特異的に発現し、Wnt signal ではなく Protein X のリン酸化を亢進させるシグナルを介して細胞の増殖や遊走を促進する作用を有すると考えられた。Protein X を介するシグナルを抑制する低分子化合物 A は DKK3 による作用を打ち消す効果が認められ、治療への応用が期待できると考えられた。

※現在、本学術研究費助成対象研究の結果を査読付き英文雑誌に投稿し revise 中であるため、結果の一部を非公開としています。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導をいただきました川崎医科大学 自然科学教室 西松 伸一郎 准教授、旧:分子生物学1 (発生学) 教室 濃野 勉 教授に感謝いたします。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた生化学教室 山内 明 教授、臨床腫瘍学 山村 真弘 講師、長崎大学 口腔病理学分野 藤田 修一 准教授、東京医科歯科大学 口腔病理学分野 池田 通 教授、川崎医科大学 分子細胞生物ユニットおよび研究補助員の皆様に感謝を表します。

7. 参考文献

- 1) O'Rorke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2012; 48(12): 1191-1201.
- 2) Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene.* 2006; 25(57): 7469-7481.
- 3) Veeck J, Dahl E. Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1825(1): 18-28.
- 4) Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Araki M, Ebara S, Yanai H, Watanabe M, Nasu Y. Feasibility of neoadjuvant Ad-REIC gene therapy in patients with high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Clin Transl Sci.* 2015;8(6):837-840.
- 5) Katase N, Lefevre M, Gunduz M, Gunduz E, Beder LB, Grenman R, Fujii M, Tamamura R, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. Absence of Dickkopf (Dkk)-3 protein expression is correlated with longer disease-free survival and lower incidence of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2012; 3(2): 273-280.
- 6) Katase N, Lefevre M, Tsujigiwa H, Fujii M, Ito S, Tamamura R, Buery RR, Gunduz M, Nagatsuka H. Knockdown of Dkk-3 decreases cancer cell migration and invasion independently of the Wnt pathways in oral squamous cell carcinoma derived cells. *Oncol Rep.* 2013; 29(4): 1349-1355.
- 7) Brychtova V, Vojtesek B, Hrstka R. Anterior gradient 2: a novel player in tumor cell biology. *Cancer Lett.* 2011; 304(1): 1-7.
- 8) Ma SR, Wang WM, Huang CF, Zhang WF, Sun ZJ. Anterior gradient protein 2 expression in high grade head and neck squamous cell carcinoma correlated with cancer stem cell and epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget.* 2015; 6(11): 8807-8821.
- 9) Redon S, Reichenbach P, Lingner J. Protein RNA and protein protein interactions mediate association of human EST1A/SMG6 with telomerase. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(20): 7011-7022.
- 10) Zhang H, Ma X, Deng X, Chen Y, Mo X, Zhang Y, Zhao H, Ma D. PDCD10 interacts with STK25 to accelerate cell apoptosis under oxidative stress. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012; 17:2295-2305.

加齢と腸内細菌叢の関係性から運動の老化予防効果を再検討する

川崎医療福祉大学 健康体育学科

矢野 博己

(概要)

【目的】本研究では、加齢にともなう腸内細菌叢の変化が、老化現象を引き起こす原因の一つと考えられていることを受け、運動習慣がもたらす老化予防効果もまた腸内細菌叢の変化が影響しているのかどうかについて検討するため、老化促進マウス、および運動を負荷した老化抑制マウス（ドナーマウス）の表現型が、便移植法を用いて、レシピエントマウスに水平伝播するののかの検討を試みた。【方法】ドナーマウスには、SAMP1-高齢マウス（50 週齢）を用い、12 週間のレジスタンストレーニング（SAMP1-Ex）、または安静（SAMP1-Ctrl）を負荷した。対照群にはレシピエントマウスと同系統同週齢 C57BL/6 マウス（BL/6-Ctrl）を用いた。それぞれドナーマウスから採取した盲腸便を、レシピエントマウスに胃ゾンデを用いて移植した。その後、ドナーマウスの腸内細菌叢の解析とともに、レシピエントマウスの、身体活動および不安行動の影響を評価した。【結果】ドナーマウス腸内細菌叢の α -多様性は、運動を負荷した SAMP1 マウスが安静 SAMP1 マウスより有意に高い値であった。SAMP1-Ctrl および SAMP1-Ex マウスからの便移植を受けたレシピエントマウスの筋力は、BL/6-Ctrl マウス便移植群と比較して低下していた。しかし、SAMP1-Ctrl 移植マウスと SAMP1-Ex 移植マウス間には、有意な差は観察されなかった。また回転輪による自発運動量にも、便移植の影響は観察されなかった。【結論】以上の結果から、腸内細菌叢が老化にともなう活動性の低下と関係している可能性は考えられたものの、運動習慣によって成立した腸内細菌叢の変化と老化予防効果がリンクしてレシピエントマウスに伝播するののかについては本研究から明らかとはならなかった。

【序論】

世界にも類を見ない速さで進む日本人の高齢化は、国民医療費の増加、社会保障費の財源不足、貧困や格差といった社会問題を引き起こし、深刻化する一方である。我々にとって健康寿命の延伸こそが、個々人にかせられた課題と言えるのかもしれない。ヒトは誰しも老いるものではあるが、加齢にともなう活動性の低下は、代謝性疾患やサルコペニアとともに、加齢に伴う神経伝達物質（ドーパミン、セロトニンやその受容体、合成酵素など）の減少とそれらの働きを阻害するサイトカインの増加による。近年は、腸内細菌叢と代謝性疾患や老化現象との関係が知られるようになってきた。すなわち、痩せ型と肥満型では腸内細菌叢が異なること、メタボリックシンドローム発症に腸内細菌叢の違いが関係することなどが報告されるようになった。加えて、加齢によって変化する腸内細菌叢は、結果として免疫低下、肝臓や腎臓、膵臓などの各種臓器の機能障害、肝がん、

動脈硬化など疾患発症へとつながる可能性が高いとされる。さらに、神経伝達物質とされるドーパミンやセロトニンでさえ腸管や腸内細菌によって産生される事も明らかとなる中で、痴呆症や自閉症といった精神疾患にも腸内細菌叢が関与する可能性が指摘されるようになった。

一方、運動習慣は、老化に伴う骨格筋や循環器の形態的・機能的低下抑制への貢献にとどまらず、精神疾患の予防にも寄与することが知られている。さらに、我々は運動による腸管免疫機能の劇的な変化を報告し（Uchida, et al., 2014）、現在、腸内細菌叢の変化を介した自発運動によるメタボリックシンドロームの発症予防効果についても明らかにしつつある。その中で、運動を負荷したマウスの糞便を別のマウスの腸管内に移すこと（便移植）により、移植を受けたマウス（レシピエントマウス）の神経伝達物質に影響を与えるサイトカインの脳内発現可能性がある。今回我々は、老化促進モデルマウス

(SAMP1) を用いて、運動の老化抑制実験を検討する中で (共同研究)、貴重な盲腸便の回収に成功しており、腸内細菌叢が加齢に伴う活動性の低下にどのように影響するかについて検討 (便移植実験) を行うことが可能となった。

そこで、本研究では、老化促進マウスおよび運動を負荷した老化抑制マウス (ドナーマウス) の表現型が、便移植法を用いて、レシピエントマウスに水平伝播するのかを明らかにし、加齢と腸内細菌叢の関係性から運動の老化予防効果の検討を行うことを目的とした。

【方法】

実験動物

便移植レシピエントマウスとして C57BL/6 雄マウス 4 週齢 (n=30) を使用し、以下の 3 群に分けた。すなわち、C57BL/6-Ctrl マウス便移植群 (BL/6-Ctrl, n = 10)、SAMP1-Ctrl マウス便移植群 (n = 10)、および SAMP1-Ex マウス便移植群 (n = 10) であった。すべてのマウスは、便移植前に、抗生剤アンピシリン (1 mg/ml) とネオマイシン (0.5 mg/ml) の混合水を 3 日間飲水させ、腸内除菌を実施した。除菌期間終了後、0、1、2 週目の計 3 回、便移植を実

施した。

便移植

レシピエントマウスと同系統同週齢マウスの盲腸便 (BL/6-Ctrl)、および SAMP1-高齢マウス (50 週齢) で 12 週間のレジスタンストレーニング (SAMP1-Ex) または安静 (SAMP1-Ctrl) を負荷した後の盲腸便 (立命館大学 家光研究室より提供) を移植便として使用した。移植方法は、無菌水に溶かした便を 100 mg/ml に調整し、スピンドダウン後、上清 200 μ l/匹を胃ゾンデにて投与した (Vijay-Kumar, et al., 2010)。

身体活動および不安行動測定

飼育期間終了後、クライミング法を用いた筋力測定 (Neto, et al., 2016 modified)、回転輪を用いた身体活動測定 (Swallow, et al., 1998)、およびビー玉隠し試験による不安行動測定 (Bruce-Keller, et al., 2015)、を実施した。測定はそれぞれ 24~48 時間の間隔を空けて実施した。

測定終了後、全てのマウスは、三種混合 (ドルベネ (0.45 mg/kg)、ドルミカム (4 mg/kg)、ベルトファール (5 mg/kg)) 麻酔薬の腹腔内投与 (0.2~0.3 ml/匹) 後、採血および各臓器の摘出を実施した (解析は現在検討中)。

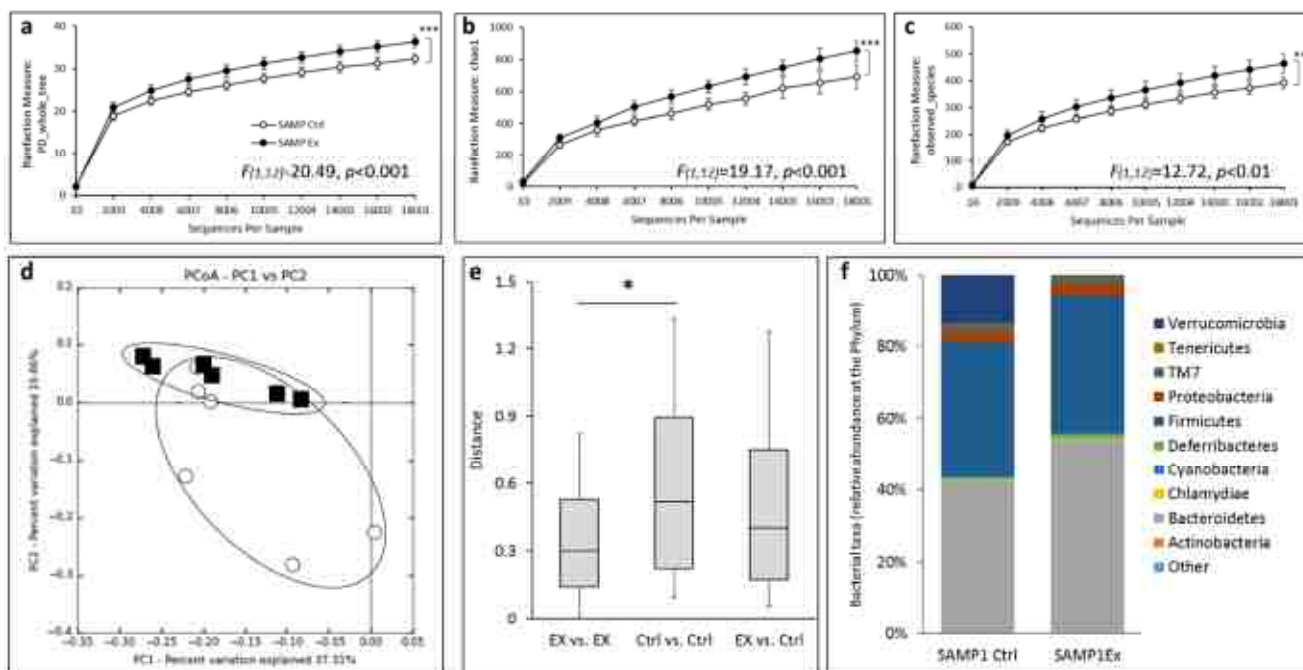


Fig. 1 Microbial diversity and difference in the bacterial community between controlled and exercised SAMP1 mice. (a-c) Rarefaction curve of α -diversity (PD whole tree, Chao1 and Observed species, respectively); (d and e) visualized UniFrac distances between the groups; (f) bacterial classification at the phylum level. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

なお本研究は、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を受けて実施された（承認番号：16-007）。

腸内細菌叢解析

ドナーマウスの24時間便の腸内細菌の16S rRNA遺伝子をターゲットに次世代シーケンス法を用いて糞便DNAを解析した。

【結果と考察】

ドナーマウスの腸内細菌叢を解析した結果、便中の細菌種の α -多様性（系統樹的、Chao1、種の数）は、いずれのIndexにおいても、SAMP1-Ex群の方が有意に高い値を示した（Fig. 1a-c）。ユニフラック（unweighted UniFrac）解析による腸内細菌叢の類似性（ β -多様性）を調べたところ、SAMP1-ExとSAMP1-Ctrlとの主座標分析（principal coordinate analysis: PCoA）に見られる違いがあった（Fig. 1d,e）。さらに両群の腸内細菌叢を門（Phylum）のレベルで比較すると、運動負荷によってBacteroidetes、Cyanobacteria、Deferribacteres、Tenericutesの増加、Actinobacteria、TM7の減少、ならびにVerrucomicrobiaの激減が観察された（Fig. 1f）。特に、SAMP1-Exマウスが、SAMP1-Ctrlと比較して顕著に高い割合を示した科（Family）は、Prevotellaceae、Staphylococcaceae、Streptococcaceae、Christensenellaceae、Clostridiaceae、Dehalobacteriaceae、Lachnospiraceae、Peptococcaceaeであった。一方、SAMP1-ExマウスでSAMP1-Ctrlと比較して顕著に低い値を示した科（Family）は、EnterobacteriaceaeとVerrucomicrobiaceaeであった。

これらの腸内細菌叢を移植されたレシピエントマウスの体重には、有意な差は観察されなかった（Fig. 2a）。一方、クライミング法を用いた筋力測定の結果、SAMP1-CtrlおよびSAMP1-Exマウスからの便移植を受けたマウスでは、BL/6-Ctrlマウス便移植群と比較して低下していた（それぞれ $p=0.05$ 、 $p<0.01$ ）。体重比で比較すると、SAMP1-Ex移植マウスで顕著な低下であった（ $p<0.01$, Fig. 2c）。しかし、SAMP1-Ctrl移植マウスとSAMP1-Ex移植マ

ウス間には、有意な差は観察されなかった。SAMP1マウスは老化促進モデルマウスとして、骨格筋の萎縮を生じることから（Sakakima, et al., 2004）、今回の結果は、老化にともなう筋力の低下が、腸内細菌叢の移植を介して伝播した可能性を示唆するものなのかもしれない。一方で、SAMP1マウスへの運動トレーニングは筋萎縮抑制効果を生じ（Sakakima, et al., 2004）、そしてドナーマウスの腸内細菌叢の変化も観察されたものの、便移植によるレシピエントマウスへの筋力や筋萎縮抑制の水平伝播は生じなかった（Fig. 2d,e）。また回転輪による身体活動量にも、便移植の影響は観察されなかった（Fig. 2f）。したがって、腸内細菌叢が老化にともなう活動性の低下と関係している可能性は考えられるものの、運動習慣によって成立した腸内細菌叢の変化と老化予防効果がリンクしてレシピエントマウスに伝播するののかについては本研究からは明らかにはならなかった。

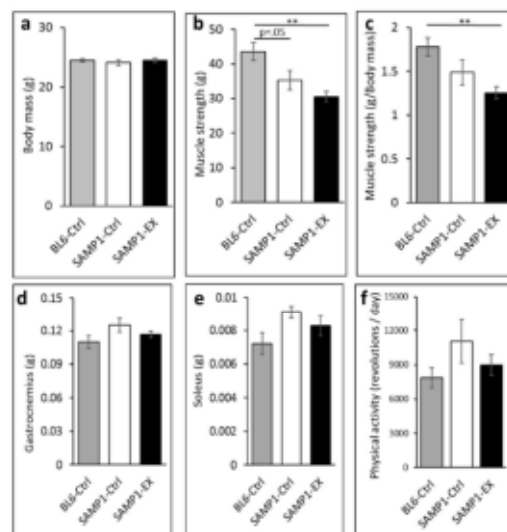


Fig. 2 The effect of fecal microbiota transplantation from controlled and exercised SAMP1 mice on body mass(a), muscle strength (b and c), skeletal muscle mass (d and e) and physical activity (f) in recipient mice. ** $p<0.01$.

さらに、不安行動（Emotional behavior）を評価するために、ビー玉覆い隠し行動試験（Marble-burying behavior test）を実施した。情動ストレス（Anxiety-related disorders）、常同行動（Stereotyped behavior）、強迫性障害（Obsessive compulsive disorder）を評価できるとされるテストであるが、SAMP1-Ctrl移植マウスで上昇し、SAMP1-Ex移植マウスでは、BL/6-Ctrl移植マウスと同程度に不安行動が改善される傾向であった。しかしながら、統計学的な有意差は観察されず、更なる検討が必要で

ある。Bravo ら (2011) によれば、*Lactobacillus* 摂取は、脳内の GABA 受容体の発現をコントロールすることで迷走神経活動を介した不安行動を抑制している。さらに、自閉症スペクトラム障害 (Autism spectrum disorder: ASD) モデルマウスを用いた研究では、*Bacteroides fragilis* 摂取で、腸内細菌叢の変化とともに ASD 行動異常の改善が見られたことが報告されている (Hsiao, et al., 2013)。腸内細菌叢が神経系に対して何らかの影響を及ぼしている可能性は否定できず、腸 - 脳相関と腸内細菌叢に関して更なる検討が必要である。

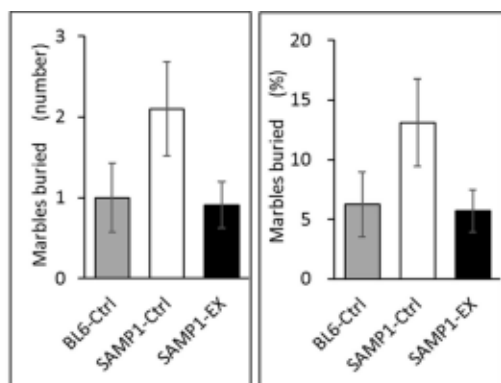


Fig. 3 The effect of fecal microbiota transplantation from controlled and exercised SAMP1 mice on stereotyped behavioral abnormalities in recipient mice.

本研究の限界として、移植便からの腸内細菌叢のレシピエントマウスへの定着度が不明である点があげられる。宿主の腸内細菌叢に対するジェネティックな影響を吟味した上での検討が必要である。また、SAMP1 マウスからの便移植による筋力低下のメカニズム、さらには SAMP1-Ctrl マウスからの便移植による不安行動が高くなる傾向を示したメカニズムの解明が不十分である。脳（大脳、海馬、間脳）腸（小腸、大腸）、および骨格筋（ヒラメ筋、腓腹筋）のサンプリングは完了しており、今後解析を進めることで、そのメカニズム解明に迫ることが出来るものと考ええる。

以上本研究は、加齢にともなう腸内細菌叢の変化が、老化現象を引き起こす原因の一つと考えられることから、運動習慣がもたらす老化予防効果もまた腸内細菌叢の変化が影響しているのかどうかについて検討するため、老化促進マウス、および運動を負

荷した老化抑制マウスの表現型が、便移植法を用いて、レシピエントマウスに水平伝播するのかの検討を試みた。その結果、腸内細菌叢が老化にともなう活動性の低下と関係している可能性は一部示唆されたものの、運動習慣によって成立した腸内細菌叢の変化にともなう老化予防効果は本研究から明らかとはならなかった。

【謝辞】

本研究に際し、糞便および盲腸便を提供していただいた立命館大学家光素行教授、ならびに内田昌孝助教に深謝する。本研究は、平成28年度公益法人ウエスコ学術振興財団 学術研究助成事業の支援により遂行された。ここに記して深謝する。

【参考文献】

- Uchida M, Oyanagi E, Kawanishi N, Iemitsu M, Miyachi M, Kremenik MJ, Onodera S, Yano H. (2014) Exhaustive exercise increases the TNF- α production in response to flagellin via the upregulation of toll-like receptor 5 in the large intestine in mice. *Immun Lett* **158**: 151-158.
- Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT. (2010) Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* **328**: 228-231.
- Neto WK, de Assis Silva W, Cienca AP, Anaruma CA, Gama EF. (2016) Vertical climbing for rodent resistance training: a discussion about training parameters. *Int J Sports Sci* **6**: 36-49.
- Swallow JG, Carter PA, Garland TJr. (1998) Artificial selection for increased wheel-running behavior in house mice. *Behav Genet* **28**: 227-237.
- Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, Blanchard E IV, Taylor CM, Welsh DA, Berthoud HR. (2015) Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry* **77**: 607-615.
- Sakakima H, Yoshida Y, Suzuki S, Morimoto N. (2004) The effects of aging and treadmill running on soleus and gastrocnemius muscle morphology in the senescence-accelerated mouse (SAMP1). *J Gerontol A*

Biol Sci Med Sci **59**:1015-1021.

Thomas A, Burant A, Bui N, Graham D, Yuva-Paylor LA, Paylor R. (2009) Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* **204**: 361-373.

Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. (2011) Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**:16050-16055.

Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK. (2013) Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* **155**:1451-1463.

複数のカメラを用いた超高信頼防犯システムの開発

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床工学科

近藤 真史

近年、広く用いられている複数のカメラを用いた防犯システムでは、幾何学変換(補正)により画像に対する種々の変形と合成が行われているが、リアルタイム性を維持するためには幾何学変換の高速化が必要となる。この種の幾何学変換式には演算負荷の高い乗算と除算が含まれるため、専用回路によるハードウェア化を前提として、多項式近似と漸化式表現により加算のみに帰着して解く手法が提案されている。しかし、多項式近似では漸化式が複雑化するために完全なハードウェア化を実現し難く、高性能な汎用プロセッサ上での動作確認に留まっている。そこで本研究では、複数のカメラを用いた防犯システムの高性能化に先立って、線形近似による漸化式の簡単化と組み込みプロセッサ(ARM)への実装について検討を行った。特に前者では、線形近似により漸化式を定数加算に帰着する手法を提案するとともに、これによって生じる変換誤差については、区間分割により漸化式の定数を初期化することで改善を図っている。そして、これに基づいた幾何学変換法を ARM に実装した結果、既存法と同程度の精度を維持しつつも、その変換速度を約 40%短縮できることが明らかとなった。

1. まえがき

近年、世界情勢の不安定化と情報技術の発展に伴って、個人・企業を問わず自己防衛意識が高まっており、監視カメラのグローバル市場は 2010 年に比して 8 割増の 2845 万台に拡大すると試算されている^[1]。特にスーパーマーケットなどの商業施設では、万引き対策のために監視カメラを積極的に導入しているが、陳列棚などにより完全に死角を排除できず、日本の万引き被害額は 4500 億円以上(世界第 2 位)に達している。これに対する有効な解決策の一つとして、広視野角・高解像度なカメラを導入することが挙げられるが、これに代表される魚眼レンズなどはレンズが特殊であるため依然として高価であり、設置コストの観点から導入可能な台数に限界がある^[2]。したがって現実的には、極力死角を補うように複数の安価なカメラを配置するなどの対策が採られており、その最適なカメラ配置も検討されつつあるが完全に死角を排除することは困難である^[3]。

一方、これまで筆者らは、複数の画像を用いたパノラマ動画画像合成システムの開発に従事している。この種の画像合成には画像の変形処理、いわゆる幾何学変換が必要となるが、この処理はソフトウェア的に処理されるため、高解像度化に伴って演算負荷

が増大し、リアルタイム処理の保証が困難となる。

これに対して筆者らは、ハードウェア化を前提として、関数近似と漸化式表現に基づいた高速幾何学変換法を提案し、その有効性を示している^[4]。

そこで本研究では、フロア天井に複数の安価なカメラを格子状に配置した上で、筆者らの提案している高速幾何学変換法に基づいてフロア全体の俯瞰(見下ろし)画像として高速に合成することにより、死角のない高性能・高機能な防犯カメラシステムの開発を行っている。以下本稿では、その第一段階として、新たに 1 次関数近似により漸化式を簡単化し、幾何学変換を加算処理のみに帰着する手法について報告する。そして、提案法を組み込みプロセッサ(ARM)に実装し、近似次数に依る変換速度の改善効果を定量的に明らかにする^{[5][6]}。

2. 画像に対する幾何学変換の高速化

2.1. 幾何学変換

幾何学変換とは、矩形を拡大・縮小・回転などの操作により、任意の形状の画像に変形する変換の総称であり、アフィン変換、擬似アフィン変換、ヘルマート変換、射影変換の 4 種がよく知られている。通常、この種の幾何学変換に係る画像処理は、変換

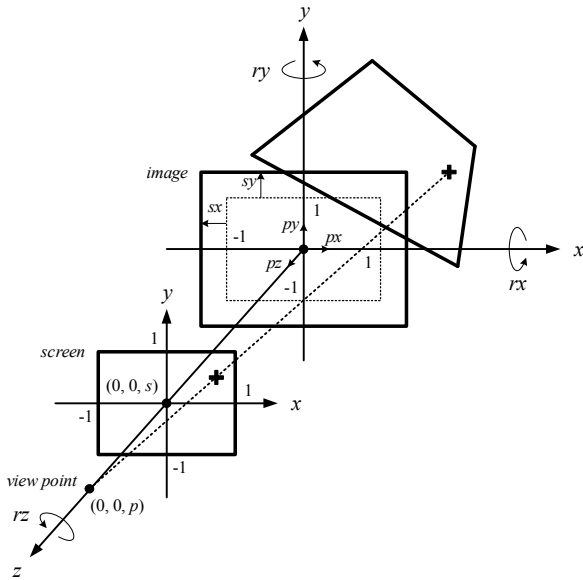


図1：射影変換

後の座標 (X, Y) から対応する変換前の座標 (x, y) を求めた上で、その近傍座標における画素値を用いて補間する(内挿)手続きが一般的である。以降、本稿では、上述の幾何学変換の中でも最も汎用的かつ変換式が複雑な射影変換に焦点を絞って検討を進める。

射影変換は、直線性を維持したまま矩形を任意の四角形に変形することにより、平面画像に遠近感を与える変換である。射影変換の模式図を図1に示し、変換の手続きを以下に記す。

- 手順1. 原画像を横サイズが2(横の幅が ± 1)となるように正規化する。
- 手順2. $z = 0$ 平面上に移動する。
- 手順3. x, y 軸方向にそれぞれ sx, sy 倍して拡大・縮小を施す。
- 手順4. x, y, z 軸方向にそれぞれ px, py, pz 分だけ平行移動を施す。
- 手順5. x, y, z 軸方向にそれぞれ rx, ry, rz 度だけ回転を施す。
- 手順6. 視点 $(0, 0, p)$ からスクリーン $(0, 0, p - s)$ を通して原画像を見る。

ここで、射影変換における逆変換は次式として与えられる。なお、式中の $A \sim H$ は変換係数であり、具体的な算出方法については文献[7]を参照されたい。

$$x = \frac{Au + Bv + C}{Gu + Hv + 1} \quad (1)$$

$$y = \frac{Du + Ev + F}{Gu + Hv + 1} \quad (2)$$

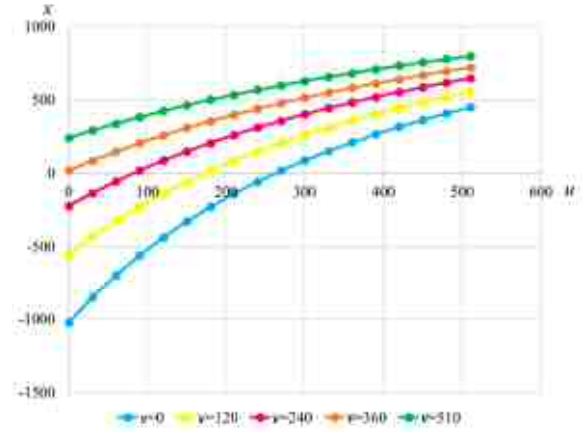


図2：x座標の分布

2.2. 射影変換の高速化

一般的に画像の座標計算は、 u の最小値、すなわち画像の一番左上から右へ順に行われ、右端に到達して1行の座標計算が完了すると、 v をインクリメントして同様に座標計算を繰り返す。この際、1行の座標計算においては v が固定され、1列の座標計算においては u が固定される。したがって、 x 座標に係る逆変換式(1)は次のように表すことができる。

$$g(u, v_a) = \frac{A_p u + B_p v_a + C_p}{G_p u + H_p v_a + 1} \quad (3)$$

$$g(u_a, v) = \frac{D_p u_a + E_p v + F_p}{G_p u_a + H_p v + 1} \quad (4)$$

ここで、 u_a および v_a はそれぞれの変換画像における画素の列および行の位置により決まる定数である。以上のように実際の画像走査手順に従えば、射影変換の逆変換式は単に u および v からなる1変数関数と見なすことができる。本稿では、水平走査線にならない、 v を固定した場合における x 座標の分布を図2に示す。なお、変換パラメータについては、 512×512 画素の画像を左上座標から反時計周りに $(150, 150)$, $(0, 350)$, $(200, 400)$, $(450, 100)$ へ変形した場合について求めた(図3)。図2より、算出された x 座標の分布は凡そ単調増加する関数となることが分かる。そこで文献[4]では、変換誤差を考慮して式(3)および(4)を以下のように2次関数近似を施すことで除算の排除を図っている。ここで、 $a_i \sim c_i$ および $a_j \sim c_j$ はそれぞれ u および v 座標における近似係数である。

$$g(u, v_a) \cong q(u, v_a) = a_j u^2 + b_j u + c_j \quad (5)$$

$$g(u_a, v) \cong q(u_a, v) = a_i v^2 + b_i v + c_i \quad (6)$$

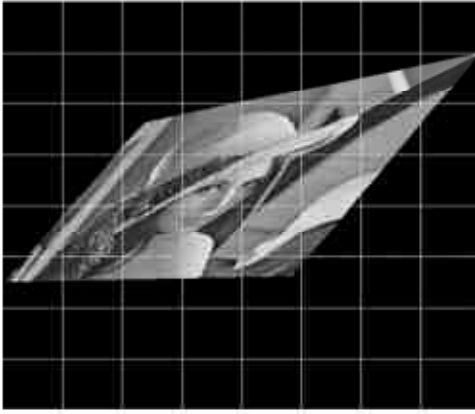


図3：射影変換の一例(8×8の区間分割を含む)

ここでさらに1行の走査、つまり v のインクリメントに着目すると、式(5)および(6)は漸化式的に以下のように表現することができる。

$$g(u, v_a) = q(u-1, v_a) + 2a_j u - a_j + b_j \quad (7)$$

$$g(u_a, v) = q(u_a, v-1) + 2a_i v - a_i + b_i \quad (8)$$

まず、 $g(u, v_a)$ について一時変数 $w_u(u)$ を導入すると、

$$w_u(u) = 2a_j u - a_j + b_j$$

$$w_u(u) = w_u(u-1) + 2a_j \quad (9)$$

となり、結局式(5)は次式として表すことができる。

$$q(u, v_a) = q(u-1, v_a) + w_u(u) \quad (10)$$

したがって、初期値として $q(u-1, v_a)$ 、 $w_u(u)$ 、 $2a_j$ を与えれば、 $q(u, v_a)$ は順次加算のみで算出できる。

続いて、式(8)から行座標を固定し、 u_a をインクリメントさせて座標計算を行うことで1行の計算を行うことができる。ただし、行のインクリメントは画像の走査が左端に来たときに行うため $u_a = 0$ となる点に注意する。ここで同様に一時変数 $w_v(v)$ を導入すると、

$$w_v(v) = 2a_i v - a_i + b_i$$

$$w_v(v) = w_v(v-1) + 2a_i \quad (11)$$

となり、式(6)も同様に以下の通り加算のみの漸化式で表現できる。

$$q(u_a, v) = q(u_a, v-1) + w_v(v) \quad (12)$$

以上の式(10)と式(12)を併せることで、画像全体の座標計算を加算のみで行うことができる。以降、式(10)および(12)をそれぞれ水平漸化式および垂直漸化式と言う。また、以上の x 座標についてのみ述べたが、 y 座標についても同様の手法で漸化式が求まることは明らかである。

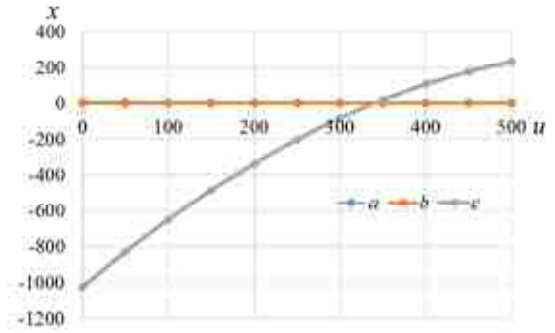


図4：近似係数の分布

3. 射影変換の高速化

3.1. 係数近似

関数近似により決定される係数 a 、 b 、 c は変換後画像の各行で算出、すなわち y 座標に依存することとなる。したがって、各行ごとの係数を保持するメモリが別途必要となり、これに係るメモリへのアクセスが座標変換に係る処理時間のオーバーヘッドとなり得る。ここで、2次関数近似を施した場合における x 座標の係数 a 、 b 、 c の分布を図4に示す(a と b は凡そ同値)。図4より、各係数の概形も図2の座標分布と同様に2次関数的に分布することが分かる。このことから、近似係数についても関数近似と漸化式表現を再帰的に適用することにより、単に定数加算として順次求めることができる。以降、係数の算出に係る漸化式を係数漸化式と言う。

3.2. 近似次数の削減

2次関数近似に基づく射影変換の高速化手法では、一時変数 w の導入や $2a$ の乗数項が生じるため、これを実際のハードウェア化に応用するにはその制御が複雑化することとなる。ここで、図2および図3の分布に着目すると、その曲線は緩やかであり、線形近似、すなわち1次関数近似でも差し支えないように思われる。以降、本稿では紙面の都合上、2章と同様に x 座標に係る1次関数近似についてのみ記す。

まず、式(3)および(4)の1変数関数を1次関数で近似して次式を得る。

$$g(u, v_a) \cong q(u, v_a) = a_j u + b_j \quad (13)$$

$$g(u_a, v) \cong q(u_a, v) = a_i v + b_i \quad (14)$$

ここで、 $a_i \sim b_i$ および $a_j \sim b_j$ は近似係数であり、便宜上、式(5)および(6)と同じ変数名を付しているが、近似次数が異なるためその値も異なる点に注意する。

続いて、まず式(13)に漸化式表現を導入すると、

$$g(u, v_a) = q(u-1, v_a) + a_j \quad (15)$$

として単に a_j の加算に帰着できる。したがって、初期値として $q(u-1, v_a)$ 、 a_j を与えれば、 $q(u, v_a)$ は順次加算により算出できる。さらに、上式から行座標を固定して、 u_a をインクリメントさせて座標計算を行うことで1行の計算を行うことができる。ただし、 $u_a = 0$ であり、式(14)を漸化式表現すると、

$$g(u_a, v) = q(u_a, v-1) + a_l \quad (15)$$

となり初期値 $q(u_a, v-1)$ と a_l の加算で算出できる。

以上より、射影変換の逆変換式を1次関数で近似した場合、その水平漸化式および垂直漸化式はそれぞれ単に $+a_j$ および $+a_l$ の加算のみに帰着され、単純な逐次加算器(アキュムレータ)としてハードウェア化を実現できる。また、 y 座標に係る漸化式その他、3.1の係数近似に係る漸化式もこれと同形の極めて単純な漸化式に帰着できることは明らかである。

3.3. 区間分割による変換精度の改善

上述した関数近似と漸化式表現に基づいた射影変換の高速化手法は、あくまでも近似的な手法であるため逐次加算を行う度に誤差が蓄積し、図5のように変換画像が大きく歪むこととなる。そこで本研究では、変換後の座標 u, v の変域をそれぞれ複数の領域に分割し、区間ごとに近似係数を算出、初期化することで変換後の歪みを軽減する方針を採る。

文献[4]ではこの区間分割について、変換精度向上の観点から、各区間の勾配が一定になるように区間を定める中心差分法を採用している。しかし、各区間の境界線が動的に変動するため、ハードウェアには適さない。そこで本研究では、処理の単純化・高

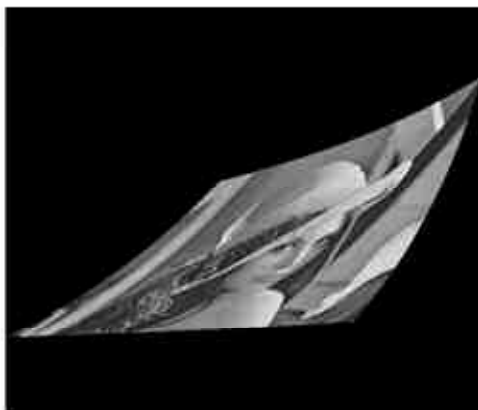


図5：1次関数近似による歪み

表1：実装環境の仕様

	汎用	組み込み
CPU	Core i7-4790k 3.6GHz	Cortex-A53 1.2GHz
キャッシュ	L1: 128 KB L2: 1 MB L3: 8 MB	L1: 64 KB L2: 2MB
メモリ	DDR3 16GB	DDR2 1GB
OS	Windows7 64bit	Raspbian 64bit
カメラ	CMS-V28SETW	
解像度	640×480	
描画速度	30 fps	



図6：組み込みプロセッサの実装環境

速化を指向して、全ての区間面積を均等に定める等区間分割法を採用する。図3はこれに基づいて、 8×8 の区間分割を施した場合の射影変換画像であり、図5のような歪みは低減され、適切な射影変換が行われていることを確認できる。

4. 組み込みプロセッサへの実装と評価

4.1. 実装環境

関数近似と漸化式表現に基づいた高速幾何学変換法を汎用プロセッサおよび組み込みプロセッサに実装し、その評価を行った。組み込みプロセッサへの実装には、シングルボードコンピュータ Raspberry Pi3 Model B を用いており(図6)、各プロセッサとUSBカメラモジュールの仕様を表1に示す。また、開発環境はMicrosoft Visual Studio 2015、開発言語はC++であり、画像の入出力などの汎用処理には画像処理ライブラリOpenCV 2.4.10を用いた。

4.2. 変換時間

まず、本研究の主題である座標算出時間、すなわち変換後座標から変換前座標の値を算出するまでの時間を図7に示す。縦軸の時間単位はミリ秒、横軸は区間分割数である。評価対象は、凡例に示すよう

に式(1)および(2)の変換原理式の他、1 次関数近似および2次関数近似を施した場合との計3種であり、さらにこれらを汎用プロセッサおよび組み込みプロセッサ上で実行した場合とでそれぞれ計測した。図7より、組み込みプロセッサの座標算出時間は汎用プロセッサのそれに比して最大5倍程度増大しており、これはプロセッサのクロック周波数の差の他に、プロセッサに搭載されている演算器の性能差も考えられる。ただし、各プロセッサにおける演算方法の違いに着目すると、原理式、2次関数近似、1次関数近似の順に座標算出時間の短縮効果が確認できる。特に、1次関数近似を施すことにより、組み込みプロセッサでも汎用プロセッサに近い性能を達成できることが分かる。また、従来の2次関数近似では、区間分割数の増加に伴って座標算出時間の増加傾向が確認されるが、漸化式が簡単化された1次関数近似では区間分割数に依らず一定の座標算出時間を維持できていることは特筆すべき点である。

次に、変換時間、すなわち座標算出後に、カメラからの入力画像の画素値を用いて出力画像を生成するまでの時間を図8に示す。図8より、図7に比して汎用プロセッサと組み込みプロセッサの変換時間差が約10倍に拡大している。これはプロセッサ自体の性能差の他に、内挿処理においてキャッシュやメモリ上から画素値を取得する際のオーバーヘッドが顕著に表れた結果と考えられる。

最後に、描画速度、すなわちカメラで撮像した画像に射影変換を施してディスプレイに表示するまでのフレームレートを図9に示す。図9より、汎用プロセッサでは、約30fpsと人間が視認する上で違和感のないフレームレートを達成できる。一方、組み込みプロセッサでは、内挿処理に係るメモリアクセスによる変換時間の劣化が影響し、そのフレームレートは約5fpsと著しく低下することとなる。

以上の結果より、関数近似と漸化式表現を導入することで、ソフトウェア的に処理する上でも座標算出時間の短縮効果が確認できる。しかし、カメラなどを用いた実用化を図る上では、内挿処理などのメモリアクセスがボトルネックとなり、特に組み込みプロセッサではその影響が顕著に表れる。

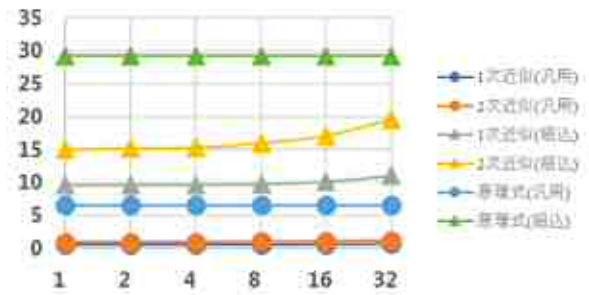


図7：座標算出時間

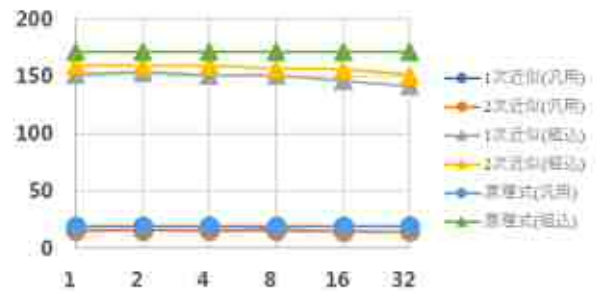


図8：変換時間

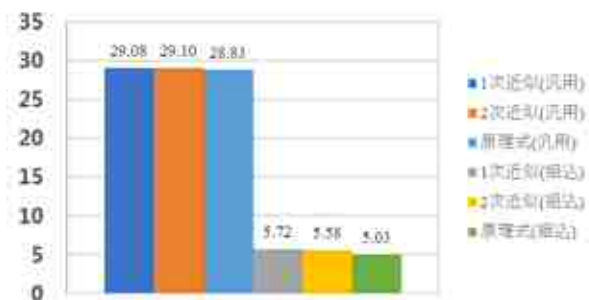


図9：描画速度(フレームレート)

4.3. 変換精度

様々な変換パラメータに基づいて射影変換を施し、関数近似と区間分割の導入に伴う変換誤差の評価を行った。その一例として、スクリーン座標を(0,0,5)、視点座標を(0,0,10)、y軸方向拡大率を $sy = 0.5$ に固定した上で、各軸に対する回転角度 rx, ry, rz をそれぞれ $0^\circ \sim 45^\circ$ の範囲で変動させた場合について、近似次数と変換誤差の評価結果を表2に示し、このときの変換画像を図10に示す。なお、表中の青字の値は変換誤差が1 pixel以下であることを表す。

表2より、2次関数近似の場合、区間分割数4×4以上ならばいずれの回転角度でも変換誤差を1 pixel以下に抑制可能であり、 15° 以下ならば区間分

表 2 : 近似次数と変換誤差

近似 次数	区間 分割数	回転角度										座標算出 時間[ms]
		0°	5°	10°	15°	20°	25°	30°	35°	40°	45°	
一次関数近似	1×1	0.00	9.82	21.90	37.30	57.81	86.53	129.29	197.27	311.21	524.06	0.586
	4×4	0.00	0.64	1.49	2.64	4.04	5.82	8.68	12.81	18.59	28.29	0.587
	8×8	0.00	0.16	0.37	0.65	1.05	1.53	2.24	3.35	4.78	7.17	0.586
	16×16	0.00	0.04	0.10	0.17	0.26	0.39	0.56	0.81	1.21	1.81	0.623
	32×32	0.00	0.01	0.02	0.04	0.07	0.10	0.14	0.21	0.30	0.46	0.683
二次関数近似	1×1	0.00	0.07	0.29	0.72	1.44	2.58	4.67	9.41	20.41	49.05	0.853
	4×4	0.00	0.00	0.01	0.01	0.03	0.07	0.13	0.21	0.38	0.77	0.861
	8×8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.05	0.11	0.926
	16×16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	1.000
	32×32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.116

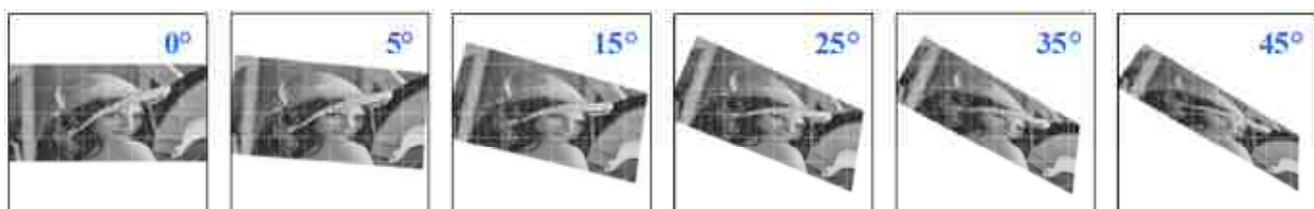


図 10 : 各回転角度における射影変換画像

割自体が不要である。一方、1 次関数近似の場合、変換誤差を 1 pixel 以下に抑えるためには区間分割数 32×32 以上が必要となる。ここで、表の末列に記した座標変換時間に着目すると、1 次関数近似かつ区間分割数 32×32 において変換誤差を 1 pixel 以下に抑えつつ最も高速に変換できることが分かる。

5. あとがき

本稿では、1 次関数近似と区間分割による高速・高精度な射影変換法を提案した。そして、組み込みプロセッサへの実装・評価を通じて、32×32 分割時に 2 次関数近似と同程度の精度を維持しつつも座標算出時間を約 40%短縮できることを示した。今後の課題としては、提案手法を FPGA に実装し、高機能防犯カメラシステムへ応用することが挙げられる。

参考文献

- [1] 森 健一郎, “監視カメラ世界市場に関する調査結果,” 矢野経済研究所プレスリリース (Aug. 2015)
- [2] 高野 照久, 松下 侑輝, 小野 晋太郎, 川崎 洋, 池内 克史 “視界支援用の車載カメラとして使用

される魚眼カメラ画像列を用いた超解像の提案,” 生産研究, Vol. 67, No. 2, pp. 99-104 (Jan. 2015)

- [3] K. Yabuta, and H. Kitazawa, “Optimum camera placement considering camera specification for security monitoring,” IEEE Proc. Circuits and Systems, pp. 2114-2117 (May 2008)
- [4] 尾崎亮, 佐藤洋一郎, 杉山裕二, 岡本卓爾, “射影変換における座標計算の高速化手法,” 電子情報通信学会論文誌 D, Vol. 88, No. 1, pp. 1-7 (Jan. 2006)
- [5] 田所 勇生, 近藤 真史, 佐藤 洋一郎, “組み込みプロセッサにおける幾何学変換の高速化に関する基礎検討,” 第 67 回電気・情報関連学会中国支部連合大会, No. R16-22-06 (Oct. 2016)
- [6] 田所 勇生, 大坪 浩次, 佐藤 洋一郎, 近藤 真史, “組み込みプロセッサにおける射影変換の高速化に関する基礎検討,” 2017 年電子情報通信学会総合大会, ISS-SP-195 (Mar. 2017) **優秀ポスター賞**
- [7] 井上 誠喜, 住吉 英樹, 八木 伸行, “C 言語で学ぶ実践 CG・映像合成,” オーム社, pp. 167-168 (Apr. 2006)

障害児の生涯健康記録 (PHR : Personal Health Records) の開発にむけた課題の検討

川崎医療福祉大学

三田 岳彦

概要

本研究では在宅重症心身障害児（者）を対象に質問紙調査をおこない、本人の機能障害のおよび医療・福祉施設の利用状況を明らかにし、障害児の生涯健康記録 (PHR) の開発にむけた課題を検討することを目的とした。対象者 62 名のうちの 60%以上が医療的ケアを必要としており、78%が現在およびこれまでにてんかん発作を経験していた。対象者のうち、90%以上が医療施設を利用しており、このうち 60%以上は複数の施設を利用していた。リハビリテーション施設も 80%以上が利用しているが、単一施設の利用割合が高いのが特徴的であった。短期入所施設、日中活動サービス施設は約 70%が利用していると回答した。本結果から、医療的ケアや発作のコントロールが必要な重度の障害児（者）にとって診療・投薬記録を適切に管理・活用する重要性が示唆される。障害児（者）にとって役立つ PHR を開発するには利用した医療・福祉サービス施設で発生した健康情報を統合し、本人・家族が生涯にわたって活用できる仕組みが不可欠である。

1. 研究の背景と目的

生涯健康記録: Personal Health Records (PHR) は「個人が自らの生活の質 (QOL=Quality of Life) の維持や向上を目的として自らの健康に関する情報を収集・保存・活用する仕組み」と定義される。PHR の共通の機能として①個人が自らの QOL の維持・増進を目的として、自らの健康に関する情報を収集・保存・活用することを可能とする仕組みであること、②個人が情報を所有し、情報の収集・保存・参照・開示など、すべてのコントロールを個人自らが行うことが挙げられる。PHR は協働の医療を促進し、医療や看護(介護)の質と効率化を改善する強力なツールやプラットフォームとしての期待も高い¹⁾。

障害児（者）の場合、その重症度によっては自ら健康情報を管理することに困難さを持ち、保護者や主たる介護者に依存せざるを得ない状況があり得る。また、濃厚な医療や福祉サービス必要とする重度の障害児（者）は複数の医療・福祉施設を頻回に利用し、それぞれの施設で健康記録（診療記録等）が発生していると考えられる。PHR の考え方（情報の収集・保存・参照・開示）に立てば、障害児（者）の健康記録を適切に管理し、活用することで、本人・保護者の QOL の向上が期待できる。

本研究では在宅重症心身障害児（者）（以下、在宅重症児（者）とする）を対象に質問紙調査をおこない、本人の機能障害のおよび医療・福祉施設の利用状況を明らかにし、障害児の生涯健康記録 (PHR : Personal Health Records) の開発にむけた課題を検討することを目的とした。

2. 方法

(1) 対象

対象は東京都 A 市と鳥取県 B 市およびその近郊に在住する在宅重症児者 62 名（平均年齢: 13.0±11.3 歳）である。2016 年 4 月～5 月にかけて各地域の重症児を対象とする医療福祉施設の協力を得て無記名式質問紙調査を実施した。

(2) 調査項目

調査項目は年齢、性別、医療的ケア・てんかん発作の有無および既往、医療・リハビリテーション、短期入所、日中活動サービス施設の利用状況とした。

(3) 分析

各項目の記述統計量を算出したのち、項目間の関連を検討するためにクロス集計をおこなった。解析には IBMSPSS ver. 19.0 を用いた。

3. 結果と考察

対象者62名のうちの60%以上が医療的ケアを必要としており、78%が現在およびこれまでにてんかん発作を経験していた。重症心身障害とは重度の知的障害と身体障害を併せ持つ人たちを指す。近年では在宅において濃厚な医療的ケア（呼吸、栄養、排泄管理）が必要な人たちは増加傾向である²⁾。本結果もこうした傾向と類似するものであった。中枢神経系の疾患に付随するてんかん発作をコントロールしつつ日々の生活をおくるためには、本人および保護者が発作に関係する診療記録や投薬記録を適切に管理する必要が示唆される。

図1に医療・福祉施設の利用状況を示す。対象者のうち、90%以上が医療を利用しており、このうち60%以上は複数の施設を利用していた。リハビリテーションも80%以上が利用しているが、単一施設の利用割合が高いのが特徴的であった。短期入所、日中活動サービスは約70%が利用していると回答した。医療については定期健診と検査・施術等の特定の医療を併用しているように推察される。ホームドクターと専門医、大学病院等の有機的な連携を期待させる。医療・リハビリテーション・短期入所・日中活動サービスで発生する健康記録をPHRとして統合し、本人・家族が活用できる仕組みが必要と考える。なお、項目間の関連性についてクロス集計したところ注目すべき関連性は見出せなかった。

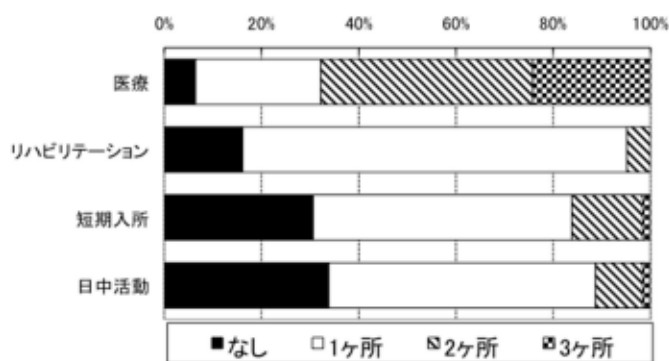


図1 医療・福祉施設の利用状況

結論

本結果からは、医療的ケアや発作のコントロールが必要な重度の障害児（者）にとって、診療・投薬記録を適切に管理・活用することの必要が示唆される。障害児（者）にとって役立つPHRを開発するには利用した医療・福祉サービス施設で発生した健康情報を統合し、本人・家族が生涯にわたって活用できる仕組みが不可欠である。

参考文献

- 1) 杉山 博幸，池田 俊也，武藤 正樹. 我が国におけるパーソナル・ヘルス・レコード(PHR)の定義に関するレビュー. 国際医療福祉大学学会誌 17(2), 20-31, 2012.
- 2) 西澤 真澄，米田 照美，伊丹 君和，清水 房枝. 重症心身障害児者の家族の社会資源の情報収集に関する看護研究の現状. 人間看護学研究 11, 39-44, 2013.

母胎の免疫機能活性化が胎児の脳形成に与える影響の解析

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床検査学科

上野 浩司

統合失調症や自閉スペクトラム症(ASD)の発症は遺伝的要因と環境的要因によって引き起こされる。多くの疫学研究や実験研究は妊娠中の免疫機能の活性化などの環境的要因によって胎児が出生後に神経心理疾患に罹患するリスクが増大することを示している。さらに、統合失調症やASDの原因の一つとして Parvalbumin 発現ニューロン(PV ニューロン)の機能異常が近年の研究で示されている。しかしながら、妊娠中の免疫活性化と PV ニューロンの機能異常の関係性は調べられていない。そこで本研究では、実験モデルとして、妊娠マウスにウイルス性の Poly(I:C)を注射し、生まれてきた子供(Poly(I:C)マウス)の行動と中枢神経系の PV ニューロンとその周囲の Perineuronal net(PNN)の形成を分析した。成熟した Poly(I:C)マウスはコントロールマウスと比較して社会性の低下、空間認知機能の低下、不安様行動の低下を示した。さらに、Poly(I:C)マウスはコントロールマウスと比較して PNN で覆われた PV ニューロンの割合が高かった。本研究結果は、妊娠期間中の過剰な免疫機能活性化は子供が神経心理疾患に罹患するリスクを増大させることを示唆している。

1. 序文

妊娠中の感染は生まれてきた子供が統合失調症や自閉スペクトラム症(ASD)などの発達期の神経心理疾患に罹患されるリスクを増大させることに関連があるとされている。ASD や統合失調症にはいくつかの遺伝的要素と環境的要因が相互に関わっている。しかしながら、双子ではない兄弟と比較して二卵性双子が ASD を発症するリスクが高いことを疫学的研究は示唆している。実際に、疫学的研究は妊娠中のストレス、感染などの母体の環境的要因が子供の ASD 発症のリスクを増大させることを報告している。さらに、子供が統合失調症や双極性障害を呈した母体の血清サンプルは感染状態にあったことも報告されている。これらの疫学的研究は、動物実験モデルにおいて、妊娠した動物が過剰な免疫反応状態となった場合に、生まれた子供が精神疾患に関連した行動異常、神経解剖学的異常を示すことによって支持されている。

動物実験モデルは統合失調症や ASD と妊娠中の感染との関係性を理解するのに発展してきた。母体の免疫活性化モデルにおいて、妊娠した雌マウスは合成 2 本鎖 RNA の Poly(I:C)を注射されると、ウイルス感染刺激を疑似的に与えられたことになる。Poly(I:C)注入は母体と胎児にサイトカインが関連

した免疫反応が生じる。この処理を受けた妊娠マウスから生まれたマウスはヒトの統合失調症や ASD と関連した異常行動や神経解剖学的異常を示す。

近年、統合失調症や自閉症の死後脳の研究において、特定の抑制性介在ニューロンである Parvalbumin ニューロン(PV ニューロン)とその周囲を覆う細胞外マトリックスである Perineuronal net(PNN)が異常を示すことが報告されている。PV ニューロンは GABA 作動性抑制性介在ニューロンの一部である。GABA 作動性抑制性介在ニューロンを生化学的に分類すると、発現している Ca 結合タンパク質によって PV ニューロン、CB ニューロン、CR ニューロン等に分類される。PV ニューロンは興奮性錐体細胞の細胞体や軸索起支部にシナプスを形成している。1 つの PV ニューロンは数百の錐体細胞にシナプスを形成し、錐体細胞の同期発射をコントロールし、 γ 振動の発生を調整している。PNN は PV ニューロン周囲の細胞体、近位樹状突起、軸索起支部に形成される細胞外マトリックス分子である。PNN は PV ニューロンの高い代謝をサポートし、PV ニューロンを保護する機能を持っている。中枢神経系における PV ニューロンの機能異常は、興奮と抑制のバランスを崩壊させ、神経心理疾患を生じさせると考えられている。

Poly(I:C)注射によって免疫機能が活性化した動物実験モデルは建設的で有効なモデルである。しかしながら、これらの処理をしたモデルマウスの異常行動と PV ニューロン, PNN 形成の関連性を同じモデルマウスで示した報告はない。また、ヒトの死後脳の研究サンプルは観察される脳領域が限られていたり、慢性的に薬物投与を受けており、精神疾患様行動異常と神経解剖学的異常の関連性を分析することが難しい。本研究ではウイルス性の Poly(I:C)を使用して母体マウスの免疫機能を活性化させ、生まれてきた子供の行動と PV ニューロン, PNN の形成をいくつかの脳領域で観察を行った。

2. 材料と方法

2.1. 材料と方法

マウスは C57BL/6N を使用した。妊娠 13 日目に Poly(I:C) グループとコントロールグループに分けた。妊娠 13~17 日目に毎日、Poly(I:C) グループには 5mg/kg の Poly(I:C) を腹腔内に注射した。コントロールグループには生理食塩水を注射した。生まれてきた仔マウスは生後 21 日目に離乳し、性別によってケージを分けた。実験には雄マウスのみを使用した。生後 10 週目から行動実験を開始した。本動物実験は、川崎科大学動物実験委員会の承認を受けて、ガイドラインに従って行った。

2.2. 行動実験

マウスの体重、体温、ヒゲの有無など身体的な計測と観察を行った。前肢の握力を測定した。

2.2.1. 高架式十字迷路テスト

2 つのオープンアーム(8 × 25 cm)と透明な板で閉じられたアームで装置は構成されている。装置は床から高さ 30cm である。それぞれのマウスを 10 分間、この十字の中を自由に動き回らせた。ビデオに撮影し、解析ソフトウェア(TopScan)を使用して解析した。

2.2.2. 明暗選択テスト

装置はケージ(60 × 60 × 40 cm)を小さい穴(5 × 3 cm)を持つ仕切りで 2 つに区切っている。片側は明るく (200 ルクス)、もう一方は蓋をして暗くしている。それぞれのマウスを 10 分間、装置の中を自由

に動き回らせた。ビデオに撮影し、解析ソフトウェア(TopScan)を使用して解析した。

2.2.3. オープンフィールドテスト

マウスをオープンフィールド装置(60 × 60 × 40 cm)に入れ、自由に 2 時間動き回らせた。ビデオに撮影し、解析ソフトウェア(TopScan)を使用して解析した。

2.2.4. 移動物体認知テスト

装置は 3 つの部屋に区切っている。それぞれの部屋は 20 × 60 × 40 cm であり、小さい穴(5 × 3 cm)を通して自由に部屋を行き来できる。まずマウスを 10 分間、この装置に慣れさせた。次に、2 つの同じ物体(ペットボトル; 直径 5.2cm, 高さ 13.5cm)を両端の部屋の壁側に置き、マウスを 10 分間入れて慣れさせた。次に、片方の物体を 5cm 前方に動かした。そして、マウスを 10 分間入れ、自由に動き回らせた。ビデオに撮影し、解析ソフトウェア(TopScan)を使用して解析した。

2.2.5. 社会性テスト

装置は 3 つの部屋に区切っている。それぞれの部屋は 20 × 60 × 40 cm であり、小さい穴(5 × 3 cm)を通して自由に部屋を行き来できる。端の部屋にワイヤー製のケージを置き、知らないマウスをその中に入れた。テストするマウスはこの装置の中を自由に移動できる状態にある。10 分間、装置の中を自由に動き回らせた。ビデオに撮影し、解析ソフトウェア(TopScan)を使用して解析した。

2.3. 組織切片の準備

全ての行動実験終了後、全てのマウスから脳サンプル採取を行った。マウスに麻酔をかけた後、4% パラホルムアルデヒド(pH 7.4; 4%PFA)を使用して灌流固定を行った。脳を取り出し、同じ 4%PFA で後固定を実施した。15%スクロース、30%スクロースで凍結保護処理をした後、脳を OCT コンパウンドに入れて凍結させた。クライオスタットを使用して、40μm の冠状断凍結切片を作成し、アジ化ナトリウム含有 PBS(-)中に切片を保存した。

2.4. 免疫組織化学

凍結切片を 0.1%Triton X-100 で 15 分間処理した後、10%正常ヤギ血清でブロッキングを行った。

PBS(-)で切片を洗浄後、ビオチン標識 *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA)と抗 PV 抗体を含む PBS(-)中で一晚反応させた、PBS(-)で洗浄後、Texas-Red 標識ストレプトアビジンと Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体に 2 時間反応させた。PBS(-)で洗浄後、切片をスライドに載せて封入した。

2. 5. 顕微鏡観察とニューロン数の計測

蛍光染色した切片から画像を取得するために共焦点レーザー顕微鏡を使用した。10 倍の対物レンズを使用して撮影後、TIFF ファイルに変換した。ImageJ ソフトウェアを使用して PV ニューロンと PNN の数を計測した。計測したニューロン密度は平均±標準誤差で表示した。統計解析には ANOVA を使用し、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

3. 結果

3. 1. Poly(I:C) マウスの正常な特性

我々は成熟した Poly(I:C)マウスとコントロールマウスを比較して身体的な特徴がないか調べた。体重、体温、握力に Poly(I:C)マウスとコントロールマウスに差は見られなかった。

Poly(I:C)マウスの不安様行動を評価した。高架式十字迷路においてオープンアームに入った回数、層移動距離、オープンアームの滞在時間に Poly(I:C)マウスとコントロールマウスで有意な違いは見られなかった。明暗選択テストでは、Poly(I:C)マウスとコントロールマウスの間で行き来の回数、明るい部屋での滞在時間、明るい部屋に出てくるまでの潜時、総移動距離に有意な差はなかった。

3. 2. Poly(I:C) マウスの不安様行動の低下

オープンフィールドテストにおいて、Poly(I:C)マウスはコントロールマウスと比較して中央部分で過ごす時間が増加していた(図 1)。また、Poly(I:C)マウスはコントロールマウスと比較して周辺部分で過ごす時間が減少していた。2 時間の 5 分毎の解析でも Poly(I:C)マウスは中央部分で過ごす時間が多い傾向にあった。

3. 3. Poly(I:C) マウスの短期記憶の低下

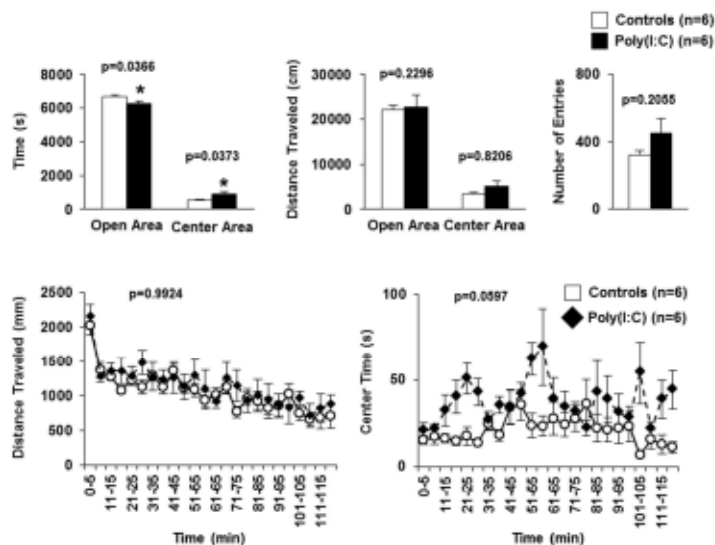


図1. オープンフィールドテスト

移動物体認知テストはマウスの空間認知能力と短期記憶を計測するために実施した。コントロールマウスは移動した物体が存在する部屋で多くの時間を過ごした(図 2)。しかしながら、Poly(I:C)マウスは移動した物体がある部屋、移動していない物体がある部屋で同じ時間過ごした。さらに、Poly(I:C)マウスは物体周囲を過ごす時間もほぼ変わらなかった。しかしながら、コントロールマウスは移動した物体の周囲で過ごし時間は移動していない物体の周囲で過ごす時間より長かった。

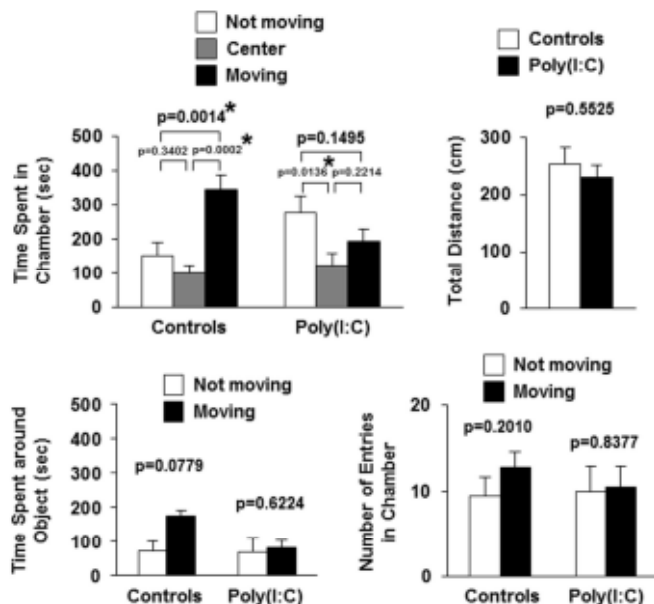


図2. 移動物体認識テスト

3. 4. Poly(I:C) マウスの社会性の低下

コントロールマウスは空のケージのある部屋よりも知らないマウスのいる部屋で多くの時間を過ごし

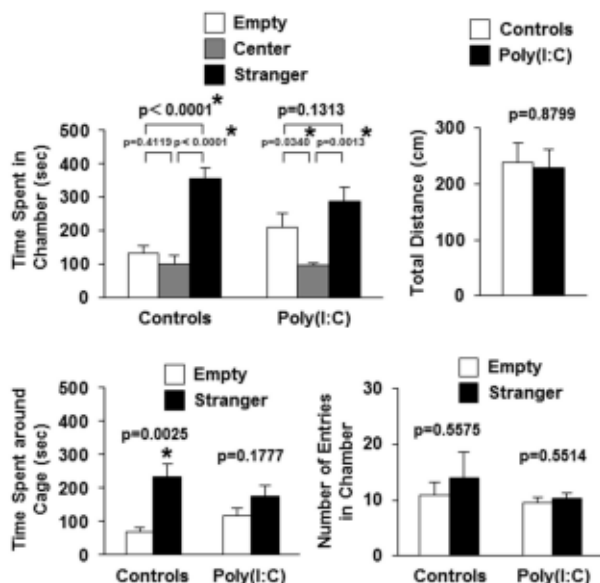


図3. 社会性テスト

た(図 3)。しかしながら, Poly(I:C)マウスは両方の部屋を同じ時間で過ごし, ケージ周囲で過ごす時間も同じであった。

3.5. Poly(I:C) マウスの PV ニューロン数と PNN 数

前頭前皮質 dAC の 2/3 層においてのみ, コントロールマウスと比較して, Poly(I:C)マウスで PV ニューロン密度が減少していた(図 4)。

前頭前皮質では PNN 数にコントロールマウスと Poly(I:C)マウスに違いは見られなかった(図 4)。しかしながら, 側頭皮質のいくつかの領域でコントロ

ールマウスと比較して Poly(I:C)マウスでは PNN 数が増加していた。

コントロールマウスと比較して Poly(I:C)マウスの前頭前皮質のいくつかの領域で PNN 形成された PV ニューロンの割合が高かった(図 4)。側頭皮質においても, コントロールマウスと比較して Poly(I:C)マウスのほうが PNN 形成された PV ニューロンの割合が高かった。

4. 考察

本研究は妊娠中に Poly(I:C)注射を受けた雌マウスから生まれた Poly(I:C)マウスは社会性の低下, 空間記憶, そして不安様行動の低下を示すことを示した。さらに, 成熟した Poly(I:C)マウスの前頭前皮質では PNN で覆われた PV ニューロンが増加し, 側頭皮質では PNN 数が増加していることを示した。

近年, 中枢神経系における興奮と抑制のバランスが健全な脳活動に重要であることが示されており, このバランスの崩壊が神経心理疾患を招くと考えられている。PV ニューロンは錐体細胞の発火を調整する重要な役割を持っており, 統合失調症, ASD, 双極性障害の患者で PV ニューロンの機能異常が報告されている。近年の研究では, 中枢神経系における PV ニューロンのニューロンそのものの喪失ではなく PV 蛋白の発現や PV, GAD67 の mRNA の低下が PV ニューロンの機能異常を引き起こしていることが示されている。さらに, ASD や統合失調症患者の死後脳の研究は, PV ニューロン周囲の PNN 形成に異常があることを報告している。PNN は大脳皮質では主に PV ニューロンの周囲に形成されており, PV ニューロンの機能の維持に必要である。すなわち, PNN の形成異常は PV ニューロンの機能に異常を生じさせる。

側頭皮質に存在する TeA 領域は感覚情報を連合する領域である。Ect 領域の明確な機能は未だ不明であるが, 課題学習時に活性化する領域であると報告されている。PRh 領域は他の皮質や海馬と結合しており情報を統合する領域であり, 認知機能に関わっている。前頭前皮質はいくつかの認知機能に関わっている。実際に, 多くの研究が, ASD 患者の TeA

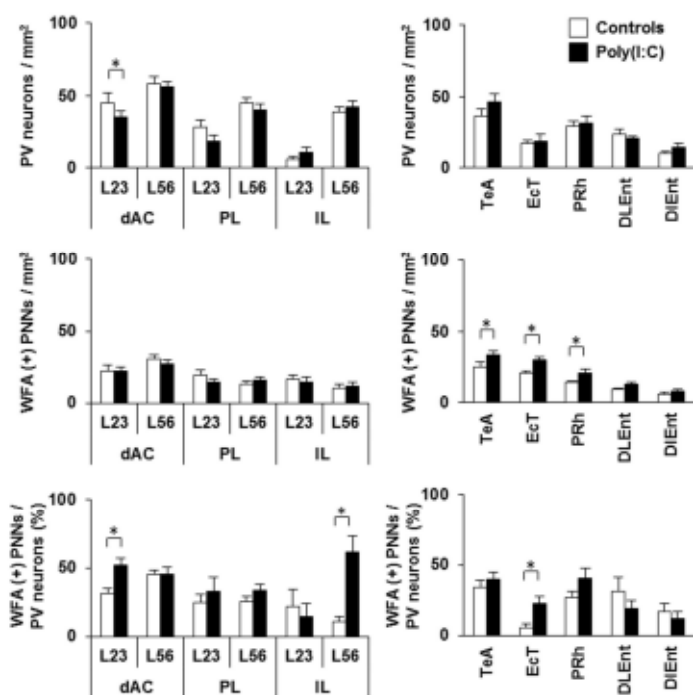


図4. PVニューロン数とPNN数

に異常があることを示している。さらに、ASD では TeA が他の皮質と強固に結合していることが報告されている。前頭前皮質も ASD 患者では強固に扁桃体と結合していると報告されている。本研究結果は、Poly(I:C)マウスの前頭前皮質や側頭皮質においてコントロールマウスと比較して周囲に PNN をもつ PV ニューロンが多いことを示した。PNN はシナプス可塑性に関わっており、生後の発達期における臨界期の終了を制御している。これらの ASD 患者で見られる強固な結合に本研究が示した過剰な PNN 形成に関わっている可能性を本研究は示してある。

前頭前皮質における PV ニューロンは恐怖条件に関わっていることが示されている。前頭前皮質は主に作業記憶や、意思決定、認知行動、社会的活動の機能に重要な役割を持っている。作業記憶や認知行動に重要な同期発射である γ 振動に PV ニューロンの活動が重要な役割を果たしている。行動の柔軟性は環境によって行動の戦略を適正化させるのに重要であり、これらを決定させているのは前頭前皮質である。本研究では Poly(I:C)マウスは PV ニューロンの多くが PNN 形成していることを示しており、前頭前皮質の柔軟性が低下していることがオープンフィールドテストで見られた不安様行動の低下の原因であると推測される。

PV のエネルギー代謝に遺伝的に異常を起こした場合、PV ニューロン数に変化は生じないが、マウスの社会性が低下する。この機序として、PV の持つ fast-spiking が維持出来ないからだと示されている。また、PV 蛋白の発現を欠損させたマウスでは ASD 様の行動異常として社会性の低下、記憶能力の低下を示す。これらの以前の研究結果は、本研究で見られた Poly(I:C)マウスの社会性の低下、記憶能力の低下が過剰な PNN で形成された PV ニューロンの機能異常が原因である可能性を支持する。実際に、精神疾患の原因説の 1 つとして脳の可塑性の低下が示されている。過剰な PNN 形成は神経回路の可塑性を低下させ、柔軟な行動を障害する。側頭連合野の TeA 領域は認知や特定に重要な役割を持ち、この領域が障害されると認知機能障害が引き起こされる。TeA は情報を調整する必要がある、生涯に渡

って可塑性が高い領域であることが分かっている。本研究結果が示したように、側頭皮質における PV ニューロンの多くが PNN 形成されることで神経可塑性が低下し、柔軟なネットワーク形成が出来ず、行動異常を示した可能性がある。

ニューロン自身に加え、アストロサイトが PNN 形成に必要な細胞外マトリックス分子を分泌している。妊娠中の炎症がどのように PNN 形成に異常を来したのかは不明である。しかしながら、以前の研究において、Poly(I:C)注射を受けた仔マウスの前頭前皮質の PL 領域では成熟後に PNN 形成に異常が生じることを示している。妊娠中の炎症がどのようなメカニズムで細胞外マトリックス分子に影響を与えるのか、さらなる研究が必要である。

妊娠マウスへの Poly(I:C)(5 mg/kg)の 1 回の投与は前頭前皮質における PV ニューロンの減少を示した報告がある。しかし、妊娠マウスへの Poly(I:C)(1 mg/kg)の 1 回の投与は前頭前皮質における PV ニューロンの減少を示していない報告もある。この結果の違いは、Poly(I:C)の投与量、投与回数、妊娠マウスの時期によるものと考えられる。実際に、妊娠 9 日目と妊娠 17 日目に同じ量の Poly(I:C)を投与した場合の子孫の行動異常は異なることが示されている。さらに、コホート研究は、妊娠期間中にストレスを受けた場合統合失調症や ASD、双極性障害に子孫が罹患するリスクが増大することを示している。しかしながら、とりわけ妊娠初期にストレスを受けた場合、子孫が統合失調症に罹患するリスクが他の妊娠時期と比較して増大することが示されている。これらの研究結果は、妊娠期間中に受けたストレスの時期、程度が子孫に与える影響は異なることが示唆される。本研究では、妊娠後期に連続して Poly(I:C)を注射し炎症を引き起こした。その結果、ASD 様の行動異常を子孫が示した。以前の研究でも妊娠後期に Poly(I:C)投与を受けた子孫マウスは空間認知能力が低下していることが報告されている。さらに、連続して高濃度(5mg/kg)の Poly(I:C)投与を受けた子孫マウスは社会性が低下し、ASD の 3 兆候を示すことが示されている。本研究結果は以前の研究結果と一致し、妊娠期間中の高い炎症状態の持続は子孫

が ASD に罹患するリスクを増大させることを示している。

5. 結論

本研究結果は、妊娠後期の過剰な炎症状態は子孫が ASD に罹患するリスクを増大させることを示している。また、胎児脳における PV ニューロンとその周囲の PNN 形成は妊娠中の炎症に脆弱性が高いことを示している。妊娠期間中の胎児の高い脆弱時期と、胎児脳の脆弱性の高いニューロンを特定することは ASD や統合失調症を予防する方法を確立するのに役立つ。

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援いただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に深く感謝致します。

保育士の早期離職予防のための「保護者-保育士間コミュニケーション自己分析尺度」の開発 —その1 新人保育士が望ましい保護者対応をする際の基準となるモデルの作成—

山陽学園大学

上地 玲子・松浦 美晴

はじめに

保育士の有資格者のうち 68 万人が資格を持ちながら働いていない（NHK、2013 年報道）という潜在保育士問題が深刻である。潜在保育士には、一旦保育士として働きながら離職したものが多く含まれるため、早期離職の予防が有効であると考えられる。保育士の早期離職の要因の 1 つは、新人保育士が感じる保護者対応の困難さである。この問題を解消することは、保育士だけでなく、保護者の不安を軽減するためにも重要である。

宮崎(2016)は、新人保育士の保護者対応について、先輩保育士が新人保育士の個々の性格や特性の理解に努め、保護者対応で求められる力を育成するためのサポートが行われていたことを明らかとした。また、赤田(2010)は、保育士ストレス評価尺度を作成し、その中で「保護者対応」の因子、5 項目を抽出している。このように、新人保育士にとっては、保護者対応が課題となっている。

そこで、本研究では、保護者対応において必要な予備尺度による調査を行い、因子分析・項目分析等を行い、自己分析尺度を完成することを目的とする。そのため、1 年目は、園長および保護者へヒアリングを実施してモデルを作成し、2 年目に自己分析尺度を完成させる。

方法

新人保育士が望ましい保護者対応をする際の基準となるモデルの作成

研究代表者が研究指導をしている保育施設から、園長 3 名に依頼し、保護者とのコミュニケーションにおいて気をつけていること、経験を積むことで身についたスキル等、意識レベル・行動レベルでのコミュニケーションの特徴についてのヒアリングを行

った。さらに、保護者 3 名に依頼し、新人保育士とのコミュニケーションについてヒアリングを行った。ヒアリングの音声データを文字化した上で、軽量テキスト分析を行い、園長と保護者の間のコミュニケーションの特徴を抽出した。

インタビュー項目は、Matsuura(2016)らで実施した保育士インタビューから保護者対応に関連した内容を抽出して作成した。

【園長へのインタビュー項目】

1. 保護者同士のトラブル
2. 子どもの障がいの疑いがある場合の対応
3. 子どもが園で怪我（病気）をした時の対応
4. お迎えのときの子どもの様子を保護者に報告
5. 保護者に頼りにされていない
6. 保護者への言葉遣い
7. 保護者懇談
8. 延長料金
9. 運動会に来る保護者
10. 家庭訪問する場合の対応
11. 話の長い保護者への対応
12. 虐待（ネグレクト）傾向のある保護者への対応
13. うまくいった事例

【保護者インタビュー項目】

1. 保育園にクレームを言いたかったことはありましたか、それはなんですか？
2. 保護者同士のトラブルがあったときはどうでしたか？
3. 子どもの障がいの疑いがある場合の対応
4. 子どもが園で怪我（病気）をした時の対応（怪我）
5. お迎えのときの子どもの様子を保護者に報告するとき

6. 保育士が頼りにならないとき
7. 保護者への言葉遣いについてどう思いますか？
8. 保護者懇談
9. 延長料金（駐車場）
10. 運動会に来る
11. 家庭訪問する場合の対応
12. 自分が長く話をしたいときの保育士の対応についてどう思いますか？
13. 保護者が虐待をしていると疑われたことはありませんか？他の保護者について
14. うまくいった事例（保育士と関係がうまく行ったときの事例）

分析方法

(1) 分析対象の語の抽出

テキストデータ分析ツール KH Corder を用いて、分析対象となる語（名詞，サ変名詞，形容動詞，固有名詞，組織名，人名，地名，動詞，形容詞）を抽出した。

(2) 抽出語の分析

自動的に抽出された語を対象として，次の分析を行った。

(a) 出現回数：抽出された語の分析対象テキスト内での出現回数を数えることにより，頻出語を把握した。

(b) 階層的クラスター：出現パターンの似通った語の組み合わせによりデンドログラムを描画した。類似性を測る尺度としては Jaccard 係数を用い，Ward 法によりクラスターを作成した。

(c) 共起ネットワーク：出現パターンの似通った語を線で結びネットワークを図示した。共起の程度を測る尺度としては，Jaccard 係数を用いた。

結果

1. 出現回数分析

園長3名のヒアリングで使用された文は2,842件であり，抽出された語数は9,394語であった。一方保護者3名のヒアリングで使用された文は1,957件であり，抽出された語数は2,618語であった。

それぞれの抽出された語数のうち，上位10語を拾

い上げた結果，表1のようになった。

表1. 園長および保護者が使用した抽出語（上位10語）

園長		保護者	
思う	.238	先生	.157
言う	.167	保育	.059
人	.112	上	.024
話	.104	入る	.024
自分	.084	多い	.022
聞く	.076	怒る	.016
見る	.075	様子	.016
お母さん	.071	相談	.014
出来る	.065	不満	.013
新人	.063	手	.013

2. 階層的クラスター分析

出現回数が多い語について，最小出現回数10語以上を園長3名および保護者3名をそれぞれ階層的クラスター分析を行い，さらに階層をまとめた結果，図1・2のようになった。

3. 共起ネットワーク

出現回数が多い語について，最小出現回数10語以上を園長3名および保護者3名をそれぞれ共起ネットワーク分析を行った結果，図3・4のようになった。

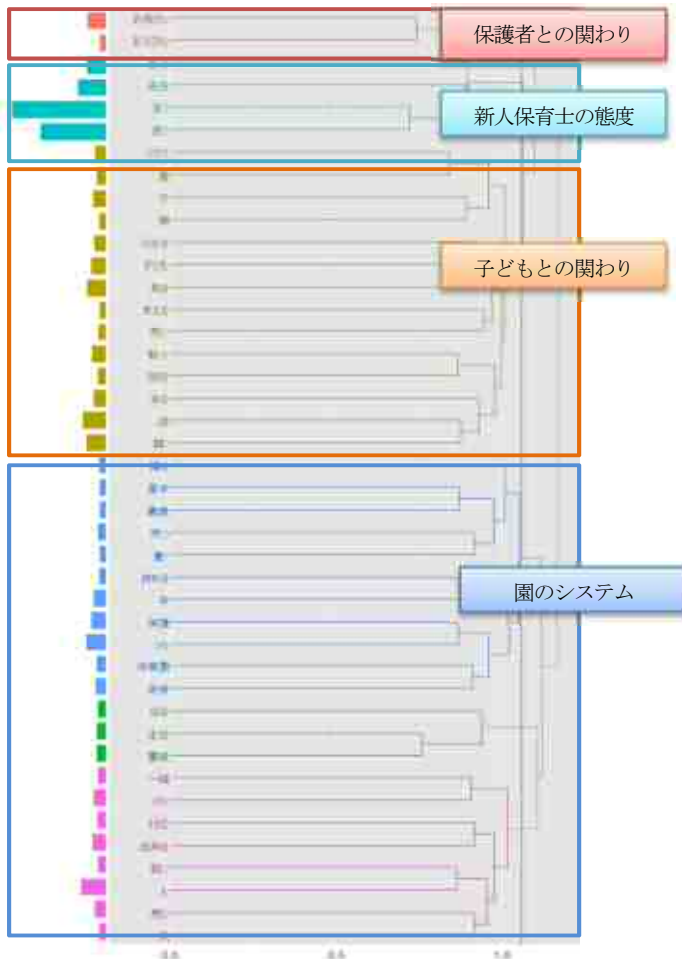


図 1. 園長 3 名の階層的クラスタ分析結果

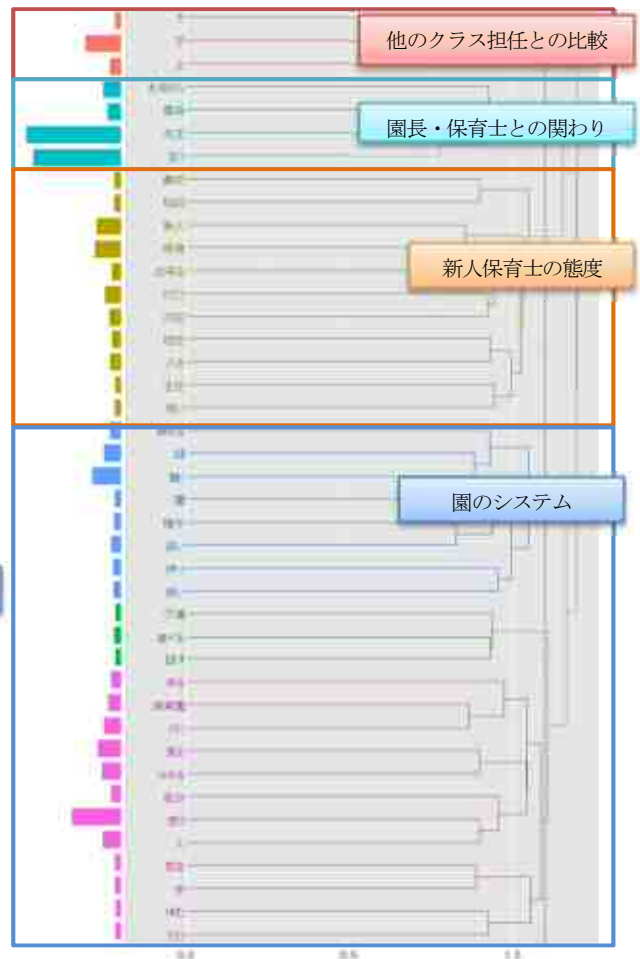


図 2. 保護者 3 名の階層的クラスタ分析結果

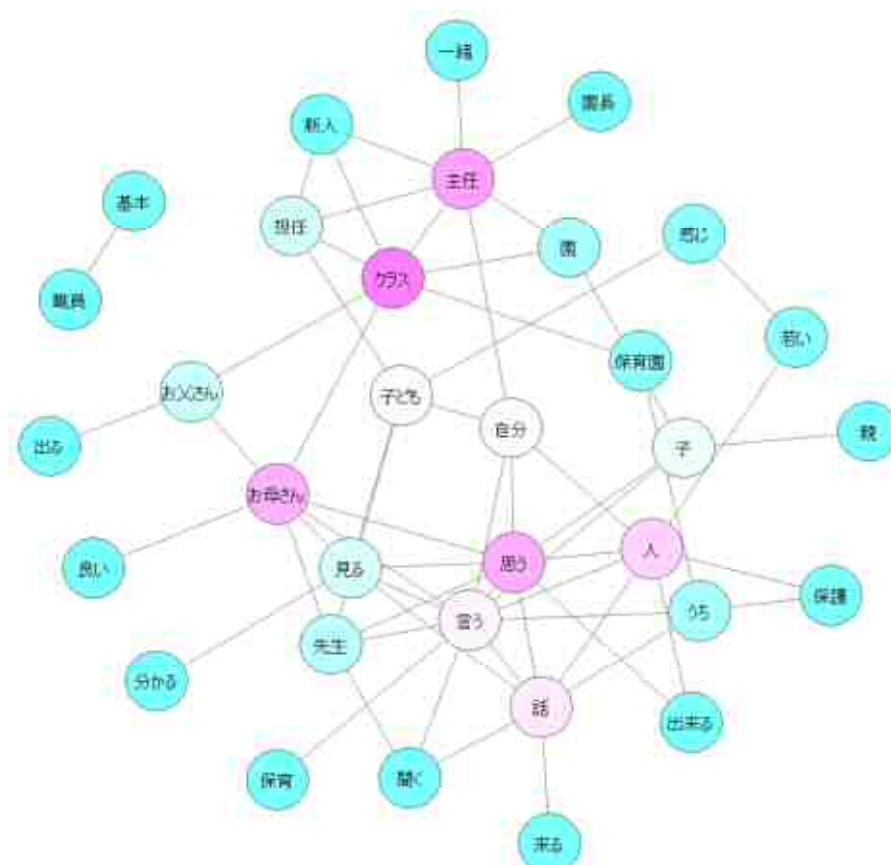


図3. 園長3名共起ネットワーク

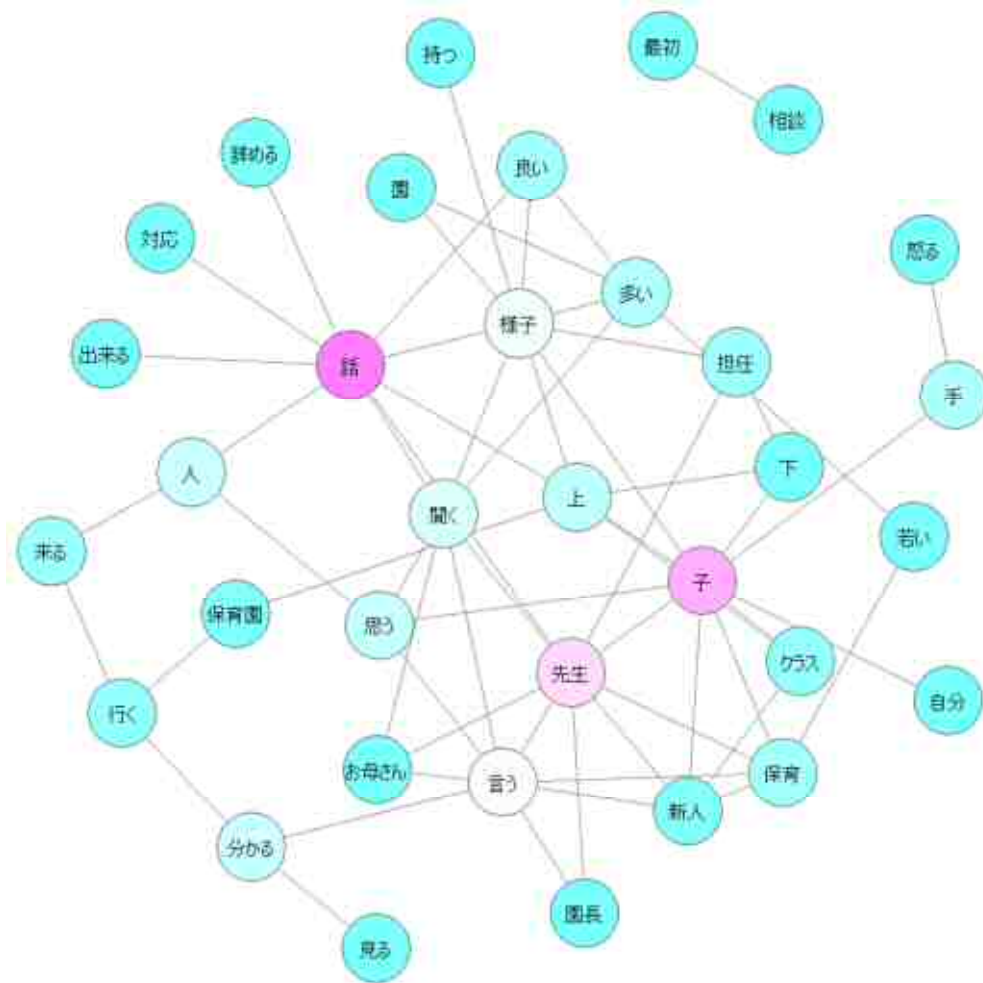


図 4. 保護者 3 名共起ネットワーク

考察

園長と保護者が新人保育士について語る場合の視点の違いがある。園長は育て見守る存在として新人保育士を捉えており、主任との連携や園長による新人保育士のサポートを中心に語っている。

一方保護者は、園の体制とともに新人保育士の関わりについて語っている。その中で不満や怒りという言葉が使われており、新人保育士の対応の問題は園の問題であると捉えている。保護者は、きょうだい児がいる場合はきょうだい児を担当しているクラス担任と比較する傾向がある。そのため、新人保育士への不満を感じることがある。

これらのことから、現時点の分析においては、新人保育士の保護者対応について注意すべき点として以下の3つが挙げられる。

1. 新人保育士は専門職としての自覚を持って対応することを心がける。
2. 新人保育士はトラブルが遭ったときは自分ひとりで対応しようとせずに直ちに管理職へ報告する。
3. 管理職は、新人保育士自身のできている部分を肯定的に評価し、自信を持てるようにする。

今後の予定

園長および保護者それぞれに語られた内容を切片化し、分類を行う。その後「保護者-保育士間コミュニケーション自己分析尺度」の開発を行うため、新人保育士 100 名以上にアンケート調査を実施する。その後、回収したデータを分析し尺度を完成させる。また、保護者と新人保育士の望ましいコミュニケーションを促す要因を分析し、新人保育士の望ましい

保護者対応をマニュアル化する。これらの活用によって新人保育士の早期離職予防対策の一助となるように広報活動を実施したい。

引用文献・参考文献

赤田太郎(2010) 保育士ストレス評定尺度の作成と信頼性・妥当性の検討. 心理学研究 81(2), 158-166.

千田サダ子(1986). リアリティショックの問題に看護教育はどうかかわるか 看護展望, 11, 575-582.

傳馬淳一郎・中西さやか(2014). 保育者の早期離職に至るプロセス: TEM(複線径路・等至性モデル)による分析の試み 地域と住民: 道北地域研究所年報, 32, 61-67.

遠藤知里・竹石聖子・鈴木久美子・加藤光良 (2012). 新卒保育者の早期離職問題に関する研究 2 - 新卒後 5 年目までの保育者の「辞めたい理由」に注目して 常葉学園短期大学紀要 43, 155-166.

後藤桂子(1986). 新卒看護婦のリアリティショック対策としてのプリセプターシップ看護展望, 11, 589-591.

樋口 耕一(2014). 社会調査のための計量テキスト分析—内容分析の継承と発展を目指して. ナカニシヤ出版.

井部俊子・上泉和子(1986). 新卒看護師のリアリティショック 看護展望, 11, 568-574.

糸嶺一郎(2013). 新卒看護師のリアリティショックに関する研究の動向と課題 過去 20 年の文献から 茨城県立医療大学紀要, 18, 1-13.

伊津美孝子・清水房枝・湯浅智子・平野加代子(2008). プリセプターシップにおける看護師長の役割行動評価とプリセプターシップ概念の解釈との関連 三重看護学誌, 10, 77-81.

株式会社ポピンズ(2011). 平成 23 年度厚生労働省委託事業 潜在保育士ガイドブック保育士再就職支援調査事業・保育園向け報告書 < http://www.mhlw.go.jp/bunya/kodomo/pdf/h120423_g.pdf > (2016 年 1 月 21 日)

加藤光良・鈴木久美子(2011). 新卒保育者の早期離職問題に関する研究 1 幼稚園・保育所・施設を対象とした調査から 常葉学園短期大学紀要, 42, 79-94.

亀岡正二・富樫千秋(2014). プリセプターのリーダーシップ行動と新人看護師の組織社会化との関連 日本看護学教育学会誌, 23, 1-13.

厚生労働省(2013). 待機児童解消加速化プラン 2013 年 5 月 10 日 < <http://www.city.okayama.jp/contents/000157485.pdf> > (2016 年 1 月 21 日)

厚生労働省(2014a). 新人看護職員研修ガイドライン 改訂版 < <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000049578.html> > (2016 年 1 月 21 日)

厚生労働省(2014b). 平成 26 年(2014)医療施設(静態・動態)調査・病院報告の概況 < <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/iryosd/14/> > (2016 年 1 月 21 日)

Kramer, M. (1974). Reality Shock: Why Nurses Leave Nursing? The C. V. Mosby Co., St. Louis, MO.

久保江里・前田ひとみ・山田美幸・津田紀子・串間秀子・池田スエ子 (2007). 新卒看護師の仕事に対する予想とのギャップと対処の実態: 就職 3 ヶ月後と 6 ヶ月後の縦断的調査から 南九州看護研究誌, 5, 45-52.

Kamiji, Reiko・Matsuura, Miharu・Mingawa, Jun (2016). Reality shock experienced by nursery teachers part III: Comparative study of reality shock experienced by nursery teachers employed 1-4 years. International Congress of Psychology, 300.

Matsuura, Miharu・Kamiji, Reiko・Mingawa, Jun (2016). Reality shock experienced by nursery teachers part I: Revealing aspects of reality shock experienced by nursery teachers employed less than one year by interviews. International Congress of

- Psychology, 300.
- 松浦美晴・上地玲子・皆川順(2016). 潜在保育士復職支援研修会のあり方ー研修会参加者に対する個別インタビューからー. 日本教育心理学会第58回大会発表論文集.
- Mingawa, Jun・Matsuura, Miharu・Kamiji, Reiko (2016). Reality shock experienced by nursery teachers part II: Revealing aspects of reality shock experienced by nursery teachers employed 2-4 years by interviews. International Congress of Psychology, 300.
- 宮崎静香(2014). 新人保育士が保護者に対処する過程で求められる職場体制の在り方 : 社会福祉法人A会A保育園のインタビュー調査を通して 東洋大学大学院大学院紀要, 51(社会学・福祉社会), 219-243.
- 宮崎静香(2016). 新人保育士の保護者対応を支える先輩保育士による職場体制 : 保育所における主任保育士・園長へのインタビュー調査から. 浦和論叢 (54), 107-122.
- 森本美佐・林悠子・東村知子 (2013). 新人保育者の早期離職に関する実態調査 奈良文化女子短期大学紀要 44, 101-109.
- 宗像恒次・及川尚美 (1986). リアリティショックー精神衛生学の視点からー 看護展望, 11, 562-567.
- 内閣府(2015). 子ども・子育て支援新制度<<http://www8.cao.go.jp/shoushi/shinseido/outline/>>(2016年1月21日)
- 内藤寿喜子・木村チヅ子・川端貴美子 (1986). リアリティショック-新卒看護婦をどう支えていくかー 看護展望, 11, 583-588.
- NHK(2013) クローズアップ現代 深刻化する保育士不足～“待機児童ゼロ”への壁～NHK オンライン<http://www.nhk.or.jp/gendai/kiroku/detail102_3384_all.html>(2016年1月12日)
- 尾形真実哉(2012). リアリティ・ショック(reality shock)の概念整理 甲南経営研究, 53, 85-126.
- 岡本響子・岩永誠 (2015). 新人看護師のリアリティショック尺度の開発 インターナショナル nursing care research, 14, 1-10.
- 岡本響子・松浦美晴(2015). 就業3か月における新人看護師のリアリティショックの体験日本保健医療行動科学会雑誌, 30, 72-80.
- 岡山県教育庁指導課 (2009)「学校に対する苦情・不当な要求等への対応」岡山県教育庁.
- 佐居由美・松谷美和子・平林優子・松崎直子・村上好恵・桃井雅子・高屋尚子・飯田正子・寺田麻子・西野理英・佐藤エキ子・井部俊子(2007). 新卒看護師のリアリティショックの構造と教育プログラムのあり方 聖路加看護学会誌, 11, 100-108.
- 谷川夏美(2013). 新任保育者の危機と専門的成長 : 省察のプロセスに着目して 保育学研究, 51, 105-116.
- 内野恵子・島田涼子(2015). 本邦における新人看護師の離職についての文献研究 心身健康科学 11, 18-23.
- 安田裕子・サトウタツヤ編著(2012). TEM でわかる 人生の経路質的研究の新展開 誠信書房.

平成 28 年度 海外渡航報告書

岡山大学 大学院自然科学研究科

後藤 佑介

発表題目：Proposition of Division-based Broadcasting System over Wireless LAN

著者：Yusuke Gotoh and Yuki Takagi

出席学会等名称：The 5th Workshop on Advances in Data Engineering and Mobile Computing (DEMoC-2016)

開催場所：オストラヴァ工科大学，オストラヴァ，チェコ共和国

開催期間：平成 28 年 9 月 7 日～平成 28 年 9 月 9 日

渡航期間：平成 24 年 9 月 4 日～平成 24 年 9 月 10 日

1. 研究成果報告

報告者が参加・発表した国際会議 NBiS-2016 (19th International Conference on Network-Based Information Systems)は，単年度あたり 1 回の会議を開催する国際会議である．19 回目となる本年度は，平成 28 年 9 月 7 日～平成 28 年 9 月 9 日の日程で，チェコ共和国・オストラヴァで開催された．本国際会議は，メインカンファレンスに加え，複数の併設ワークショップが同時に開催され，発表件数は 192 件，参加者は 250 名を超える大規模な会議であった．発表では，世界各国より研究者が参加し，活発な議論が展開された．報告者は，併設ワークショップ「DEMoC-2016 (5th Workshop on Advances in Data Engineering and Mobile Computing)」において，採択された査読論文を発表した．質疑応答では，発表内容について参加者と積極的な議論を行った．なお，本論文は The Workshops of the 19th International Conference on Network-Based Information Systems (NBiS 2016)において，Best Paper Award を受賞した (図 1)．

2. 要旨

計算機や携帯端末を用いた動画視聴形態の普及にともない，Internet Protocol (IP) ネットワーク上で，音声や動画といった連続メディアデータを放送型で配信する研究が盛んに行われている．連続メディアデータの放送型配信は，使用する帯域幅と配信サーバの負荷がクライアント数に比例して増加する従来の Video on Demand (VoD) に比べて，一定の帯域幅で複数のクライアントに同じデータをまとめて配信できる．しかし，放送型配信はデータを繰り返し配信するため，データの受信要求から再生開始までに発生する待ち時間が長大化する問題がある．この待ち時間を短縮するため，データを複数の部分に分割して，複数の通信路で配信する分割放送型配信が考えられてきた．

また，分割放送型配信において，データ受信時の待ち時間を短縮するスケジューリング手法が多数提案されており，スケジューリング手法を導入可能な分割放送型配信システムが実現されてきた．しかし，システムの評価で構築したネットワークは有線 LAN 環境であり，無線 LAN 環境を用いた評価は行っていなかった．近年では，スマートフォンやノート型計算機といった移動端末を用いて連続メディアデータを受信するクライアントは増加しており，無線 LAN 環境でシステムの有用性を示す必要があった．

そこで、本研究では、無線 LAN 環境における分割放送型配信システム **TeleCaS** (図 2) を実現し、システムの有用性を評価した。本システムでは、無線 LAN 環境に対応した通信プロトコルの設計、およびパケット欠損への対応という課題に対して、ルータとイーサネットコンバータを使用した通信プロトコルの構築、およびルータの通信出力やサーバとクライアントの計算機間の性能差を考慮したパケット欠損の発生環境の構築を行った。無線 LAN 環境における本システムの評価では、帯域幅による影響、データサイズによる影響、チャネル数による影響の三項目について評価し、無線 LAN 環境によるパケット欠損、および経路上のパケット欠損が再生中のデータ途切れに大きく影響を与えることが分かった (図 3)。その上で、無線 LAN 環境で発生するパケット欠損の発生状況、およびパケット欠損発生時における分割放送型配信システムの有用性をそれぞれ確認した。



図 1 : Best Paper Award の賞状



図 2 : 分割放送型配信システム **TeleCaS**

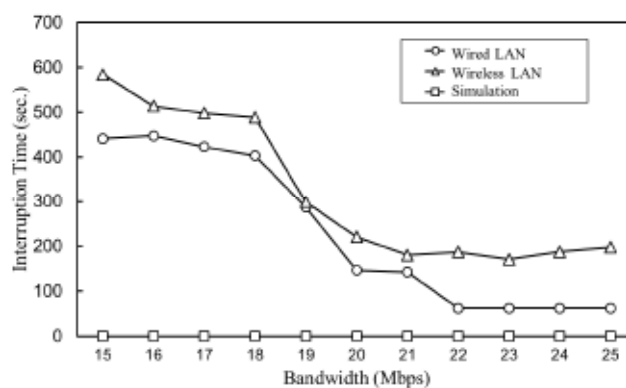


図 3 : サーバの帯域幅に応じた再生中の途切れ時間

平成 28 年度 海外渡航報告書

岡山大学大学院環境生命科学研究科

高橋 一男



図1. 第25回国際昆虫学会の参加者状況(アメリカ昆虫学会HPより)

形態測定学的手法は、対象物の形を定量化するツールとして、主に人類学や古生物学の分野で、長年に渡り有用な手法として活用されてきた。しかし、この20年間に於ける理論的な発展に加えて、エンドユーザーにも利用可能な解析ソフトウェアが多数開発されたことで、国内外において、その適用範囲は広がり続けている。生態学分野においても、既に様々な研究で形態測定学的手法が活用されているが、アイデア次第でまだまだ新規性の高い応用が可能である。外骨格で外部形態が決まっている昆虫では、一度発育が完了すれば、容易にはその外部形態が変化しないため、特に形態定量化に適した研究材料といえる。昆虫学分野での形態測定学的解析の使用数は過去5年間で急激な増加を見せており、形態測定学のアプローチとその他のアプローチをいかに上手く組み合わせるのか、先端的な解析手を適用する上での工夫などは、世界中の昆虫学研究者の関心事である。このような状況において、昆虫学分野において先端的な形態測定学的研究事例をまとめたシンポジウムを行うこと、また、形態測定学的手法と先端的なゲノミクスを組み合わせた申請者の研究発表には大きな価値があるものと考えられた。このような状況を考え、申請者は第25回国際昆虫学会にて、形態測定学に関連したシンポジウム、“In the Light of Morphometrics: Frontiers in Ecology and Evolution of Insect Morphology”を企画した。

国際昆虫学会は、昆虫学分野においては世界で最大規模の国際学会である。第25回国際昆虫学会大会では推定5000名以上の昆虫学者が世界中から集い(図1)、先端的な研究成果の報告・議論を行った。申請者が主催した予定のシンポジウムにも100名を超

える多くの参加者があつまり、研究成果の発表および研究ネットワークの構築の機会を得ることができた。

シンポジウムの共同企画者となったKlingenberg博士は、形態測定学分野における世界的権威である。申請者は、2015年にKlingenberg博士を岡山大学に招聘し、今回のシンポジウムの企画打ち合わせを行っており、着実に国際交流の下地を固めてきた。このような下準備の結果、申請者の企画したシンポジウムでは、昆虫の形態解析で世界的に顕著な業績を上げている13名の研究者(申請者およびKlingenberg博士を含む)が講演を行い、講演者の国籍は実に9カ国に及んだ(図2)。今回企画したシンポジウム、“In the Light of Morphometrics: Frontiers in Ecology and Evolution of Insect Morphology”では、近年急速に発達してきた、昆虫の形態解析手法に注目し、最先端の手法への理解を深め、情報交換を行うことを目的としていたが、実際に行われた講演は、多様な研究材料に先端的な形態測定学的解析を適用したものが多く、参加者に貴重な情報交換の場を提供できただけでなく、申請者自身にとってもとても学びの多い機会となった。また、シンポジウム参加者には

Symposium: In the Light of Morphometrics: Frontiers in Ecology and Evolution of Insect Morphology

Room W314 A (Convention Center)

Moderators and Organizers: Kazuo Takahashi¹, Chris Klingenberg², and Haruki Tatsuta³, ¹Okayama Univ., Okayama, Japan, ²The Univ. of Manchester, Manchester, United Kingdom, ³Univ. of the Ryukyus, Nishihara, Japan

- 1:30 **0684** Insect morphometrics: New developments and applications. **Chris Klingenberg** (cpk@manchester.ac.uk), The Univ. of Manchester, Manchester, United Kingdom
- 2:00 **0685** Hidden biodiversity in hoverflies assessed by wing geometric morphometrics: Conservation implications. **Vesna Milankov** (vesna.milankov@dbe.uns.ac.rs), Jasmina Ludoški, Ljubinka Francuski, and Marko Djurakic, Univ. of Novi Sad, Novi Sad, Serbia
- 2:15 **0686** Inferring phylogenetic origins of dimorphic sexual trait in a beetle *Oedemera sexualis*. **Haruki Tatsuta** (htatsuta@agru-ryukyu.ac.jp), Wataru Ogasa¹, Daisuke Satomi², Shin-ichi Kudo³, and Chiharu Koshio¹, ¹Univ. of the Ryukyus, Nishihara, Japan, ²Kobe Univ., Kobe, Japan, ³Naruto Univ. of Education, Naruto, Japan
- 2:30 **0687** Detecting divergent sexual selection operating upon divergent genital morphologies. **Yasuoki Takami** (takami@people.kobe-u.ac.jp) and Sogo Takahashi, Kobe Univ., Kobe, Japan
- 2:45 **0688** Ecological adaptation and morphological divergence in the snail feeding carabid beetle *Damaster blaptoides*. **Junji Konuma** (junji.konuma@sci.toho-u.ac.jp), Toho Univ., Chiba, Japan
- 3:00 **BREAK**

- 3:15 **0689** Through the looking-glass: Morphological diversity pattern of ants is reflected in the sympatric ant-mimicking spiders or not? **Yoshiaki Hashimoto** (yoshiaki@hitohaku.jp), Univ. of Hyogo Museum of Nature and Human Activities, Sanda, Japan
- 3:30 **0690** On the importance of shape in a ménage à trois among an orchid, a female bee, and a male bee. **Yannick Staedler** (yannick.staedler@univie.ac.at), Jürg Schönenberger¹, Philipp Schlüter², Susanne Pamperl¹, and Sara Manafzadeh², ¹Univ. of Vienna, Vienna, Austria, ²Univ. of Zürich, Zürich, Switzerland
- 3:45 **0691** Interspecific variation of wing asymmetry in Syrphidae. **Adam Tofilski** (rotofil@cyf-kr.edu.pl), Agricultural Univ. of Krakow, Krakow, Poland
- 4:00 **0692** HSP90 as a global genetic modulator for male genital morphology in *Drosophila melanogaster*. **Kazuo Takahashi** (kaz_tak@cc.okayama-u.ac.jp) and Hiroyoshi Iwata², ¹Okayama Univ., Okayama, Japan, ²The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan
- 4:15 **0693** Morphometrics meets network theory: Modularity and the origin of camouflage patterns of butterfly and moth wings. **Takao Suzuki** (homaresuzuki@gmail.com), National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan
- 4:30 **0694** Understanding the evolution of *Drosophila* wing shape: An integrative approach using geometric morphometrics. **Hugo Benitez** (hugobenitez@gmail.com)¹ and Chris Klingenberg², ¹Univ. of Tarapacá, Arica, Chile, ²The Univ. of Manchester, Manchester, United Kingdom
- 4:45 **0695** Quantitative morphological study of Scarabaeoidea. **Xing-Ke Yang** (yangxk@ioz.ac.cn) and Ming Bai, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
- 5:00 **0696** Landmarks, semilandmarks, and outlines in medical entomology. **Jean-Pierre Dujardin** (dujardinbe@gmail.com), IRD, Montpellier, France

図2. シンポジウム「In the Light of Morphometrics: Frontiers in Ecology and Evolution of Insect Morphology」の講演タイトルおよび講演者(大会プログラムより)

若手の研究者が多く、今後の研究活動におけるネットワーク作りにもつながった。申請者自身も、このシンポジウムにおいて、“HSP90 as a global genetic modulator for male genital morphology in *Drosophila melanogaster*”というタイトルで、講演を行い、研究内容に対する様々なコメントやアドバイスを得ることができた。

平成 28 年度 海外渡航報告書

岡山大学異分野基礎科学研究所 (理学部化学科)

鈴木 孝義

平成 28 年 7 月 3 日より 11 日までの 9 日間、公益財団法人ウエスコ学術振興財団のご支援により、第 42 回錯体化学国際会議に出席し研究成果を発表・討論するため、および Paul Sabatier 大学 (University of Toulouse III) との学術交流協定締結に向けた事前協議のため、フランス共和国ブレスト市およびトゥールーズ市に渡航した。申請時での渡航計画では、国際会議に参加した後、パリ市内の Pierre et Marie Curie 大学 (UPMC) を訪問し、今後の両大学間の学術および学生交流に関する協議を行う予定であったが、訪問を予定していた 7 月 9 日 (土) が先方の大学の夏休み期間中であり、昨今欧州各地で頻発しているテロ事件の影響で大学の警備が強化されていることから、休日に学内を訪問することは難しい旨の連絡があり、UPMC 訪問は断念した。その代わり、新たな大学 (部局) 間の協定締結に向けて、国際会議期間中ではあるが 7 月 4 日に Paul Sabatier 大学内の配位化学研究所 (Laboratoire de Coordination Chimie, Toulouse) を訪問し、講演を行うとともに先方の研究者および国際交流機関関係者と学術および学生交流に関する協議を行った。

7 月 3 日午前 11 時 (定刻) に関西国際空港を離陸し、パリ (シャルルドゴール) 国際空港を経て、現地時間の 3 日午後 11 時過ぎ、第 42 回錯体化学国際会議の開催地であるブレスト市 (フランス共和国) に到着した。同会議は、3 日夕方の Opening Ceremony から始まっていたが、渡航スケジュールの関係で Opening Ceremony および Welcome Party への参加は断念した。また、関西国際空港 (パリ経由) ブレスト間の往復航空券を手配した後に、急遽 Paul Sabatier 大学 (LCC, Toulouse) への訪問が決まったために、国際会議開催中ではあったが翌 4 日早朝にブレスト市からトゥールーズ市に空路移動した。

トゥールーズ空港からは Paul Sabatier 大学の大学間協定締結対応者である Isabelle Sasaki 博士にお世話いただいた。11 時前には Paul Sabatier 大学内の配位化学研究所 (Laboratoire de Coordination Chimie, Toulouse) に到着し、早速、Jean-Pascal Sutter 教授と多核錯体の構造制御と磁気挙動の解明に関する研究について意見交換を行った。その後、Sasaki 博士と Sutter 教授に加えて Sylviane Sabo-Etienne 教授とともに昼食をとりながら両大学の学術および学生交流の進め方に関して意見交換を行った。14 時より LCC 内の講義室において、我々の最新の研究成果である「完全自然分晶の発現」に関する講演会 (図 1) を行った。その後、Sabo-Etienne 教授と有機金属ヒドリド錯体の合成および構造に関する研究について議論し、Jean-Pierre Costes 名誉教授とは多核金属錯体の磁気挙動と完全自然分晶について意見交換した。当日夜は、開催中の第 42 回錯体化学国際会議の会場から LCC に戻られた Rinaldo Poli 教授、Paul Sabatier 大学の国際交流機関の副室長である Fabrice Dumas 博士、Sasaki 博士とともに夕食をとりながら、両大学間における学術および学生交流協定の締結に向けた協議を行った。丸 1 日に満たない Paul Sabatier 大学への訪問であったが、その中身は非常に濃くかつ有意義であった。実際、この訪問を契機として、本年 9 月に岡山大学で開催予定のシンポジウムに Sutter 教授が講演者として参加していただけることになり、今後両研究室間で共同研究を行う準備も進めている。また、本学大学院自然科学研究科と Paul Sabatier 大学間の部局間協定 (学生交流を含む) の締結に向けた準備も、帰国後直ちに開始しており、今年度内の締結を目標に進めている。

Conférence LCC

Pr Takayoshi Suzuki



Okayama University

Complete Spontaneous Resolution: Peculiar Crystallization Phenomena of Chiral Metal Complexes

Lundi 4 juillet 2016 à 14h00
Auditorium Fernand Gallais

Campus CNRS 205
205, route de Narbonne, Toulouse

Contact LCC: Dr Isabelle Sasaki, isabelle.sasaki@lcc-toulouse.fr
Retrouvez le programme complet des séminaires sur le site web du LCC: <http://lcc-toulouse.fr>

図 1 LCC, Toulouse での講演会の案内

7月5日に空路にて、トゥールーズ市からパリ経由で再びブレスト市に戻り、15時過ぎからは第42回錯体化学国際会議に参加した。Michael Ward 教授 (University of Sheffield) や 藤田誠教授 (東大) による超分子錯体に関する最新の研究成果を聴講した後、18時30分から開始されたポスターセッションにおいて、指導大学院生(博士後期課程)とともにヒスチジンから誘導した配位子を用いた新規遷移金属錯体の合成と構造に関する研究成果を発表し、聴衆者と研究内容に関する議論を行った。また、他の発表者によるポスター発表も聴衆し、金属錯体が関与する様々な研究課題の最新動向を調査した。

6日および7日も、同様に錯体化学国際会議にて多数の講演を聴講した。Guo-Xin Jin 教授 (Fudan University) とノーベル賞受賞者である Jean-Marie Lehn 教授 (University of Strasbourg) による Plenary Lectures をはじめとして、スピנקロスオーバーと光誘起現象に関するシンポジウム (S2)、新規配位化合物の合成と帰属および性質に関するシンポジウム (S5)、MOFs (有機-金属-骨格構造体) に関するシンポジウム (S4B) を中心に多数の講義を聴講し、各分野での最新の研究動向を調査した。また、共同研究者である砂月幸成助教が7日のS2シンポジウムで「直鎖状六座配位子を含むコバルト(II) 錯体の合成と磁気挙動」について成果報告を行った。この会場では、Paul Sabatier 大学や Pierre et Marie Curie 大学の研究者も研究発表しており、共通の研究課題を見つけ、共同研究として今後発展できる可能性を感じた。さらに、7日の夜に開催された国際会議の Banquet にも参加し、Helmul Sigel 名誉教授 (University of Basel) や Gary Watkins 教授 (Rhodes University) など世界的に著名な研究者と親交を深めることができた。

国際会議の最終日である7月8日には、S5シンポジウム会場にて自身の研究成果報告を「Thyminato-bridged cyclic tetranuclear rhodium(III) complexes containing a calcium ion as a template metal core」の講演題目で行った(図2)。この発表は、重要な生体分子のひとつである核酸塩基を構築素子として用い、メタラカリックスアレーン骨格を有する環状四核ロジウム(III) 錯体をカルシウムイオンを鋳型とすることで選択的に構築し、さらにこの環状錯体のある種の有機分子または陰イオンを用いて超分子的に連結させる機能性分子の設計に関する研究である。

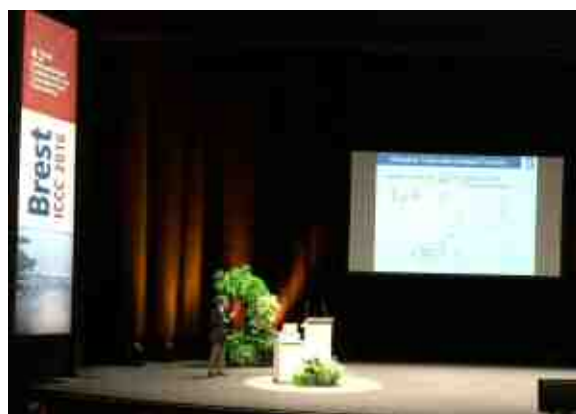


図2 第42回錯体化学国際会議での講演の様子

発表後、座長の Nathan McClenaghan 教授 (University of Bordeaux) や Paola Ceroni 教授 (University of Bologna) と生成錯体の選択性や超分子構築に関して討論を行った。その後、西原寛教授 (東大) による今国際会議最後の Plenary Lecture を拝聴し、Closing Ceremony にも出席した。国際会議は昼過ぎに全プログラムを終了したが、飛行機のスケジュールのために当日の夜にブレスト市からパリ (オルリー) 市に移動した。

冒頭で述べたように、当初の渡航計画では7月9日(土)に Pierre et Marie Curie 大学 (UPMC) を訪問する予定であったが、先方の大学の事情により中止した。なお、UPMC との学術および学生交流に関する打合せのため準備した資料は、国際会議の会場で UPMC から参加していた研究者に手渡した。また、再訪問のスケジュール調整や、現在当方で受入れている UPMC から交換留学生の状況、今後の学生交流計画については、帰国後に先方の対応者と電子メールで意見交換している。

パリ市内に1日間滞在した翌日の10日にパリ (シャルルドゴール) 国際空港より帰途につき、11日朝に関西国際空港に帰着した。本報告書の最後に、今回の実り多いフランス渡航をご支援いただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団にお礼申し上げる。

平成 28 年度 海外渡航報告書

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

橋川 直也

【概要】

渡航目的 北米神経科学学会 (Neuroscience 2016) 出席
 研究内容 社会敗北ストレスによる抑うつ行動における熱ショックタンパク質の役割
 渡航先 アメリカ カリフォルニア州 サンディエゴ
 日程 2016 年 11 月 11 日～11 月 18 日
 発表演題 「Role of Heat shock proteins 105 on depression-like behavior in mice.」
 発表者 Yuta Utaka (修士 2 年), Ryo Tanoue (修士 1 年), Yuna Morita (修士 1 年), Sayumi Yamamoto (修士 1 年), Narumi Hashikawa-Hobara, Naoya Hashikawa

北米神経科学学会 (Neuroscience) は世界に 4 万人以上の会員を抱える、神経科学分野で世界最大の学会であり、神経科学分野において一流の研究者たちが集まる学会である。申請者は今回、「Role of Heat shock proteins 105 on depression-like behavior in mice.」というタイトルで発表を行った。うつ病と関係する因子として、神経細胞の生存維持、神経突起の伸長促進、神経栄養因子の変化が報告されているが、熱や紫外線など様々なストレスにより発現が誘導される熱ショックタンパク質とうつ様症状の関係性についての報告はまだない。本発表が世界で初めてうつ様症状と熱ショックタンパク質の関係性を明らかにした発表であり、科学の発展のためにも世界に発信することに大きな意義があると考えられる。また、現在、同時に論文を作製中であるが、一流の研究者達から見て疑問点、実験において足りなり点、アドバイスなどを直にディスカッションできることに国際学会発表の大きなメリットがあると考えている。実際に様々な研究者から異なった視点で質問があり、今後の研究をする上でとても有意義な学会参加であった。

発表内容

【背景】

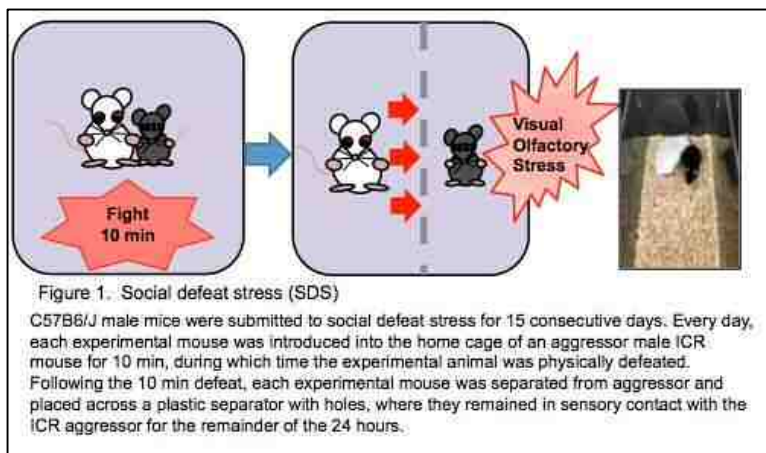
うつ病と関係する因子として、神経細胞の生存維持、神経突起の伸長促進、神経栄養因子の変化が報告されているが、熱や紫外線など様々なストレスにより発現が誘導される熱ショックタンパク質(HSP)とうつ様症状の関係性についての報告はまだない。HSP とは、新生タンパク質の折り畳みや変性タンパク質の修復を行う分子シャペロンとして機能するタンパク質の総称で分子量の違いによって分類される (Table 1)。近年、アルツハイマー病などの中枢神経疾患においても HSP の発現量が変化することが報告されており、様々な疾患と HSP の関係性の研究が進められている。今回うつ様症状と HSP との関係性を解明するため、うつ病のモデルマウスとして知られる社会敗北ストレス負荷マウスを用いて行動解析を行い、脳内 HSP 及び神経栄養因子発現量解析を行った。更に HSP 誘導剤として知られているテプレノン(GGA)を用いて脳内の HSP 発現誘導を行い、うつ様行動への影響を検討した。

Table 1 HSPの種類

Protein name	function
HSP25	HSP25 is crucial roles in specific developmental stages associated with cell proliferation, differentiation, and cell death.
HSP60	HSP60 is a mitochondrial chaperonin that is typically held responsible for the transportation and refolding of proteins from the cytoplasm into the mitochondrial matrix.
HSP72	HSP72 is an important part of the cell's machinery for protein folding, and help to protect cells from stress.
HSP105	HSP105 is constitutively expressed, but exhibits particularly high levels in the brain.

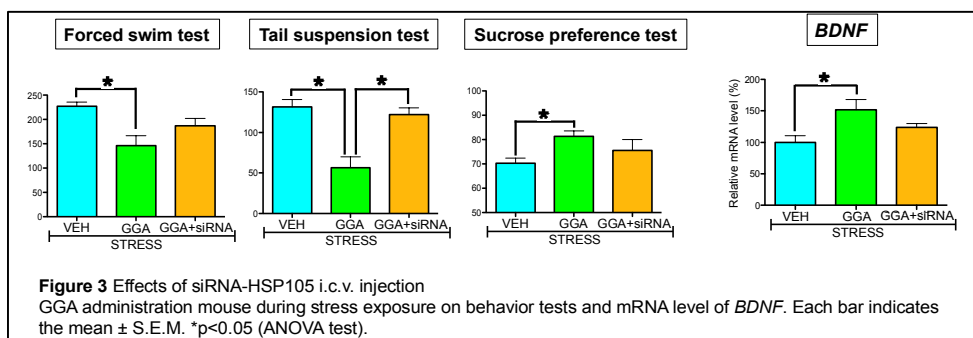
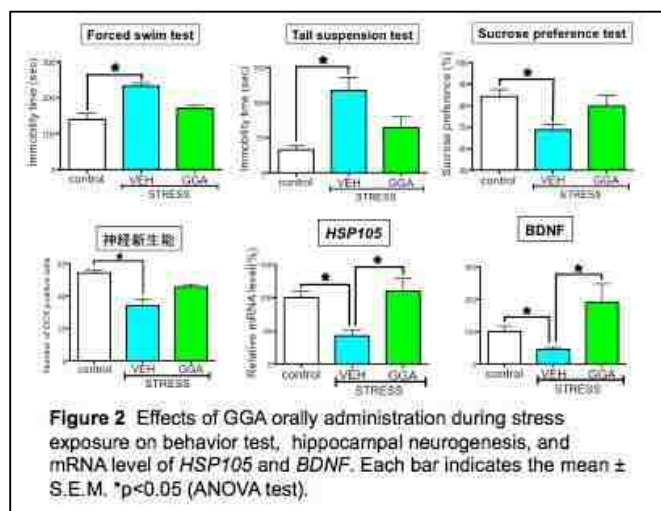
【方法】

8 週齢雄性 C57BL6J マウスを体が大きい ICR マウスの入ったケージ内に 10 分間滞在させ敗北ストレスを与えた。その後穴の開いた透明な仕切りを設置して 2 匹を分離飼育し、継続的に視覚・嗅覚的ストレスを与えた。また C57BL6J マウスを毎日異なる ICR マウスのケージに移し 15 日間毎日ストレスを与えることで社会敗北ストレス (social defeat stress; SDS) マウスを作製した (Figure 1)。うつ様行動の評価は、強制水泳試験、尾懸垂試験、スクロース嗜好性試験により行った。うつ様行動との関係性が指摘されている海馬において、HSP (HSP25, 60, 72, 105) 及び神経栄養因子(BDNF、CNTF、NT-3、NGF)の発現量を qRT-PCR によって解析し、海馬における神経新生能は免疫蛍光染色法により解析した。また、0.34%GGA をストレス負荷期間中経口投与し同様の実験を行った。更に GGA の効果が特定の HSP によるものかを明らかにするため、siRNA をマウスの脳室内に投与し、HSP の発現を抑制して解析を行った。



【結果】

ストレス負荷マウスにおいて強制水泳試験、尾懸垂試験、スクロース嗜好性試験の全てでうつ様行動が認められ、海馬における神経新生細胞数の低下、BDNF 及び HSP 発現量の低下が認められた (Figure 2)。GGA 飲水投与により脳内の HSP 発現誘導を行うことでストレス負荷によるうつ様行動の改善が認められ、更に神経新生細胞数、BDNF 発現量の低下の抑制が認められた。また、HSP に対する siRNA を脳室内投与したマウスでは GGA 投与によるうつ様行動の改善が認めなかった (Figure 3)。



以上のことから HSP 発現誘導が抗うつ作用を示すことが示唆された。更に特定の HSP がうつ様行動に関与していることが明らかになった。

最後に、公益財団法人ウエスコ学術振興財団の海外渡航費助成事業において、本研究課題を採択・助成していただいたことに感謝いたします。

平成 28 年度 海外渡航報告書

岡山理科大学 理学部

森 嘉久

イタリアのエリーチェにある Ettore Majorana Foundation and Centre for Scientific Culture にて 2016 年 5/27~6/5 の日程で開催された国際結晶学会主催の高圧結晶学関連のサマースクールのワークショップ講師として参加するために海外渡航いたしました。サマースクールは初めての出席でしたが、出席者は博士課程や修士課程の学生を中心に 103 名で、国別の参加者 (Fig. 1) を見ると開催地のイタリアよりも USA, UK, France の参加者が多いことに驚いた。更にそれ以外の参加国としては、Italy, German, India, Switzerland, Poland, Turkey, Sweden, China, Taiwan, Uzbekistan, Island, Algeria, Brazil, Slovakia, Spain, Australia, Ireland, Argentina など、欧米を中心に各国から若い研究者が集まっていることが分かる。残念なことに日本からの参加者は私を含めた講師が 2 名参加しただけで学生の参加者はなかった。若い研究者が積極的にこのようなサマースクールに参加して独自の世界的ネットワークを築いている中、日本の学生が参加していないのは、日本における研究力の将来を考えると非常に憂慮すべきことである。開催時期は日本にとっては講義期間 (博士課程はあまり気にする必要はないと思われるが・・・) であるが、欧米にとっては夏休みのところがあり、このようなサマースクールが 50 ほど開催されているとのことである。

実質的なスクールが 8 日間にわたり実施され、30 を超える講義と 5 回にわたるワークショップ、2 回のポスタープレゼンテーションとその他のショートプレゼンテーションが高密度で実施された。私が担当したのは *Discovering the extreme beauty of high-pressure crystallization* のワークショップで、1 コマが 90 分で 5 回実施した。内容としてはダイヤモンドアンビルセルを用いた水の結晶化と私が持参した SEED による高圧下における液体の結晶化のワークショップであった。高圧下での結晶構造相転移や電子物性などを研究する場合の高圧手段として多くの研究室ではダイヤモンドアンビルセルを用いている。SEED はサファイアアンビルをベースに非常にコンパクトに設計された高圧発生装置で、持ち運びが可能であるだけでなく、扱いが非常に簡易で小中学生でも触ることが出来る。しかしながらその発生圧力は、2 万気圧まで到達するので、水を含む様々な液体の結晶成長を自由に制御しながら観察することが可能な装置である。

WS に参加した学生は、真剣な眼差しでデモ実験に取り組むとともに、そこで感じた疑問をすぐに講師に対して質問するのではなく、Fig.2 の写真風景のように WS 参加者同士で議論を初めて自分たちで結果を得ようとする姿勢を強く感じた。この姿勢は WS だけでなく講義後の質疑応答においても同様で、現在の日本の学生に不足している能力と指摘されている。その能力を養うためにもこのようなサマースクールに積極的に参加し、同世代の様々な国籍の研究者と議論を交わす訓練をすべきであろう。

今回の海外渡航における当初の予定は、ワークショップの講師として高圧科学の面白さを伝えるために参加したつもりであったが、実際は、サマースクールに参加する若い研究者が真剣にディスカッションする姿勢に感銘するだけでなく、そこで構築される若い研究者間の世界的なネットワークの動向、そしてそのネットワークに入りきれていない日本の若い研究者の実態を知る機会となる、大変有意義なサマースクールであった。

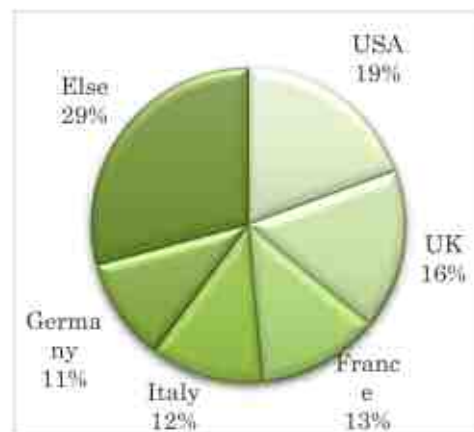


Fig.1 国別の参加者数



Fig.2 ワークショップ実施風景

平成 28 年度 海外渡航報告書

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

畑中 唯史

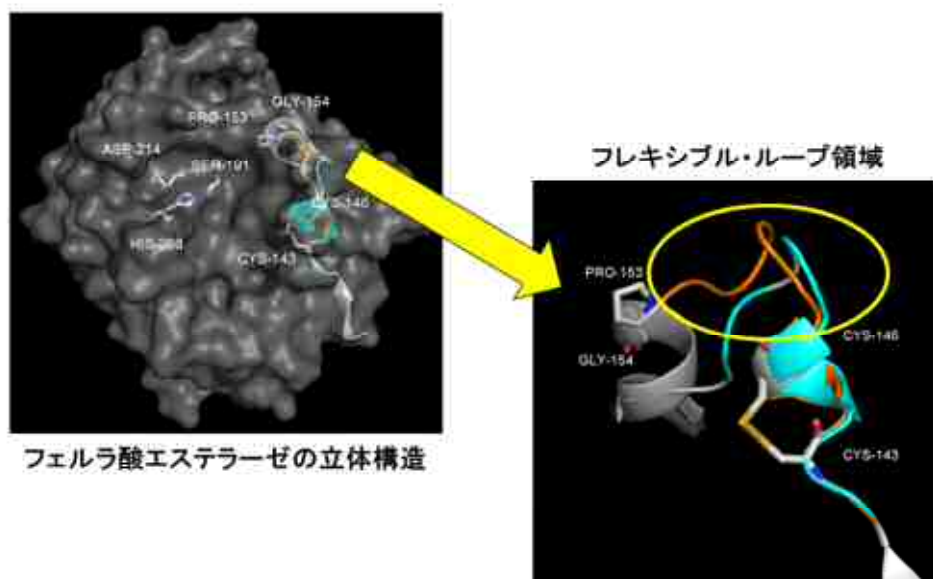
10月24日から27日にかけて、オーストラリア・メルボルンで開催された、International Biotechnology Symposium and Exhibition 2016 (IBS2016) に、参加しました。この学会は、2年毎に開催されており、今回は17回目の開催です。貴財団の援助もあり、私は前々回、韓国・テグで開催された15回目以来4年ぶりにエントリーすることができました。

23日の早朝、岡山空港から、羽田、シンガポールまで JAL、ついでカンタス航空に乗り継ぎ、24日の早朝ようやくメルボルン・タラマリン空港に到着、スカイバスでメルボルン市内へ移動して、約40分でサザンクロス駅に到着し、徒歩10分ほどで、会場のメルボルン・コンベンションセンターに到着しました。日本との時差は、2時間なので、長旅ではありますが、さほどの疲れはありませんでした。

私の所属する研究所は、今年で創立20周年を迎える節目の年なのですが、この20年間、一貫して放線菌由来酵素の応用研究に取り組んでまいりました。今回のポスター発表演題は、Relationship between enzyme activity and structure of *Streptomyces feruloyl esterase* であります。フェルラ酸エステラーゼは、イネ科細胞壁に多く含まれるポリフェノールの一種であるフェルラ酸を切り出す酵素であります。フェルラ酸は、香料バニリンの原料として多く用いられ、近年ではアルツハイマー予防効果も報告される有用化合物であります。フェルラ酸は、現在のところ、米糠から搾油した残渣から得られるオリザノールを、アルカリ加水分解して製造されていますが、植物細胞壁に豊富に含まれるフェルラ酸は、未利用資源となっています。植物細胞壁は、複雑な構造を有しており、酵素分解を行うには、ヘミセルラーゼ・アラビノフラノシダーゼといった複数の酵素を組み合わせる必要があります。フェルラ酸を切り出すために、鍵酵素となるのが、フェルラ酸エステラーゼです。この酵素は、これまでコウジカビ由来のものしか、報告がありませんでした。今回、我々は放線菌由来の新規なフェルラ酸エステラーゼを見出し、酵素の性状解析、酵素の結晶解析結果を中心に発表しました。

結晶解析は、大阪大学の井上先生の協力を得て、成し遂げた成果であり、この酵素の結晶解析は、現在、宇宙航空開発研究機構 (JAXA) のきぼう宇宙ステーションで、宇宙空間での結晶化について、現在でも検討を継続しています。これまでの変異体酵素の性状

解析および結晶構造解析により、我々のフェルラ酸エステラーゼのもつフレキシブル・ループの構造（上図参照）が、その活性に重要な役割をもつことを明らかにすることができ、今回の発表につながりました。



平成 28 年度 海外渡航報告書

川崎医療短期大学 放射線技術科

矢納 陽

1. はじめに

このたび、国際会議にて研究発表する機会を本助成事業により与えていただきました。ありがとうございます。大変貴重な経験をすることが出来ました。以下では、国際会議への参加発表に関する報告を記します。

2. 国際会議の概要

国際会議名	21st IEEE International Conference on Emerging Technologies and Factory Automation (ETFA2016)
渡航先	ベルリン（ドイツ）
期間	2016 年 9 月 6 日～9 月 9 日
主催団体	IEEE

本会議は 1992 年にオーストラリアで初開催された。その後オーストラリア（1993 年）、日本（1994 年）、フランス（1995 年）、ハワイ（1996 年）、ロサンゼルス（1997 年）、スペイン（1999 年）、フランス（2001 年）、ポルトガル（2003 年）、イタリア（2005 年）、チェコ（2006 年）等での開催を経て、現在に至っている。次回は 2017 年にキプロスで開催される予定である。今回の会議では、40 以上の国と地域から論文が投稿され、その件数は 217 件であった。このうち採択された論文数は 125 件とのことである。また、これらの論文以外にもスペシャルセッションについて 13 件の論文、Work in progress 論文に対して 119 件の論文が採択され、すべての論文に少なくとも 3 名の査読者が割り当てられていたとのことである。発表者の国別内訳はドイツ、オーストリア、チェコ、フランス、スペイン、イタリア、イギリス、スウェーデン、ノルウェーなどヨーロッパ諸国を中心とした構成であり、日本以外のアジアの国々ではシンガポール、韓国、インドから発表があった。

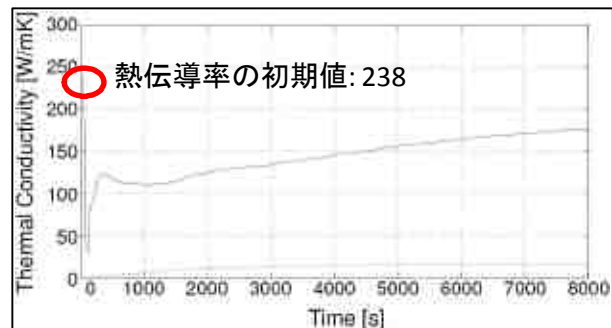


会議の様子

3. 研究発表の内容ならびに他の研究等について

研究発表 「Estimation of Thermal Conductivity for Model with Radiative Heat Transfer by Extended Kalman

Filter (拡張カルマンフィルタを用いた放射伝熱を含むモデルの熱伝導率の推定)」の研究発表を会議3日目に行った。発表の際、(1)物理パラメータを推定する理由や(2)拡張カルマンフィルタのパラメータの決定方法について質問を受けた。これに対し、(1)変動する物理パラメータの推定値を用いて、より正確なモデルを構築し制御性能の向上を図りたいためであることや(2)実験データを基にパラメータを決定したと回答した。また、画像処理に基づく自動縫製装置の開発を目指した研究発表について意見交換を行った。具体的には、奥行きを検出や生地の厚みの測定方法について質問し、奥行きについてはあらかじめ定められた規定値を利用し、生地の厚みについてはそれを押さえる力から計算するという回答を得た。さらに、「Industrie4.0 - From the Perspective of Applied Research」という講演では Industrie4.0 (実世界のセンサ情報とコンピュータの計算能力を結び付けることで、情報通信技術を製造業に統合しようとするドイツ政府主導の取り組み) についての紹介がなされ、その実現に必要な要素(データ転送速度、セキュリティ、互換性、機械学習、人的資源)について述べられた。スマート工場のデモも見ることができたが、現状では一つのモノを作るためのコストが高い印象を受けた。



実験装置 (左) と実験データから推定したアルミニウム板の熱伝導率の推移 (右)

4. おわりに

本助成事業のおかげで研究発表できました。重ねてお礼申し上げます。自分の研究発表だけでなく、他の研究を聴講することで大変良い刺激を受けました。今後も研究領域を掘り下げるだけでなく、他領域との融合を図り、地域の発展に寄与できる研究を推進いたします。ありがとうございました。

以上