

平成 29 年度研究費助成 研究成果報告書集

研究成果報告書 目次

■ ダイナミンを機能コアとするがん浸潤制御ネットワークの解明 岡山大学 大学院 医歯薬学総合研究科 助教 竹田 哲也	1
■ Interleukin-6-Janus kinase カスケードを標的とした炎症性骨破壊疾患に対する新たな治療戦略の構築 岡山大学 大学病院・歯周科 講師 大森 一弘	3
■ 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	6
■ 脂肪細胞の尿酸トランスポーターを介した非アルコール性脂肪性肝炎と心機能・血管障害の関連 岡山大学 大学院 保健学研究科 講師 渡辺 彰吾	10
■ 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
■ 時空間制御可能な神経分化制御法の開発 岡山大学 大学院 自然科学研究科 助教 渡邊 和則	17
■ キラルナフトキノンの合成と光学特性スイッチング 岡山大学 大学院 自然科学研究科 講師 高石 和人	21
■ 画像検出のための Web からの学習画像の自動収集 Simple Alignment Sentence Classification for Aspect-Based Sentiment Analysis 岡山大学 大学院 自然科学研究科 助教 新妻 弘崇	24
■ 疎水性キャピラリーバリアを持った河川堤防の安全性に関する研究 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 助教 金 兼洙	30
■ 航空レーザー測深による旭川河道の計測と洪水流解析精度向上への応用 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 准教授 吉田 圭介	41
■ 卵の老化に伴うオルガネラの動態・機能の解析 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 准教授 若井 拓哉	47
■ 含フッ素天然化合物をリードとした化合物ライブラリーの構築 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科 准教授 泉 実	50
■ 植物の分布を決める適応機構に関する遺伝的基盤の解明 岡山大学 資源植物科学研究所 助教 池田 啓	54
■ 再分化を促す転写因子 BBM1 と WUS2 を過剰発現したオオムギの網羅的遺伝子発現解析 岡山大学 資源植物科学研究所 助教 久野 裕	56
■ 炎症性脂質メディエーター合成系を標的とした慢性炎症予防効果を有する食品機能性 岡山県立大学 保健福祉学部 教授 山本 登志子	60
■ 乳児を養育する母親の産後うつと睡眠、生活状況に関する海外との比較研究 岡山県立大学 保健福祉学部 准教授 池田 理恵	66
■ 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 准教授 川上 祐生	72
■ ウェアラブルモニタを用いた移動形態の判別と生体負荷の推定法に関する研究 岡山県立大学 情報工学部 准教授 綾部 誠也	74

■ Cross-Company Defect Prediction における分野外データセットの有用性に関する評価 岡山県立大学 情報工学部 助教 天寄 聡介 79
■ 無線ボディアエリアネットワークにおけるデータとノードの優先度に応じた高信頼アクセス制御に関する研究 岡山県立大学 情報工学部 助教 高林 健人 85
■ 視線情報が付与された大規模映像データベースの構築と深層学習に基づく視覚的注意予測の実現 岡山県立大学 情報工学部 助教 滝本 裕則 91
■ 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 97
■ スリランカ新国会議事堂の成立過程と設計手法に関する研究 岡山県立大学 デザイン学部 教授 岩本 弘光103
■ 効果的ながん治療を目指したホウ素化合物の液液界面における反応挙動の解明 岡山理科大学 理学部 助教 坂江 広基109
■ ヒト・オキシトシン受容体の試験管内発現と部位特異的安定同位体標識試料を用いた構造解析 岡山理科大学 理学部 講師 山口 悟111
■ RNA による DNA トポイソメラーゼ I の酵素活性制御メカニズムの解析 岡山理科大学 理学部 講師 河野 真二114
■ 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
■ 段ボール受動歩行ロボットを用いた実験授業およびその評価 岡山理科大学 工学部 教授 衣笠 哲也121
■ 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125
■ 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129
■ 日本産ヤリテンツキ（カヤツリグサ科植物）の系統分類学的研究 岡山理科大学 生物地球学部 講師 矢野 興一131
■ 質問紙と加速度計で評価した小学生の運動時間は一致するか？ 岡山理科大学 教育学部 講師 笹山 健作135
■ 石英地質温度計の高温変成岩への適用へ向けて 岡山理科大学 自然科学研究所 准教授 今山 武志138
■ 位置選択的ヒドロシリル化反応を利用したポリマーの合成とその性質 倉敷芸術科学大学 生命科学部 教授 仲 章伸142
■ 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146
■ 竹久夢二の美人画作品のインタラクティブコンテンツ制作研究 倉敷芸術科学大学 芸術学部 教授 中川 浩一149
■ プラナリア多能性幹細胞集団内での生殖系列決定機構 津山工業高等専門学校 総合理工学科 准教授 前澤 孝信159
■ 高演色 LED 光源を用いた農産物の外観色評価装置の開発 津山工業高等専門学校 総合理工学科 特命教授 眞鍋 由雄162

■ 再生を保証する自己複製/分化スイッチング機構の解明 津山工業高等専門学校 総合理工学科 准教授 柴田 典人168
■ 銅製熱交換器の温間酸化被膜が及ぼす濡れ性への影響 津山工業高等専門学校 総合理工学科 講師 竹村 明洋172
■ <i>Streptomyces cinnamoneus</i> ゲノム情報を利用した有用酵素の探索 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 グループリーダー 畑中 唯史178
■ モモ花粉稔性を支配する遺伝子の同定とマーカー化 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 小田 賢司182
■ 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187
■ 慢性炎症を駆動する「AGEs-RAGE 系」の活性化メカニズムの解明 就実大学 薬学部 助教 渡邊 政博191
■ 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 教授 丹羽 俊朗195
■ 発酵乳ホエーより単離した睡眠を誘導するペプチドの作用機序の解明 就実大学 薬学部 教授 坪井 誠二199
■ ラマン分光法を利用した鼻腔内投与型粉末製剤最適化システムの開発 就実大学 薬学部 准教授 古林 呂之204
■ たくましいカラダと心を育む短時間運動習慣形成支援プログラムの開発～運動を通して子どもの可能性を伸ばす学校の取り組み～ 就実大学 教育学部 講師 森村 和浩209
■ 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213
■ 認知機能等を改善させる植物由来物質の探索 川崎医療福祉大学 医療技術学部 講師 上野 浩司218
■ Hecke 環と環のゼータ関数に関する研究 川崎医療福祉大学 医療福祉マネジメント学部 助教 兵藤 史武221
■ 未来に残す資産としての岡山方言のデータベース構築 ―映像アーカイブの研究活用― ノートルダム清心女子大学 文学部 教授 尾崎 喜光223
■ 「保育士の早期離職を予防する養成校及び施設管理職者向けマニュアル」の作成 ―リアリティショ ックに着目して― 山陽学園大学 総合人間学部 准教授 松浦 美晴227
■ 職員の精神的健康度と関連する経営行動・マネジメント行動の同定 山陽学園大学 大学院 看護学研究科 教授 高木 二郎233
■ ゲノム編集技術を用いたノックアウトマウスの作製と腎臓線維化の制御機構の解明 重井医学研究所 分子遺伝部門 研究員 古家野 孝行239

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	今井 純243
■ 岡山大学 大学院 自然科学研究科	助教	萬代 大樹245
■ 岡山大学 大学院 環境生命科学研究科	准教授	三木 直子247
■ 岡山大学 理学部	准教授	野坂 俊夫248
■ 岡山大学 異分野基礎科学研究所	助教	岩崎 真之250
■ 岡山県立大学 情報工学部	助教	瀬島 吉裕251
■ 川崎医科大学 微生物学教室	助教	内藤 忠相253
■ 川崎医療福祉大学 医学技術学部	助教	鈴木 啓太254

長期間海外派遣滞在 研究成果報告書 目次

【平成 27 年度長期間海外派遣滞在費助成】

■ 視触覚クロスモーダルな質感形成の脳機能解明と質感評価システムの提案 岡山大学 工学部 助教 楊 家家255
■ ラマン分光技術の習得と共溶媒が誘起するタンパク質の構造変化における疎水効果の理解 岡山大学 大学院 自然科学研究科 特任助教 望月 建爾259

【平成 28 年度長期間海外派遣滞在費助成】

■ 炎症性腸疾患由来発癌における免疫担当細胞の役割 岡山大学 大学院 自然科学研究科 助教 増田 潤子262
--	----------

ダイナミンを機能コアとするがん浸潤制御ネットワークの解明

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

竹田 哲也

浸潤は悪性がんに顕著な特徴であり、その分子病態の解明が革新的ながん治療法の開発に不可欠である。しかし、がんの悪性化に伴って浸潤能が亢進するメカニズムには未解明な点が多い。私たちは、がん浸潤を司る膜突起構造（浸潤突起）の新規形成因子として、ダイナミン（Dynammin2）を同定した（Zhang *et al.*, *BBRC* 2016）。ダイナミンは、アクチンや細胞内膜輸送を制御しながら、浸潤突起の形成や機能に関わると考えられる。さらにダイナミンはPR（プロリンリッチ）ドメインをもち、SH3 ドメインを持つ他の蛋白質と相互作用して浸潤を制御する可能性が高い。しかし浸潤突起形成においてダイナミンと相互作用する SH3 ドメイン蛋白質は不明であった。そこで本研究では、がん浸潤を制御する既知の蛋白質のうち、SH3 ドメインを持つアダプター蛋白質 Tks5 と、膜リモデリング因子 ASAP1 の膀胱がん細胞における局在を解析し、ダイナミンとの相互作用の可能性について検証した。

がんは日本人の死亡原因の1位であり、年間死者数の約3割を占める。がん患者の命を奪う原因のほとんどは、浸潤とそれに引き続いて起こる転移である（図1）。がん細胞が転移する過程では、基底膜の破壊と間質への浸潤、血管内侵入が起こる。しかし基底膜や間質、血管壁の細胞外基質が物理的な障害になるため、がん細胞は細胞外基質を分解して遊走する必要がある。それゆえに、がん細胞による細胞外基質分解メカニズムの解析は、がん浸潤・転移の分子病態の解明と、それに基づいた革新的ながん治療法の開発に重要である。多くのがん細胞は、浸潤突起（invadopodia）と呼ばれる構造を形成し、プロテアーゼを分泌しながら細胞外基質を分解することが明らかになっている。浸潤突起は、束ねられたアクチン繊維から成るコア（アクチンコア）を持つ膜突起構造で、その形成や機能には細胞内輸送やア

クチン細胞骨格の再編成が必要である。しかし、がんの悪性化に伴って浸潤突起が形成され、浸潤能が亢進するメカニズムは不明である。

ダイナミンは分子量約100kDaのGTPアーゼで、エンドサイトーシスや分泌などの細胞内膜輸送や、アクチン細胞骨格制御において重要な機能を持つ。私たちは先行研究において、ダイナミン（Dynammin2）が膀胱がん細胞T24の浸潤突起に局在することを明らかにした（図2A）。RNAiやダイナミン特異的阻害剤であるDynasoreを用いてDynamminの機能を阻害すると浸潤突起の形成が抑制され、浸潤活性が顕著に低下した（図2B）。以上の結果より、ダイナミンは浸潤突起形成の制御因子として、がん細胞の浸潤に必須の機能を持つことが世界に先駆けて明らかになった（Zhang *et al.*, *BBRC* 2016）。

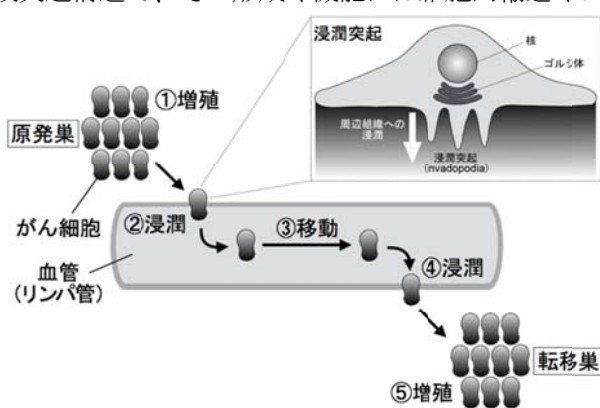


図1 がん転移のプロセスと浸潤突起

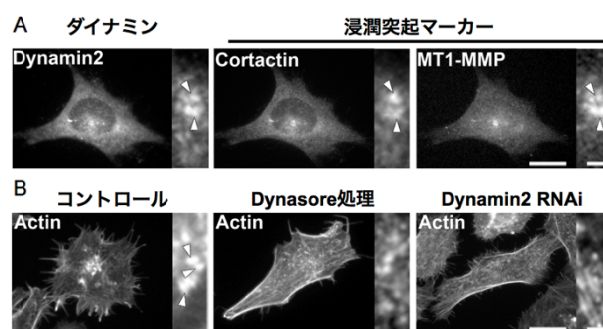


図2 ダイナミン2による浸潤突起形成制御 (A)膀胱がん細胞T24の浸潤突起へのダイナミン2の局在。(B)ダイナミン機能阻害(Dynasore処理およびRNAi)による浸潤突起の形成抑制。(Zhang *et al.*, *BBRC* 2016)

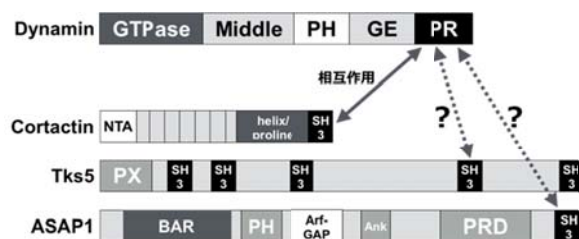


図3 ダイナミンおよび浸潤突起で機能するSH3ドメイン蛋白質

ダイナミンは C 末にプロリンリッチ (PR) ドメインを持ち、SH (Src homology) 3 ドメインを持つ他の蛋白質と相互作用する (図3)。ダイナミンを RNAi した際に起こる浸潤突起形成および浸潤活性の低下は、ラット由来のダイナミンを強制発現することによって回復した (Zhang *et al*, *BBRC* 2016)。一方、PR ドメインを欠損したラット由来ダイナミンを強制発現しても、ダイナミン RNAi 細胞の浸潤活性の回復は見られなかった (Zhang *et al*, *BBRC* 2016)。この結果は、ダイナミンの浸潤制御機能に、SH3 ドメインを持つ他の蛋白質との相互作用が必要であることを強く示唆している。実際に、SH3 ドメインを持つアクチン結合蛋白質コルタクチン (Cortactin) はダイナミンと複合体を形成し、がん細胞の浸潤突起に局在することが明らかになっている (図2)。

そこで本研究では、浸潤突起の機能に関わる既知の蛋白質のうち、SH3 ドメインを持つ蛋白質 Tks5 (tyrosine kinase substrate 5) および ASAP1 (Arf GTPase-activating protein 1) について、浸潤突起におけるダイナミンとの相互作用の可能性について検証した (図3)。Tks5 はアダプター蛋白質で、リン脂質に結合する PX ドメインと、5 つの SH3 ドメインを持つ (図3)。一方の ASAP1 は、細胞膜やアクチン細胞骨格のリモデリングに必要な蛋白質で、膜変形ド

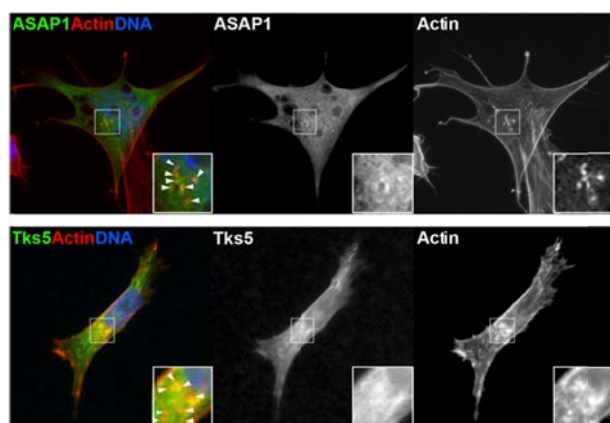


図4 ASAP1とTks5の浸潤突起への局在

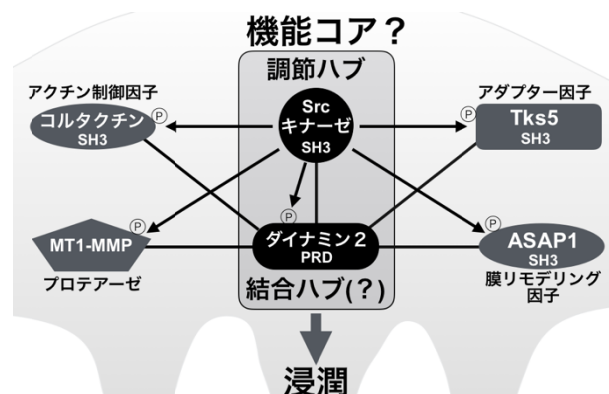


図5 Src-ダイナミン浸潤機能コアモデル 浸潤制御ネットワークにおけるリン酸化(矢印)と相互作用(直線)を示す。メイン BAR や、PH、Arf-GAP、Ankyrin repeat、PRD などの機能ドメインに加え、C 末に SH3 ドメインを持つ (図3)。Tks5 と ASAP1 の局在を明らかにするために、それぞれの蛋白質の GFP 融合蛋白質を膀胱がん細胞 T24 で発現し、その局在について解析したところ、Tks5 と ASAP1 はどちらも浸潤突起に局在することが明らかになった (図4)。今後 Tks5 と ASAP1 のさらなる機能解析を進め、ダイナミンとの相互作用についての生化学的な検証、浸潤突起形成におけるそれぞれの蛋白質の機能などを解明したいと考えている。

ASAP1 や Tks5 に限らず、浸潤突起の機能に関わる因子には SH3 ドメインをもつ蛋白質が数多く存在し、これらの蛋白質もダイナミンと相互作用する可能性が高いと考えられる。さらに、ダイナミンやコルタクチン、Tks5、ASAP1 は、悪性がんでは活性化するがん遺伝子 *Src* のリン酸化調節を受けることも明らかになっている (図5)。そのためがん浸潤を司る分子ネットワークにおいてダイナミンが中心的な機能を持ち、その機能が *Src* によって制御される可能性が高い (図5)。今後、がん細胞におけるプロテオーム解析などを通じてがん浸潤制御に関わる分子ネットワークの全貌を解明し、浸潤をターゲットにした次世代のがん治療に向けた学術的な基盤を構築したい。

最後に、本研究のサポートをしていただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に、心より感謝申し上げます。

IL-6-JAK カスケードを標的とした炎症性骨破壊疾患に対する新たな治療戦略の構築

岡山大学病院・歯周科

大森 一弘

超高齢社会を迎えた我が国において、高齢者の健康寿命を延伸させることが国家的命題の一つとなっている。健康寿命を維持するためには栄養を司る口腔機能を良好に維持することが求められる。歯周病は成人国民の約 8 割が罹患する国民病の一つであり、高齢期における歯の喪失の主な原因となりうる炎症性骨破壊疾患の一つである。近年、糖尿病や動脈硬化等の生活習慣病との関連も強く示唆される歯周病の効果的な予防・治療法の開発が強く望まれている。本研究では、真菌由来代謝産物 *terrein* の抗 IL-6 効果に着目し、歯周炎マウスモデルに対する抗炎症・骨破壊抑制効果を *in vivo* で検証した。その結果、*terrein* には歯周炎症を抑制する効果、さらに炎症性歯槽骨破壊抑制効果があることを確認した。以上から、IL-6-JAK カスケードを標的とする炎症性骨破壊疾患に対する新たな治療戦略の一つとして *terrein* を応用できる可能性が示唆された。

はじめに

超高齢社会を迎えた我が国において、高齢者の「健康寿命を延伸させる」ことが医療費削減を目指す上で国家的命題の一つとなっている。健康寿命を維持するためには、栄養を司る口腔機能を良好に維持すること、そして、日常生活動作 (ADL) を維持するための骨格・筋力を良好に維持することが重要である。

歯周病は、口腔内常在菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* が歯周組織に感染し続けることによって発症する感染症である。さらに、成人国民の約 8 割が罹患し、成年期から高齢期にかけて歯の喪失の主な原因となりうる口腔内の代表的な炎症性骨破壊疾患としての側面もある。また、関節リウマチや骨粗鬆症といった全身性の炎症性骨破壊疾患は女性に多く発症し、高齢女性における ADL の重度低下を来す原因となっている。以上のような背景から、炎症性骨破壊疾患の効率的な治療・予防法を開発することが健康寿命延伸を目指す上で世論から強く求められている。

我々は真菌の一つである *Aspergillus terreus* が産生する二次代謝産物 *terrein* の抗炎症効果に着目して研究を進めている。その成果として、従来報告されていた *terrein* の有機化学的合成法¹⁾を改良して、効率的に合成する手法を開発した (天然由来の収率 0.03 %→新規合成経路の総括収率 46 %)。

さらに、合成した *terrein* が歯肉線維芽細胞における炎症性サイトカイン interleukin-6 (IL-6) の細胞内シグナル伝達に関わる主経路 Janus kinase (JAK) /STAT および Ras/MAPKs のタンパク質リン酸化を抑制する抗 IL-6 効果を明らかにした²⁾。

IL-6 は歯周病、そして関節リウマチといった炎症性骨破壊を主病態とする疾患の発症および進展に深く関与していることが報告されており、炎症性骨破壊の進行を抑制する上で、非常に重要なターゲット因子の一つである^{3,4)}。IL-6 に対する治療法として、現在、日本発の抗 IL-6 受容体抗体 (トシリズマブ) に代表される分子標的薬 (抗体医薬) が注目を集め、その効果に注目が集まっている。しかし、分子標的薬は非常に高価であり、また、易感染状態の惹起という副作用が存在する。さらに、近年、抗 IL-6 受容体抗体が無効な関節リウマチの症例が報告され始め、新たな標的分子として IL-6 受容体の下流に存在する JAK への注目が集まっている⁵⁾。

JAK は非受容体型チロシンキナーゼの一つであり、IL-6 の共役受容体である膜タンパク gp130 に結合し、IL-6 細胞内シグナル伝達に関与している。特に、細胞増殖や生存、分化に関与しており、免疫細胞や血球系細胞において重要な役割を果たしている。我々は低分子化合物 *terrein* に JAK1 のタンパク質リン酸化を抑制する効果があるこ

とをすでに見いだしており、JAK を標的とした炎症性骨破壊疾患の効果的かつ効率的な治療法開発に terrein を応用できると考えた。そこで本研究では、炎症性骨破壊疾患の一つである歯周炎のマウスモデルを用いて、terrein の抗炎症・骨破壊抑制効果を *in vivo* で検証することを目的とした。

材料と方法

1. Terrein の合成

Terrein (図 1) は、Altenbach らの報告を一部改変し、有機化学的に合成したものをを用いた (岡山大学大学院自然科学研究科合成プロセス化学研究室, 萬代大樹博士から供与)。合成したテレインの立体構造の確認は、¹H および ¹³C の核磁気共鳴 (NMR) を用いて炭素骨格を確認し、高分解能質量分析 (FAB) により分子量を測定してテレインであると判断した。また、高速液体クロマトグラフィーによる光学純度 (>98 % ee) も併せて確認した。天然抽出物との比較は、比旋光度を比較することによって、天然物と同一の鏡像異性体であることを確認した。

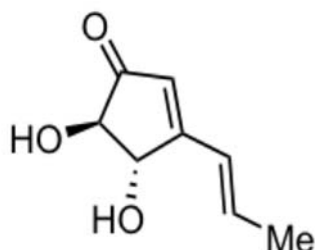


図1. (+)-terrein, MW=154.16

2. 歯周炎マウスモデルに terrein が及ぼす影響の検討

歯周炎マウスモデルでは、通法に従い実体顕微鏡下でマウス (C57BL/6J, 雄性, 8~10 週齢) 上顎第二大臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* W83 (膿瘍形成株) を投与して歯周感染を惹起した。歯周感染 3 週間後、炎症巣のミエロペルオキシダーゼ (MPO) に結合する蛍光プローブ (XenoLight Rediject Inflammation Probe, 住商ファーマ) を腹腔から注入して、IVIS spectrum (Perkin Elmer) を用いて歯周組織の炎症状態を評価した。ライブイメージ

ング解析後、安楽死させた後に、通法に従い組織を摘出し、顎骨の状態をマイクロ CT による画像解析で評価した。その後、通法に従いパラフィン包埋した後に組織切片 (厚さ 5 μm) を作成し、炎症性細胞浸潤等を組織学的に検討した。なお、本実験は岡山大学動物実験委員会の承認のもと行った (承認番号: OKU-2016531)。

結 果

1. Terrein が歯周炎症に及ぼす影響の検討

歯周炎マウスモデルに terrein を腹腔投与し、歯周炎症に対する抗炎症効果を分子イメージング解析にて検証した。PBS を腹腔投与した群 (コントロール群) においては、5-0 絹糸を結紮した上顎第二大臼歯相当部に蛍光プローブの強い集積を確認した (図 2A)。一方、terrein を腹腔投与した群 (実験群) においては、5-0 絹糸を結紮した上顎第二大臼歯相当部にコントロール群と比較して弱い蛍光プローブの集積を確認した (図 2B)。

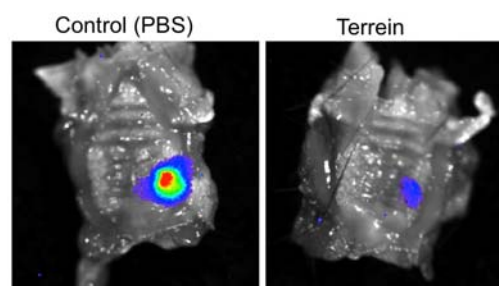


図2. Terreinが歯周炎症に及ぼす効果

2. Terrein が歯槽骨吸収に及ぼす影響の検討

歯周炎マウスモデルの分子イメージング解析後、マウス上顎骨を摘出し、歯槽骨吸収量はマイクロ CT 画像解析にて検討した。PBS を腹腔投与した群 (コントロール群) においては、骨吸収の進行が観察された。一方、terrein 投与群 (実験群) では、濃度依存的に歯槽骨吸収量が抑制される傾向が確認された (図 3)。

考 察

歯周病はう蝕とならんで口腔内における二大疾患の一つであり、その罹患率の高さから生活習

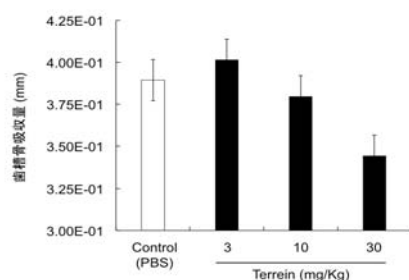


図3. Terreinが歯槽骨吸収に及ぼす効果

慣病の一つと言える。その発症には、口腔内の常在菌である歯周病原細菌（*Porphyromonas gingivalis*等の嫌気性菌）が歯肉溝に感染することによって発症する。不適切な歯磨きや歯磨きをしないといった悪習慣によって歯周病原細菌が歯肉溝に長期的に感染し続けると、好中球やマクロファージ等の免疫担当細胞が産生する炎症性サイトカイン（TNF- α やIL-6等）によって歯周組織に炎症が惹起される。しかし、炎症を起こしているにも関わらず「痛み」といった自覚症状を感じることがほとんどないため、多くの歯周病患者は歯磨き時の出血を自覚したとしても放置しているケースが多い。そのため、歯肉溝に歯周病原細菌が感染し続け、歯垢や歯石といったバイオフィルムが形成されると、歯肉溝が病的に深くなった状態（歯周ポケット）へと移行する。形成された歯周ポケットに対して適切な歯周治療が実施されずに放置され続けると、歯周炎症は深部の結合組織層へと波及し、最終的には歯を支える歯槽骨に炎症性骨吸収を引き起こす。そして、歯の喪失へとつながり、口腔機能の低下が生ずる。歯周病の進行に伴う口腔機能の低下は、QOLの低下を惹起するのみならず、糖尿病や心疾患等の基礎疾患に対しても悪影響を及ぼし、全身状態の悪化へとつながる。そのため、昨今、話題となっている健康寿命の延伸を図る上でも、国民の大多数が罹患する歯周病の効率的な予防および治療法を開発することが必須である。

我々が着目する真菌由来代謝産物 terrein には、IL-6受容体下流シグナル伝達における主経路の一つである JAK のタンパク質リン酸化を抑制する効果がある。これまで我々は、terrein の抗炎症効果、そして炎症性骨破壊抑制効果を *in vitro* で評価

するも、動物モデルに対する効果は検証できていなかった。しかし、今回の研究において、*in vivo* である歯周炎マウスモデルに対する terrein の抗炎症および炎症性骨破壊抑制効果を確認できた（図2, 3）ことは、terrein の新たな炎症性骨破壊治療薬としての可能性を大きく示唆するものである。今後は、他の炎症性骨破壊疾患である関節リウマチや骨粗鬆症のマウスモデルに対する terrein の効果をさらに検証していく予定である。

以上本研究では、terrein の IL-6-JAK カスケードを起点とした抗炎症・骨破壊抑制薬としての可能性が示唆され、炎症性骨吸収を主病態とする歯周病の予防・治療薬としての応用が示唆された。さらに、本研究では有機化学的に合成した terrein を用いたことから、自然界には存在しない新たな類縁体を合成することが可能である。今後はさらに抑制効果の高い化合物を探索していくことによって、より効果的な炎症性骨破壊疾患の予防・治療薬の開発へと繋げていきたい。

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。

引用文献

- 1) Altenbach HJ, Holzapfel W: *Angew Chem Nt Ed Engl*, 29: 67-68 (1990)
- 2) Mandai H, Omori K, Yamamoto D, Tsumura T, Murota K, Yamamoto S, Mitsudo K, Ibaragi S, Sasaki A, Maeda H, Takashiba S, Suga S: *Bioorg Med Chem*, 22: 5338-5344 (2014)
- 3) Hirano T: *Int Rev Immunol*, 16: 249-284 (1998)
- 4) Kishimoto T: *Int Immunol*, 22: 347-352 (2010)
- 5) Genovese MC, Kremer J, Zamani O, Ludivico C, Krogulec M, Xie L, Beattie SD, Koch AE, Cardillo TE, Rooney TP, Macias WL, de Bono S, Schlichting DE, Smolen JS: *N Engl J Med*, 374: 1243-1252 (2016)

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

当研究室ではこれまでに、腫瘍組織内の血管透過性が高いマウス結腸がん Colon-26 モデルマウス及びマウス肺がん LLC モデルマウスに、光増感剤投与と光照射からなる、腫瘍内血管を標的とした光線力学的処置 (Photo-triggered tumor Vascular Treatment, PVT) を施すことで、腫瘍の増殖を有意に抑制することを明らかとしている。そこで本研究では、血管透過性の高い広範ながん種において、PVT による腫瘍増殖の抑制が可能であるかを追求するため、皮下移植モデルマウスの腫瘍内血管透過性が高いことで知られる、マウス乳がん由来がん細胞 FM3A 及びマウス腹水がん細胞 Ehrlich の 2 種を選択し、種々の検討を行った。まず、FM3A モデルマウス並びに Ehrlich モデルマウスに対して PVT を施したところ、FM3A モデルマウスにおいては、PVT 単独の処置により強い抗腫瘍効果が認められたものの、Ehrlich モデルマウスにおいては、PVT 単独の処置による抗腫瘍効果は認められなかった。また FM3A モデルマウスでは、血管内皮細胞のアポトーシス及び血栓の形成が誘導され、腫瘍内の血流を伴った血管が減少することで、血管周辺に存在していたがん細胞のアポトーシスを引き起こすこととなり、腫瘍増殖の抑制に至ったことが示された一方で、Ehrlich モデルマウスでは、FM3A モデルマウスで認められた血管内皮細胞のアポトーシス、血栓の形成、並びに腫瘍内の血流を伴う血管の割合の減少は認められなかった。以上の結果から、PVT はそれ単独で腫瘍の増殖を抑制する作用を示す、有用な処置となり得るものの、その効果は腫瘍内血管の構造特性により異なることが示唆された。

はじめに

主ながん治療法である外科手術、放射線療法、化学療法の 3 種のがん治療法に加わる第 4 のがん治療法として、光増感剤の投与及び外部からの組織特異的な光照射という 2 段階の処置からなる、光線力学療法 (Photodynamic Therapy, PDT) が近年注目を集めている。PDT の作用機序は、投与した光増感剤に応じた特定波長の光を照射すると、光増感剤が励起状態となり、その後、励起した光増感剤が基底状態へと戻る際に、周囲の酸素分子にエネルギーを渡すことで、一重項酸素を始めとした種々の活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) が産生され、産生された ROS ががん細胞に直接作用し、アポトーシスまたはネクローシスを誘導することでがん細胞自体の死滅が引き起こされるというものである。PDT は腫瘍組織選択的な治療が可能なことや、投与される光増感剤の生体適合性が非常に高いこと、侵襲性が低く安全性に優れることなどから、現在盛んに研究が進められている¹⁾。

PDT の中でも、血管を標的とした PDT (Vascular targeted PDT, VTP) は血管に対して様々な作用を引き起こすことが報告されている。血管を標的とした PDT は、がん細胞を標的とした通常の PDT と比較して、光増感剤投与から光照射までのインターバルを短くすることで、主に腫瘍組織の血管内で光増感剤の活性化を図る。そうすることで、腫瘍内血管において、血小板の凝集や血栓の形成が起り、血流の停滞が引き起こされた結果、腫瘍組織への酸素や栄養分の供給を絶つ、所謂「兵糧攻め」による腫瘍の増殖抑制が可能となる。

難治性と言われる一部のがんでは、一般的ながん組織に認められる組織学的な特徴が認められず、血管透過性が低いため、ナノ粒子製剤化した抗がん剤を投与しても、EPR 効果に基づいた十分な治療効果に繋がらないことが報告されている。このような背景のもと、当研究室では、腫瘍組織内の血管透過性が低いマウスメラノーマ (B16/BL6) モデルマウスに対し、低用量の光増感剤投与と光照射からなる腫

瘍内血管を標的とした光線力学処置 (Photo-triggered Vascular Treatment, PVT) を施すことで、腫瘍内血管の透過性亢進に基づき、その後投与するナノ粒子製剤の腫瘍組織移行量の増大並びに抗腫瘍効果の増強を引き起こすことを明らかにし、PVT が難治性がんへのナノ粒子製剤を用いたがん治療を行う上で有用な前処置となる可能性を報告している²⁾。しかし一方で、腫瘍組織内の血管透過性が高いマウス結腸がん (Colon-26) モデルマウス及びマウスルイス肺がん (LLC) モデルマウスに対して PVT を施すと、血管透過性亢進作用は認められないものの、PVT 単独の処置により腫瘍の増殖を強く抑制することを明らかにした²⁾。

そこで我々は、このような背景に基づき、PVT 単独処置により腫瘍の増殖が抑制されたのは、腫瘍組織内の血管透過性が高いことに起因するのではないかと仮説を立てた。そこで本研究では、PVT により、血管透過性の高い広範ながん種において、腫瘍増殖の抑制が可能であるかを更に追求するため、皮下移植モデルマウスの腫瘍内血管透過性が高いことで知られる、マウス乳がん由来がん細胞 (FM3A) 及びマウス腹水がん細胞 (Ehrlich) の2種を選択し、種々の検討を行った。

材料と方法

1. 光増感剤内封ポリマーナノ粒子(PN-Por)の調製³⁾
PLA-PEG とポルフィリンの疎水化誘導体 (PppIX-DME) を酢酸エチルに溶解させ、精製水と混和した。プローブ型ソニケーター (Sonicator, 大岳製作所) による超音波処理 (50 W, 室温, 5 min) を行い、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、ポリマーナノ粒子を調製した。残留した酢酸エチルを除去するため、超遠心機 (日立 SCP85H) による遠心分離 (30,000 rpm, 45 min, 10°C) を3度繰り返した。

2. 固形がんモデルマウスの作製

培養フラスコ上で培養したがん細胞を、80%コンフルエントの状態での回収し、FM3A 細胞 (3.0×10^6 cells/100 μ L) を C3H/He マウスの背部皮下に、Ehrlich 細胞

(1.0×10^7 cells/200 μ L) を BALB/c マウスの背部皮下にそれぞれ移植することで作製した。

3. 固形がんモデルマウスにおける in vivo 抗腫瘍効果の評価

腫瘍組織の体積が約 100 mm³ に達した時点で PppIX-DME として 0.1 mg/kg で PN-Por を投与し、投与15分後にハロゲン光源により、腫瘍組織へ3分間光の照射を行った。その後、腫瘍体積を継続的に測定した⁴⁾。

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

4. 腫瘍組織の凍結切片の作製

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 μ m の厚さに薄切して、シランコートしたスライドガラス (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。

5. 免疫組織染色によるアポトーシス細胞の検出・定量

アポトーシスを起こした細胞の検出は、Takara in situ Apoptosis Detection Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて TUNEL 染色により行った。4. に準じて作製した凍結切片を 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 抗体を blocking PBS (5% FBS) の 1/50 (v/v) 量添加し、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 抗体を blocking PBS (5% FBS) の 1/10000 (v/v) 量添加し、45分間処理した。再び洗浄した後、Permeabilisation Buffer を添加し、氷上で5分間処理した。洗浄後、反応調製液 (5 μ L TdT Enzyme 及び 45 μ L Labeling Safe Buffer) を添加して、37°C で1時間処理し、その後、精製水で洗浄した。

6. 免疫組織染色による血小板凝集の検出・定量

血小板凝集の検出は、常法に従い、CD41 抗体を用いた免疫組織染色により行った。

7. 腫瘍組織内血管の構造特性評価

4. に準じて作製した凍結切片を 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 blocking PBS (5% FBS) の 1/50 (v/v) 量添加し、45分間処理した。洗浄後、2次抗体としてFluorescein 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Life Technologies 社) を blocking PBS (5% FBS) の 1/200 (v/v) 量添加し、60分間処理した。再び洗浄した後、Cy3 標識 α SMA モノクローナル抗体 (SIGMA-ALDRICH 社) を blocking PBS (5% FBS) の 1/400 (v/v) 量添加し、60分間処理した。

結果と考察

1. モデルがん細胞の活性酸素種に対する感受性

FM3A と Ehrlich の両がん細胞に対して、様々な濃度の PN-Por を添加し、光照射後の細胞生存率を MTT アッセイにより評価したところ、両がん細胞の IC_{50} 値がほぼ同じ値を示したことから、両者の活性酸素種に対する感受性は同程度であることが明らかとなった。(図 1)

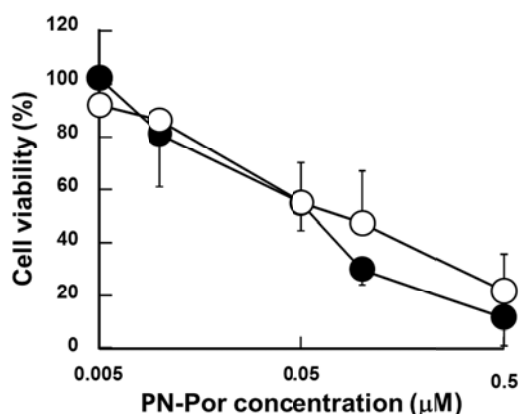


図 1 PN-Por 添加後の細胞生存率の評価
○ FM3A がん細胞、● Ehrlich がん細胞

2. 固形がんモデルマウスにおける PVT 単独処置による抗腫瘍効果

FM3A モデルマウスにおいては、PVT の単独処置により、腫瘍の増殖が有意に抑制されることが明らかとなった。その一方で、Ehrlich モデルマウスにおいては、ポルフィリン量として 0.5 mg/kg で同様の処置を施しても、PVT 単独処置による抗腫瘍効果は認められなかった。(図 2)。

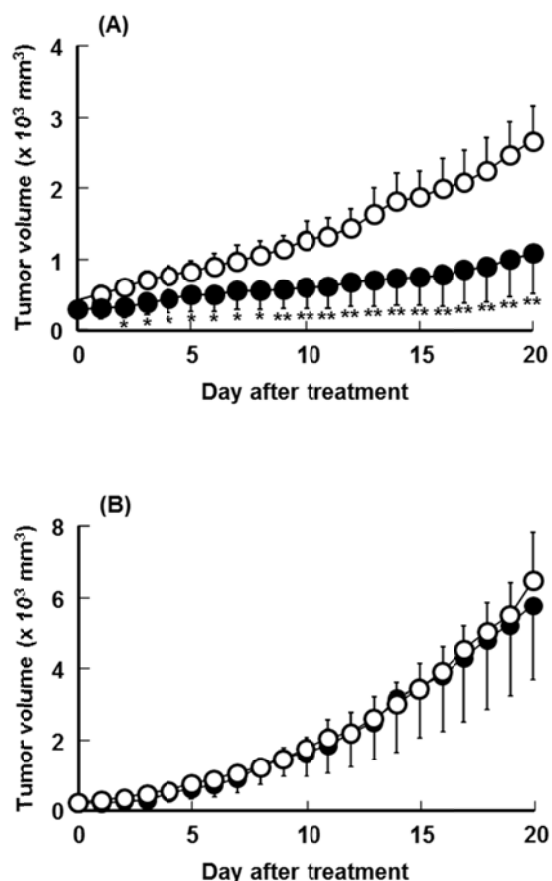


図 2 PVT 単独処置による in vivo 抗腫瘍効果の評価

(A) FM3A 固形がんモデルマウス、(B) Ehrlich 固形がんモデルマウス ○ 無処置群、● PVT 処置群、PN-Por の投与量 : 0.1 mg/kg as PppIX-DME
** $p < 0.01$ (比較対象, 無処置群)

3. PVT が両腫瘍組織に与える影響の多面的評価

FM3A モデルマウスに PVT を施し、その 1 日から 7 日後に作製した腫瘍組織切片に対して、種々の免疫化学的染色を行った。まず、TUNEL 染色によりアポトーシスを起こしている細胞を検出したところ、その数は PVT 処置後に経目的に増加することが明らかとなった。

さらに、アポトーシスを起こしている細胞中における血管内皮細胞の割合が、PVT 処置後 1 日目の方が処置後 7 日目と比べて有意に高いことから、PVT 処置直後には血管内皮細胞のアポトーシス誘導が起こりやすいことが示唆された。続いて、血小板凝集マーカー分子に対する免疫化学的染色を行ったところ、PVT 処置後 2 日目の腫瘍組織において、多くの血小板凝集部位が確認され、PVT により血栓形成が誘導されることが確認された。更に、PVT の腫瘍内血管への影響を明らかにするために、蛍光色素 DiI により標識した PEG リポソームを用いて、血流を伴う血管数の評価を試みた。即ち、投与した PEG リポソームの殆どが血液中に残存している投与後 1 時間の時点で腫瘍組織切片を作製し、血管内皮細胞に対する免疫化学的染色を行い、血管内皮細胞と DiI の分布性とを比較検討した。その結果、PVT 処置後 2 日目以降の腫瘍組織において、血流を伴う血管数が有意に減少することが明らかとなった。一方、Ehrlich 腫瘍に対しても、FM3A 腫瘍組織と同様に PVT を施した後、各種免疫化学的染色を行ったところ、FM3A 腫瘍内で認められたような有意な変化は認められなかった。

4. 両腫瘍組織中血管の構造特性評価

両固形がんモデルマウスより作製した腫瘍組織切片を用いて、血管内皮細胞及び血管壁細胞に対する蛍光二重免疫染色を行い、腫瘍内血管の構造特性について評価した。その結果、Ehrlich 腫瘍は、FM3A 腫瘍と比較して、腫瘍内の血管総面積は同程度である一方、腫瘍内の血管数は有意に少ないことが示され、Ehrlich 腫瘍内の血管径は FM3A 腫瘍内の血管よりも大きく、このことが Ehrlich モデルマウスに PVT を施しても血小板凝集が起きなかった一因と推察された。また、Ehrlich 腫瘍では壁細胞の量が FM3A 腫瘍より有意に多いことが確認され、更に壁細胞被覆を伴った血管の割合も有意に高いことが明らかとなったことから、Ehrlich 腫瘍内の血管は、FM3A 腫瘍内の血管と比較して、構造的に安定な、正常血管により近い血管構造特性を有することが示唆された。

おわりに

FM3A モデルマウスに PVT を施すことにより、腫瘍内の血管内皮細胞のアポトーシスならびに血栓形成が誘導され、腫瘍内の血流を伴った血管が減少したものと考えられた。その結果、所謂、「兵糧攻め」により血管周辺に存在していたがん細胞のアポトーシスが引き起こされることとなり、強い抗腫瘍効果に繋がったものと推察された。一方、Ehrlich 腫瘍内の血管は、血管径が大きく、構造的にも安定していることから、活性酸素種等による各種ストレスに対する抵抗性が強く、そのため Ehrlich モデルマウスにおいて PVT による抗腫瘍効果が認められなかったものと考えられた。

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) Ogawara K and Higaki K : *Chem Pharm Bull* **65** : 637-641 (2017)
- 2) Araki T, Kono Y, Ogawara K, Watanabe T, Ono T, Kimura T, Higaki K : *Biol Pharm Bull* **35** : 1306-1313 (2012)
- 3) Ogawara K, Shiraishi T, Araki T, Watanabe T, Ono T, Higaki K : *Eur J Pharm Sci* **82** : 154-160 (2016)
- 4) Yoshizawa Y, Ogawara K, Fushimi A, Abe S, Ishikawa K, Araki T, Molema G, Kimura T, Higaki K : *Mol Pharm* **9** : 3486-3494 (2012)

脂肪細胞の尿酸トランスポーターを介した非アルコール性脂肪性肝炎と心機能・血管障害の関連

岡山大学大学院保健学研究科 検査技術科学分野

渡辺 彰吾

非アルコール性脂肪性肝炎：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH)は、肥満や糖尿病などといった生活習慣病が増悪因子と考えられており、肝硬変や肝がんに移行することが大きな問題となっている。それに加えて、心血管系疾患の発症率や死亡率も2倍以上上昇することから、NASHと心血管疾患の関係は非常に密接であると考えられる。しかしながら、その仲介因子は未だ解明されていない。本研究では、高尿酸血症が引き起こす脂肪細胞の炎症とそれにもなうアディポサイトカインの放出異常に着目し、脂肪細胞に存在する尿酸トランスポーター (URAT-1)と心機能・血管障害との関連性についてNASH疾患モデルであるSHRSP5/Dmcrラットを用いて検討した。その結果、血清尿酸値の上昇、精巣上体脂肪におけるURAT-1の遺伝子発現量の増加がみられた。また、それにもなう、酸化ストレス関連遺伝子、悪玉アディポサイトカインの遺伝子発現量増加、脂肪細胞と心筋でのマクロファージの集積が確認された。以上より、NASH病態を背景に持つSHRSP5/Dmcrラットにおいて、高尿酸血症が脂肪細胞の炎症を介して、心機能・血管障害を増悪される可能性が示唆された。

【背景】

尿酸はメタボリックシンドロームや飲酒、ストレスなどによって高値になり、痛風や腎障害を引き起こすことが知られている。また、NASHにおいても同様に尿酸の増加が認められることがわかっている。しかしながらそれだけでなく、米国のNHANES I studyや日本の富田、箱田らは、高尿酸血症が独立した心機能・血管障害の危険因子となることを報告している。

さらに近年になって、脂肪細胞には、URAT-1と呼ばれる尿酸を脂肪細胞内に取り込むトランスポーターが発現することが明らかになった。このURAT-1を介して、尿酸が脂肪細胞内に取り込まれると、NADPH オキシダーゼの活性化により酸化ストレスが亢進する。これにもない、脂肪細胞から放出される生理活性物質であるアディポサイトカインの放出量が増減する。すなわち、悪玉アディポサイトカインが増加し、善玉アディポサイトカインが減少する(悪玉アディポサイトカインの増加と善玉アディポサイトカインの減少により炎症が悪化する)。また、尿酸は肝臓においてヒポキサンチンがキサンチンへと酸化される際に合成されるが、同時に活性酸素も生成される。この活性酸素が血中に放出されることで、体内の酸化LDLも増加する。これらの作用によ

り、全身で炎症が惹起され、動脈硬化や心筋炎症などの心機能・血管障害が起こりやすくなると考えられる。

本研究では、NASHの疾患モデルであるSHRSP5/Dmcrラットを用いて、NASHによる高尿酸血症と心機能・血管障害との関連性について検討した。

【方法】

1. 対象

SHR等疾患モデル共同研究会より、雄性的SHRSP5モデルラット(n=10)、WKYラット(control, n=10)を9週齢で入手した。入手時から体重、血圧、摂食量、飲水量を測定し、10週齢開始時にこれらに有意差が生じないように、通常(SP)食と高脂肪(HFC)食に切り替え、以下の4群に分けた。

- ・WKY+SP食・・・・・・・・・・CONT群(n=5)
- ・WKY+HFC食・・・・・・・・・・CONT+HFC群(n=5)
- ・SHRSP5+SP食・・・・・・・・・・SP5群(n=5)
- ・SHRSP5+HFC食・・・・・・・・・・SP5+HFC群(n=5)

2. 生理学的検討

9週齢から17週齢まで、毎週1回体重を測定し、その後摂食量と飲水量の24時間値を測定した。

18週齢に、一晚絶食後ペントバルビタール

(0.75mL/kg)の腹腔内投与による麻酔下で、右頸動脈から全採血を行った。その後、生理食塩水を用いて還流を行い、大動脈、肺、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、膵臓、脛骨および各脂肪（腸間膜脂肪、後腹膜脂肪、精巣上体脂肪、皮下脂肪）を摘出した。摘出した各臓器重量は体重で補正した。

3. 糖代謝機能

16週齢において一晩絶食後、3mL/kgの容量で経口糖負荷試験（OGTT）を実施した。グルコース水溶液投与直前、投与15分後、30分後、60分後および120分後に尾静脈から少量採血し、簡易血糖値測定器を用いて血糖値を測定した。

インスリン負荷試験（ITT）も同様に、16週齢において一晩絶食させ実施した。生理食塩水で調整したインスリン溶液を0.01mL/kgの容量で腹腔内投与し、OGTTと同様に血糖値を測定した。

4. 生化学的検討

18週齢解剖時に全採血より得られた血清を用いて、尿酸の血中濃度を測定した。

5. 精巣上体脂肪と心筋のCD68免疫染色

解剖によって得られた精巣上体脂肪と心筋を、ホルマリンで室温48時間振盪固定し、パラフィンブロックを作成した。その後、薄切（心筋：3 μ m、精巣上体脂肪：5 μ m）、脱パラフィン処理、抗原賦活化処理（95℃・20分間）、ブロッキング、一次抗体反応（室温60分間）、標識二次抗体反応（室温30分間）、発色・対比染色（室温5分間）、脱水、透徹、封入を行い観察した。

6. 遺伝子学的検討

1) RT-リアルタイムPCR法による遺伝子発現量の測定

解剖によって得られた精巣上体脂肪150mgを、回転式ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、Total mRNAを抽出した。次に、抽出したmRNAを50ng/ μ Lに統一し、cDNAに逆転写した。作成したcDNAを鋳型としてリアルタイムPCRを行い（シャトルPCR法

[2stepリアルタイムPCR法]、熱変性：95℃・5秒、アニーリングと伸長反応：60℃・30秒を50サイクル、下記の遺伝子発現量を測定した（URAT-1、MAPK [p38]、NF κ B、Cox2、PDGF、TNF α 、IL-6、MCP-1、Adiponectine）。

7. 統計

実験結果は、平均値（Mean） \pm 標準誤差（SE）で示した。有意差検定はMann-Whitney U-testを使用した。統計解析にはKruskal Wallis H-testを用い、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. 体重、摂食量、血圧の変化

全週齢においてHFCを与えた群の摂食量はSP食を与えた群に比べて有意に少なく、それにとまって、CONT+HFC群の体重減少も顕著であったが、SP5+HFC群の体重減少は小さかった。また、収縮期血圧はCONT群では有意差は認められなかったが、SP5+HFC群では有意に減少した（図1）。

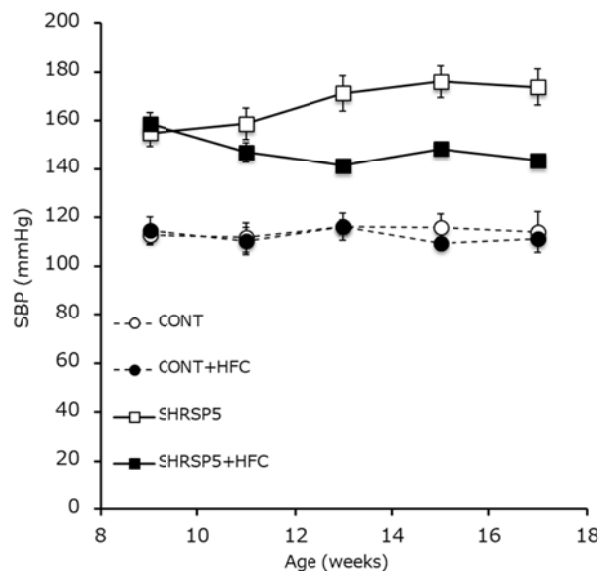


図1. 収縮期血圧

2. 各脂肪重量の変化

腸間膜脂肪、後腹膜脂肪、精巣上体脂肪、皮下脂肪の重量変化を比較したところ SP5+HFC 群で4か所全ての脂肪重量の低下が確認された。一般的に、HFC食を与えると脂肪重量は増加することが予想される。しかしながら、本実験に用いたcontrolであるWKY、

NASH 疾患モデルである SP5 ラットともに HFC 食を加えた群では脂肪重量が有意に低下した。

3. 脂肪細胞の CD68 免疫染色

脂肪細胞の横断面積は SP5+HFC 群で小型化した (図 2)。各脂肪重量が SP5+HFC 群で有意に減少した原因は、脂肪細胞の横断面積が減少したことであると考えられる。また、SP5+HFC 群では、CD68 陽性細胞 (マクロファージ) の集積が認められた (図 3)。一般的に脂肪細胞の炎症は脂肪細胞の肥大化にともなうといわれているが、脂肪細胞の横断面積が減少したにもかかわらず、脂肪細胞に炎症が惹起されていることが確認された。

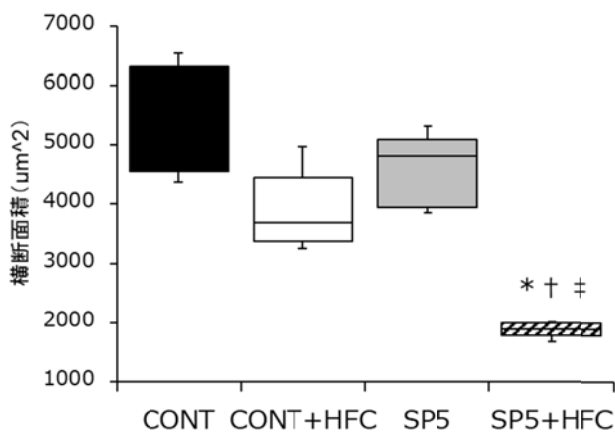


図2. 精巣上体脂肪の横断面積

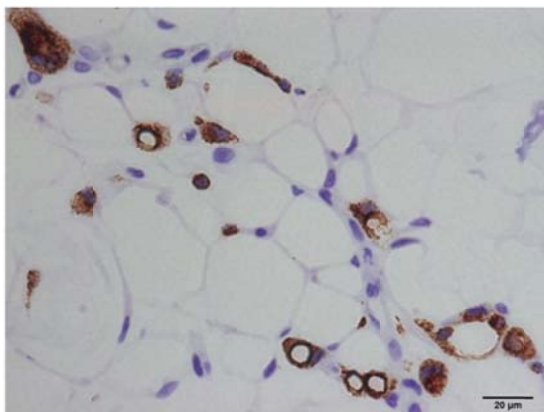


図3. 精巣上体脂肪のCD68免疫染色

4. URAT-1 を介した尿酸および酸化ストレス経路

血清尿酸値は SP5+HFC 群で有意に増加した (図 4)。また、URAT-1 の mRNA 発現量も SP5+HFC 群で有意に増加した。さらに、MAPK (p38)、NF κ B、Cox2、PDGFa、MCP-1 の mRNA 発現量は、複数の項目で増加の傾向が認められた。

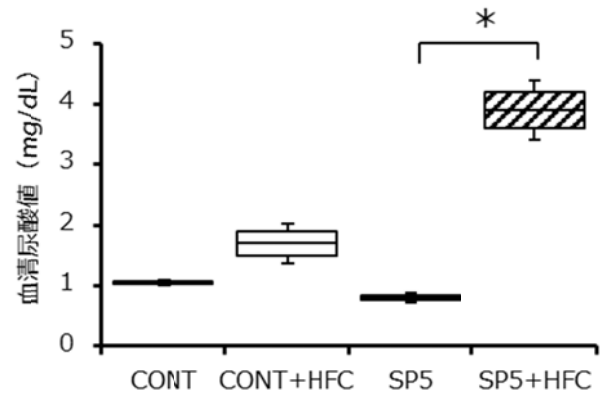


図4. 血清尿酸値

5. アディポサイトカインの遺伝子発現量

悪玉アディポサイトカイン (TNF α 、IL-6、MCP-1) の mRNA 発現量は、増加傾向を示した。しかしながら、善玉アディポサイトカインである Adiponectine の mRNA 発現量の減少は認められなかった。

6. 心筋の CD68 免疫染色

SP5+HFC 群のみで CD68 陽性細胞 (マクロファージ) の激しい集積が認められ、心筋の炎症が促進していることがわかった (図 5)。

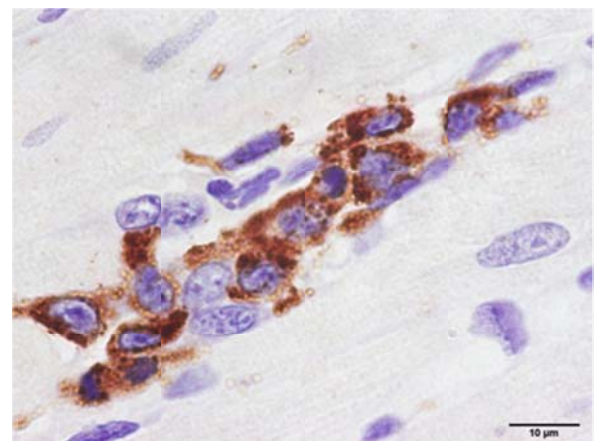


図5. 心筋のCD68免疫染色

7. 腸間膜動脈のオイルレッドO染色

単離した腸間膜動脈の Oil red O 染色を行ったところ、CONT+HFC 群では腸間膜動脈の脂肪沈着は認められなかったが、SP5+HFC 群では腸間膜動脈の脂肪沈着が認められた。

8. 糖代謝

OGTT の結果より、CONT 群に比べて SP5 群はグルコース投与による血糖値の変化に有意な違いは認められ

なかった。ITT についても CONT 群に比べて SP5 群はインスリン投与による血糖値の変化に有意な違いは認められなかった (図 6)。

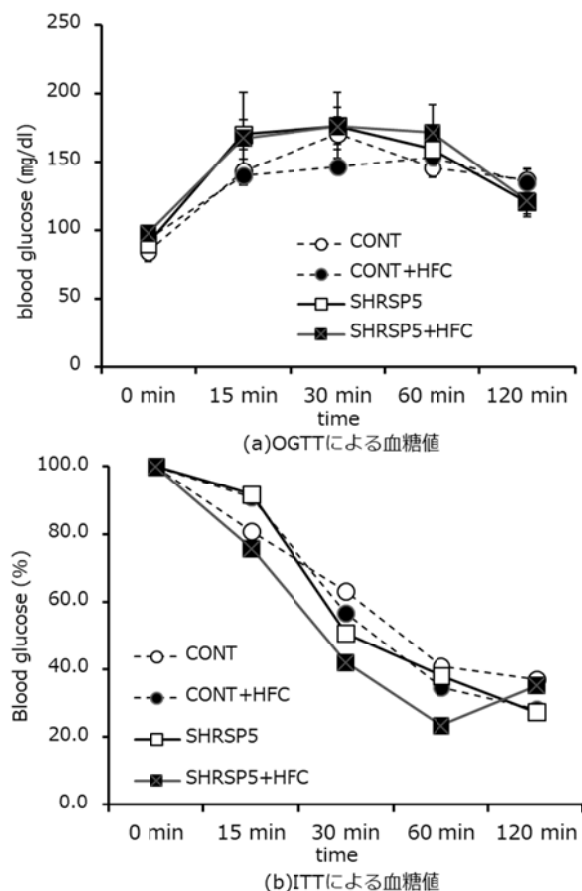


図6. 糖代謝

【考察】

本研究で我々は、NASH の動物モデルである SHRSP5/Dmcr ラットを用いて、NASH 病態によって引き起こされる高尿酸血症が脂肪細胞の URAT-1 を介して心血管系に与える影響について検討した。その結果、本疾患モデルラットが NASH により高尿酸血症を引き起こすことを確認できた。また、高尿酸血症が脂肪細胞の URAT-1 を介して酸化ストレスの上昇を引き起こし、放出される悪玉アディポサイトカイン量を増加させることを証明した。その結果として心筋炎症の促進、動脈硬化の悪化を引き起こす可能性が示唆された。また、これらの変化は SP5+HFC 群で収縮期血圧が低下しているにも関わらず惹起され、さらに OGTT、ITT といった糖代謝の結果から血圧およびインスリン抵抗性に依存しないことも明らかになった。したがって、NASH の病態を背景に持つ SHRSP5 ラットにおいても、高尿酸血症が脂肪細胞の

URAT-1 を介して心機能・血管障害を増悪させる可能性が示唆された。

【謝辞】

最後になりましたが、本研究をご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。

【参考文献】

1. K Kitamori, H Naito, H Tamada et al. Development of novel rat model for high-fat and hogh-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5 / Dmcr, Environ. Health Prev. Med., 17: 173-182, 2012.
2. K Kunimasa, C Miura, H Mori et al. High Susceptibility of Obese Hypertensive SHRSP. Z-Leprfa/IzmDmcr Rats to Lipid Deposition in the Mesenteric Artery. 37: 1102-1104, 2010.
3. William Baldwin, Steven McRae, George Marek et al. Hyperuricemia as a Mediator of the Proinflammatory Endocrine Imbalance in the Adipose Tissue in a Murine Model of the Metabolic Syndrome. Diabetes. 60: 1258-1269, 2011.

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

(概要)

これまでに、ヒトグリオーマ（神経膠腫）由来細胞株の腫瘍を安定して形成する担癌マウスモデルを作製することに成功した。このモデルマウスの腫瘍は CD44 を高発現している。本研究では、このモデルマウスを用いてリポソームによる標的を試みた。

がん治療薬のドキソルビシンを高効率でリポソーム内に封入する技術を開発できた。また、グリオーマに特異的に結合するクロトキシニンタンパク質 (CTX) にヒト IgG の Fc ドメインを結合したタンパク質 (M-CTX-Fc) をリポソーム表面に提示する方法も確立した。これらの技術を応用し M-CTX-Fc を表面に提示したドキソルビシン内封リポソーム (M-CTX-Fc-L-Dox) を作製した。M-CTX-Fc-L-Dox をヒトグリオーマ由来 U251MG-P1 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り、副作用を低減しながら CD44 タンパク質高発現細胞を特異的に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。

クロトキシニンタンパク質はサソリ毒に含まれる 36 アミノ酸からなるペプチドであり、正常細胞には結合することなく、ヒトグリオーマ細胞に特異的に結合することが報告されている。当研究グループは CD44 タンパク質を高発現しているグリオーマ細胞の U251MG-P1 細胞にクロトキシニンタンパク質が結合し、遊走能や浸潤能、増殖能を阻害すること、M-CTX-Fc は市販のクロトキシニンタンパク質よりもこれらの効果が高く、安定していることを見出したため、リポソーム表面に提示した M-CTX-Fc-L-Dox を作製して、U251MG-P1 細胞を標的する試験を行った。

結果と考察

1. M-CTX-Fc-L-Dox の作製と評価。

ヒスチジンタグ、CTX、ヒト IgG ドメイン (hinge なし) を融合した M-CTX-Fc タンパク質を大腸菌で

発現するプラスミドを構築して、大腸菌でこのタンパク質を作製して精製し、タンパク質のリフォールディングを行った。この M-CTX-Fc を図 1 の様にドキソルビシンを内封するリポソーム表面上に提示した。

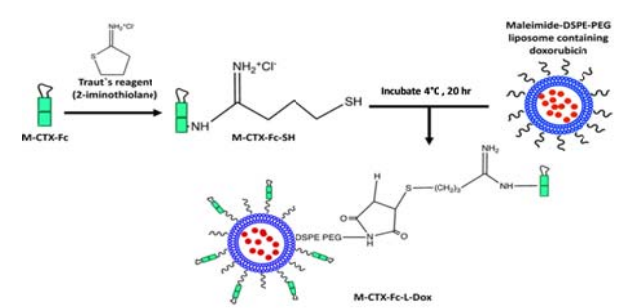


図 1. M-CTX-Fc をドキソルビシン内封リポソーム表面に提示するイメージ図。

この M-CTX-Fc-L-Dox、および対照としてヒト IgG を表面提示した hIgG-L-Dox とドキソルビシンを内封したリポソーム L-Dox を作製してその評価を行った（表 1）。

表 1. ドキソルビシンを内封したリポソーム

Formulation	Diameter (nm)	Polydispersity Index	Zeta Potential (mV)	Encapsulation Efficiency (%)	Loading Efficiency (%)
L-Dox	133.4±12.7	0.09±0.03	8.13±2.32	97.5±3.1	3.4±0.1
M-CTX-Fc-L-Dox	148.3±3.0	0.05±0.03	7.86±1.19	98.2±1.3	4.5±0.4
hIgG-L-Dox	151.3±4.3	0.07±0.02	6.66±3.78	94.4±7.2	4.1±0.4

いずれも直径が約 150 nm であり、ドキソルビシンの内封率や担持率、分散性も DDS 試験に適していることが分かった。

2. U251MG-P1 細胞へのリポソームの取り込み評価

M-CTX-Fc-L-Dox および L-Dox を U251MG-P1 細胞に暴露して、37℃、5% CO₂ の条件で 1 時間静置した後、核を染色し、蛍光顕微鏡下で観察を行った（図 2）。L-Dox では細胞内のドキソルビシンは殆ど観察されなかったが、M-CTX-Fc-L-Dox では細胞内および核にドキソルビシン由来の蛍光が観察された。

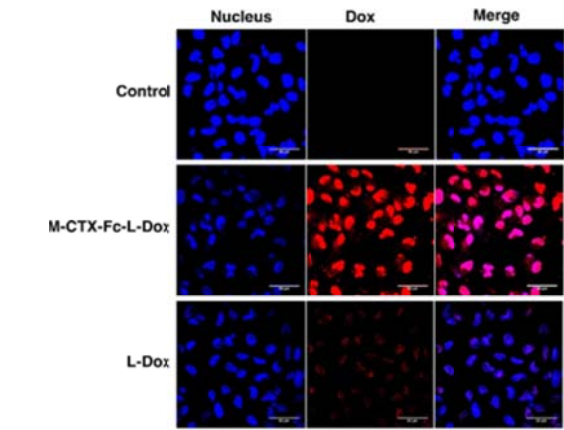


図 2. ドキソルビシンの細胞内取り込みの評価
上段：核染色のみ（対照区）、中段：M-CTX-Fc-L-Dox、下段：L-Dox。左：核の観察、中央：ドキソルビシン由来の蛍光観察、右：

3. M-CTX-Fc-L-Dox の細胞障害性

遊離のドキソルビシン（Dox、リン酸緩衝液（PBS）溶液）、および L-Dox、M-CTX-Fc-L-Dox、hIgG-L-Dox をそれぞれ、U251MG-P1 細胞に暴露して、72 時間後に MTT assay を行うことによって、細胞障害性を評価した。M-CTX-Fc-L-Dox の効果が最も高く、遊離のドキソルビシンと同等の障害性を示した。一方、短時間暴露した後、細胞表面の洗浄を行って特異性を評価したところ、M-CTX-Fc-L-Dox が最も効率良く U251MG-P1 細胞を障害することが明らかとなった。

これらの結果を基に、Balb/c-nu/nu マウスに U251MG-P1 細胞を移植した担癌マウスを作製して、腫瘍体積が 100 mm³ に達した時点で、ドキソルビシン量に換算して 10 mg/kg の Dox、および L-Dox、M-CTX-Fc-L-Dox、hIgG-L-Dox、PBS をそれぞれ尾静脈から血中投与した。さらに、投与試験開始から 7 日後と 14 日後にも同量をそれぞれ投与し、合計 3 回の血中投与を行った。体重と腫瘍体積を経時的に測定し（図 3、4）、1 回目の投与から 20 日後に腫瘍を摘出して、その体積を比較した（図 4）。

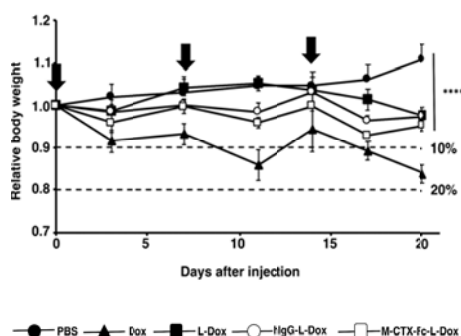
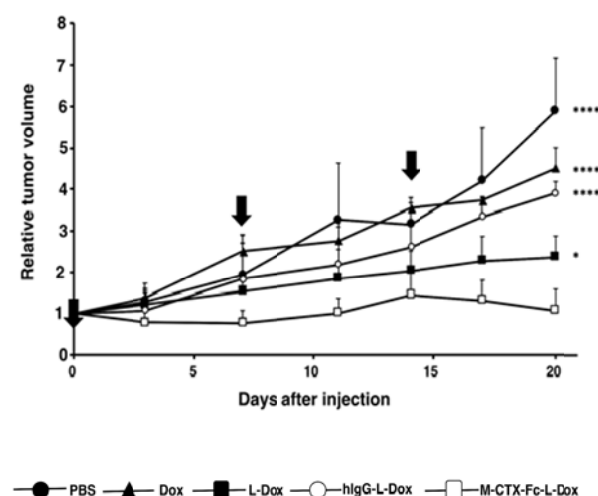


図 3. マウスの体重変化

Dox 投与群ではマウスの体重減少が著しく、20% 近く減少している (図 3. ▲) 一方 M-CTX-Fc-L-DOX では体重の減少は 10%以下に抑えられ (図 3. □)、リポソームを用いることで、副作用を有意に抑えることが出来ると考えられた。

A



B

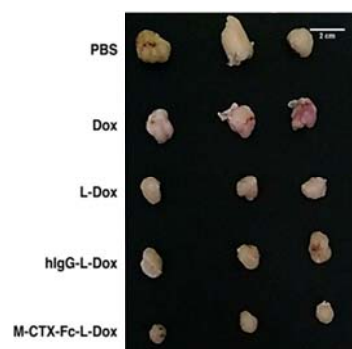


図 4. 腫瘍体積の変化

マウスを用いた試験では全試験期間を通して、M-CTX-Fc-L-DOX 投与による腫瘍の治療効果が最も高く (図 4.A,□)、投与開始時と比較して腫瘍体積は殆ど変化が認められなかった。摘出した腫瘍からも投与群における効果の差は顕著であった (図 4. B)。

なお、動物実験は岡山大学動物実験委員会の審査と承認を受けて (承認番号: OKU-2016078) 行った。

3. まとめ

ドキシソルビシンを内封した immuno-liposome の作製に成功し、U251MG-P1 細胞を用いた *in vitro*, *in vivo* での試験によって、副作用を低減しながら CD44 高発現細胞を特異的に標的することが可能であることが分かった。これまでに CD44 と反応する抗体の作製法も確立しているため、グリオブラストーマのみならず、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が可能になった。

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

Mahmud H, Kasai T, et al.

“Targeting Glioblastoma Cells Expressing CD44 with Liposomes Encapsulating Doxorubicin and Displaying Chlorotoxin-IgG Fc Fusion Protein”. *Inter. J. Mol. Sci.* 19(3), 659 (2018).

参考文献

Vaidyanath A, Kasai T, et al. “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

Shigehiro T, Kasai T, et al. 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.

時空間制御可能な神経分化制御法の開発

岡山大学大学院自然科学研究科

渡邊 和則

再生医療において臓器や器官を効率良く作成するには、効率良く細胞分化を誘導する必要がある。現在、この課題を解決するために、マイクロ RNA (miRNA) を用いた細胞分化の誘導が試みられている。しかし、miRNA による細胞分化誘導効率が低く、miRNA の細胞内導入に用いられるウイルスベクターやリポフェクション試薬には安全性や細胞毒性などの問題を抱えている。そこでこれらの問題を克服するために、我々が開発した光誘導 RNA 導入法 (PCDR 法) に着目した。PCDR 法は低毒性で、複数回 miRNA を細胞内に導入することができる。そこで本研究では、PCDR 法で複数回また、複数の miRNA を細胞内に導入することで神経分化誘導効率の改善を試みた。

まず神経分化誘導時間依存的に発現上昇する miRNA の同定及び、miR-664a-5p が神経分化に関与することを明らかにした。次に、miRNA の前駆体である pre-miRNA を PCDR 法で細胞内に二回導入することで低効率だが神経分化が誘導されたことを明らかにした。さらに、PCDR 法で複数の miRNA を特定の順番で細胞内に導入することで神経分化誘導効率が改善することが示唆された。

【はじめに】

再生医療において、臓器や器官を効率良く作成することが求められている。臓器などを効率良く作成するには空間的に細胞分化を制御し、効率良く細胞分化を誘導する必要がある。現在、薬剤処理による細胞分化の誘導が主流であるが、薬剤自身および薬剤代謝産物が毒性を示す可能性があるため、新規化合物の探索や異なったアプローチ、例えば低分子 RNA を用いた細胞分化の誘導が試みられている。

細胞分化を制御する低分子 RNA としてマイクロ RNA (miRNA) が報告されている。miRNA は細胞分化時に発現変動することで、miRNA の標的 mRNA の発現量を制御することで細胞分化を制御していることが報告されている。例えば、神経分化時に miR-10a が発現上昇することで SFRS1 タンパク質の発現を減少させることで神経分化が誘導されている⁽¹⁾。また、細胞分化時に発現上昇する miRNA を細胞内に導入することで細胞分化を誘導できることも報告されている。細胞分化時に発現している miRNA を用いた細胞分化の誘導は、薬剤よりも副作用の少ない分化誘導法だと考えられており、miRNA は細胞分化誘導試薬として注目されている。

miRNA を用いた細胞分化誘導は利点がある一方で、問題点も抱えている。miRNA を細胞内に輸送するための方法として、ウイルスベクターや RNA 導入試薬が用いられるが、これらの方法は安全性や細胞毒性などの問題点を抱えている。また、単一の miRNA を用いることが多いため、細胞分化誘導効率が低い問題点も抱えている。

我々は新たな細胞内 RNA 導入法として、光誘導 RNA 導入法 (PCDR 法) を開発している^(2,3)。PCDR 法は、光照射した細胞のみに RNA を輸送できる。また PCDR 法はタンパク質が RNA キャリアとして働くことから、安全性も高く RNA 導入試薬であるリポフェクション試薬よりも低毒性である。そのため、PCDR 法は連続的に複数の RNA を細胞内に導入することができる。

PCDR 法のもう 1 つの利点としてコストが挙げられる。22 塩基ほどの miRNA は化学合成によって得られることが多いため、miRNA は高価な試薬の 1 つである。PCDR 法は miRNA の前駆体である pre-miRNA を用いることができる。Pre-miRNA は 65 ~ 90 塩基ほどあることから、酵素反応で調製することができるため、比較的安価で大量に取得すること

ができる。

本研究では、miRNA による神経分化効率を上昇させるために、PCDR 法を用いて神経分化に関与する pre-miRNA を複数回導入することで、効率良く神経分化が誘導できるのか検討した。また、複数の pre-miRNA を細胞内に導入することで、効率良く神経分化が誘導できるのかも検討した。

【結果と考察】

1. 神経分化誘導時間に依存して発現変動する miRNA の同定

我々はまず、神経分化誘導時間依存的に発現変動する miRNA を同定するために、ヒト神経芽腫細胞である SH-SY5Y を神経分化誘導試薬であるレチノイン酸処理後、マイクロアレイと定量 PCR を用いて神経分化誘導時の miRNA の発現解析を行った。そ

の結果、分化誘導後 2 日目と 14 日目で発現量が増加し続ける miRNA (グループ 1)、分化誘導 2 日目に発現量が上昇し、14 日目も 2 日目と同程度発現している miRNA (グループ 2)、分化誘導 2 日目では発現量が変化しないが 14 日目に発現量が増加する miRNA (グループ 3) を同定した⁽⁴⁾ (図 1A, B)。

2. miR-664a-5p が神経分化を誘導する

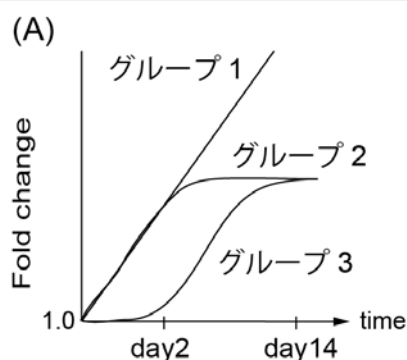
グループ 2 に属する miR-664a-5p、グループ 2 に属する miRNA はこれまでに神経分化に関与することが報告されていない。そこで、miR-664a-5p が神経分化に関与しているのか明らかにするために、miR-664a-5p mimic をリポフェクション試薬を用いて細胞に導入することで神経分化が誘導されるか解析を行った。その結果、miR-664a-5p を細胞に導入することで神経分化を誘導することができた。このことから、miR-664a-5p が神経分化に関与していることが明らかになった⁽⁴⁾。

3. PCDR 法による単一の pre-miRNA 輸送による神経分化誘導

miRNA による神経分化誘導効率は低い。この問題を改善するためには、miRNA を複数回細胞に輸送することで改善するのではないかと考えた。そこで、RNA を複数回輸送することができる PCDR 法に着目した。PCDR 法はヘアピン構造を有する RNA を細胞内に輸送することができるが、ヘアピン構造を有さない miRNA を細胞内に輸送することはできない。そこで我々は miRNA の前駆体である pre-miRNA を用いることにした。pre-miRNA はヘアピン構造を有しており、酵素反応で調製することができるという利点がある。

次に PCDR 法で輸送する miRNA を検討した。これまでに神経分化を誘導することが報告されている miR-9-3p、miR-124-3p、miR-125-3p、miR-132-3p、申請者らが発見した miR-664a-5p に注目した。miR-124-3p、miR-132-3p、miR-664a-5 はグループ 2 に属していることから、神経分化を短時間に誘導できると考えたからである。

まず、miR-9-3p、miR-124-3p、miR-125-3p、



(B)

グループ 1	miR-135a-3p
	miR-212-5p
グループ 2	miR-124-3p
	miR-132-3p
	miR-210-3p
	miR-212-3p
	miR-664a-5p
グループ 3	miR-3178
	miR-3185
	miR-3195
	miR-4634
	miR-4734
	miR-4741
	miR-6068
	miR-8069

図 1 神経分化時に時間依存的に発現上昇する miRNA

(A) 時間依存的に発現する miRNA のグループ

(B) 各グループに属する miRNA



図2 試験管内転写で調製したpre-miRNA

miR-132-3p、miR-664a-5p の前駆体を試験管内転写で調製した(図2)。その後、PCDR 法で pre-miRNA を二回ずつ細胞内に輸送後、神経分化マーカーである MAP II を用いて免疫染色を行い、神経分化誘導効率を検討した。その結果、神経分化誘導効率は低いが、pre-miR-9、pre-miR-124、pre-miR-125、pre-miR-132 で神経分化が誘導された。

驚いたことに pre-miR-664a を細胞に輸送することで細胞死が誘導されていた。そのため助成課題と少し離れてしまうが、現在 pre-miR-664a がどのようにして細胞死を誘導しているのか解析を進めている。

4. 複数の pre-miRNA を用いた神経分化誘導

様々な順番で pre-miRNA を導入することで pre-miR-9、pre-miR-124、pre-miR-125、pre-miR-132 による神経分化の誘導効率を改善できるのではないかと考えた。そこで、図3の pre-miRNA の組み合わせで神経分化が効率良く誘導されるのか検討を行った。その結果、幾つかの組み合わせにおいて神経分化誘導効率が改善した。このことから、複数の miRNA を特定の順番で細胞内に導入することで神経分化誘導効率が改善することが示唆された。

【まとめ】

神経分化時間に依存した miRNA の同定と、神経分化を誘導する新規の miRNA として miR-664a-5p を同定することができた。また、PCDR 法を用いて複数の pre-miRNA を細胞内に導入することで、特定の組み合わせの時に神経分化誘導効率が改善された。また、驚いたことに pre-miR-664a が細胞死を誘導することも明らかになった。



1st miRNA	2nd miRNA
pre-miR-9	pre-miR-9 pre-miR-124 pre-miR-125 pre-miR-132
pre-miR-124	pre-miR-9 pre-miR-124 pre-miR-125 pre-miR-132
pre-miR-125	pre-miR-9 pre-miR-124 pre-miR-125 pre-miR-132
pre-miR-132	pre-miR-9 pre-miR-124 pre-miR-125 pre-miR-132

図3 本実験で行った pre-miRNA の組み合わせ

今後は、PCDR 法で輸送する pre-miRNA の種類と回数を増やすことで神経分化誘導効率が改善するか試みる予定である。また、PCDR 法は光照射した細胞にのみ RNA を輸送することができる。そこで PCDR 法と pre-miRNA を用いて空間的に神経分化の誘導を制御する予定である。

【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。

【研究成果発表】

渡邊和則、山路隆平、大槻高史、“マイクロ RNA-664a-5p は SH-SY5Y の神経分化を誘導する” 日本分子生物学会、(2016)

渡邊和則、山路隆平、大槻高史、“MiR-664a-5p は神経分化誘導に重要である” 日本 RNA 学会、(2017)

縄稚朋子、渡邊和則、大槻高史、“Pre-miR-664a を用いた光依存的な細胞死の誘導” 日本分子生物学会、(2017)

【参考・引用文献】

(1) Meseguer, S., Mudduluru, G., Escamilla, J.M.,

Allgayer, H. & Baretino, D. (2011) MicroRNAs-10a and -10b contribute to retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells and target the alternative splicing regulatory factor SFRS1 (SF2/ASF). *J Biol Chem* 286, 4150-4164.

(2) Endoh, T., Sisido, M., Ohtsuki, T. (2008) Cellular siRNA delivery mediated by a cell-permeant RNA-binding protein and photoinduced RNA interference. *Bioconjug Chem* 19, 1017-1024.

(3) Matsushita-Ishiodori, Y., Morinaga, M., Watanabe, K., Ohtsuki, T. (2013) Near-infrared light-directed RNAi using a photosensitive carrier molecule. *Bioconjug Chem* 24, 1669-1673.

(4) Watanabe K, Yamaji R, Ohtsuki T. (2018) MicroRNA-664a-5p promotes neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *Genes Cells* 23, 225-233.

キラルナフトキノンの合成と光学特性スイッチング

岡山大学大学院自然科学研究科

高石 和人

近年、円偏光発光性 (CPL) が注目され、国内外で有機 CPL 色素の開発研究が活発である。その多くはヘリセン類、シクロファン類、螺旋ポリマーであり、既存の発光色素を CPL 色素に変える手法は限られていた。本研究ではキラルナフタレン四量体を用いて、発光団としてよく知られているピレンに CPL を付与することを目指した。キラル軸が連続する (*R,R,R*)-ナフタレン四量体にピレン環をエステル結合を介して八つ導入したところ、ピレン由来の非常に強いエキシマー CPL が観測された。理論計算により、この強い CPL は隣接するカルボニル基同士およびピレン環同士の立体反発によって生じる、キラルなエキシマー形成に因ることが明らかになった。

【1. はじめに】

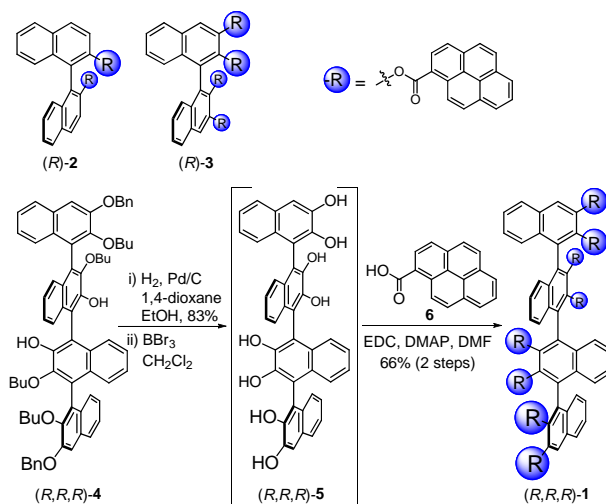
近年、キラル光学特性の一種である円偏光発光性 (CPL) が注目されており、有機 CPL 色素の開発研究が盛んである。ヘリセン類、シクロファン類、螺旋ポリマーを中心に研究が展開されている。

一方で我々はキラル軸が連続するナフタレン多量体の研究を進めている。本骨格をキラルな足場として捉え、より汎用性に優れた CPL 色素の開発を目指した。各ナフタレン環には置換基の導入が可能であり、置換基を発光団とすると発色団はキラルな環境に置かれる。それに伴い発光団由来の CPL が観測できるのではないかと考えた。発光団として、よく研究されているピレンを選択し、以下の研究を行った。

【2. ピレン多置換ナフタレン四量体の合成】

(*R,R,R*)-ナフタレン四量体に八つのピレン環がエステル結合により連結した (*R,R,R*)-**1** と、対照化合物としてビナフチル (*R*)-**2** と (*R*)-**3** を設計した。(*R,R,R*)-**1** は以下のように合成した (Scheme 1)。ビナフチル化合物から誘導した (*R,R,R*)-**4** を脱ベンジル化と脱ブチル化してオクタヒドロキシ体 (*R,R,R*)-**5** を調製した後、1-ピレンカルボン酸 (**6**) と縮合させることで収率良く (*R,R,R*)-**1** が得られた。(*R*)-**2** と (*R*)-**3** も対応するヒドロキシ体から合成した。

Scheme 1. Synthesis of (*R,R,R*)-**1**.



【3. ピレン多置換ナフタレン四量体の光学特性】

Figure 1 に吸収と円偏光二色性 (CD) スペクトルを示す。**1-3** の吸収スペクトルの形状はほぼ同一であり、ナフタレンと 1-オキシカルボニルピレン類のスペクトルの足し合わせとなっていた。これは少なくとも基底状態ではナフタレン環とピレン環は独立しており、また、ピレン環は単量体として存在していること示している。CD スペクトルではピレン環由来の吸収波長 (320–430 nm) 領域で正の分裂型のシグナルが観測された。これはピレン環が時計回りの関係に位置していることを示している。

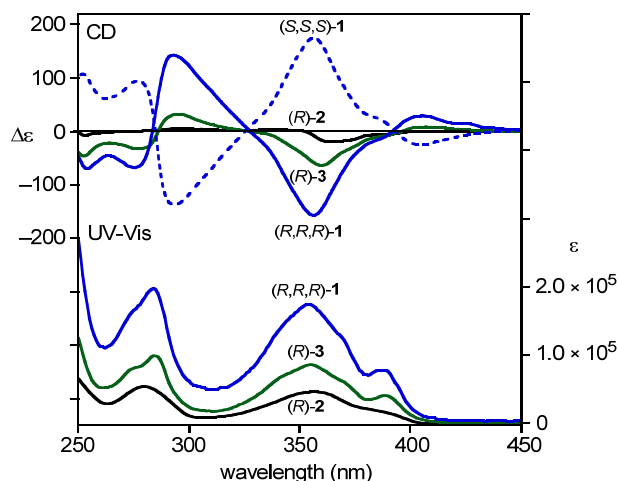


Figure 1. UV-Vis and CD spectra of **1-3** in CH_2Cl_2 .

続いて蛍光と CPL スペクトルを測定した (Figure 2). また、**1** の発光の様子を Figure 3 に示す。(*R,R,R*)-**1** ($\Phi_{\text{FL}} = 0.25$) と (*R*)-**3** ($\Phi_{\text{FL}} = 0.24$) では主にピレンのエキシマー発光が、(*R*)-**2** ($\Phi_{\text{FL}} = 0.79$) では主にモノマー発光が観測された。このことから、同じナフタレン環に結合したピレン環同士が効率良くエキシマーを形成し、軸を隔てたピレン環はエキシマーを形成しにくいことが明らかとなった。CPL スペクトルでは、(*R*)-**2** は有意なシグナルを示さなかったが、(*R,R,R*)-**1** ($g_{\text{lum}} = +0.034$) と (*R*)-**3** ($g_{\text{lum}} = +0.013$) が強い正のシグナルを示した。異方性因子 g_{lum} は、CPL の効率の指標となる値で、左円偏光発光強度 I_L と右円偏光発光強度 I_R を用いて、

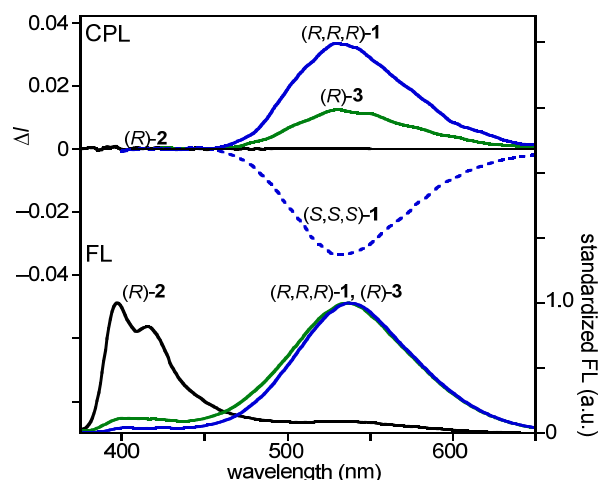


Figure 2. FL and CPL spectra of **1-3** in CH_2Cl_2 ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\Delta I = I_L - I_R$).

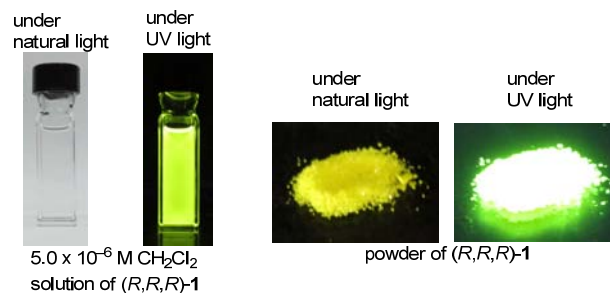


Figure 3. FL of **1** in CH_2Cl_2 ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$).

$2(I_L - I_R)/(I_L + I_R)$ で表される。これらの g_{lum} はピレン誘導体としても、有機化合物としても最高水準である。(*R,R,R*)-**1** は固体でも消光せず、ある程度の g_{lum} を保持していた ($\Phi_{\text{FL}} = 0.28$, $g_{\text{lum}} = +5.3 \times 10^{-3}$) (Figure 4, (*R*)-**2** の CPL スペクトルはノイズが大きいため示していない)。

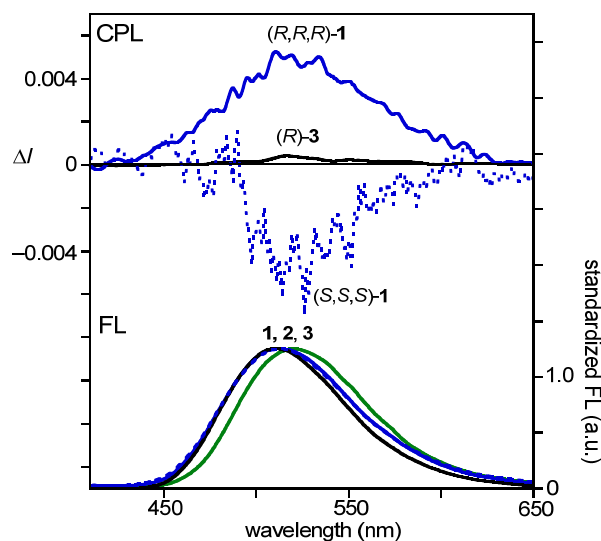


Figure 4. FL and CPL spectra of **1-3** in the solid state ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\Delta I = I_L - I_R$).

【4. 理論計算による CPL 発現機構の解明】

次に (*R,R,R*)-**1** の CPL 発現機構を予想した。理論計算により得た最安定構造では、同一のナフタレン環に結合しているピレン環は時計周りに位置し、上述の CD スペクトルの結果と矛盾が無かった (Figure 5)。これには以下の 2 つの要因が考えられた。
(1) 隣り合うカルボニル酸素は互いに反発し反対を

向く。(2) 軸を隔てたピレン環同士 (R^2 と R^3, R^4 と R^5, R^6 と R^7) は立体反発によって離れて位置する。このように複数のカルボニル酸素とピレン環の存在によって強固な立体配座を構築しているようであった。これは主に高分子研究で議論される *sergeant-and-soldiers* 効果に因るものと考えている。誌面の都合上、詳細は省くが、カルボニル基の向きやピレン環の向きを一部または全部反転させた立体配座を約 20 個計算したが、それらの不安定さは顕著であった。また、カルボニル基の必要性を調査するため、エーテル結合 ($-\text{CH}_2\text{O}-$) でピレン環が連結した疑似体を合成したが、やはり CPL は発現しなかった。 (R,R,R) -**1** の安定構造から抜き出したジピレニル体 **7** の励起状態の構造を予測したところ、およそ基底状態の構造を維持し、ピレン環が時計回りに位置するエキシマーが得られた (Figure 6)。つまり (R,R,R) -**1** の強い CPL は、複数のカルボニル基とピレン環が連続することによって生じる、キラルなエキシマー形成に因るものであると結論付けた。

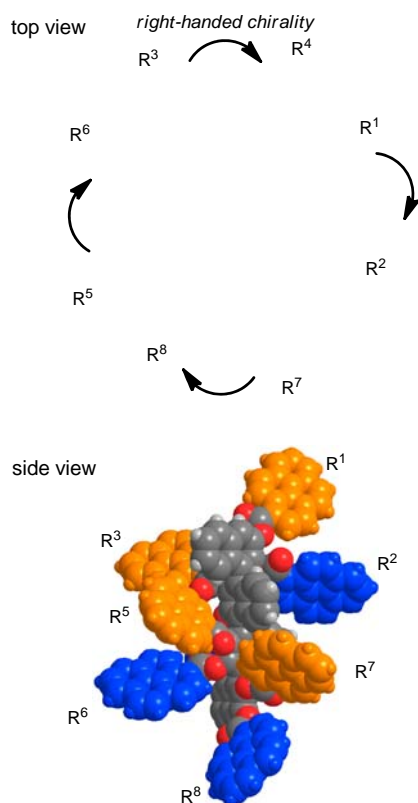


Figure 5. DFT-optimized structure of (R,R,R) -**1** (CAM-B3LYP/6-31G(d,p)).

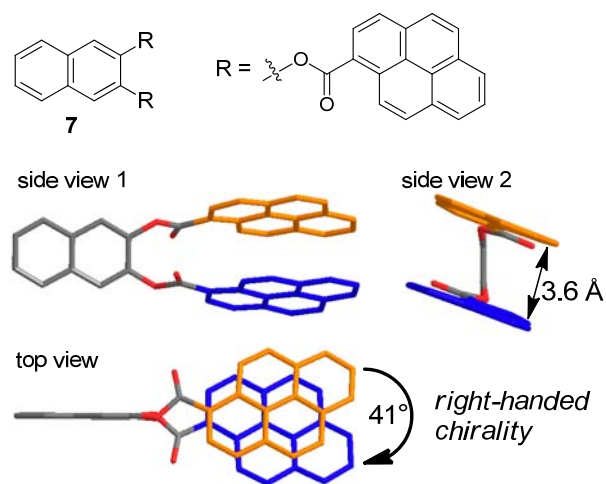


Figure 6. TD DFT-optimized structure of **7** (CAM-B3LYP/6-31G(d,p)).

【5. まとめ】

キラルナフタレン四量体に八つのピレンユニットを導入した。本化合物は溶液および固体状態において、ピレンのエキシマーに由来する強い CPL を示した。この強い CPL は隣接するカルボニル基同士およびピレン環同士の立体反発によって生じる、キラルなエキシマー形成に因るものであることが明らかになった。今回、発光色素を CPL 色素に変える手法を開発した。本法に適用するキラル骨格はビナフチルでは不十分であり、ナフタレン四量体であるからこそ成し得た結果である。

【謝辞】

本研究の遂行に対して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申し上げます。

【本助成による発表論文】

“Intense Excimer CPL of Pyrenes Linked to a Quaternaphthyl”

Kazuto Takaishi, Ryosuke Takehana, Tadashi Ema.

Chem. Commun. **2018**, 54, 1449–1452.

Simple Alignment Sentence Classification for Aspect-Based Sentiment Analysis

(所 属) 岡山大学 自然科学研究科

(氏 名) 新妻 弘崇

(概要) 文書には書き手の様々な感情が含まれており、それらの極性を特定するのが文書分析のタスクの一つである。一般に、これは文書中に含まれる観点を予測し、それに対する感情の極性を予測するというタスクであり、Aspect-Based Sentiment Analysis と呼ばれる。本研究では Aspect-Based Sentiment Analysisを行う単純な neural networkを提案する。このneural networkは実質、調節すべきパラメータが1つしかない単純なものであるにもかかわらず、近年提案されたrecurrent neural networkの複雑な手法よりも高い性能を発揮する。

文章の感情情報の推定は、多数の応用が存在する重要なタスクである [1, 2]。このタスクは一般的には sentiment analysis[3] または opinion mining[4] と呼ばれている。sentiment analysis[1, 2] とは具体的には、与えられた文章を入力として、その文書の感情として positive/negative のどちらかを推定するタスクである。しかし、sentiment analysis は単純に文章の positive/negative のみを推定する単純なタスクであるため、多くの情報が抜け落ちている。一般的に文章には様々な観点において positive/negative の感情が混在している。Aspect-based sentiment analysis (ABSA)[4] は、この様々な観点に対する感情の推定をするタスクである。例として次のレストランのレビューを考えてみよう。

“Food is good, but attitude of clerk is rude.”

このレビューは “food” については positive の感情を持っている。しかし “attitude of clerk” については negative の感情がある。ABSA とはつまり、このような文章が与えられた時に、“food” の aspect (観点) について positive であり、“attitude of clerk” については negative である、という複数の感情を推定するタスクである。

本研究では、ABSA を行なう neural network のモデルを提案する。また提案したモデルを SemEval 2016 Task 5 Subtask 1 (SE16T5S1)¹ の ABSA の

ベンチマークを使って評価し、他の手法と比較する。SE16T5S1 のベンチマークは次の2つのサブタスクから構成される。1つめは aspect の抽出である。2つ

めは、抽出した aspect に対する positive/negative の感情の推定である。この 2 つめのタスクは sentiment identification と呼ばれる。1 つめの aspect の抽出に対して、我々はそれまでのベストな手法 [5, 6, 7, 8, 9, 10] を上まわる recurrent neural network (RNN) に基づく手法 [11] を提案した。その従来のベストだった手法は、特徴エンジニアリングを多用する対象のベンチマークに特化した性質を利用している可能性のある、汎用性の点で劣る手法であった。我々の RNN に基づく手法 [11] は特徴エンジニアリングをほぼ利用しない汎用的な neural network で従来の手法を SE16T5S1 の aspect 抽出についてのベンチマークで上まわった。我々の RNN モデルは Collobert

らの neural network [12] と類似したものであった。Collobert らの neural network は文の断片をスライディングウィンドでスキャンして、そのスキャンした文の断片を n-gram の集合として neural network に入力するというものであった。

SE16T5S1 のベンチマークにおける 2 つめのタスクである sentiment identification に対しては、多くの neural network を使った比較的汎用的なアプローチが行われてきた [13, 14, 15, 16]。このタスクについては sequential convolutional neural networks (CNNs) [12, 17] と呼ばれる仕組みがうまく

働くことが報告されている。特に [14, 13, 18] は、ABSA のベンチマークで非常に良い結果を達成している。一般的に自然言語処理のタスクでは neural-attention と呼ばれる仕組みを使うと精度を向上する傾向がある。RNN と neural-attention の両方を使っ

¹<http://alt.qcri.org/semeval2016/task5/>

てABSAを行なった研究としては[16]がある。しかし、この研究はSE16T5S1のベンチマークで良い結果を出すことはできていない。

我々は、CNNとRNNを適切に組合せた recurrent convolutional network (RCNN) によるABSAの推定方法[11]を提案した。このRCNNはCollobertらのRNN[12]にCNNを組み合わせたものである。RCNNはABSA以外にも多くのタスクで良い結果をあげている: 文字ベースの文書分類[19], 画像分類[20], 動画の感情推定[21]などで高い性能を発揮している。しかし、RCNNには調節しなければならないパラメータが非常に沢山あるという問題が存在している。

本研究では、調節しなければならないパラメータが実質1つしかない単純な neural network を提案し、これが従来のRNNやCNNよりも高い精度を達成できることを示す。これは、パラメータ調節の手間がかかる分について減点を導入するならば従来の様々な手法を上回る手法であると言える。

1 タスクの設定

1.1 データセット

SE16T5S1は様々な言語で書かれたレビューのデータセットである。データセットのレビューには、aspectを表わす単語とその極性のデータが付加されている。この付加されたデータはレビューアの意見の要約と考えることもできる。本研究は英語のレストラン

ンのレビューのデータのみに注目して実験を行なう。この英語のレストランのレビューのデータは、学習用に2,000のレビュー、テスト用に676のレビューから構成されている。それぞれのレビューには前述の付加データが与えられている。以下に例を示す。以

下の英文はレストランレビューデータの1つである。

“The wine list is interesting and has many good values.”

このレビューには以下のXML形式の付加データが与えられている。

```
<Opinions>
  <Opinion target="wine_list"
    category="DRINKS#STYLE_OPTIONS"
    polarity="positive" />
  <Opinion target="wine_list"
    category="DRINKS#PRICES"
    polarity="positive" />
</Opinions>
```

ここで<Opinions>は意見の集合を表している。1つのレビューが複数の意見を含む場合があるため、意見は複数の場合も推定しなければならないタスクとなっている。そのため<Opinions>タグは意見の集合を表すことになっている。一方<Opinion>は単独の意見を表している。<Opinion>は対応する文中の単語

target, そのaspectが含まれるカテゴリ category, そのaspectについての感情極性 polarity の情報を持つ。対応する文中の単語が存在しない場合にはtargetは“NULL”となる。polarityはpositive, negative, neutralのどれかとなる。また一つの単語に複数の意見が含まれる場合もあるため、この例の場合のようにtargetに同じ単語が複数表われる場合もある。targetが“NULL”の場合はimplicit aspects, そうでない場合はexplicit aspect[18,10]とも呼ばれる場合がある。

1.2 Sentiment Polarity Identification Task

本研究ではSentiment Polarity Identification Taskに我々の提案する neural network を適用して評価する。このタスクはSE16T5S1のslot3とも呼ばれる

タスクである。slot3はaspectと、そのカテゴリが既に検出されている場合に、最後の感情極性を推定するタスクである。

2 Simple Alignment Sentence Classification

Sentiment Polarity Identification Task 即ちTask3の問題を推定するために、我々は図1に示す単純な neural network を提案する。この neural network

を以下では simple alignment sentence classification(SASC) と呼ぶこととする。

SASC のモデルの詳細は以下の様である。SASC の入力単語の word vector の列である。入力された文の i 番目の単語の word vector を $\mathbf{x}_i \in \mathbb{R}^d$ であらわす。ここで d は word vector の次元である。この時、文は以下の word vectors が並んだ列で表現される。

$$X = \mathbf{x}_1 \quad \mathbf{x}_2 \quad \dots \quad \mathbf{x}_L \quad (1)$$

ここで L は文の長さである。この入力から SASC は感情極性を以下で推定する。

$$\mathbf{y} = \text{softmax}(W \cdot X \cdot \alpha^T) \quad (2)$$

ここで $\mathbf{y} \in \mathbb{R}^3$ は感情極性の確立分布である。 \mathbf{y} は推定される感情が { positive neutral negative } どれであるかの確率を示している。

$$\mathbf{y} = (P(\text{positive}), P(\text{neutral}), P(\text{negative}))^T \quad (3)$$

$W \in \mathbb{R}^{3 \times d}$ は入力された文から、推定したい感情極性 { positive neutral negative } への射影行列である。 $\alpha \in \mathbb{R}^L$ は attention weights である。attention weights α は次で計算する

$$\alpha = \text{softmax}(X \mathbf{v}_a^T) \quad (4)$$

ここで $\mathbf{v}_a \in \mathbb{R}^d$ は推定したい aspect categories を表現する embedding のベクトルである。本研究で扱うデータでは aspect categories として 12 種類のカテゴリが現れる。なので全てのカテゴリ \mathbf{v}_a を以下の行列で表現する。

$$V = \begin{bmatrix} \mathbf{v}_1 & \mathbf{v}_2 & \dots & \mathbf{v}_{12} \end{bmatrix} \quad (5)$$

このモデル実質 1 つのパラメータ d しか調節する必要のないモデルである。 d は word vector の次元である。もし適切な word vector が事前に与えられている場合には、 d は固定値となり、このモデルにはパラメータは存在しない。以下の実験では Google News Corpus(GNC)² を使って学習された 300 次元の word vector を利用するため、この場合、提案

モデルにはパラメータは存在しない。

²<https://code.google.com/p/word2vec/>

3 実験

我々は SASC モデルを cross-entropy loss が最小となるように Adam optimizer[22] を使って学習した。Adam optimizer のパラメータは[22]と同様に設定した。行列 V と W は初期値を乱数で設定した。word vector X は GNC を使って事前に学習した 300 次元のクトルが公開されており、これを利用する。word vector は初期値を前述のように適切に設定した後に、学習によって変化させる。学習は SE16T5S1 の英語レストランレビューの学習用 2,000 のレビューを用いて行なう。学習後に同データセットのテスト用 676 レビューを用いて精度の評価を行う。epoch の回数は 8 に固定した。これは他の word vector を使った場合にも epoch=8 の場合が常に最良となるため、この値に設定した。

3.1 CNN model

比較のために CNN のモデルも評価する。この比較する CNN モデルは [17] のモデルに基づいたモデルである。この CNN モデルの詳細は以下のような。

感情極性の確率分布は以下で与えられる。

$$\mathbf{y} = \text{softmax}(W \cdot \mathbf{z} + \mathbf{b}) \quad (6)$$

$\mathbf{y} \in \mathbb{R}^3$ は推定される感情が { positive neutral negative } どれであるかの確率を示している。

$$\mathbf{y} = (P(\text{positive}), P(\text{neutral}), P(\text{negative}))^T \quad (7)$$

ここで

$$\mathbf{z} = \max Z \quad (8)$$

$$Z = \text{ReLU}(C) \quad (9)$$

$$C = W^{\text{conv}} \square X + \mathbf{b}^{\text{conv}} \quad (10)$$

$$X = \begin{bmatrix} \mathbf{x}_1 & \mathbf{x}_2 & \dots & \mathbf{x}_L \end{bmatrix} \quad (11)$$

とした。 $W^{\text{conv}} \square$ は convolution 演算を表している。convolution は近傍 3 単語について 128 channel の

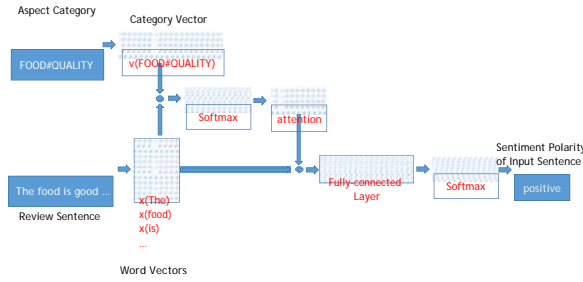


図 1: Simple alignment sentence classification

convolutionを行った。この convolution の計算結果が $C \in \mathbb{R}^{(L-2) \times 128}$ である。 $\mathbf{b}^{\text{conv}} \in \mathbb{R}^{128}$ は、この convolution 演算の bias である。 convolution の計算結果は ReLU に適用された後に Max pooling される。最後に (6) 式で感情極性の確率分布が計算される。このモデルは aspect のカテゴリについて考慮していないモデルとなっている。 aspect のカテゴリを考慮しない方が高い精度を示すことが実験によりわかっているため、比較対象としてこのモデルを選んだ。

表 1: model comparison

method	accuracy	sec/epoch
SASC	0.835	0.82
CNN	0.814	2.45
LSTM	0.790	13.8
ATAE-LSTM	0.819	15.2

3.2 RNN model

もう 1 つの比較対象として [23] の RNN モデルを評価する。 [23] は attention の機構を導入した LSTM の neural network であり、attention-based LSTM with aspect embedding (ATAE-LSTM) model と呼ばれている。 attention の値は SASC と同様に aspect category によって変化するようにする。また比較のために attention の機構のない単純な LSTM についても評価する。

3.3 実験結果

表 1 に比較実験の結果を示す。比較は計算時間についても行った。実験は Intel i5 5300U の CPU を使って行った。 Deep Learning のフレームワークとしては TensorFlow を使った。

実験結果は SASC が精度、計算時間共に比較手法を上まわっているのがわかる。特に計算時間は SASC の計算時間は ATAE-LSTM の 1/20 であり、計算時

間の点で非常に有利な手法であることがわかる。この結果から ATAE-LSTM, LSTM, CNN などの複雑な neural network は ABSA には不要で単純なものだけで十分である可能性が示されている。

4 Conclusion

SASC は ABSA を高い精度で推定できる単純なモデルである。その精度は従来の RNN を上回る。また計算時間も 20 倍近く高速である。最も重要な特性は調節すべきパラメータが実質存在しない neural network である点である。

参考文献

- [1] Cambria, E., White, B.: Jumping nlp curves: A review of natural language processing research [review article]. *IEEE Computational Intelligence Magazine* **9** (2014) 48–57
- [2] Cambria, E.: Affective computing and sentiment analysis. *IEEE Intelligent Systems* **31** (2016) 102–107
- [3] Nasukawa, T., Yi, J.: Sentiment analysis: Capturing favorability using natural language processing. In: *Proceedings of the 2Nd International Conference on Knowledge Capture. K-CAP'03, New York, NY, USA, ACM(2003)* 70–77
- [4] Liu, B.: Sentiment analysis and opinion mining. *Synthesis Lectures on Human Language Technologies* **5** (2012) 1–167
- [5] Toh, Z., Su, J.: Nlangpat semeval-2016 task 5: Improving aspect based sentiment analysis using neural network features. In: *Proceedings of the 10th International Workshop on Semantic Evaluation (SemEval-2016), San Diego, California, Association for Computational Linguistics (2016)* 282–288
- [6] Brun, C., Perez, J., Roux, C.: Xrce at semeval-2016 task 5: Feedbacked ensemble modeling on syntactico-semantic knowledge for aspect based sentiment analysis. In: *Proceedings of the 10th International Workshop on Semantic Evaluation (SemEval-2016), San Diego, California, Association for Computational Linguistics (2016)* 277–281
- [7] Saias, J.: Sentiue: Target and aspect based sentiment analysis in semeval-2015 task 12. In: *Proceedings of the 9th International Workshop on Semantic Evaluation (SemEval 2015), Denver, Colorado, Association for Computational Linguistics (2015)* 767–771
- [8] Toh, Z., Su, J.: Nlangp: Supervised machine learning system for aspect category classification and opinion target extraction. In: *Proceedings of the 9th International Workshop on Semantic Evaluation (SemEval 2015), Denver, Colorado, Association for Computational Linguistics (2015)* 496–501
- [9] Hamdan, H., Bellot, P., Bechet, F.: Lsislif: Crf and logistic regression for opinion target extraction and sentiment polarity analysis. In: *Proceedings of the 9th International Workshop on Semantic Evaluation (SemEval 2015), Denver, Colorado, Association for Computational Linguistics (2015)* 753–758
- [10] Poria, S., Cambria, E., Gui, C., Gelbukh, A.: (A rule-based approach to aspect extraction from product reviews)
- [11] Asakura, R., Niitsuma, H., Ohta, M.: Recurrent neural networks on convoluted word vectors for aspect-based sentiment analysis. (In: *Computational Linguistics and Intelligent Text Processing: Proceedings of the 18th International Conference*)
- [12] Collobert, R., Weston, J., Bottou, L., Karlen, M., Kavukcuoglu, K., Kuksa, P.: Natural language processing (almost) from scratch. *J. Mach. Learn. Res.* **12** (2011) 2493–2537
- [13] Khalil, T., El-Beltagy, S.R.: Niletmr at semeval-2016 task 5: Deep convolutional neural networks for aspect category and sentiment extraction. In: *Proceedings of the 10th International Workshop on Semantic Evaluation (SemEval-2016), San Diego, California, Association for Computational Linguistics (2016)*

- ciation for Computational Linguistics (2016) 271–276
- [14] Wang, B., Liu, M.: Deep learning for aspect-based sentiment analysis(2015)
 - [15] Chernyshevich, M.: Ihs-rd-belarus at semeval- 2016 task 5: Detecting sentimentpolarity using the heatmap of sentence. In: Pro- ceedings of the 10th International Workshop on Semantic Evaluation (SemEval-2016), San Diego, California, Association for Computa- tional Linguistics (2016)296–300
 - [16] Yanase, T., Yanai, K., Sato, M., Miyoshi, T., Niwa, Y.: bunji at semeval-2016 task 5: Neu- ral and syntactic models of entity-attributere- lationship for aspect-based sentiment analy- sis. In: Proceedings of the 10th International Workshop on Semantic Evaluation (SemEval- 2016), San Diego, California, Association for Computational Linguistics (2016)289–295
 - [17] Kim, Y.: Convolutional neural networks for sentence classification. CoRR **abs/1408.5882** (2014)
 - [18] Poria, S., Cambria, E., Gelbukh, A.: Aspect extraction for opinion mining with a deep con- volutional neural network. Know.-Based Syst. **108** (2016) 42–49
 - [19] Xiao, Y., Cho, K.: Efficient character- level document classification by combining convolution and recurrent layers. CoRR **abs/1602.00367** (2016)
 - [20] Zuo, Z., Shuai, B., Wang, G., Liu, X., Wang, X., Wang, B., Chen, Y.: Convolutional recurrent neural networks: Learning spatial dependencies for image representation. In: The IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) Workshops. (2015)
 - [21] Poria, S., Chaturvedi, I., Cambria, E., Hus- sain, A.: Convolutional MKL based mul- timodal emotion recognition and sentiment analysis. In: IEEE 16th International Confer- ence on Data Mining, ICDM 2016, December 12-15, 2016, Barcelona, Spain. (2016) 439–448
 - [22] Kingma, D.P., Ba, J.: Adam: A method for stochastic optimization. CoRR **abs/1412.6980** (2014)
 - [23] Wang, Y., Huang, M., Zhu, X., Zhao, L.: Attention- based lstm for aspect-level senti- ment classification. In Su, J., Carreras, X., Duh, K., eds.: EMNLP, The Association for Computational Linguistics (2016) 606–615

疎水性キャピラリーバリアを持った河川堤防の安全性に関する研究

岡山大学大学院 環境生命科学研究科

金 秉洙

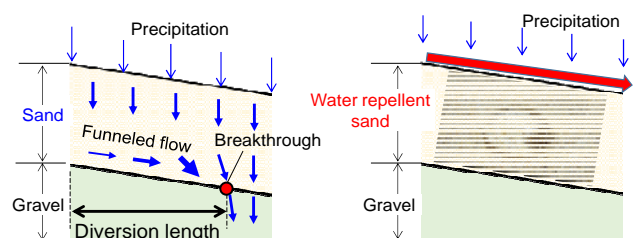
本研究では、表面が水を排斥するという性質をもつ疎水性地盤材料を用いてキャピラリーバリア盛土への適用性及び安全性について検討を行う。そのため、研究期間内に疎水性地盤材料の物理特性や力学特性・水理学特性について把握することを目指す。初年度では、まず保水性試験の効率化と試験時間の短縮を目的とした既存の連続加圧方式の保水性試験システムに基づいて試験装置の改良を行い、新たに試験装置を作製した。試験試料として豊浦砂を用いて人工的に疎水性砂を作製し、親水性砂と共に連続加圧方式の保水性試験を行った。よって、得られた水分特性曲線結果により、連続加圧方式の試験法の適応性の検討と共に疎水性砂の保水特性について評価ができた。

1. はじめに

キャピラリーバリアは砂層とその下部に礫層を重ねた土層構造により生じる一つの遮水機能である(図-1(a)参照)。これは砂と礫の保水性の違いを利用して層境界面の上部で水を捕捉し、層境界以深への水の浸潤を妨げるものであり、自然材料のみを用いるので環境負荷が少ないという長所を持つ(森井ら, 2009)。しかし、砂の保水能力を超える水の浸透が生じた場合、礫層への浸透が発生するブレイクスルー(breakthrough)によりキャピラリーバリアは崩壊するため、遮水性には限界がある。また、地盤が傾斜している時、砂層への浸透水が層内を流れてブレイクスルーが生じるまでの水平距離を限界長(diversion length)と呼び、その長さで遮水性能が評価されるが、現状では最大でも 300cm に満たない程度である(森井ら, 2009; 松元ら, 2016)。このような現状のキャピラリーバリアの性能の影響で、工事現場への適用まで繋がっていないのが状況である。一方、山火事のような自然災害や石油漏れのような環境汚染によって自然状態の土(親水性を持つ土, wettable soil)が疎水性をもつ土に変化する場合がある。よって、物理学・化学分野では、疎水性を持つ地盤材料(water repellent soil)に関する研究が活発に

行われてきているが(Sun et al., 2002; Frattolillo et al., 2005; Goebel et al., 2007 etc.), 地盤工学分野では十分な研究実績が少ないことが現状である。そこで疎水性地盤材料の物理特性や力学特性・水理学特性などの把握により、この地盤材料の表面が水を排斥するという性質を地盤建設分野に有効に適応できると考えられる。

本研究は、キャピラリーバリア盛土の砂層に水を排斥する疎水性地盤材料を用いることで、より高い遮水性能を持つキャピラリーバリアを実現させて土構造物に適用することを最終目標としている(図-1(b)参照)。よって、初年度の研究では、まず保水性試験の効率化と試験時間の短縮を目的とした既存の連続加圧方式の保水性試験システムに基づいて試験装置の改良を行い、新たな試験装置を作製した。その後、キャピラリーバリアに用いる疎水性地盤材料



(a) CB の概念

(b) 砂層に疎水材の適用

図-1 CB 盛土の砂層に疎水材の適用

の物性及び保水特性を把握するために、様々な物性試験および連続加圧方式の保水性試験を行い、親水性地盤材料と比較検討を行った。

2. シラン処理による疎水性材料の作製

2.1 疎水性地盤材料の性質とその適用

一般的な地盤材料は粒子表面と間隙に水を容易に吸収する親水性を持つが、疎水性地盤材料の粒子表面は水を排斥し、明らかに異なる性質を示す。このような疎水性地盤材料は、地盤表面上の水が内部に浸透するのを防ぎ、結果的に地表面を流れる水量と土の流失量を増加させて、予測不可能な氾濫を発生させる可能性をもたらすので、地盤工学分野においても疎水性地盤材料の存在に対する認識が必要である。

近年は局地的な集中豪雨が頻繁に生じる気候環境であり、地盤構造物においても排水施設を設ける必要性が高まっている。このような状況の下で、環境や費用面で排水施設を設置しにくいケースにおいて、疎水性地盤材料の持つ粒子表面が水を排斥するという性質を、排水機能向上の一手段として活用するのは、経済的な利点となると考えられる。なお、農業土木分野では、塩分を含んだ地下水による塩害の防止に疎水性地盤材料を適用するための研究が既に行われている(美濃ら, 2012)。さらに今後の研究課題として、廃棄物埋立地の被覆や盛土の斜面などへの遮水性能を持つ疎水性地盤材料の適用が考えられる(Lourenço et al., 2015)。

2.2 地盤材料のシラン処理における化学反応

自然状態の土は、前述したように様々な原因によって疎水性を持つ土へと変化する場合がある。しかし、それらの作用により生成される疎水性地盤材料は、物理・化学的性質が均質になり難い。よって、このような問題を解決し、親水性地盤材料との相対的な特性を比較するために、本研究ではシラン処理による人工的に疎水性地盤材料を作製した。

シラン処理 (Silanization process) を行う場合、材料の表面を活性化する必要がある、酸素プラズマ処

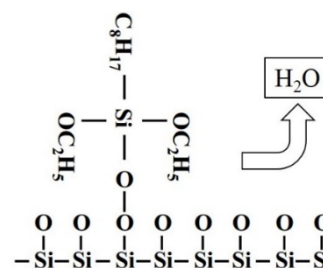
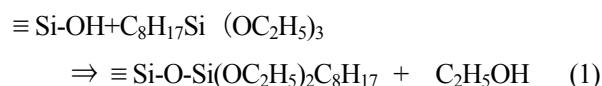


図-2 砂粒子の表面に吸着されたシラン分子と副産物(水分子)

理や UV オゾン処理等を行って材料表面のケイ素にヒドロキシ基 (hydroxyl group, OH-) が結合した状態にする必要があるが、砂粒子表面に存在するケイ素は水が吸着する過程でヒドロキシ基を形成している (Da Re, 2000)。シラン処理に用いた試薬は n-オクタトリエトキシシラン ($C_{14}H_{32}O_3Si$) で、ケイ素原子を中心に、直鎖炭化水素 (C_8H_{17}) と 3 つのアルコキシ基 (alkoxyl group, OC_2H_5) が結合した分子構造で、弱い粘性を持つ透明な液体である。このシラン処理試薬を体積比で 10% になるようイソプロピルアルコール (IPA) で希釈した溶液に地盤材料を浸して容器を密封し、できるだけ空気との接触を避け、常温下で 72 時間反応させる。

アルコキシ基は加水分解してヒドロキシ基が付加し、副産物としてエタノール (ethanol, C_2H_5OH) が生成する。加水分解したシラン試薬は、地盤材料のケイ素表面に付着する。これによって、砂粒子の表面がシラン分子を獲得する過程で凝結が起きるが、シラノール基のヒドロキシ基は、脱水縮合反応により砂粒子表面で水素と結合しながら水分子を放出する (図-2)。全体的な化学反応過程は、以下の化学式で表わされる。



シラン処理によりシラン分子が様々な厚さで形成されるため、砂粒子の表面は微細な凹凸を生じ、これが疎水性の増加につながる (Sun et al., 2002)。また、反応時間が長くなるほど、シラン分子は多くの層を形成し、交差結合を形成できる機会が増えることになる。これによって表面の粗さはさらに増加する

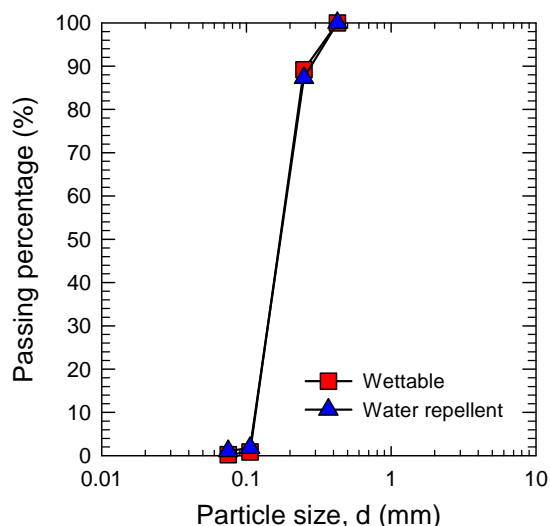


図-3 粒度分布曲線

(Howarter and Youngblood, 2006)。なお、シラン溶液中で十分な期間化学反応を終えた砂粒子は有機物で覆われて粘性を持つ状態になるため、実験の際、処理した砂を水(アルカリ性電解水)で三回洗浄する。その後、24 時間以上炉乾燥して、疎水性砂を作製している。

2.3 疎水性地盤材料の作製方法

本研究で用いた試験試料は、標準砂である豊浦砂である。豊浦砂の土粒子密度(ρ_s)は、 2.64 g/cm^3 であり、最大間隙比(e_{\max})と最小間隙比(e_{\min})が0.977, 0.605である。平均粒径(D_{50})は、0.161 mm, 最大粒径(D_{\max})0.54 mm であり、そして曲率半径(U_c)と均等係数(U'_c)は、1.22 と 1.38 である。豊浦砂とシラン処理により作製された疎水性豊浦砂の粒径加積曲線を図-3 に示している。

本研究では、以下に述べる手順によって豊浦砂のシラン処理を行い、疎水性地盤材料を作製している。

- ① 不純物の混入の少ない状態の豊浦砂を用意する。
- ② 処理のための混合液として、n-オクチルトリエトキシシランをイソプロピルアルコールに体積比で10%混合したシラン溶液(10% n-octyltriethoxy-silane, $\text{C}_{14}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{Si}$)を用意する。
- ③ 水とシラン溶液を混ぜ合わせた混合溶液を用意し、その中に豊浦砂を投入する。(図-4(a))



(a) 豊浦砂を混合溶液に投入



(b) 放置後の豊浦砂(72 時間放置)

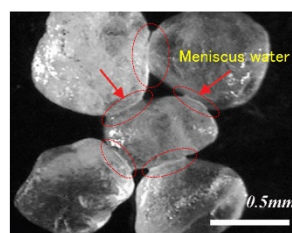


(c) 乾燥炉に入れ、24 時間放置

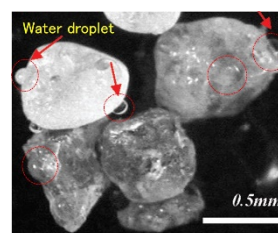


(d) 作製された疎水性豊浦砂

図-4 疎水性地盤材料の製作手順



(a) 親水性砂



(b) 疎水性砂

図-5 親水性砂と疎水性砂の表面に水が付着する様子 (Kim et al., 2011)

- ④ その後、容器に密閉し、常温でそのまま 72 時間放置する。(図-4(b))
- ⑤ 放置後、試料の余分な水を取り除いてから、水で洗浄する。その後、乾燥炉に試料を入れて、約 110°C の温度の下で 24 時間程度乾燥して(図-4(c)), 疎水性砂を作製する(図 4-(d)). この過程で珪酸塩鉱物の表面上に前述の式(1)の反応式で示される水素結合反応が生じる。

2.4 親水性・疎水性砂の粒子表面での水の分布状況

親水性砂は、シラン処理により疎水性砂に変化する。図-5 は、親水性・疎水性砂の表面に水がどのように分布しているかを顕微鏡で観察したものである。図から、親水性砂の場合はメニスカス水が多く分布している様子が分かる。一方、疎水性砂の場合、粒子表面が水と反発する作用のため、水は水玉の状態

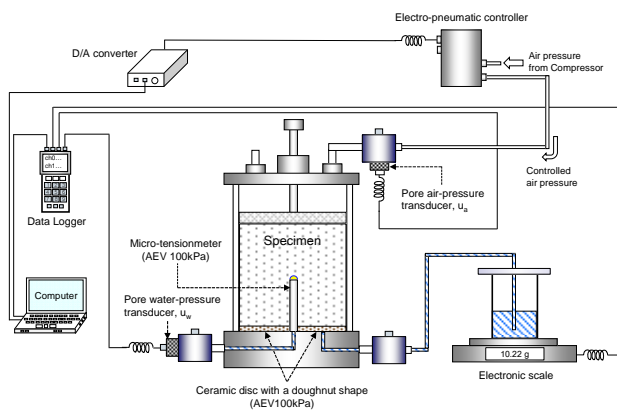


図-6 連続加圧方式の保水性試験装置の概念図

になって粒子表面に付着している様子が観察できる。よって、このような親水性砂と疎水性砂の水の分布状況の違いは、保水特性や力学特性に差をもたらすものと考えられる。

3. 連続加圧方式による保水性試験

3.1 製作された試験装置の概要

本研究で用いた試験装置の概念図を図-6 に示す。連続加圧方式による保水性試験装置では空気圧を連続的に供給する方式であるため、加圧板法のように水分定常状態のサクションを把握することができない。この課題に対しては、図-6 に示すマイクロテンシオメーター (micro-tensionmeter) を供試体中央部に鉛直方向に設置し、空気圧の連続的変化に対応する供試体内の平均的な間隙水圧を測定している。そして、同時に測定される空気圧と間隙水圧の圧力差を、その測定時の供試体に対するサクションと定義している。また、排水過程や吸水過程での供試体からの吸排水量を測定するため、底盤にドーナツ形状のセラミック板 (空気侵入値 100kPa) を設置している。

供試体を試験容器 (以下、セル) に設置し、飽和状態としてから、空気圧、すなわち間隙空気圧が所定の目標値まで連続的にセル内に与えられる (図-7 参照)。セル内の空気圧は、間隙空気圧計により測定されている。また、空気圧の上昇・下降速度は、パソコンにより D/A 変換器を通じて電空レギュレーターにより制御される。

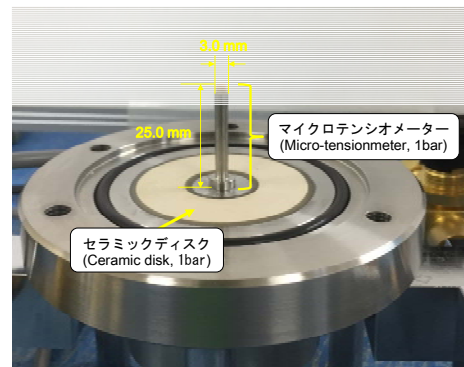


図-7 マイクロテンシオメーターの取り付けの様子

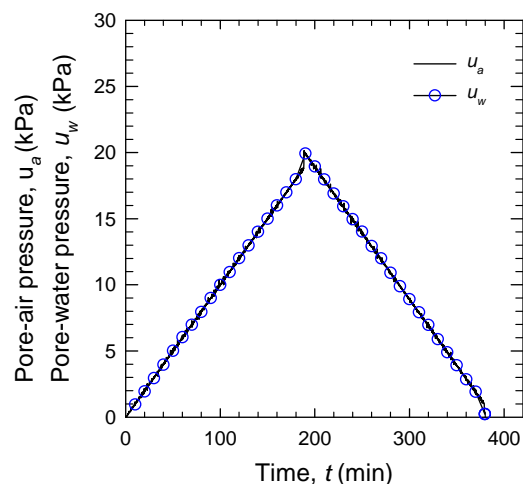


図-8 マイクロテンシオメーターの感度確認

一方、供試体に間隙空気圧が与えられると、マイクロテンシオメーターに連結されている間隙水圧計により間隙水圧が測定される。そして、排水過程や吸水過程での供試体からの吸排水量は、ドーナツ型セラミックディスクに通じた排水経路を経て、電子天秤により測定される。

3.2 マイクロテンシオメーターについて

図-7 に示しているマイクロテンシオメーターのサイズは、直径 3.0 mm、高さ 25.0 mm であり、先端部にはセラミックカップ (直径 3.0 mm、高さ 2.5 mm ; 空気侵入値約 100 kPa) が取り付けられている。マイクロテンシオメーター、およびそれと間隙水圧計をつなぐ経路は脱気水で飽和されており、経路に連結した間隙水圧計によって供試体内の間隙水圧を測定している。阿部ら¹⁰⁾は、供試体に水平方向に挿入する方法でマイクロテンシオメーターを設置して保水性試験を行っている。しかし、この方法の場合、以

下のような点がマイクロテンシオメーターへの影響として懸念される。まず、供試体が入った試料容器の側面からマイクロテンシオメーターを水平に挿入する過程で、供試体に乱れを与えることが問題となる。さらに、加圧中の供試体が体積変化することによって、マイクロテンシオメーターの下側に空洞が生じ、間隙水圧が正しく測定されない可能性があることにも留意する必要がある。また、マイクロテンシオメーターと試料容器の間からの漏水・漏気は、試験結果に大きな影響を与えるので、毎回シリコン接着剤でシールすることは、試験の非効率化につながる原因になる。本研究では、以上のような点を考慮し、マイクロテンシオメーターはセラミックディスクに対して垂直方向に設置されている。

なお、マイクロテンシオメーターから間隙水圧計までの経路を十分に飽和させることは、間隙水圧を正確かつ高精度に測定するために重要である。そこで、セル内に水を入れた状態でセルに与える空気圧を増減しながらマイクロテンシオメーターの反応を測定して、経路飽和過程の信頼性を確認した。与える空気圧の加圧・減圧速度は 0.1kPa/min とし、空気圧を $0\sim 20\sim 0\text{kPa}$ に設定に対して、空気圧とマイクロテンシオメーターによる間隙水圧を測定した。その結果を図-8 に示している。図により、与えられた空気圧に対してマイクロテンシオメーターからの間隙水圧はほぼ等しい値を示していることがわかり、本研究で用いるマイクロテンシオメーターは、測定感度に問題がないと確認できた。

3.3 試験方法

本研究での供試体は、親水性・疎水性の豊浦砂を用いて静的締固め法によって、初期乾燥密度 (γ_{di}) 15.0 kN/m^3 、初期飽和度 (S_{ri}) 50% を目標に作製した。供試体サイズは、直径 50mm 、高さ 50 mm である。親水性と疎水性豊浦砂における各供試体の初期条件は表-1 に示す。

ペデスタル部の排水経路及びマイクロテンシオメーターを飽和させたのち、セルを組み立て、セル内に含水比調整された試料を投入し、静的に締固めて供試体を作製した。その後、セル全体を組み立て、

表-1 保水性試験における試験条件

項目		$\gamma_{di}(\text{kN/m}^3)$	$S_{ri}(\%)$	間隙空気圧の変化
親水性豊浦砂	No.1	14.4	48.2	$0\text{kPa}\rightarrow 40\text{kPa}\rightarrow 0\text{kPa}$
	No.2	15.0	58.7	$0\text{kPa}\rightarrow 80\text{kPa}\rightarrow 0\text{kPa}$
疎水性豊浦砂	No.1	15.1	51.4	$0\text{kPa}\rightarrow 40\text{kPa}\rightarrow 0\text{kPa}$
	No.2	14.4	58.7	$0\text{kPa}\rightarrow 80\text{kPa}\rightarrow 0\text{kPa}$

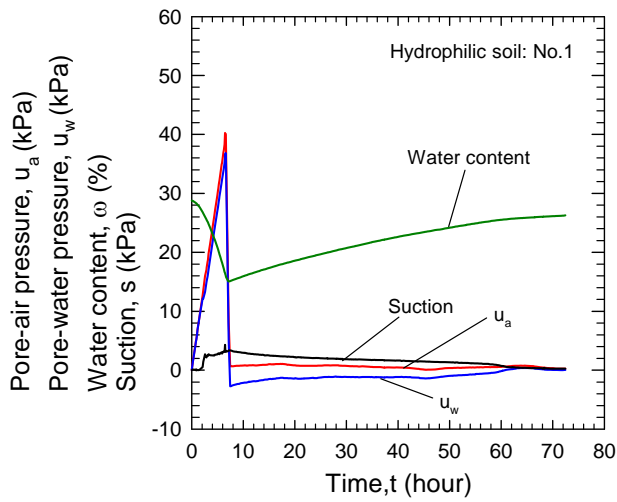
所定の水量で浸水させることにより供試体を飽和化して試験を開始した。空気圧載荷過程として、セル内の空気圧を一定速度 (0.1 kPa/min) で連続的に増加・減少させた。ただし、親水性豊浦砂の No.1 のケースでは、 0.1kPa/min の加圧速度で 40kPa まで達した時点で一挙に 0kPa まで減圧されるように設定した。その理由は、間隙空気圧のピーク値後の減圧時間が保水性試験に及ぼす影響を確認するためである。よって、空気圧は、親水性・疎水性豊浦砂ともに No.1 のケースでは $0\text{kPa}\rightarrow 40\text{kPa}\rightarrow 0\text{kPa}$ 、No.2 のケースでは $0\text{kPa}\rightarrow 80\text{kPa}\rightarrow 0\text{kPa}$ と制御された。ここで、空気圧のピーク値を 40kPa および 80kPa に分けて設定したのは、供試体が残留状態まで達する空気圧の大きさを検討するためである。空気圧を減少して 0kPa に達したら、空気圧の変化を終了して、供試体への吸水が終了するまでその状態を保って測定を続けた。なお、試験開始から終了まで排水量を測定し、試験終了後に供試体含水比を測定して、それに基づいて試験中の供試体水分量を決定した。

4. 保水性試験結果

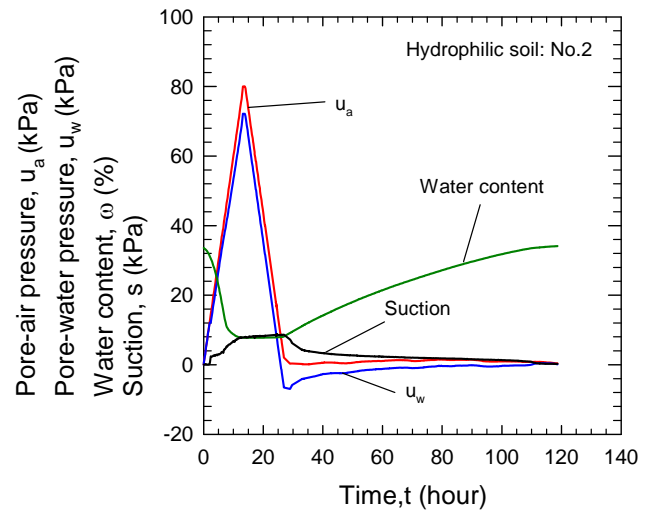
4.1 親水性豊浦砂の試験結果

図-8 と図-9 に親水性豊浦砂の保水性試験結果を示す。図-8 (a) & (b) と図-9 (a) & (b) には供試体含水比 (w)、間隙空気圧 (u_a)、供試体中央に設置したマイクロテンシオメーターで測定される間隙水圧 (u_w) ならびにサクション (s) の経時変化をそれぞれ示している。図から明らかなように親水性豊浦砂 No.1 と No.2 における排水・吸水過程の所要時間は、それぞれ約 73 時間と 120 時間であった。

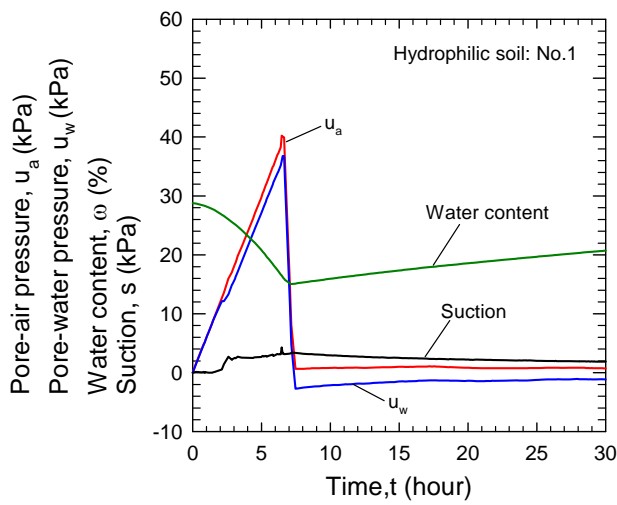
図-8 (b) と図-9 (b) には試験開始からそれぞれ 30 時間と 50 時間までの関係を示した。図の関係が



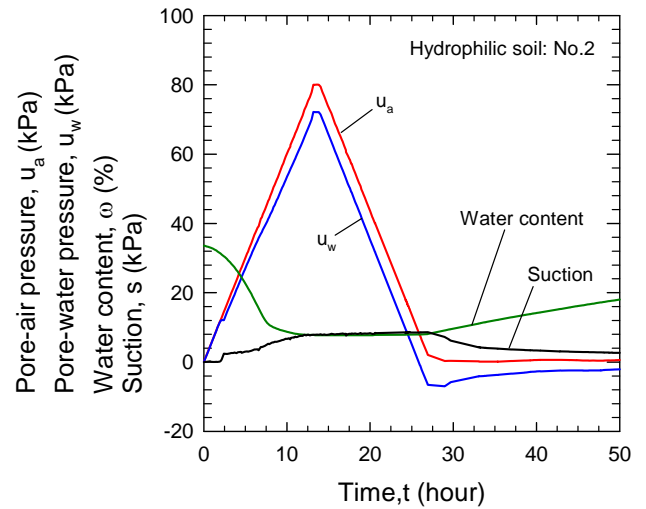
(a) 経過時間 73h までの測定結果



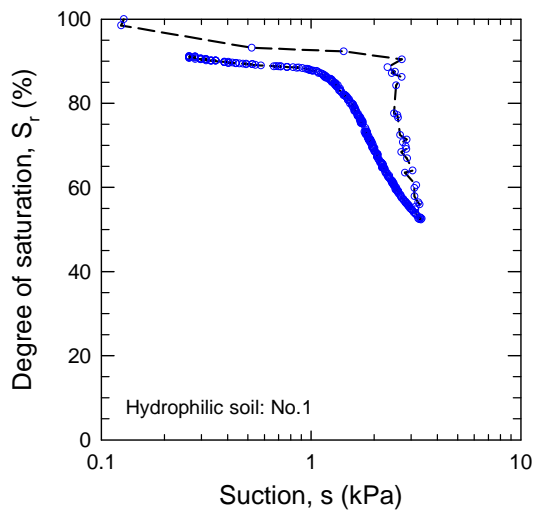
(a) 経過時間 120h までの測定結果



(b) 経過時間 30h までの測定結果

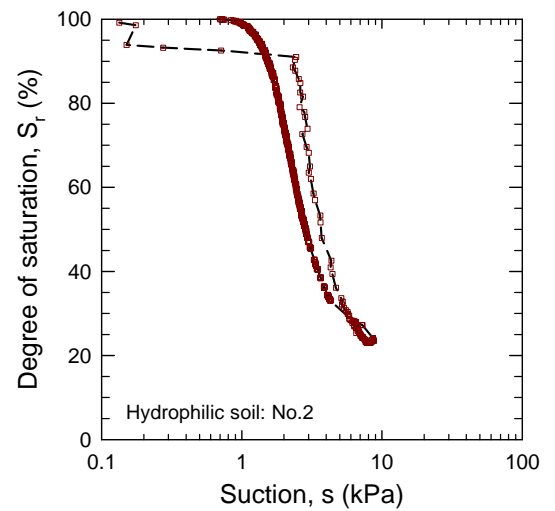


(b) 経過時間 30h までの測定結果



(c) 水分特性曲線

図-8 親水性豊浦砂 No.1 の試験結果



(c) 水分特性曲線

図-9 親水性豊浦砂 No.2 の試験結果

ら間隙空気圧 u_a が増加することにより、供試体から排水が始まり含水比が減少する状況が確認できる。

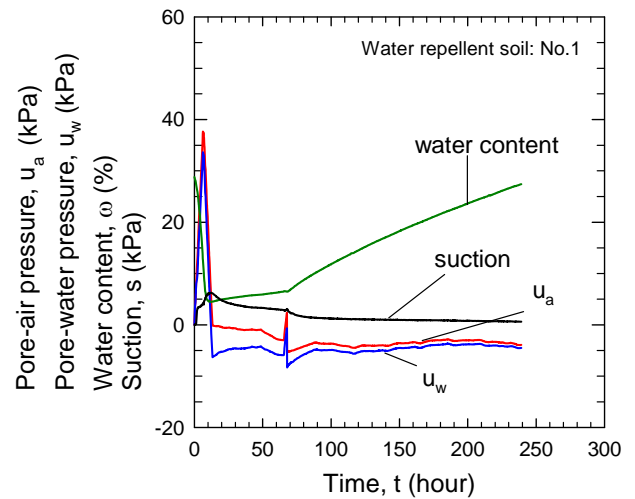
しかし、間隙水圧 u_w は間隙空気圧 u_a とほぼ同じ値となりサクション(s)はほぼゼロの状態推移して

いる。その後、間隙水圧の低下とともにサクシジョンの値が徐々に増加することが分かる。含水比の減少傾向は、No.1 のケースと No.2 のケースで異なり、No.2 のケースでは間隙空気圧 u_a が 44 kPa を超えたあたりから減少傾向が確認され、間隙空気圧が 60kPa 付近では含水比の変化量がほとんど見られない残留含水比状態となっているものと判断される。しかし、No.1 と No.2 のケースでは間隙空気圧の条件がそれぞれ 40kPa と 80kPa と異なっているため、No.1 では間隙空気圧が小さかったことからこのような状態にいたらなかったものと判断させる。また、間隙水圧の最大値は、No.1 のケースで 36.7kPa、No.2 のケースで 72.1kPa であった。間隙水圧と間隙空気圧のピーク値を比較すると 10 %程度の違いを示している。そこから間隙空気圧が減少すると、それに対応して間隙水圧も同時に減少し、間隙空気圧が 0kPa になってから湿潤過程が始まっている。この際、含水比も増加し、最終的に No.1 のケースで 26.3%、No.2 のケースで 29.3%まで達したことが確認できる。また、サクシジョンの最大値は、No.1 のケースで 4.3kPa、No.2 のケースで 8.6kPa となっている。

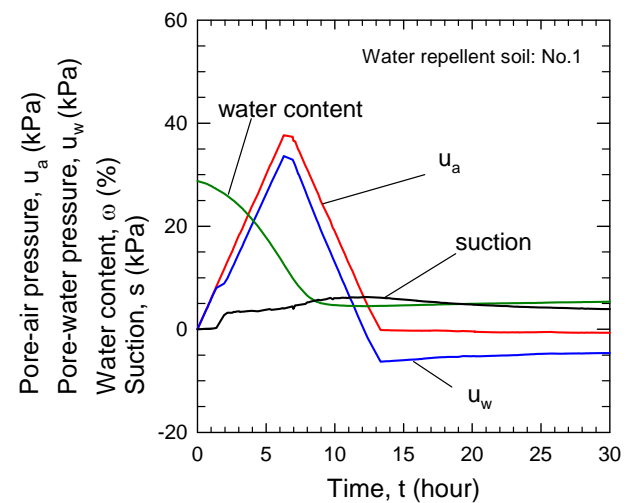
図-8 (c) と-9 (c) は、No.1 と No.2 のサクシジョン (s) と飽和度(S_r)の関係を示す水分特性曲線 (SWCC) をそれぞれ示している。この水分特性曲線から空気侵入値 (air entry value, AEV) を求めると No.1 のケースで 2.7kPa、No.2 のケースで 2.5kPa 程度であることがわかる。No.1 のケースでは、排水過程が約 7 時間、吸水過程が約 65 時間で空気侵入値の把握は可能であったが、最大間隙空気圧の大きさが 40kPa であったため、No.2 のケースのように高いサクシジョン領域や残留状態での挙動を把握することができなかったと判断される。よって、親水性豊浦砂の場合、間隙空気圧の最大値は、80kPa 以上とした方が良くと考えられる。また、残留状態の挙動を把握するためには、間隙空気圧の最大値で圧力を保持し、供試体から十分に排水させる必要があると判断される。

4.2 疎水性豊浦砂の試験結果

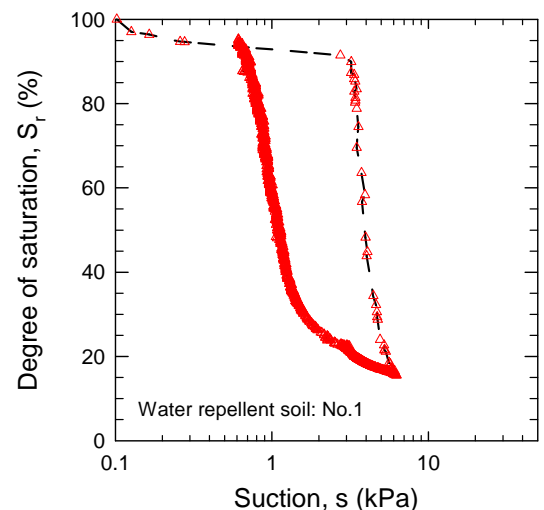
図 10 と図 11 に疎水性豊浦砂の保水性試験結果を示す。図 10 (a), (b) と図 11 (a), (b) には供試体



(a) 経過時間 240h までの測定結果



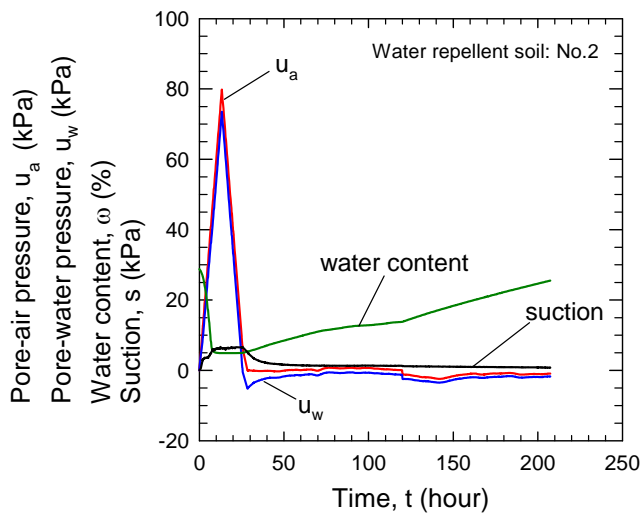
(b) 経過時間 30h までの測定結果



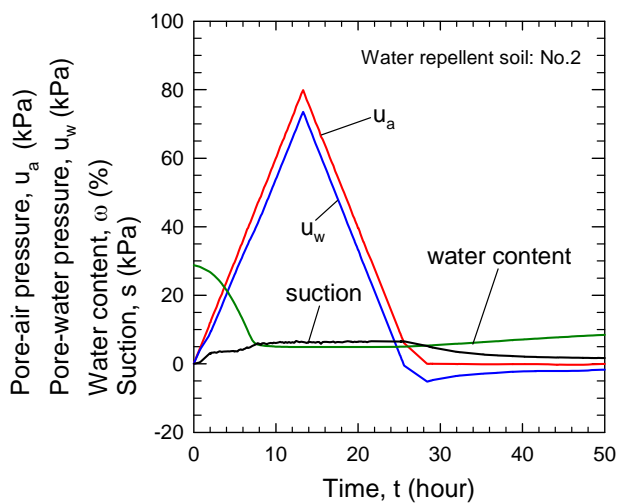
(c) 水分特性曲線

図-10 疎水性豊浦砂 No.1 の試験結果

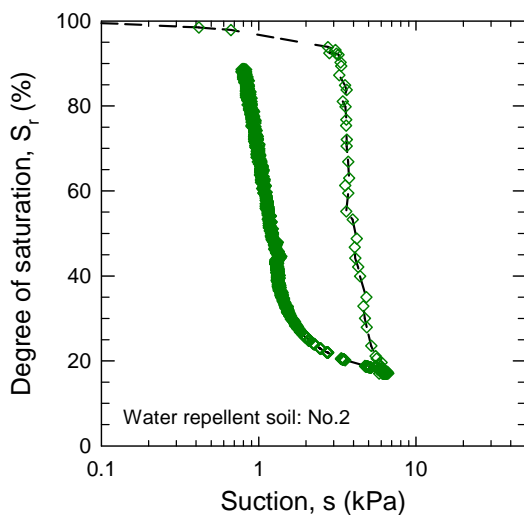
含水比 (w), 間隙空気圧 (u_a), 供試体中央に設置したマイクロテンシオメーターで測定される間隙水圧



(a) 経過時間 73h までの測定結果



(b) 経過時間 30h までの測定結果



(c) 水分特性曲線

図-11 疎水性豊浦砂 No.2 の試験結果

(u_w) ならびにサクション (s) の経時変化をそれぞれ示している。疎水性豊浦砂 No.1 と No.2 のケース

における排水・吸水過程の所要時間は、それぞれ約 240 時間と 210 時間であった。なお、図 10 (b) と図 11 (b) には試験開始からそれぞれ 30 時間と 50 時間までの関係を示した。

図により、試験開始から間隙空気圧が徐々に増加することにより、No.1 では 60 分程度、No.2 では 30 分程度経過したところから間隙水圧が間隙空気圧と圧力差を生じ始めている。これは、親水性豊浦砂 No.1 のケースで 150 分、No.2 のケースで 120 分の結果に比べて約 2 倍以上の早さである。また、間隙空気圧がピーク値 (No.1 : 40kPa と No.2 : 80kPa) となった際、それに対応する最大間隙水圧は約 10% 差の値 (No.1 : 34.0kPa, No.2 : 73.5kPa) であった。その後、減圧過程により間隙空気圧が 0kPa になってから湿潤過程が始まっている。この際、含水比も増加し、最終的に No.1 のケースで 29.0%, No.2 のケースで 25.5% まで達したことが確認できる。また、サクションの最大値は、No.1 のケースで 6.0kPa, No.2 のケースで 6.7kPa であった。

図 10 (c) と 11 (c) は、疎水性豊浦砂 No.1 と No.2 の水分特性曲線をそれぞれ示している。図から、空気侵入値 (AEV) は No.1 のケースで約 3.2kPa, No.2 のケースで約 3.2kPa となっていることが分かる。No.1 と No.2 の排水過程で飽和度が約 15% まで低下したが、親水性豊浦砂と同じく残留状態までは至らずに排水過程が終了している。その後、吸水過程になり、飽和度が 90% 以上まで上昇している。疎水性豊浦砂 No.1 と No.2 の吸水過程の時間と比べると、2 倍以上試験時間を要していることが分かる。これは、親水性と疎水性地盤材料の表面物性が異なることにより土粒子の空隙に水への侵入形態の違いがもたらす影響であると考えられる (Beckett et al., 2016)。

5. 親水性・疎水性豊浦砂における保水特性の比較

図-12 は、親水性・疎水性豊浦砂の水分特性曲線を比較したものである。空気侵入値 (AEV) は、親水性豊浦砂 No.1 で約 2.7kPa, No.2 で約 2.5kPa となり、疎水性豊浦砂 No.1 と No.2 で共に約 3.2kPa となった (表-2 参照)。親水性豊浦砂を用いた段階加圧

方式による加圧板法の結果(神谷ら, 2006)と連続加圧方式による加圧板法(畠山ら, 2015)の結果と比較すると、ほぼ同じ結果であることが確認され、本研究での保水性試験装置の精度に問題がないことと判断される。一方、疎水性豊浦砂の空気侵入値が少し大きい結果となっているが、その差は僅かであると判断される。このような結果は、金ら(2015)による親水・疎水性のジュムンジン砂の試験結果と類似な傾向であることが分かった。

また、水侵入値 (water entry value, WEV) は、飽和状態に至る過程で、最後の空気が抜けようとする際に入れ替わって浸入しようとする水圧に対応すると考えられ、水圧がそれ以上でないと空気は抜けずそのまま留まるものと考えられる (図-13 参照)。今回の結果における水侵入値は、親水性豊浦砂 No.1 で約 1.2kPa, No.2 で約 1.4kPa, 疎水性豊浦砂 No.1 と No.2 で共に約 0.7kPa となった。この結果により、水侵入値は、疎水性地盤材料よりも親水性地盤材料の方が高くなることが分かった。

なお、本研究では、図-13 のように水分特性曲線上で排水過程後の残留飽和状態から吸水過程に移行した場合に、水が供試体内に浸透し始める時点のサクションの大きさを水浸透値 (water infiltration value, WIV) を定義している。水浸透値は、親水性豊浦砂 No.1 で約 9.0kPa, No.2 で約 6.0kPa, 疎水性豊浦砂 No.1 で約 1.9kPa, No.2 で約 2.0kPa となった。この結果により、水浸透値は、疎水性地盤材料よりも親水性地盤材料の方が高くなることが分かる。これは、残留含水比状態から吸水過程に移った時に、親水性材料では速やかに水が侵入するが、疎水性材料の場合、水が侵入しにくいことと関連していると考えられ、疎水性材料の水を弾く特性と吸水過程での水の接触角が関係していると考えられる。つまり、疎水性土粒子の表面が乾燥状態であれば、間隙に水が大きな接触角を保ちながら浸透するため、土粒子の間隙に水が入りにくいと考えられる (図-5 参照)。よって、疎水性豊浦砂の場合、親水性豊浦砂より水分特性曲線のヒステリシスが大きくなる傾向を示すものと推測される。この結果から、ある飽和度に対して親水性豊浦砂の方が、疎水性豊浦砂より大きいサ

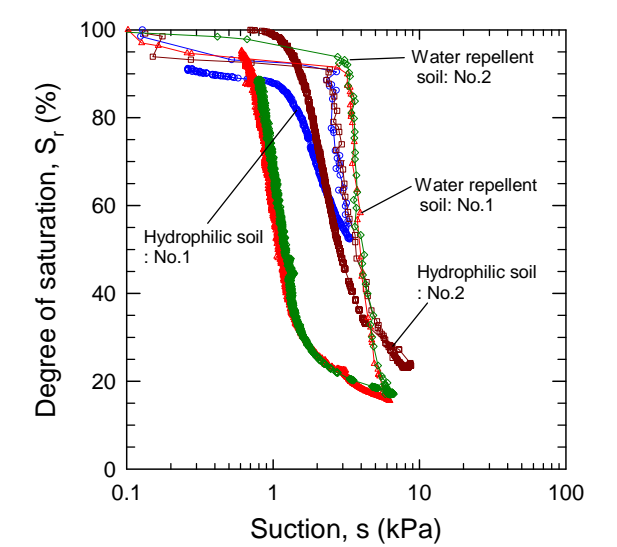


図-12 親水性・疎水性豊浦砂の水分特性曲線の比較

項目		AEV (kPa)	WEV (kPa)	WIV (kPa)
親水性豊浦砂	No.1	2.7	1.2	9.0
	No.2	2.5	1.4	6.0
疎水性豊浦砂	No.1	3.2	0.7	1.9
	No.2	3.2	0.7	2.0

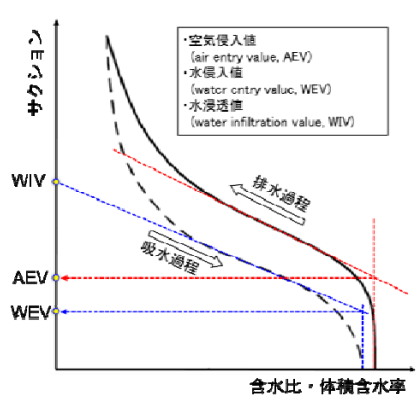


図-13 水分特性曲線でのヒステリシスと保水特性値

クションを持つことが予測される。

一方、疎水性土粒子の間隙に水が侵入するためには、疎水性土粒子の表面に水膜が生じるまでサクションの値が減少する必要があることになる。よって、親水性地盤と疎水性地盤に対して、降雨による浸透が発生する場合を想定すると、疎水性地盤材料より親水性地盤材料の方が早く浸透が生じると判断できる。このような疎水性地盤材料の特徴を実際の現場

に適用することにより、不飽和土地盤の安全性の向上に繋がることが期待できる。

6. 結論

初年度の研究では、キャピラリーバリア盛土への適用性を検討するため、親水性・疎水性砂を対象として連続加圧方式による加圧板法の保水性試験を行った。得られた結果により、親水性と疎水性砂との保水性特性について検討を行った。本研究で得られた知見を以下に示す。

- (1) 連続加圧方式による保水性試験において、水分特性曲線における排水・吸水過程に要する試験時間が短縮されることが確認できた。親水性地盤材料では5日間程度、疎水性地盤材料では吸水過程で試験時間がより必要となり、10日間程度で試験結果を得ることができた。課題としては、親水性・疎水性地盤材料において残留状態の挙動を把握するため、排水過程での試験時間を長く保つ必要があることがわかった。
- (2) 空気侵入値(AEV)については、疎水性豊浦砂が親水性豊浦砂より僅かに大きい値が得られた。他の機関で行われた、段階加圧方式や連続加圧方式による親水性豊浦砂の空気侵入値との比較により、本研究での試験装置の精度の検定ができた。また、金ら(2015)による親水・疎水性ジュムンジン砂の研究結果と同じ傾向であることが分かった。一方、水侵入値(WEV)や水浸透値(WIV)については、親水性豊浦砂が疎水性豊浦砂より大きい値が得られ、疎水性豊浦砂のヒステリシスが親水性豊浦砂より大きくなる傾向を示すことが把握できた。疎水性土粒子の表面が乾燥状態であれば、残留状態から吸水過程に移る時、疎水性材料の水を弾く特性と吸水過程での水の接触角が関係し、間隙に水が大きな接触角のまま浸透するため、土粒子の間隙に水が入りにくいことがその理由と考えられる。この影響により、ある飽和度に対して親水性豊浦砂が疎水性豊浦砂より大きいサクシオンを持つこ

とが予想される。

- (3) 疎水性土粒子の間隙に水が侵入するためには、疎水性土粒子の表面に水膜が生じるまでサクシオンの値が減少する必要がある。よって、降雨時、親水性と疎水性地盤に雨水の浸透が生じることを想定すると、疎水性地盤材料より親水性地盤材料の方が早く浸透されると判断できる。つまり、このような疎水性地盤材料の特徴を実際の不飽和土構造物に適用することにより、その安全性の向上に繋がることが期待できる。

参考文献

- 1) 加藤正司, 吉村優治, 河井克之, 寸田 亘: 不飽和土の一軸圧縮試験時の強度特性に及ぼすサクシオンの影響, 土木学会論文集, No.687/III-56, pp. 201-218, 2001.
- 2) 神谷浩二, Rully Bakrie, 本城勇介: 保水性を制御した不飽和土の透気係数の測定, 土木学会論文集 C, Vol. 62, No. 3, pp. 679-688, 2006.
- 3) 金秉洙, 加藤正司, Seong-Wan PARK, 竹下祐二: 不飽和状態の親・疎水性砂のせん断挙動に及ぼすメニスカス水の影響, 地盤工学ジャーナル, Vol. 10, No.2, pp. 267-276, 2015.
- 4) 畠山 正則, 京野 修, 川原 孝洋: 連続加圧方式による保水性試験装置の開発, 応用地質技術年報, No.34, pp. 23-54, 2015.
- 5) 松元 和伸, 小林 薫, 森井 俊広, 中房 悟: 上部層厚の影響を考慮した3層キャピラリーバリア地盤の限界長の評価方法, 地盤工学ジャーナル, Vol.11, No.4, pp. 305-313, 2016.
- 6) 松倉 公憲, 恩田 裕一: 安息角: 定義と測定法にまつわる諸問題, 筑波大学水理実験センター報告, No.13, pp. 27~35, 1989.
- 7) 美濃規央, 長光左千男, 脇田由実, 山田修, 田尾本昭, Stephen John: 撥水砂技術の開発と応用, 環境技術特集, Vol.58, No.2, pp. 109-112, 2012.
- 8) 森井 俊広, 竹下 祐二, 井上 光弘, 松本 智: キャピラリーバリア地盤における雨水浸潤挙動の現地計測と限界長の評価, 農業農村工学会論文

集, No.263, pp. 91~97, 2009.

- 9) Beckett, C., Fourie, A., and Toll, D.: Water repellent soils: the case for unsaturated soil mechanics, 3rd European Conference on Unsaturated Soils - "E-UNSAT 2016", Vol. 9, 11011, 2016.
- 10) Da Re, G.: Physical Mechanisms Controlling the Pre-Failure Stress-Strain Behavior of Frozen Sand, Ph.D. Thesis, Department of Civil and Environmental Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA., 2000.
- 11) Frattolillo, A., Giovinco, G., Mascolo, M.C., and Vitale, A.: Effects of hydrophobic treatment on thermophysical properties of lightweight mortars, *Experimental Thermal and Fluid Science*, Vol. 29, pp. 733–741, 2005.
- 12) Goebel, M.O., Woche, S.K., Bachmann, J., Lamparter, A., and Fischer, W.R.: Significance of wettability-induced changes in microscopic water distribution for soil organic matter decomposition, *SOIL PHYSICS, Soil Science Society of America Journal (SSSAJ)*, Vol. 71, No. 5, pp. 1593-1599, 2007.
- 13) Kim, D.H., Kim, Y.J., Lee, J.S., and Yun, T.S.: Thermal and Electrical Response of Unsaturated Hydrophilic and Hydrophobic Granular Materials, *Geotechnical Testing Journal, ASTM*, Vol. 34, No. 5, pp. 1-9, 2011.
- 14) Lourenço, S.D.N., Wang, G-H., Kamai, T.: Processes in model slopes made of mixtures of wettable and water repellent sand: implications for the initiation of debris flows in dry slopes, *Engineering Geology*, Vol. 196, pp. 47-58, 2015.
- 15) Sun, C., Aston, D. E., and Berg, J. C.: Structural evolution of octyltriethoxysilane films on glass surfaces during annealing at elevated temperature, *Journal of colloid and interface science*, Vol. 248, No. 1, pp. 96-102, 2002.

航空レーザー測深による旭川河道の計測と洪水流解析精度向上への応用

岡山大学 大学院環境生命科学研究科 准教授

吉田 圭介

一級河川の河道測量は原則、縦断 200m 毎の定期横断測量により行われるが、河川の治水や水環境の詳細を検討する上で必ずしも十分とは言えない。例えば、近年、問題となっている河道の樹林化のプロセスではリーチスケール程度以下の局所的な流水、砂州、樹木の相互作用を検討することが重要だが、200m 毎の計測では微小な砂州は捉えられない。また、従来の航空測量(LP)は近赤外波長域のレーザーを用いるため、測量範囲は河道陸部に限られる。そのため、小規模の砂州によって形成される、横断測線に対して直交しない、入り組んだ複数の水みちなどは従来の測量では十分に再現できない。一方、近年、緑色波長域のレーザーを併用した航空レーザー測深(ALB)の技術が実用化され、国土交通省では河川事務所単位で試験的な運用に供される段階に入った。ただし、現在、水面下や植生が密生する砂州上での測量精度は明らかではなく、また、河川管理への ALB の応用に関しては現在、模索段階にある。そこで、本研究では砂州上に樹木が密生する旭川下流河道の約 7km 区間を対象に ALB 計測を行い、河道地形の精度検証を行った。また、ALB から河道内の植生データの面的分布を得て、河川の洪水流解析精度の改善効果を検討した。

1. はじめに

従来、一級河川では河道の地形情報を得る手段として、航空レーザー測深 LP や、縦断 200m 毎の河道縦断測量が行われている。そのため、低水路側線間の情報は基本的になく、洪水に伴う深掘れの把握が十分でない場合や、洪水流解析の精度が地形の再現に制限される場合がある。また、近年、河道の樹林化が全国の河川で問題となっており、本研究で対象とする旭川下流部では礫河原の減少や河川環境の固有の生物種の減少などの課題がある。治水面を考えると、樹林化が進行した河道では平面 2 次元の洪水流解析等を用いて洪水疎通能力を適切に把握することが重要であり植生情報(植生種分類、植生高、密生度)を精度良く設定することが重要である。

そこで、本研究では河川管理手法の高度化を目指して、近年実用化されつつある緑色レーザーと近赤外レーザーを併用した航空測深技術(ALB)を用いて次の調査研究を行った。1) ALB から得られる水陸連続の高解像度地形データの精度検証を行う。2) 河道内の植生種の空間分布を把握するために、ALB の点群データから木本類、草本類および竹林を判別する方法を検討する。3) ALB 計測によって得られる植生の高さや現地の実測値とを比較し、精度検証を行う。4) 最後に、ALB 計測から生成される点群データを用いて樹木群の密生度を算定する方法を検討した。

2. ALB 計測データの精度検証

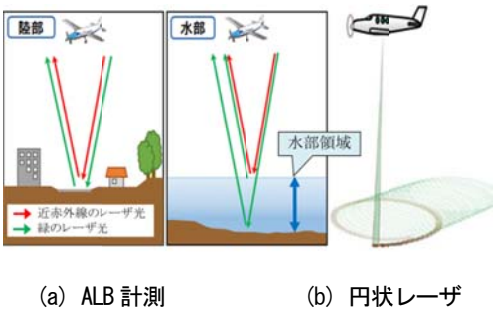
1) ALB の計測概要

ALB は、従来の航空レーザー計測で用いられる近赤外線波長域のレーザー測距儀と、緑色波長域のレーザー測距儀の 2 つを用いて、陸部と水部の地形を計測するシステムである。

図-2.1(a)に ALB の計測の模式図を示す。

2) ALB 計測の対象区間と計測仕様

岡山県旭川下流部にて、平成 28 年 3 月(河川距離標 9k5 ~15k0)と平成 29 年 3 月(河川距離標 9k5 ~17k5)に Leica



(a) ALB 計測 (b) 円状レーザ

図-2.1 ALB 計測概念と円状レーザ走査概念

表-2.1 機器仕様と計測諸元

	項目		内容
	機器名	波長帯	Leica Chiroptera II
機器仕様	レーザー測距儀の波長帯	近赤外線	1,064nm
		緑	515nm
計測仕様	レーザー照射数	近赤外線	20 万発/秒
		緑	3 万 5 千発/秒
	対地高度		500m
	飛行速度		220km/h
	計測点密度	近赤外線	0.5×0.5m に 2 点以上
		緑	1.0×1.0m に 2 点以上

Geosystems 社の Leica Chiroptera II を用いて ALB 計測した。この区間は、岡山市の市街地に位置し、川幅が約 200～300m である。みお筋の固定化により中州が発達し、樹木が繁茂している箇所が点在する。なお、現地調査との比較の都合、以下の 2, 3, 4 章では H28 の ALB データ、5 章では H29 の ALB データを用いている。

(3) 定期横断測量データ

横断測量成果は、国土交通省中国地方整備局岡山河川事務所において、ALB 計測時に最も近い時期に整備された平成 25 年成果を用いた。横断測量と ALB の取得時期が約 3 年違うため、経年変化を留意する必要がある。

(4) 結果と考察

本検証では、異なる被覆状況ごとの位置精度を評価するために 4 つの横断測線を選定した。対象地区の水部で、大きな経年変化が認められない測線のうち、上流・中流・下流ごとに草本・樹林の植生被覆域が存在する 3 測線(11k8, 13k0, 14k0)と、グラウンドや砂礫河原が多い測線(9k6)を精度検証測線に選定した。表-2.2 に、4 つの測線における道路・グラウンド区間、草本や樹林の植生被覆区間、砂礫河原区間、および河床区間(水部)ごとの精度検証結果を示す。

公共測量における航空レーザ測量の精度管理では、道路やグラウンドといった平坦地に、基準点測量により検証点を設置し、検証点との平均較差、又は平均二乗誤差(RMSE)を 0.25m 以内に保つことと定められている¹⁾。表-2.2 の道路やグラウンドの地区では、基準を十分に満たす 10cm 以下の位置精度を有していることが確認できる。砂礫河原区間や河床区間は、数 cm から十数 cm 程度の大きさの石が点在するため、道路やグラウンドといった平坦地に比べ、RMSE が高い値を示したと考えられる。植生被覆域も同様に植生の影響で平坦地に比べ高い値を示した。これは植生を計測した点や地形の凹凸による影響と考えられる。表-2.3 では、河床区間に着目し、水深ごとの RMSE と点密度を整理した。RMSE の結果より、最大水深 4.6m までの本区間では、水深に伴う位置精度への影響は認められない。水深が大きい区間では、レーザ光の減衰や拡散により計測点が減少したと考えられる。ALB 計測では、水深の点密度減少による河床地形の再現性の低下を留意した計測計画が必要であることがわかった。

表-2.2 横断測量成果との高さ位置精度の比較結果

	陸部			水部
	道路やグラウンド区間	砂礫河原区間	植生被覆区間	河床区間
検証点数	50	22	121	120
平均誤差(m)	-0.045	-0.043	-0.019	0.040
最大誤差(m)	0.091	0.255	0.344	0.512
RMSE(m)	0.057	0.079	0.103	0.179

表-2.3 水部における横断測量成果との比較結果

	水部 河床区間				
	0～1m	1～2m	2～3m	3～4m	4～4.6m
検証点数	26	40	28	19	7
平均誤差(m)	0.005	0.024	0.138	0.025	-0.048
最大誤差(m)	0.368	0.512	0.492	0.430	0.381
RMSE(m)	0.143	0.192	0.196	0.197	0.158
平均点密度(点/m ²)	1.9	1.7	1.2	0.7	0.6

表-3.1 植生高と密生度の関係(前野ら²⁾)

植生の分類	木本類		草本類		竹林
	低木	高木	柔	硬	
旭川における優先種	ヤナギ類		シナダレスズメガヤ	ツルヨシ	マダケ
l:植生高(m)	0<l≤5	5<l≤15	0<l≤1.5	0<l≤2	0<l≤12
λ:密生度(本/m)	0.023	0.013	0.031		0.286

3. ALB 点群を用いた植生種分布の判定手法の検討

本研究では表-3.1 に示すように竹林、木本、草本など密生度が異なり流水抵抗に影響する植生種の空間分布も簡易に把握できれば、洪水流解析の精度向上が期待できるため河川工学上の意義は大きい。そこで、本章では 2016 年 3 月に旭川下流部(9k0~15k0)で実施された ALB 計測のデータから草本類、木本類および竹林を判別する方法を検討した。

(1) 航空レーザ測深(ALB)の計測

a) 対象区間と計測機器

第 2 章 (2)と同様であり、説明を省略する。

b) 計測結果

本計測では、ALB 計測と同時に航空写真撮影を実施した。図-3.1 には、ALB 点群を断面表示した例を示す。得られた三次元の ALB 点群により、水陸の連続的の形状や樹林の状況を再現でき、任意の位置での横断形状の表現が可能となる。

c) 対象区間の説明と手法の概要

本手法の検討を行った区域は旭川と百間川の分流部周辺とした。この区域では、著者らが実施した現地調査から、様々な植生種が観察されることが分かっているが、本研究

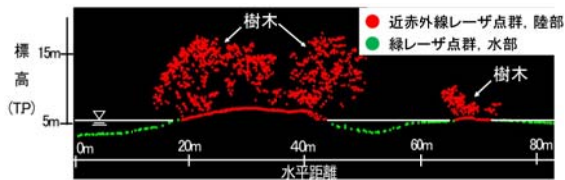


図-3.1 ALB 点群の断面表示例

表-3.2 点群データ数による植生分類

点群データ数	分類	備考
6～9	裸地	植生高30cm未満
6～9	草本	植生高30cm以上
10以上	木本	

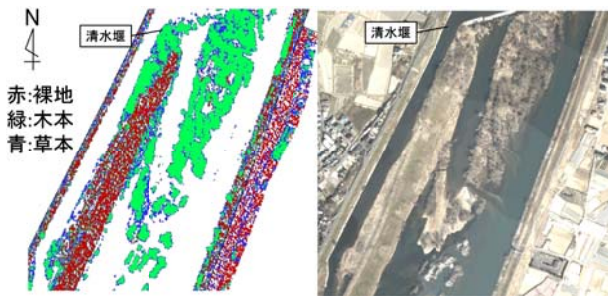


図-3.2 清水堰下流部における植生分類の結果
(左:植生分類, 右:航空写真)

では流水抵抗の観点から、植生の種類を木本、草本、竹林の3つに分類した。

(2) 植生種分布判定種法

ALB 点群は飛行航路の両端では分布密度が高い傾向にある。そこで、前処理として本研究ではその影響を排除するために対象領域を1辺0.5mの立方体(ボクセル)を用いて3次元領域分割し、各ボクセル中に複数のALB 点が存在する場合は最も標高の高い点以外を消去した。ALB 計測範囲を対象に格子幅2mの平面2次元正方格子(2m メッシュ)を作成し、上記のボクセル群を2m メッシュに落とし込んで各メッシュに存在する点群データ数を算出した。また、構造物が存在しないメッシュにおいては、地盤以外を捉えた最も高い計測点の鉛直座標から地盤を捉えた計測点の鉛直座標を差し引いた値を植生高とした。既往研究では表-3.2に示す点群データ数と植生分類の関係から2m メッシュ毎に裸地、木本、草本に分類した。ただし、ALB 計測では植生被覆箇所では地盤高に30cm程度の誤差があるため、30cm未満の草本類は判定できていない。図-3.2は清水堰下流部での植生分類と航空写真との比較を示し、分類の妥当性を概ね確認できた。

(3) 竹林の判定手法の検討

対象区間で見られる植生は木本と草本がほとんどである

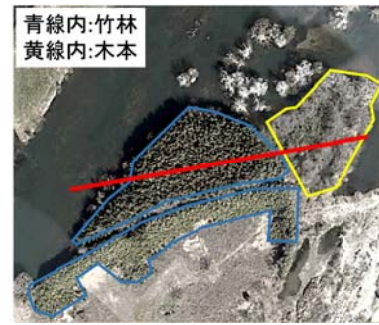


図-3.3 竹林分類の対象範囲(旭川 12k2 付近)

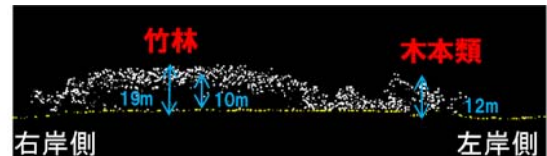


図-3.4 点群の断面表示(図-3.3の赤線上)

表-3.3 植生高カテゴリ

植生高(DSM-DTM)	植生高カテゴリ
0m～5m以下	5m
5m～10m以下	10m
10m～15m以下	15m
15m～20m以下	20m
20m～25m以下	25m

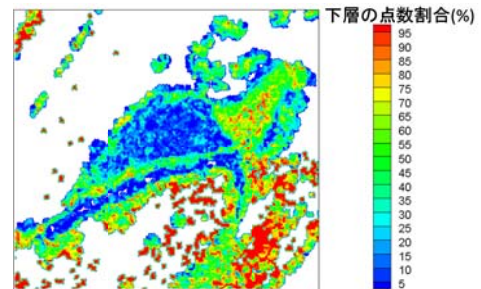


図-3.5 分流部周辺の下層割合

が、航空写真や現地踏査結果からは分流部周辺(旭川 12k2)の砂州上では竹林の存在が確認されている。図-3.3の青線と黄線内では木本と竹林が混在するが、この範囲は木本類と判定されている。そのため、別の手法を考え、竹林と木本類の分類を行う。図-3.4ではレーザ点群の断面を示している。竹林は、その他の木本に比べて植生高の半分より高いところにレーザ点群が集中していることが分かる。そのため、レーザ点群の鉛直分布に着目して竹林の分類を試みた。まず、2m メッシュごとに植生高を算出し、また、計算処理を簡素化するために植生高は表-3.3の簡易な植生高カテゴリごとに分類を行った。その後、2m メッシュごとの領域におけるレーザ点群の総数と、地盤から植生高カテゴリの1/2の高さに存在するレーザ点群の点数の割合を算出した。そして図-3.5の下層の点数の割合が、概ね40%以

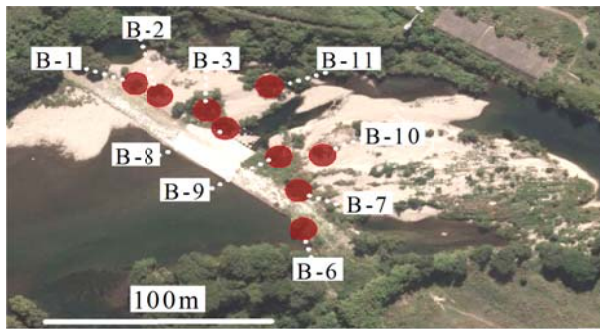


図-4.1 樹高計測位置

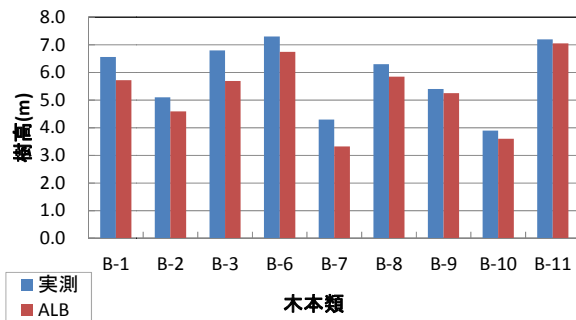


図-4.2 ALB 計測と実測の樹高

下が竹林であったため閾値を 40% とした。その結果、対象箇所における竹林の判定が概ね可能となった。

4. ALB 計測で得られた植生高データの精度検証

2016 年 3 月の ALB 計測から樹木の高さを算出し、著者らの研究室で行っている現地調査での樹高のデータとの比較を行った。比較に用いた樹高のデータは、ALB 計測と最も近い時期の平成 28 年 2 月の計測結果である。現地調査では、標尺と逆目盛検測竿を用いて、目視で樹木の高さを計測している。計測した樹木位置を図-4.1 に、ALB 計測と実測の結果を図-4.2 に示す。ALB による全ての樹高は、現地調査より数十 cm 程度低い値を示す結果となった。その要因は、計測時期が冬であったため、樹木の頂点付近は落葉しており、ALB 点群が樹木の頂点に当たりにくいと考えられること、また、実測で使用している逆目盛検測竿のしなりの影響や目視での計測による現地での誤差といった、双方の誤差の影響であると考えられる。しかし、樹高の傾向は捉えることができた。今後、他の樹林帯や調査箇所での検証を重ねていく必要がある。

5. ALB を用いた樹木群の密生度算定手法の検討

これまで著者等は樹林化が懸念される旭川下流河道を対象に洪水解析を行ってきたが、その際に用いる密生度

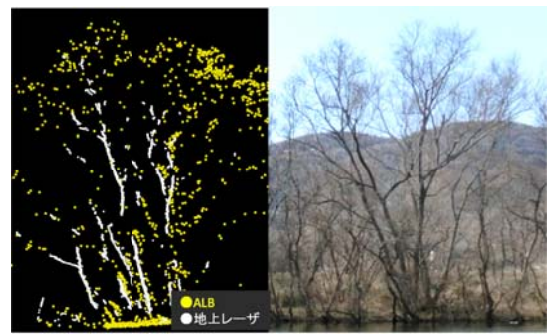


図-5.1 ALB 点群の断面表示例
(左: 点群の断面図, 右: 実際の樹木)

表-5.1 樹木の密生度に関する現地調査の結果

調査箇所	樹木の本数	胸高直径平均(m)	密生度(m^{-1})
大原 1	8	0.150	0.012
大原 2	12	0.155	0.019
大原 3	13	0.170	0.022
祇園 1	8	0.152	0.012
祇園 2	21	0.098	0.021

は、実際には値が大きくばらついていた。また、現地調査では作業者が比較的容易に踏査できるような、樹木が比較的疎らに繁茂する箇所を選んでいるため、河道全体では密生度を過小評価している可能性が懸念される。上記の課題を克服するため、ALB の点群データから樹木群の密生度を算定する方法を新たに検討する。

(1) ALB 点群を用いた密生度算出方法の検討

a) ALB 計測の概要

第 2 章 (2) と同様であり、説明を省略する。

b) 樹木存在下の ALB 点群の分布特性と密生度

対象領域内の中原箇所において、中州に繁茂する樹木の現地視察を行った。図-5.1 には視察対象の樹木群と、対応する ALB 点群および地上レーザ点群の断面例（奥行き 2m）を示した。この図から、地上レーザでは点群が樹木の主幹や太い枝に多く存在することが分かる。一方、ALB ではレーザ点群が樹冠付近の小枝に多く存在するが、樹木下層部の幹や太い枝にもある程度、存在することが分かる。

著者らは樹木下層部の単位高さ当たりの ALB 点数と、樹木群の密生度（または、幹や枝などの実質的な抵抗要素の存在率）には相関があるのではないかと考え、以下の通り、密生度の算定方法を検討した。

(2) ALB 点群を用いた密生度の算定方法

a) 密生度に関わる ALB データの抽出

本研究では樹木の下層部分の ALB 点群に着目し、そ

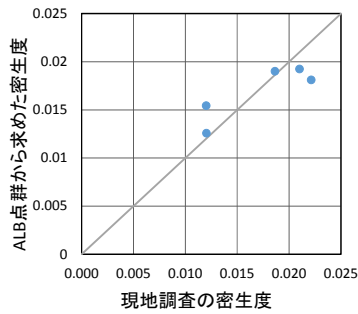


図-5.2 ALB 点群から求めた密生度の解析値と
現地調査の密生度の観測値

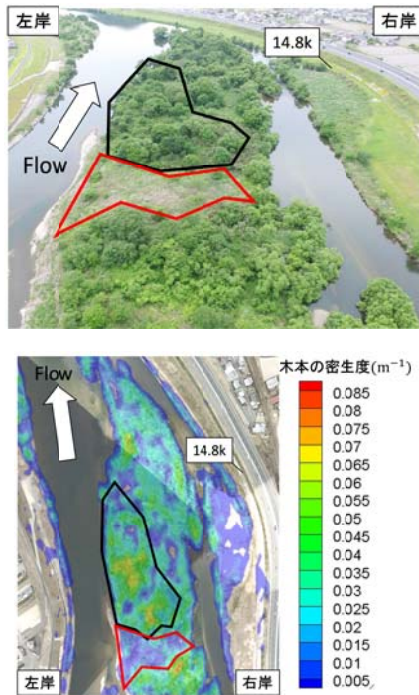


図-5.3 10m メッシュでの木本類の密生度と空中写真の比較

こから密生度を算定する方法を検討した。試行錯誤の結果、本研究では地盤高+0.5m の高さから植生高の 1/4 の高さまでの鉛直距離に含まれる点数を求め、点数を距離で除して単位高さ当たりの点数 n^{\square} を求めた。

b) ALB 点群データと密生度の関係式

本研究では試みとして、木本類と分類された 2m メッシュでの点数 n^{\square} から、2m メッシュでの密生度 I^{\square} を以下の一次線形関係式から求めた。

$$I^{\square} = a n^{\square} + b \quad (5.1)$$

ここで、係数 a, b は現地調査のデータから定める。

式(5.1)を用いると、現地調査の小領域における樹木群の密生度の算定値 \bar{I} は以下の通り、算定される。

$$\bar{I} = \frac{p}{N} \cdot \sum_{i=1}^N I_i^{\square} \quad (5.2)$$

表-5.2 解析ケース毎の地形・植生データの相違

解析ケース		本研究	既往研究1	既往研究2
地形	高水敷・砂州	ALBデータ	ALBデータ	2006年、2009年のLPデータ
	低水路	ALBデータ	ALBデータ	2009年定期横断の内挿
植生	植生高	ALBデータ	ALBデータ	2005年の現地調査を基に6年間の植生消長計算
	木本	(5.1)式に基づいた	表-3.1に基づいた	表-3.1に基づいた
	草本	表-3.1に基づいた	表-3.1に基づいた	表-3.1に基づいた
	竹林	表-3.1に基づいた	表-3.1に基づいた	表-3.1に基づいた

ここで、 i はメッシュ番号、 N は小領域において木本類と分類された 2m メッシュの数、 p は小領域において木本類と分類されたメッシュの割合である。現地調査箇所ごとに式(5.2)から密生度 \bar{I} を求め、これを観測値と比較して、最小二乗法から式(5.1)の係数 a, b の値を決定した。その結果を図-5.2 に示す。密生度の算定値 \bar{I} が現地のそれと必ずしも合わない理由は、調査箇所が少ないことに加えて、 \bar{I} には主幹以外の太い枝の影響が入り込むためと考えられる。

(3) 洪水流の解析格子(10m メッシュ)での適用性

後述の洪水流解析では幅が約 10m メッシュの境界適合格子を使用する。図-5.3 には祇園地区周辺の砂州上における、解析格子スケールでの木本類の密生度のコンターを示す。密生度は式(5.2)と同じ考えで求めた。また、比較のために同地区を 2017 年 5 月にドローンで撮影した際の空中写真を併示する。空中写真では樹冠には多く葉が付いており、密生度そのものは分らないが、樹木繁茂の粗密の違いと密生度の値が対応することが分かる。また、低水路河岸の水際にある樹木群に対しても本数が少ない場所では密生度が小さいことが読み取れる

(3) ALB データを用いた流況解析

a) 流況解析の概要

本章では得られた密生度の値の妥当性を定量的に検討するために、2011 年 9 月に生じた旭川の洪水(ピーク流量 3403m³/s)を対象に平面 2 次元流況解析を行い、縦断水位と分流量に関して本研究の解析結果と観測値及び既往研究 1³⁾、既往研究 2⁴⁾比較する。解析対象期間は 2011 年 9 月 3 日 6 時から 9 月 5 日 18 時までの 60 時間とした。解析範囲は旭川の 10.6km～17.5km の区間、および分流部から百間川の 12km までの区間とした。また表-5.2 に解析ケースの条件を示す。

b) 解析の結果と考察

図-5.4には流量ピーク (9月4日21:40) 時間帯にお

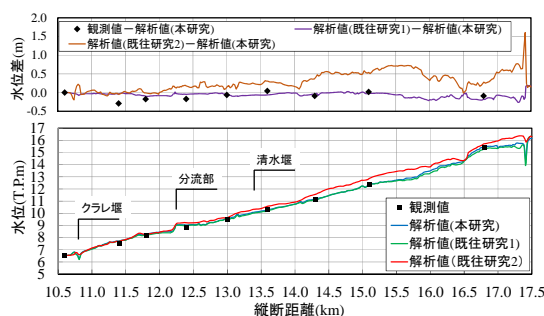


図-5.4 旭川の縦断水位と水位差(9/3 21:40, 約3400m³/s)

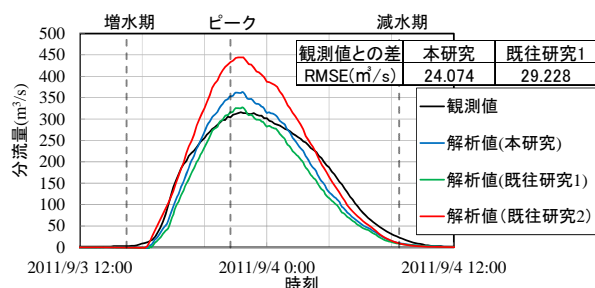


図-5.5 百間川への分流量(原尾島橋での断面流量)

ける河道中央の縦断水位を示す。本研究と既往研究1では水位に違いがあまり見られなかったが全体的に10cm程度水位が上昇し、密生度の分布を考慮した効果が現れていた。ALBデータを用いた2ケース（本研究、既往研究1）に比べて、既往研究2のケースでは観測値から大きく離れた箇所が存在し、数値解析にALBデータを使用する有用性を理解することができる。

本研究と既往研究1では図-5.5よりピーク流量に約50 m³/sの差が生じており、密生度の空間分布を考慮した影響が明確に現れていた。ピーク時に関しては既往研究1が観測値に近いが、増水期、減水期では本研究がより近い。定量的な判断は難しいが、観測と解析の平均二乗誤差(RMSE)の値から考えると密生度の分布まで考慮した本研究の結果は観測値に最も近いことが確認できた。

6. まとめ

本研究で得られた知見を以下に纏める。

- 定期横断測量との比較から、陸部・水部を含めてALB計測は数cmから数十cm程度の誤差で河床形状を再現できる。また、ALB計測では水陸に渡って連続的に河道全体の形状が計測できる。
- ALB点群データの平面密度数を基に、クラスター

グ処理を施すことにより、河道内に繁茂する草本類と木本類の平面分布を得る手法を構築した。航空写真や現地踏査結果と比較することで、現地の状況を概ね再現できることが示された。

- 河道砂州上の樹木の高さに関して、ALB計測値と現地での実測値を比較した結果、全体的にALBデータがやや小さいことが分かったが、定性的に両者は一致することが分かった。今後、検証範囲を拡大して計測精度を確認することで、ALB計測は植生管理においても有用なツールとなり得る。
- 1辺2mの正方領域毎に樹木下層の単位高さあたりのALB点数から、樹木群の密生度を得る算定式を作成し、密生度の現地調査の結果を基に算定式の定数を決定した。得られた密生度を用いて2011年の旭川洪水を対象に平面2次元流況解析を行った。その結果、既往研究と比較して、縦断水位や分流量の再現性が向上した。

参考文献

- 1) 財団法人 日本測量調査技術協会：図解 航空レーザー計測 基礎から応用まで, pp.172-181, 2008.
- 2) 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
- 3) 吉田圭介, 前野詩朗, 間野耕司, 岩城智大, 小川修平, 赤穂良輔：航空レーザー測深を用いた河道の植生種分布の判定手法の検討, 土木学会論文集 A2(応用力学), Vol.73, No.2, pp. I_607-I_618, 2017.
- 4) 吉田圭介, 前野詩朗, 藤田駿佑, 松山悟, 岩城智大, 平井康隆：旭川における植生分布の経年変化を考慮した洪水流の数値解析, 土木学会論文集 B1(水工学), Vol.71, No.4, pp. I_1039-I_1044, 2015.

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は、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。さらに、株式会社パスコの間野 耕司様、井関 禎之様、ならびに岡山大学大学院 環境生命科学研究科の山口華穂さん、小川修平君には本研究の現地調査、解析結果の整理等で大いにご協力頂きました。記してお礼申し上げます。

(表 題)

卵の老化に伴うオルガネラの動態・機能の解析

(所 属) 岡山大学大学院環境生命科学研究科

(氏 名) 若井 拓哉

(概要) 加齢による不妊の要因は多岐にわたるが、卵の数の減少や「卵の老化」による細胞機能の低下が主要因としてあげられる。これまで、ミトコンドリアや小胞体などのオルガネラの異常と卵の老化を関連付ける研究結果が報告されているものの、詳細なメカニズムは不明である。そこで、卵母細胞や受精卵におけるミトコンドリアの細胞内分布やその動態に着目し、加齢した卵では減数分裂時のミトコンドリアの動態異常が卵の機能低下の原因になるという仮説を立てた。本研究では、まず正常な卵母細胞の減数分裂過程および受精後の初期発生過程におけるミトコンドリアの細胞内分布を解析し、ATP 濃度との関連を明らかにした。減数分裂過程のミトコンドリアは第一減数分裂で紡錘体周囲に顕著なクラスター形成を示すが、この時期の ATP 濃度が一過性の上昇を示すことが分かり、紡錘体形成とミトコンドリアによる ATP 生産の関連性が示唆された。初期発生過程ではミトコンドリアは卵割時に割球間で均等に分配され、割球間で明確な差が認められなかった。これらの結果から、卵や初期胚におけるミトコンドリアの動態と ATP 濃度の関係が明らかになった。今後は、加齢マウスから採取した卵や受精卵を用いて正常卵との差異を検討する。

(背景)

成長を完了した卵母細胞は、第一減数分裂前期で細胞周期を停止しており、卵核胞 (Germinal Vesicle; GV) と呼ばれる巨大な核を持つ。卵母細胞は一過性に放出される性腺刺激ホルモンの刺激により減数分裂を再開する。まずはじめの形態的变化として、卵核胞崩壊 (Germinal vesicle breakdown; GVBD) が起こり、染色体が凝集し分裂期へ進行する。第一減数分裂中期 (Metaphase I; MI) に、染色体は紡錘体を形成し、マイクロフィラメント等の細胞骨格の働きによって卵細胞質表層へ移動し、終期を経て染色体の半数を第一極体として放出した後、第二減数分裂の中期 (Metaphase II; MII) で細胞周期を再び停止する。こうした第一減数分裂前期の停止の再開から第二減数分裂中期の再停止までの一連の減数分裂過程は卵成熟と呼ばれる。

ミトコンドリアは卵成熟過程で細胞内分布を変化させることが知られている (1)。GV 期のマウス卵におけるミトコンドリアは、核周辺への集中は見られるもののミトコンドリアは細胞質全体に分散して分布する。GVBD 期においても、ミトコンドリアは卵細胞質中に散在するが、MI 期では紡錘体の周囲にクラス

ター化したミトコンドリアが局在する。MII 卵子では紡錘体周囲に集中したミトコンドリアが観察されるものの、大部分は再び細胞質中に分散して分布する。これらのミトコンドリアの細胞内分布の変化には何か生理的な役割はあるのであろうか。卵成熟過程で起こるミトコンドリアのクラスター形成が ATP 産生の増加と関連していると報告されているが (2)、その局在様式は持つ生理的な機能についてはほとんど解明されていない。

ミトコンドリアによる ATP 産生は受精や初期胚発生の進行にも重要であることが知られている。ミトコンドリアの機能を阻害すると、受精や胚発生の進行が停止し、アポトーシスが増加することも報告されている (3)。特に初期胚におけるミトコンドリアの動態は不明な点が多く、卵割時にミトコンドリアが割球間で分配される仕組みについて謎が多い。

「卵の老化」による細胞機能の低下の要因として、ミトコンドリアの異常が関連する研究結果が多数報告されている (4)。本研究では、その詳細なメカニズムを解明する前の段階として、正常な卵や初期胚におけるミトコンドリアの動態や ATP 濃度を解析した。

(材料と方法)

マウス卵および初期胚の採取

動物実験は、岡山大学動物実験規則に従い行った。卵母細胞は8~12週齢のBDF1雌マウスの卵巣から採取した。卵巣から採取したGV期卵母細胞を取り囲む卵丘細胞をピペッティングにより取り除き、単離した卵母細胞をM-16培地に移し、37度、5% CO₂の条件下で成熟培養した。初期胚は、性腺刺激ホルモンにより過剰排卵処置を行った雌マウスを雄マウスと交配させ、翌日に卵管から採取した受精卵をKSOM培地に移し、37度、5% CO₂の条件下で発生培養した。体外胚培養開始24時間後に2-細胞期、36時間後に4-細胞期、48時間後に8-細胞期、72時間後に桑実胚期、96時間後に胚盤胞期の胚の観察を行った。

ミトコンドリアの可視化

ミトコンドリアの染色は、1 μ M MitoTracker® RedCMXRos (Molecular probes) を含むM-2培地で30分間培養することにより行った。またミトコンドリアのGFPによる可視化のため、ミトコンドリア局在化シグナルをCoxVIII配列からPCRにより増幅し、GFP配列を含むプラミドDNAに挿入した。In vitro転写 (Ambion) を用いてcDNAからRNAを合成し、卵母細胞質中へマイクロインジェクションを行った。染色またはGFPで標識したミトコンドリアは、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) を用いて観察した。

ATP濃度の測定

ATP濃度の測定は、京都大学・今村らが開発した蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理に基づいたバイオセンサー, ATeamを用いた。ATeamをコードするcDNAからIn vitro転写によりRNAを合成し、GV期の卵母細胞にマイクロインジェクションを行った。ATP濃度はCFPおよびYFP蛍光画像をそれぞれ蛍光顕微鏡を用いて取得し、YFP/CFP蛍光強度比により評価した。

(結果および考察)

卵成熟過程におけるミトコンドリア動態とATP濃度

卵成熟過程におけるミトコンドリアの動態は、MI

期に紡錘体の周囲に集中し、卵表層へ移動した (図1)。第一極体の放出後、凝集したミトコンドリアの大部分は卵細胞質中へ分散した。

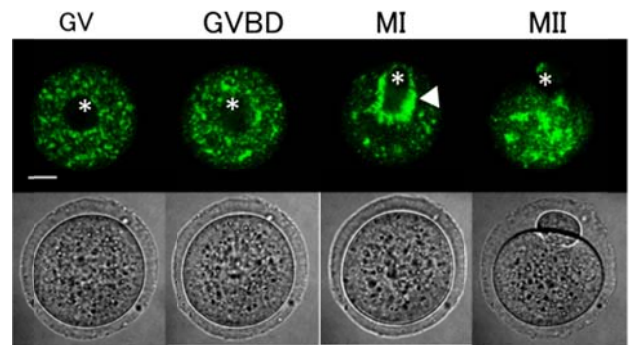


図1. 減数分裂過程におけるミトコンドリアの細胞内分布. 紡錘体の(*)周囲に集中したミトコンドリア (矢頭).

卵成熟過程におけるATP濃度を計測した結果、GVBDが起こる成熟開始後2時間までに顕著なATPレベルの減少がみられた (図2)。GVBDの遂行にはCdk1やPlk1キナーゼ等の多くのM期キナーゼの活性化が必要となるため、この減少はATPの消費による可能性が考えられる。一方、MI期に相当する成熟開始後7~8時間に一過性のATPレベルの上昇が観察された。

上述したように、MI期では顕著なミトコンドリア

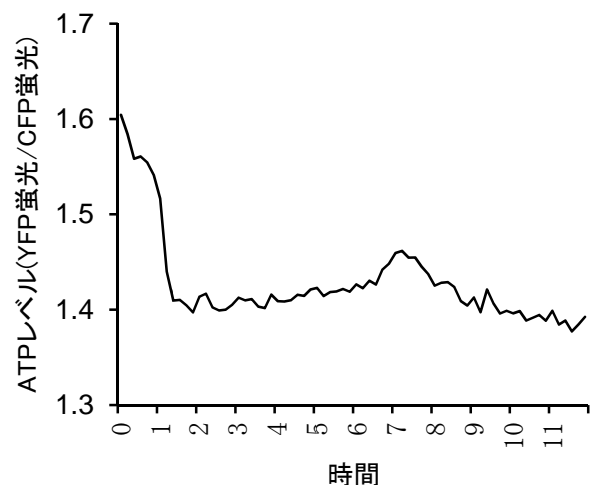


図2. 卵成熟過程におけるATP濃度の変化.

の凝集が観察されるため、この局在変化がATPレベルの上昇に寄与した可能性が考えられる。

ミトコンドリアの空間的配置がATPを介して何らかの細胞内反応に関わっているのかもしれない。

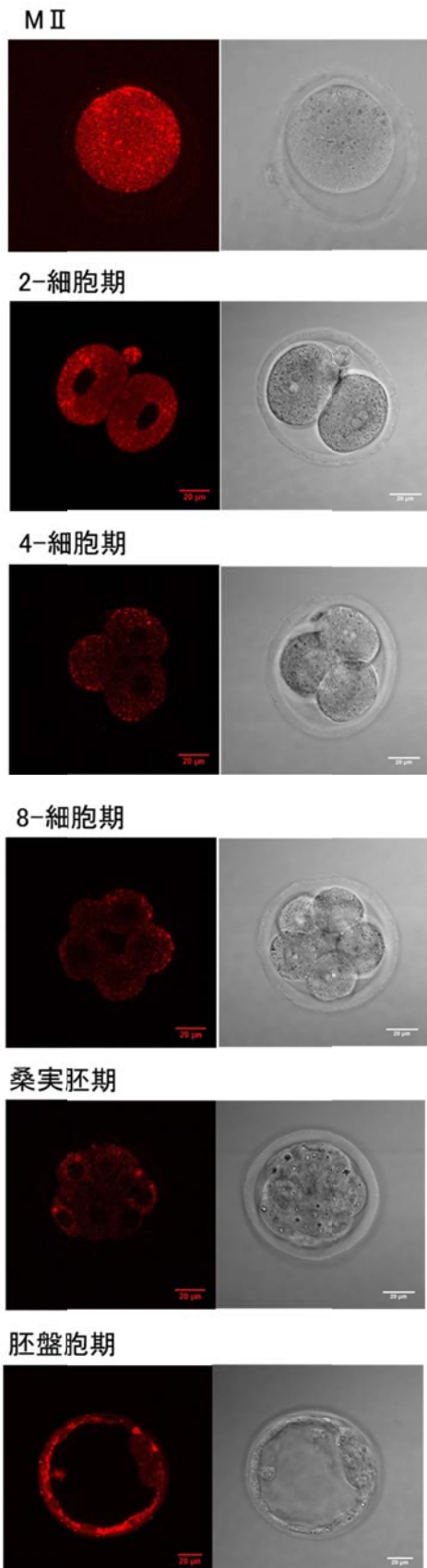


図3. 初期胚におけるミトコンドリアの細胞内分布.

初期胚におけるミトコンドリア動態

初期胚のミトコンドリア細胞内分布を調べた結果、

2-細胞期胚～胚盤胞期まで、全てのステージでミトコンドリアは細胞質中に分散して分布することが分かった (図3)。また8-細胞期までの卵割で、各割球間でミトコンドリアの分布に明瞭な差がなかったことから、卵割時にミトコンドリアは割球間で均等に分配されることが示唆された。

ミトコンドリアの機能阻害が卵成熟過程の紡錘体の形成異常に繋がる報告(5)や初期胚のアポトーシスに繋がる報告があることから(3)、ミトコンドリアの正常性は卵や胚の正常性と深く関わるものが広く知られている。今後、加齢マウスから採取した卵や胚のミトコンドリアを解析することで、卵の老化との関わりも明らかにされ、不妊治療への糸口が見出されることが期待される。

(謝辞)

本研究を支援いただいたウエスコ学術振興記念財団に深く感謝いたします。

(参考文献)

- (1) 若井拓哉. マウス卵母細胞におけるミトコンドリアの細胞内局在. Journal of Mammalian Ova Research, 29: 155-160 (2012).
- (2) Yu Y, Dumollard R, Lai FA and Swann K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. J Cell Physiol, 24: 672-680, (2010).
- (3) Dumollard R1, Carroll J, Duchon MR, Campbell K, Swann K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. Semin Cell Dev Biol. 20: 346-53, (2009).
- (4) Tilly JL and Sinclair DA. Germline energetics, aging, and female infertility. Cell Metab, 17: 838-50, (2013).
- (5) Zhang X, Wu XQ, Guo YL, Lu S and Ma X. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. Cell Res, 16: 841-850 (2007).

含フッ素天然化合物をリードとした化合物ライブラリーの構築

岡山大学大学院環境生命科学研究科（農）

泉 実

核酸系抗生物質 Nucleocidin の生合成経路の解明、低分子医薬および核酸医薬としての有効利用を目指し、Nucleocidin をリード化合物とした化合物ライブラリーの構築を目的とした。Nucleocidin の効率的な合成経路および大量合成法の確立するために、アデノシンを出発化合物として種々反応条件の検討を行い、二重結合を有する重要中間体の合成経路を確立した。また二重結合へのハロゲン基の導入方法を検討するために、NXS 存在下、グルカールと 4-ニトロフェノールまたは 4-ニトロフェノール銀塩を用いたグリコシル化について検討した。トリアセチルグルカールに *N*-ハロゲノスクシンイミドと 4-ニトロフェノール銀塩を作用させると、4-ニトロフェニル基がジハロゲン化された 2,6-ハロゲノ-4-ニトロフェニル糖を得た。NBS と NIS を用いるとフェニル基のハロゲン化を伴いグリコシル化反応が進行したが、NCS では進行しないことがわかった。

【背景】「核酸医薬」は、核酸を疾患の原因となる DNA や RNA、あるいはタンパク質に直接作用させることで病気を改善または治癒させることを目的としている。現在の医薬品の主流として「低分子創薬」と「抗体医薬」があるが、低分子医薬における創薬ターゲットの枯渇やブロックバスターの登場、また、抗体医薬は高い特異性と副作用の軽減が期待されるものの、その大量生産やコストの面にと、それぞれに課題がある。それらの課題を将来的に解決できる可能性があるとして核酸医薬が注目されている。現在、全世界で上市・承認された医薬品が 5 品目ながらも、産学官問わず創薬ターゲットとして期待されている。天然には塩素、臭素、ヨウ素と言ったフッ素以外のハロゲンを有する有機化合物が約 3500 種類も見出されているのに対し、有機フッ素化合物は極めて少なく約十数種の化合物のみである。我々はこれまでフッ素 (F) 基を有する糖質誘導体の合成について検討してきたことから、そこで本研究では天然物の一つである核酸系抗生物質 Nucleocidin (Fig. 1) に着目した。放線菌 *Streptomyces calvus* が生産する Nucleocidin は、タンパク質合成阻害により抗菌作用を示す。リボースの 4 位にフッ素が結合した独特の構造を持っており、生合成経路に興味もたれている。1957 年に単離、1969 年に構造決定された Nucleocidin の有機合成報告例はわずかである。また、現時点では有機フッ素化合物の資源を天然に

求めることも、また医薬品のシーズとなるようなフッ素系生理活性物質が天然に見出されることも期待できないことから、有機合成することが重要な意味を有すると考えている。そこで、本研究では、Nucleocidin の生合成経路の解明、低分子医薬および核酸医薬としての有効利用を目的とし、Nucleocidin をリード化合物とした化合物ライブラリーの構築を目的とした。そして、構築した Nucleocidin 誘導体ライブラリーを用いて、生合成経路の解明、生物試験による医薬品候補の探索を行うこと、さらには集合化や中分子化を行い、核酸医薬としての可能性について検討することとした。

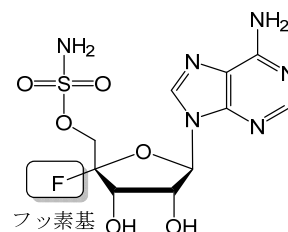
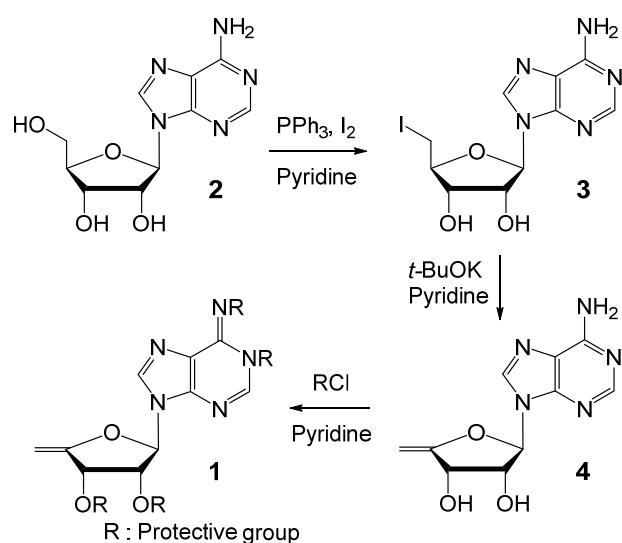


Fig. 1 Nucleocidin

【アデノシン誘導体の合成】

Nucleocidin の合成論文を参考にして種々合成経路の検討を行った結果、二重結合を有する重要中間体 **1** を如何に効率的かつ安価に合成するか課題であると考えた。多くの既報論文では出発化合物として 6-ベンゾイルアデノシンを用いているが、大量合成をする際にはそれほど安価なものではないため、より安価なアデノシン **2** から重要中間体を合成する経路について種々検討した。その結果、フラノー

ス環上のヒドロキシ基はアデニン環上のアミノ基よりも反応性が高く先に保護を受けること（一般的にはアミノ基の方がヒドロキシ基よりも反応性が高い）、また一級ヒドロキシ基よりも二級ヒドロキシ基が先に反応する、など様々な知見を得た。本研究では、Appel 反応による一級水酸基のヨード化、E2 脱離反応による二重結合の形成、最後にヒドロキシ基とアミノ基の完全保護を行い、効率的に重要中間体 **1** を得ることが出来た (Scheme 1)。



Scheme 1 重要中間体 **1** の合成

二重結合を有する重要中間体を合成する目処が立ったので、次に重要な課題として、二重結合へのフッ素基の立体選択的な導入方法について検討することとした。しかしながら、市販されているフッ素化試薬が高価であること、またフッ素はそれほど安全なものではないことから、まずは安価なグルコースから容易に合成できるグルカルを用いて、二重結合へのハロゲン基（ブromo・クロロ・ヨード）の導入について検討した。Nucleocidin 誘導体を合成し、そのライブラリーを構築するためにも、必要な実験であると考えたからである。

【糖加水分解酵素阻害剤の開発を指向した 2-ハロゲン化糖の合成】

2-デオキシ-2-ハロゲン化糖、化合物 **1** は、天然にわずかに存在している 2-デオキシ糖の合成前駆体として、また糖加水分解酵素を阻害することも報告されている[1]。我々もシアル酸の 2 位と 3 位にフッ

素を導入した化合物を設計し、合成して酵素阻害実験を行ったところ、シアリダーゼを阻害することを見出している (Fig. 2)。これは、電子吸引基であるフルオロ基をもつことから、遷移状態が不安定になるため、酵素阻害を示すと考えられている。以上のことから様々な糖加水分解酵素に対して 2-デオキシ 2-ハロゲン糖は阻害効果を示すことが示唆される。そこで本研究では様々な 2-デオキシ 2-ハロゲン化糖の効率的な合成手法の検討を行った。

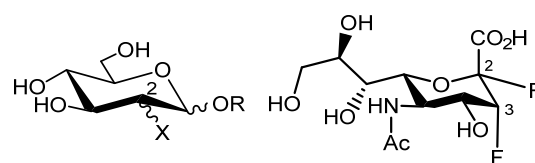
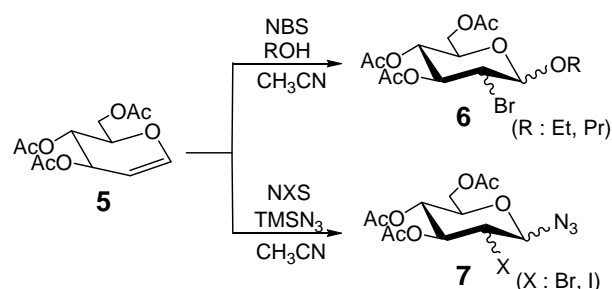


Fig. 2 糖加水分解酵素阻害活性を有する 2-ハロゲン化糖

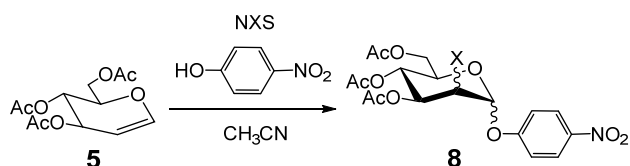
2-デオキシ-2-ハロゲン化糖を合成するために、グリカルと *N*-ハロゲノスクシノイミド (NXS) とのグリコシル化反応に着目した。過去に、竜田らはトリアセチルグルカル **5** に、NBS と様々なアルコールを作用させ、2 位にブromo基を導入した化合物 **6** を合成している[2]。ユースフらはグルカル **5** に、NBS もしくは NIS とトリメチルシリルアジドを作用させ、2 位にブromo基とヨード基を導入した化合物 **7** を合成した。



Scheme 2 竜田・ユースフらの反応

そこで、4-ニトロフェノール (4-NP) が糖加水分解酵素の検出試薬として広く利用されていることから、本研究ではアグリコン部分に 4-ニトロフェニル基を導入した 4-ニトロフェニル 2-デオキシ-2-ハロゲン化糖 **8** を目的化合物として設計した。グルカル **5** と NXS を用いた 4-ニトロフェノールとのグリコシル化から **8** の合成を目指し、**8** の糖加水分解酵素の阻害剤としての有用性を検討することに

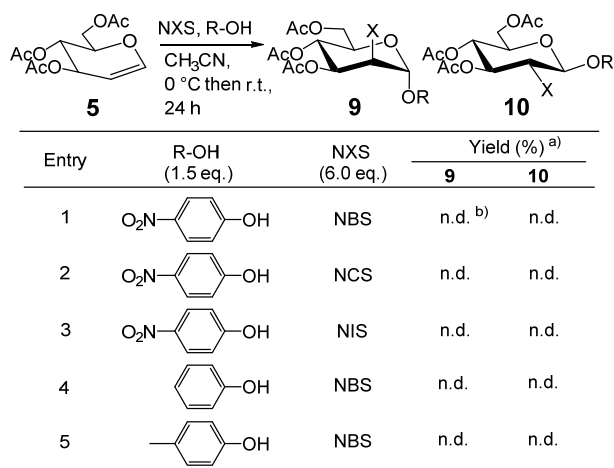
した。



Scheme 3 NXS を用いた 4-NP とのグリコシル化

アセトニトリル中、NBS とアルコールを作用させる竜田らの方法を用いることにした。このグリコシル化は、グルカールの二重結合に NXS より生成したハロゲンカチオンとアルコールがアンチ付加し、 α -マンノース型の **9** と β -グルコース型の **10** が生成する。NXS と 4-ニトロフェノールを作用させてみたところ、いずれの NXS を用いても、アノマー位に 4-ニトロフェニル基を導入できなかった。これは 4-ニトロフェノールのベンゼン環上に電子吸引基であるニトロ基が存在するためヒドロキシ基の求核性が小さく、そのため反応性が低いためであると考えた。そこで、フェノール、4-クレゾールを作用させてみたが、同様に目的化合物を得ることはできなかった (Table 1)。

Table 1 NXS を用いた 4-NP とのグリコシル化



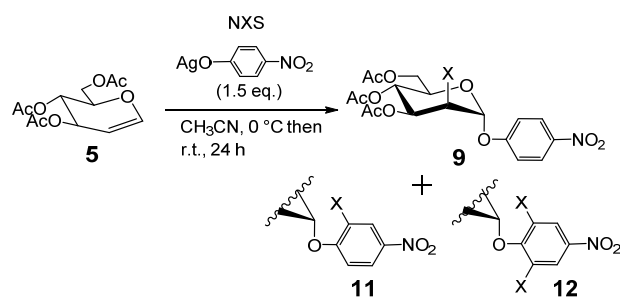
a) calculated by ¹H-NMR b) n.d. = not detected

反応性を確認するために、竜田らの既報通り、アセトニトリル中、グルカールに NBS 1.2 当量 とエタノール 1.5 当量を作用させたところ、残念ながら、目的化合物は微量しか生成しなかった。そこで、エタノールを溶媒として大過剰用いたところ、NBS の当量に関わらず生成物を定量的に得ることが出来たことから、NXS を用いたグリコシル化を進行させるた

めには、用いるアルコール成分の求核性が重要だと考えた。

そこで、4-ニトロフェノールではなく、より求核性の高い 4-ニトロフェノール銀塩に変換し反応を検討した。アセトニトリル中、グルカールに NBS 6 当量、4-ニトロフェニル銀 1.5 当量の条件で、目的である **9** ではなく、4-ニトロフェニル基の 2 位と 4 位がジブロモ化された **12** (X = Br) を収率 58% で得た。¹H-NMR の解析により、アノマー位と 2 位のケミカルシフトおよびカップリング定数から、 α -マンノース型のみが生成していることがわかった。NBS を 6 当量用いることで反応が進行することが分かったので、他の NXS でも試みたところ、NCS では反応が進行しなかったが、NIS ではジヨード化された **12** (X = I) を収率 40% で得た (Table 2)。

Table 2 NXS を用いた 4-NP 銀塩とのグリコシル化



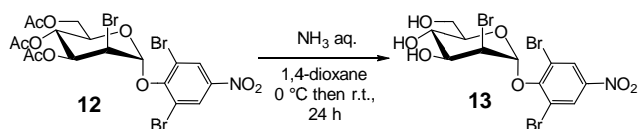
Entry	NXS (eq.)	Yield (%) ^{a)}		
		9	11	12
1	NBS (1.2)	n.d. ^{b)}	n.d.	n.d.
2	NBS (3)	n.d.	n.d.	11
3	NBS (6)	n.d.	n.d.	58
4	NCS (6)	n.d.	n.d.	n.d.
5	NIS (6)	n.d.	n.d.	40

a) calculated by ¹H-NMR b) n.d. = not detected

これは NBS より生成した ブロモカチオンがグルカール 3 の二重結合に付加し、4-ニトロフェノール銀塩ではなく、ジブロモ化された 4-ニトロフェノール銀塩が求核攻撃し、**12** が生成したと考えた。また、化学量論的に 1.5 当量の 4-ニトロフェノール銀塩のジブロモ化には NBS を 3 当量消費するため、Table 3 で示す通り NBS 1.2 当量では進行せず NBS 6 当量で **12** を得ることが出来たと考えた。

最後に、1,4-ジオキサン中でアンモニア水を作用させてアセチル基の脱保護を行った結果、2 位のブロモ基が脱離せず、収率 67% で化合物 **13** を得るこ

とが出来た。



Scheme 4 脱保護

Fig. 3 に **13** の芳香族領域の $^1\text{H-NMR}$ チャートを示した。4-ニトロフェニル α -D-マンノシド **14** の $^1\text{H-NMR}$ チャートと比べて、7.3 ppm 付近に見られるはずの芳香環の2位と6位のプロトンピークが消失していること、また3位と5位のプロトンにおいてカップリングが見られないことから、**13** ジブプロモ体であることを確認出来た。

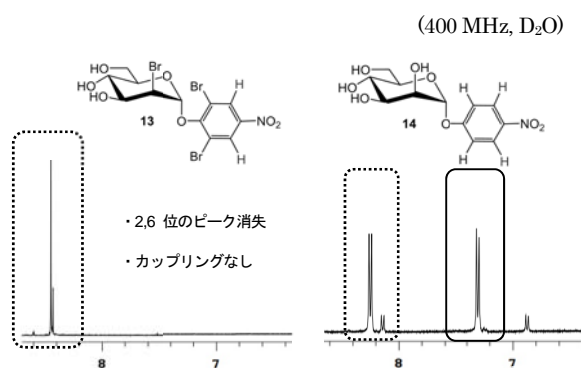


Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ の比較 (芳香族領域)

今後、合成した **13** について、その糖加水分解酵素阻害剤としての有用性について検討する予定である。

【総括】

本研究では、Nucleocidin の生合成経路の解明、低分子医薬および核酸医薬としての有効利用を目的とし、Nucleocidin をリード化合物とした化合物ライブラリーの構築を目的とした。そこで、アデノシンを出発化合物として種々反応条件の検討を行い、重要中間体 **1** の合成経路を確立した。また二重結合へのハロゲン基の導入方法を検討するために、NXS 存在下、グルカルと 4-ニトロフェノールまたは 4-ニトロフェノール銀塩を用いたグリコシル化について検討した。トリアセチルグルカル **5** に NXS と 4-ニトロフェノール銀塩を作用させると、4-ニトロフェニル基がジハロゲン化された **12** を得た。こ

れを 1,4-dioxane 中、アンモニア水で脱保護することで **13** を得た。NBS と NIS を用いると、グリコシル化反応が進行したが、NCS では進行しないことがわかった。

今後は、得た知見を基に重要中間体 **1** へのハロゲン基の導入、ついで Nucleocidin およびその誘導体の合成を行い、Nucleocidin ライブラリーの構築を行う予定である。なお、ここに記載したデータは、岡山大学大学院環境生命科学研究科 (農) 博士前期課程・井上千枝李、岡山大学農学部・岡本有未らの実験結果である。

【謝辞】

最後となりましたが、本研究の遂行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いたします。

【参考文献】

- [1] J. McCarter *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **249**, 77 (1993).
- [2] K. Tatsuta *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **54**, 85 (1977).

【本研究助成により公表した研究成果】

1. Chieri Inoue, Yumi Okamoto, Christopher J. Vavricka, Hiromasa Kiyota, Minoru Izumi, “Synthesis of Halogenated-4-Nitrophenyl 2-deoxy-2-halogenopyranosides via *N*-Halogeno-succinimide Activated Glucal”, *Nat. Prod. Commun.*, **13**(1), 85 (2018).
2. 井上千枝李・岡本有未・清田洋正・泉 実, 「糖加水分解酵素阻害剤の開発を指向した 2-ハロゲン化糖の合成」, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会, 大阪府立大学 (大阪), 2017 年 9 月.
3. 井上千枝李・岡本有未・清田洋正・泉 実, 「糖加水分解酵素阻害剤の開発を指向した 2-ハロゲン化糖の合成」, 2017 年日本化学会中国四国支部大会, 鳥取産業体育館 (鳥取), 2017 年 11 月.

植物の分布を決める適応機構に関する遺伝的基盤の解明

岡山大学・資源植物科学研究所

池田 啓

(概要)

異所的に分岐した系統を遺伝的に独立したものとして維持する仕組みを明らかにすることは、生物の種多様性を創出につながる基盤を解明することである。本研究では、中部地方と東北・北海道（北日本）の間に、遺伝的に分化している高山植物の1例であるミヤマタネツケバナ (*Cardamine nipponica*; アブラナ科) をモデル植物として、北・南系統間における遺伝子の進化様式をゲノムワイドに調べ、系統間で自然選択を受けて分岐した遺伝子を網羅的に明らかにすることを目指した。複数の個体からコード領域の全長の配列を解読できた1829個の遺伝子における分子進化的な解析を行った結果、北日本と中部地方の間に自然選択を受けて分岐した可能性のある遺伝子が13個見つかった。一方で、解析した遺伝子には先行研究によって適応進化に関わることが知られている遺伝子 (*PHYE*; フィトクロム E) や植物の生理・生態的に重要な遺伝子が含まれておらず、実験方法が十分でないことが考えられた。したがって、本研究の結果は、系統間における適応的な分岐には、フィトクロム以外にもいくつかの遺伝子に関わる可能性を指摘するものの、これらの可能性を裏付けるには十分な結果ではなく、さらなるデータが必要であると考えられた。

はじめに

生物の分布が地理的に分断されることは、集団間の遺伝子流動を妨げ、独立した系統を生み出す要因である。こうした分布の分断に伴い、互いに交配して子孫を残せなくなる系統が進化するプロセスは、新たな種を形成し、生物の種多様性を創出するものである。そのため、異所的な系統間の交配を妨げる要因は、生物の種多様性を創出する基盤となる仕組みであるといえる。

こうした仕組みを明らかにするうえで、日本列島の高山植物は優れた研究系を与える。日本列島の高山植物は、第四紀の氷河時代に北方より南下した植物に起源すると考えられている(Koidzumi 1919)。一方で、近年の分子系統地理学の研究により、日本列島の高山植物は中部地方と北日本の間で遺伝的に独自なものへと進化していることが様々な植物で明らかにされている(Ikeda *et al.* 2008など)。特に、両系統が約10万年以前に分岐したことが示されており(Ikeda *et al.* 2009aなど)、今から約2万年前の氷河時代（最終氷期）より前に2つの系統に分岐したことが示されている。したがって、日本列島の高山植物は最終氷期には中部地方から北海道まで分布を広げることができたにも関わらず、中部地方の系統と北日本の系統の間

で、交配して子孫を残すことができなかった可能性が考えられる。

これまでに高山植物の1種であり、アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナに近縁な植物（ミヤマタネツケバナ *Cardamine nipponica*）を用いた分子進化学の研究により、北・南系統のミヤマタネツケバナの間では光受容体（フィトクロム）をコードする遺伝子 (*PHYE*) が自然選択を受けて進化していることが明らかにされている(Ikeda *et al.* 2009b)。フィトクロムは開花や発芽といった植物の様々な生理応答の制御に関わることから、フィトクロムの変異が北日本と中部地方の環境に適応した生理機能をもたらし、北・南系統を遺伝的な独自なものとして維持する仕組みとして機能したのではないかと考えられてきた。

しかしながら、これまでの研究では、限られた遺伝子における進化様式を調べるにとどまっている。そのため、系統間における適応進化を担う仕組みには、フィトクロムのみが関わるのか、あるいはフィトクロム以外に多数の遺伝子に関わるのかが定かではない。したがって、ミヤマタネツケバナの北・南系統間を遺伝的に独立した系統として維持する基盤を明らかにするには、ゲノムワイドな遺伝子から系統間において自然選択

を受けて分岐した遺伝子を探索する必要がある。
結果

本研究では、北・南系統のミヤマタネツケバナに対して複数の個体でアライメントを構築できた1829個の遺伝子について、最尤法で系統樹を構築するソフトウェア (RaxML) を用いて遺伝子ごとの系統樹を作成した。系統樹の構築に当たっては、ミヤマタネツケバナの姉妹種である *Cardamine bellidifolia*、と近縁種である *Cardamine hirsuta*、シロイヌナズナを外群に用いて解析を行った。その結果、1007個の遺伝子でミヤマタネツケバナの北系統と南系統の単系統性が支持された。一方で、671個の遺伝子では、塩基配列情報に信頼できる系統関係を推定する十分な情報が含まれていなかった。また、残りの遺伝子については、*Cardamine bellidifolia* とミヤマタネツケバナのそれぞれを単系統群として区別することができなかった。

系統解析を行った遺伝子について、系統樹上における自然選択を評価するソフトウェア (PAML) を用い、北・南系統間で自然選択を受けて分岐した可能性のある遺伝子を探索した。その結果、1071個の遺伝子では、解析を行うための十分な変異がなく、統計的な解析を行うことができなかった。解析を行った759個の遺伝子に関して、北・南系統間における同義置換に対する非同義置換の割合 (ω) を計算した。 ω は中立に進化する遺伝子では $\omega = 1$ となることが期待され、系統間の分岐が正の自然選択の影響を受けている可能性のある遺伝子では、 $\omega > 1$ となることが期待される。今回の結果では、13個の遺伝子が、 $\omega > 1$ であることが明らかになった。

考察

本研究は、ミヤマタネツケバナの北系統と南系統の分岐では、*PHYE* 以外にもいくつかの遺伝子が適応進化を担う可能性を指摘している。しかしながら、本研究の成果は、以下の理由から、この可能性を裏付けるためには、十分ではないことが考えられる。

本研究の解析では、先行研究で自然選択の証拠が得られている *PHYE* をはじめ、植物の生理・生態において重要な機能を果たすことが考えられる遺伝子が解析に含まれていない。そのため、植物の適応的な

生理応答を担う可能性のある遺伝子を網羅的に調べることができていない可能性がある。特に、*PHYE* が含まれていないことは、今回の解析で得られた ω の値が、*PHYE* に匹敵するほど十分に大きいものであるかを明らかにすることができてきない。したがって、今回の結果の妥当性を評価するには、本研究の方法を用いて、*PHYE* を含め、より多くの遺伝子を解析することが必要である。

また、こうした問題を改善するうえで、考慮する点が2つある。今回の結果で *PHYE* を含めた生理的に重要な遺伝子を解析できなかった原因の1つには、解析に使用した遺伝子が実生で発現している遺伝子に由来したものであることが考えられる。この点を改善するには、植物の適応に重要な発生段階（花芽形成の直前など）で発現している遺伝子を探索する必要がある。また、今回の解析では変異が少ないために、系統樹ベースの解析方法では自然選択を適切に評価できない遺伝子がある可能性が考えられる。これらの遺伝子については、系統樹以外の方法による解析を行い、自然選択を改めて検証する必要があるものと考えられる。

参考文献

- Ikeda H, Fujii N, Setoguchi H (2009a) Application of the isolation with migration model demonstrates the pleistocene origin of geographic differentiation in *Cardamine nipponica* (Brassicaceae), an endemic Japanese alpine plant. *Molecular Biology and Evolution* **26**, 2207-2216.
- Ikeda H, Fujii N, Setoguchi H (2009b) Molecular evolution of phytochromes in *Cardamine nipponica* (Brassicaceae) suggests the involvement of *PHYE* in local adaptation. *Genetics* **182**, 603-614.
- Ikeda H, Senni K, Fujii N, Setoguchi H (2008) Consistent geographic structure among multiple nuclear sequences and cpDNA polymorphisms of *Cardamine nipponica* Franch. et Savat. (Brassicaceae). *Molecular Ecology* **17**, 3178-3188.
- Koidzumi G (1919) Genetic and floristic phytogeography of the alpine flora of Japan. *Botanical Magazine* **33**, 193-223.

再分化を促す転写因子 *BBM1* と *WUS2* を過剰発現したオオムギの網羅的遺伝子発現解析

岡山大学 資源植物科学研究所

久野裕

植物は、動物に比べて分化全能性が高く、カルスからの再分化が一般的に容易である。これまでに、*Baby boom* (*BBM*) 遺伝子ならびに *Wuschel2* (*WUS2*) 遺伝子と呼ばれる転写因子遺伝子は再分化の鍵となる茎頂分裂組織の形成に重要であることが知られているが、それらが制御する下流の遺伝子については明らかとなっていない。本研究では、オオムギの再分化メカニズムの解明を目的として、オオムギの *BBM* ならびに *WUS2* 遺伝子のホモログの単離および同定を行い、続いてそれぞれ過剰発現させたオオムギ形質転換カルスのマイクロアレイ解析を行った。その結果、*BBM* および *WUS2* 遺伝子の過剰発現により発現上昇した遺伝子は、それぞれ 13,900 個および 1,174 個であった。そのうち共通して発現上昇した遺伝子は 923 個であった。一方、*BBM* および *WUS2* 遺伝子の過剰発現により発現抑制された遺伝子は、それぞれ 467 個および 580 個であった。そのうち、共通して発現抑制された遺伝子は 150 個であった。これらの遺伝子の一部は、オオムギの再分化やその抑制に寄与していると考えられる。

1. 研究の背景と目的

個体を構成する器官や組織のあらゆる細胞が、どれにも分化することができる能力は「分化全能性」と呼ばれる。植物は、動物に比べて分化全能性が一般的に高く、一旦脱分化した未分化な細胞塊（カルス）から植物体を再生（再分化）することができる。多くの植物において形質転換（遺伝子組換え）は、この再分化を利用して行われる。植物の再分化能は、種間や系統間に多様性があり、培養環境条件や供試外植片によっても影響される。その分子機構については、双子葉植物では遺伝子レベルでの理解が進みつつあるが (Ikeuchi et al. 2016)、単子葉のイネ科植物では発展途上である。

Lowe et al. (2016) は、トウモロコシ由来の転写因子である *Baby boom* (*BBM*) ならびに *Wuschel2* (*WUS2*) 遺伝子を過剰発現することにより、トウモロコシ、ソルガムならびにイネにおいて、形質転換が困難な系統の形質転換に成功した。一方、申請者らは、形質転換が容易なオオムギ品種「Golden Promise」と形質転換が困難な品種「Haruna Nijo」の交雑後代を用いて、遺伝学的手法で形質転換に必要な遺伝子座 *TFA* (*Transformation amenability*) を特定した (Hisano and Sato 2016)。さらに、交配によって *TFA* の

「Golden Promise」アリルを導入することにより、任意の品種の形質転換効率を向上させることを示した (Hisano et al. 2017)。

これまでの知見から、*BBM* ならびに *WUS2* 遺伝子によって、再分化の礎となる茎頂分裂組織が形成されることが明らかとなっているが、それらが制御する下流の遺伝子については明らかとなっていない。また、オオムギにおいて *BBM* ならびに *WUS2* 遺伝子は同定されておらず、*TFA* との関連も明らかでは無い。そこで本研究では、オオムギの再分化効率ならびに形質転換効率の向上を目的として、オオムギにおける *BBM* ならびに *WUS2* 遺伝子の同定とその下流遺伝子の探索を試みた。

2. 材料および方法

植物材料として、オオムギ品種「Golden Promise」(GP) を用いた。GP の未熟胚由来カルスから RNA を抽出し、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法により *BBM* ならびに *WUS2* 遺伝子のホモログを単離した。トウモロコシ由来ユビキチンプロモーターを持つベクターにそれらをクローニングし、各遺伝子の過剰発現ベクターを構築した。これらのコンストラクトを用いて、アグロバクテリウム法により GP の未熟胚に遺伝子導入を行

い、各遺伝子の過剰発現カルスを作成した。得られた形質転換カルスから RNA を抽出し、マイクロアレイ (Agilent barley 44K array) による網羅的遺伝子発現解析を行った。コントロールとして、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を導入した形質転換カルスを用いた。

3. 結果および考察

始めに、オオムギの *BBM* および *WUS2* 遺伝子のホモログをクローニングし、それぞれ *HvBBM1* および *HvWUS2* と名付けた。*HvBBM1* および *HvWUS2* 遺伝子の長さは、それぞれ 1980 bp (659 aa) および 630 bp (204 aa) であった。これらを過剰発現ベクターに挿入し、オオムギへの遺伝子導入を行った結果、複数の形質転換カルスを得ることが出来た。

次に、これらの形質転換カルスから RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、コントロール (EGFP 過剰発現形質転換カルス) に比べて多数の遺伝子の発現が変動していることが明らかとなった。Fold Change (FC) が 5 以上 (発現上昇) および 0.2 以下 (発現抑制) の遺伝子数を図 1 および図 2 にそれぞれ示す。*HvBBM1* の過剰発現により発現上昇した遺伝子は 13,900 個で、*HvWUS2* の過剰発現により発現上昇した遺伝子は 1,174 個であった (図 1)。そのうち、共通して発現上昇した遺伝子は 923 個であった (図 1)。一方、*HvBBM1* の過剰発現により発現抑制された遺伝子は 467 個で、*HvWUS2* の過剰発現により発現抑制された遺伝子は 580 個であった (図 2)。そのうち、共通して発現抑制された遺伝子は 150 個であった (図 2)。なお、t 検定による P 値が 0.05 以上のものは解析から除いた。

表 1 および表 2 に、発現上昇した遺伝子および発現抑制された遺伝子の抜粋を記す。最も発現上昇した遺伝子のプローブは、A_13_P074401 (*HvBBM1*) および A_13_P074371 (*HvWUS2*) で、FC はそれぞれ 1917.0 および 50.5 であった (表 1)。一方、最も発現が抑制された遺伝子のプローブは A_13_P506789 (*HvBBM1*) および A_13_P546979 (*HvWUS2*) で、FC はそれぞれ 0.013 および 0.018 であった (表 2)。それらの遺伝子のアノテーション

(注釈、Agilent マイクロアレイに付属) を調査したが、既知の再分化に関わる遺伝子、形態形成に関わる遺伝子、植物ホルモン関連遺伝子などは見当たらなかった。

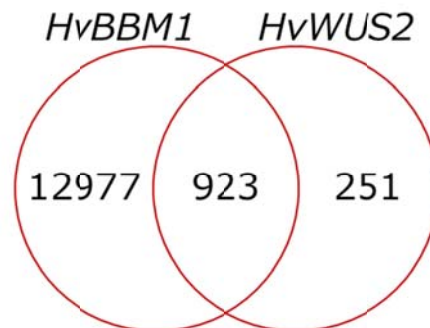


図 1 *HvBBM1* または *HvWUS2* 遺伝子の過剰発現カルスにおいて発現上昇した遺伝子の数
各遺伝子を過剰発現しているカルスから RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。Fold Change (FC) が 5 以上の遺伝子数を示す。

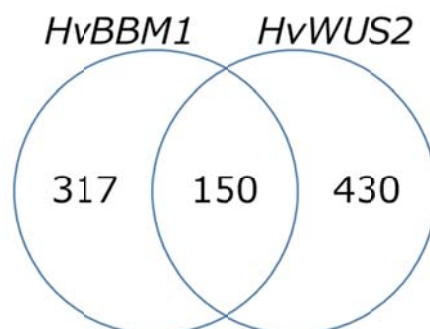


図 2 *HvBBM1* または *HvWUS2* 遺伝子の過剰発現カルスにおいて発現抑制された遺伝子の数
各遺伝子を過剰発現しているカルスから RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。Fold Change (FC) が 0.2 以下の遺伝子数を示す。

これらの遺伝子は、*HvBBM1* または *HvWUS2* によって制御されることは明らかであるが、再分化に寄与しているかどうかは未知である。今後、これらの遺伝子を詳細に解析し、オオムギの再分化に関する分子メカニズムを解明したいと考えている。また、本研究においては、これらの遺伝子と *TFA* との関係を見いだすことは出来なかった。今後、遺伝学的解析を交えて、これらの関係を明らかにする予定である。

表1 HvBBM1およびHvWUS2の過剰発現により発現上昇した遺伝子

プローブID	HvBBM1過剰発現カルス		HvWUS2過剰発現カルス		注記
	発現比	P値	発現比	P値	
HvBBM1の過剰発現により発現上昇した主な遺伝子					
A_13_P074401	1917.0	0.000	-	>0.05	Hordeum vulgare putative 32.7 kDa jasmonate-induced protein mRNA, complete cds [U43497]
A_13_P125730	890.2	0.000	3.6	0.033	Unknown
A_13_P185599	756.3	0.002	-	>0.05	Rep: Argonaute-like protein At2g27860 - Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cross), partial (23%) [TC258655]
A_13_P178094	399.9	0.002	-	>0.05	Root-specific lectin-like
A_13_P190464	281.2	0.000	-	>0.05	Rep: Os04g052490 protein - Oryza sativa subsp. japonica (Rice), partial (11%) [TC270245]
HvWUS2の過剰発現により発現上昇した主な遺伝子					
A_13_P074371	6.7	0.040	50.5	0.001	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf148l14, mRNA sequence [AK252107]
A_13_P562249	9.2	0.012	33.9	0.000	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf124b21, mRNA sequence [AK251623]
A_13_P197899	8.1	0.014	32.1	0.000	Rep: T17H7.12 - Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cross), partial (6%) [TC273030]
A_13_P046106	85.9	0.000	31.5	0.008	BES1824111A2h02BES1824 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone MPMGp2010H-0211 5-PRIME, mRNA sequence [CK125001]
A_13_P436336	3.9	0.010	25.7	0.002	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf168d16, mRNA sequence [AK252854]
上記以外で両方の遺伝子において発現上昇した主な遺伝子					
A_13_P188099	80.7	0.000	19.4	0.001	Rep: Monosaccharide transporter 6 - Oryza sativa subsp. japonica (Rice), partial (5%) [TC277404]
A_13_P463178	32.6	0.013	19.9	0.006	Rep: T3H13.3 protein - Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cross), partial (17%) [TC272103]
A_13_P508774	31.2	0.005	19.5	0.014	Unknown
A_13_P259172	27.8	0.001	21.3	0.007	Unknown
A_13_P456798	19.4	0.009	17.6	0.000	Unknown

※FC (Fold Change)が5以上のものを赤字でハイライトした

※発現比のコントロールには、EGFPを過剰発現する形質転換カルスを用いた

表2 HvBBM1およびHvWUS2の過剰発現により発現抑制された遺伝子

プローブID	HvBBM1過剰発現カルス		HvWUS2過剰発現カルス		注記
	発現比	P値	発現比	P値	
HvBBM1の過剰発現により発現抑制された遺伝子					
A_13_P506789	0.013	0.000	-	>0.05	Rep: Alpha-amylase/subtilisin inhibitor precursor - Hordeum vulgare (Barley), complete [TC279589]
A_13_P176220	0.017	0.000	3.600	0.033	Unknown
A_13_P281429	0.019	0.002	-	>0.05	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone HVSMEh0092I06f, mRNA sequence [BE196515]
A_13_P343467	0.025	0.002	-	>0.05	Rep: Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit - Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cross), partial (6%) [TC279219]
A_13_P233589	0.026	0.000	-	>0.05	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone HVSMEh0092I06f, mRNA sequence [BE196515]
HvWUS2の過剰発現により発現抑制された主な遺伝子					
A_13_P546979	0.038	0.002	0.018	0.000	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf54g09, mRNA sequence [AK249776]
A_13_P050721	0.273	0.036	0.030	0.000	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf169m24, mRNA sequence [AK252771]
A_13_P103650	0.096	0.000	0.034	0.000	HDP10J03w HDP Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone HDP10J03, mRNA sequence [EX576225]
A_13_P485015	-	>0.05	0.034	0.000	Unknown
A_13_P040581	-	>0.05	0.038	0.000	BJ451212 cv. Akashinriki vegetative stage leaves Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone baak33c11 5', mRNA sequence [BJ451212]
上記以外で両方の遺伝子において発現上昇した主な遺伝子					
A_13_P096895	0.043	0.001	0.043	0.002	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf54g09, mRNA sequence [AK249776]
A_13_P601182	0.048	0.004	0.048	0.005	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf44a22, mRNA sequence [AK249583]
A_13_P132960	0.038	0.012	0.067	0.013	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for papain-like cysteine proteinase (pap-22 gene) [AM941129]
A_13_P581534	0.038	0.003	0.073	0.015	Rep: Os12g056990 protein - Oryza sativa subsp. japonica (Rice), partial (10%) [TC277344]
A_13_P189274	0.042	0.001	0.092	0.000	Rep: Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like protein - Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cross), partial (6%) [TC278932]

※FC (Fold Change)が0.2以下のものを青文字でハイライトした

※発現比のコントロールには、EGFPを過剰発現する形質転換カルスを用いた

4. 謝辞

本研究を実施するにあたり、多大なご支援を賜りました公益法人ウエスコ学術振興財団ならびに財団関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

5. 参考文献

- Hisano H, Sato K. 2016. Genomic regions responsible for amenability to *Agrobacterium*-mediated transformation in barley. *Scientific Reports* **6**: 37505.
- Hisano H, Meints B, Moscou MJ, Cistue L, Echávarri B, Sato K, Hayes PM. 2017. Selection of transformation-efficient barley genotypes based on *TFA* (*transformation amenability*) haplotype and higher resolution mapping of the *TFA* loci. *Plant Cell Reports* **36**: 611-620.
- Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, Sugimoto K. 2016. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* **143**: 1442-1451.
- Lowe K, Wu E, Wang N, Hoerster G, Hastings C, Cho M-J, Scelonge C, Lenderts B, Chamberlin M, Cushatt J, et al. 2016. Morphogenic Regulators *Baby boom* and *Wuschel* Improve Monocot Transformation. *The Plant Cell*. **28**: 1998-2015.

炎症性脂質メディエーター合成系を標的とした慢性炎症予防効果を有する食品機能性

岡山県立大学 保健福祉学部 栄養学科

山本 登志子

超高齢社会を迎えた我が国では、いかに「健康で長生き」できるかが命題である。加齢に伴う様々な慢性疾患は、その基盤にある慢性炎症が引き金となる。ω6系不飽和脂肪酸のアラキドン酸代謝産物であるプロスタグランジン(PG)_{E2}やロイコトリエン(LT)_{B4}、システイニル LTs(LTC₄, LTD₄, LTE₄)は、慢性炎症誘導因子である。すなわち、過剰な PGE₂や LTs の産生を抑えることができれば、慢性疾患の予防につながる。そこで、私達は、慢性疾患予防のための食品機能性の探索に取り組み、癌や炎症のモデル細胞、炎症を伴う皮膚癌モデルマウスや慢性炎症性皮膚疾患の乾癬モデルマウスを用いて検討した。その中で、岡山県産の自然薯が、PGE₂ 合成系酵素の発現を抑制し、抗炎症・抗腫瘍効果を有することを明らかにした。また、岡山県産赤米の LTs 合成系初発酵素の活性阻害効果と乾癬予防効果を見出した。

1. はじめに

ω6系不飽和脂肪酸のアラキドン酸代謝産物のうち、PGE₂やLTsは慢性炎症誘導に関与する。PGE₂は、炎症、発熱、痛覚伝達、癌、動脈硬化、神経変性疾患など、LTB₄は、炎症、生体防御、好中球・マクロファージ遊走活性化、乾癬に、システイニルLTsは、喘息、肺線維化、アトピー性皮膚炎、アレルギー反応などの惹起に関与する(図1)。

PGE₂ は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)と PGE 合成酵素の触媒によって合成される。PGE₂ 合成に働くアイソザイムのうち、誘導型 COX-2 とミクロソーム型 PGE 合成酵素(mPGES)-1 の発現上昇によって過剰な PGE₂ が産生されると炎症が誘導される。非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)は COX の活性を阻害することで PGE₂ の産生を抑え、炎症や発熱のみならず癌を抑えることも知られている。しかしながら、恒常的に必要なプロスタグランジン類やトロンボキサンの産生も抑えてしまうために、胃粘膜障害や心臓血管系障害などの重篤な副作用が懸念される。よって、NSAIDs による予防目的の長期服用には厳重な注意が必要である。

LTB₄やシステイニル LTs は、アラキドン酸より 5-リポキシゲナーゼ(LOX)の触媒に始まる一連の代謝産物である。これまでに、5-LOX 活性阻害薬やシス

テイニル LT 受容体拮抗薬が開発され、特に後者は、気管支喘息やアレルギー性鼻炎の治療薬として広く臨床応用されている。

本研究では、PGE₂やLTsによって惹起される疾患の予防を目指して、それぞれの合成を担う酵素を標的とした、副作用の少ない食品機能性の探索を行うこととした。

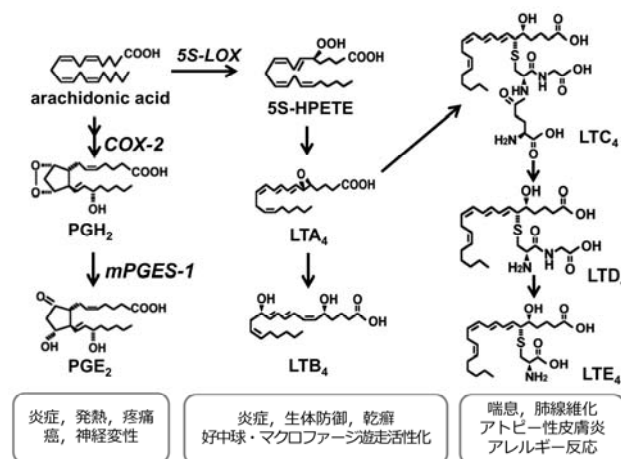


図1. PGE₂とLTsの合成経路

2. 実験材料・方法

2-1. 自然薯乾燥粉末と赤米抽出物

岡山県新見市原産の自然薯低温乾燥粉末は、皮を取り除き、天日干しで 40℃以下の低温乾燥を行い、その後粉碎し、60 メッシュでパウダー状にした試料である。

岡山県総社市原産の赤米素抽出物より、芳香族系合成吸着カラム Diaion HP20 resin で吸着後、50%メタノール抽出画分から赤米ポリフェノール (RRP) を単離し、カテキン重合体のプロアントシアニンジンであることが同定された (Ganeko, N. *et al.* ICPH2015)。

2-2. 細胞および動物

in vitro 実験には、癌モデルのヒト非小細胞肺癌 A549 細胞やヒト大腸癌 Caco-2 細胞と、炎症モデルのリポポリサッカライド (LPS) 刺激マウスマクロファージ RAW264 細胞を用い、*in vivo* 実験には、17,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) と 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) の局所塗布による化学物質誘導皮膚癌モデルマウス¹⁾やイミキモド (IMQ) 局所塗布による乾癬誘導モデルマウス²⁾を用いた。

各培養細胞には、自然薯乾燥粉末の 50%エタノール抽出物 (DJE) を添加し、皮膚癌モデルマウスには、DJE の塗布に加え、10%自然薯粉含有餌の自由摂食による投与を行った。

RRP の酵素活性阻害効果については、dimethyl sulfoxide (DMSO、終濃度 1%) で溶解し、乾癬モデルマウスへの投与は 50%エタノールで溶解して使用した。

2-3. 定量 RT-PCR による遺伝子発現解析

細胞あるいはマウス皮膚より調製した total RNA より cDNA を合成し、これを RT-PCR の鋳型とした。定量 RT-PCR は、SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (Bio Rad Labs., Hercules, CA. USA) 反応液を使用し、サーマルサイクラー StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, LLC, Foster City, CA. USA) で解析し、発現量は、 $\Delta\Delta$ Ct 比較定量法で算出した。内在性コントロールには glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) を用いた。

2-4. タンパク質発現解析

細胞ホモジネートの 10,000xg 上清を用いて、COX-2 と mPGES-1 のタンパク質発現動態をウエスタンブロー

ットにより解析した。その解析には、rabbit anti-COX-2 antibody (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Gumma, Japan), rabbit anti-mPGES-1 antibody (Cayman Chemical Co. Ann Arbor, MI) と 内部標準の解析として rabbit anti β -actin antibody (Cell Signaling Technology, Boston, MA) の抗体を使用した。

2-5. 酵素活性測定

COXは、0.1M Tris-HCl (pH7.4) / 2 μ M hematin / 5mM tryptophan / 25 μ M linoleic acid の反応液中で、24℃、5分間反応させた。5-LOXは、0.1M Tris-HCl (pH7.4) / 2mM CaCl₂ / 2mM ATP / 25 μ M arachidonic acid の反応液中で、30℃、20分間反応させた。それぞれの反応生成物を逆相高速液体クロマトグラフィーで分析した。

2-6. 病理・組織化学解析

マウス皮膚を 4%パラフォルムアルデヒドで固定し、パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した切片で、病理組織解析を行い、自然薯投与標本は、COX-2 と mPGES-1 抗体を用いた免疫組織染色を行った。

2-7. 脂質メタボローム解析

マウス皮膚から、Bligh and Dyer 法により脂質を抽出し、Oasis HLB cartridges (Waters, Milford, MA. USA) を用いた固相抽出によりサンプルを調製し、*d4*-labeled PGE₂ を内部標準として、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI) により脂質メディエーター含有量を測定した³⁾。

3. 結果

3-1. 自然薯の PGE₂ 合成系酵素発現抑制⁴⁾ と皮膚癌予防効果⁵⁾

自然薯抽出物は、A549 細胞や LPS 刺激 RAW264 細胞において、COX-2 (*Ptgs2*) と mPGES-1 (*Ptges*) の発現を抑制し、抗炎症・抗腫瘍効果を有することを明らかにした。

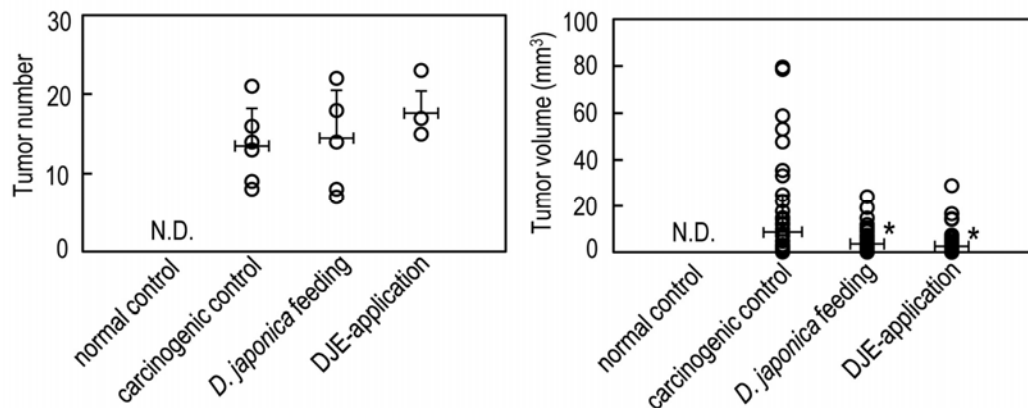


図2. 皮膚癌マウスの腫瘍の数と体積

* $P < 0.01$ vs 皮膚癌コントロール

そこで、このような自然薯の効果を *in vivo* で評価するために、DMBAとTPAの二段階化学物質誘導皮膚癌モデルマウスを用いて実験を行った。皮膚腫瘍形成について観察したところ、その数において正常を除く各群間に有意な差は認められなかったが、腫瘍体積は、癌誘導コントロール群に比べて自然薯食群とDJE塗布群において有意な減少が認められた(図2)。さらに、いずれの自然薯投与群でも、皮膚のCOX-2とmPGES-1の発現が抑制され、炎症性サイトカ

インのIL-1 β (*Il1b*) とIL-6 (*Il6*) の発現も抑制された(図3)。また、脂質メタボローム解析を行ったところ、癌誘導によって上昇するPGE₂量が自然薯投与によって減少することが認められた。病理組織解析においては、皮膚癌誘導によって、癌細胞による表皮の肥厚が自然薯投与によって減少していることが観察された(図4)。また、自然薯投与によって癌組織周辺への好中球や好酸球の浸潤が減少した。次に、COX-2とmPGES-1の発現細胞を、特異的抗体を用いて免疫組織化学的に解析したところ、COX-2の発現は、増殖した癌細胞のみならず、表皮樹状細胞のランゲルハンス細胞に強く観察され、自然薯処理により、これらの細胞における陽性強度の低下が認められた。一方、mPGES-1の発現は癌細胞で観察されたが、ランゲルハンス細胞では特に強い発現は認められなかった。

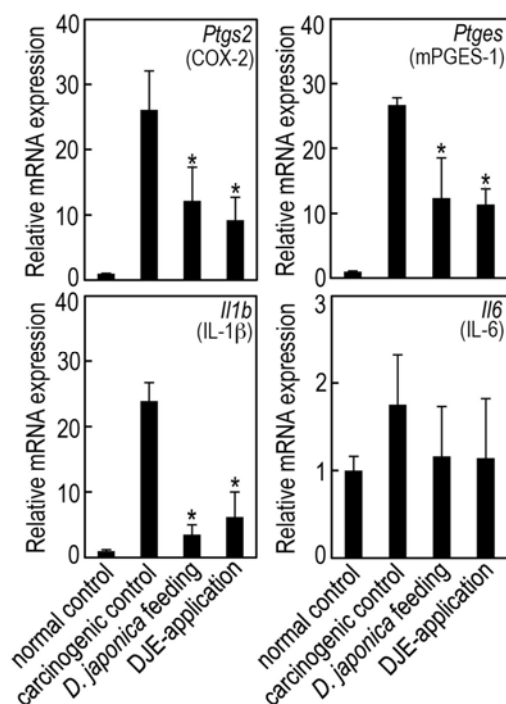


図3. 皮膚の遺伝子発現解析

* $P < 0.01$ vs 皮膚癌コントロール

3-2. 赤米ポリフェノールによる5-LOX活性阻害と乾癬予防効果

カテキン重合体を主成分とする赤米ポリフェノール (RRP) の添加による 5-LOX 活性阻害効果を検討したところ、IC₅₀ 約 9 μ M の強い阻害効果が認められた。さらに、カテキン単量体の 5-LOX 活性阻害についても検討したところ、IC₅₀ 約 13 μ M で、RRP に比べるとやや弱い阻害効果を示した。酵素反応速度論に基づく阻害様式の解析から、RRP の 5-LOX に対する阻害様式は、混合型非拮抗阻害であることが示された。

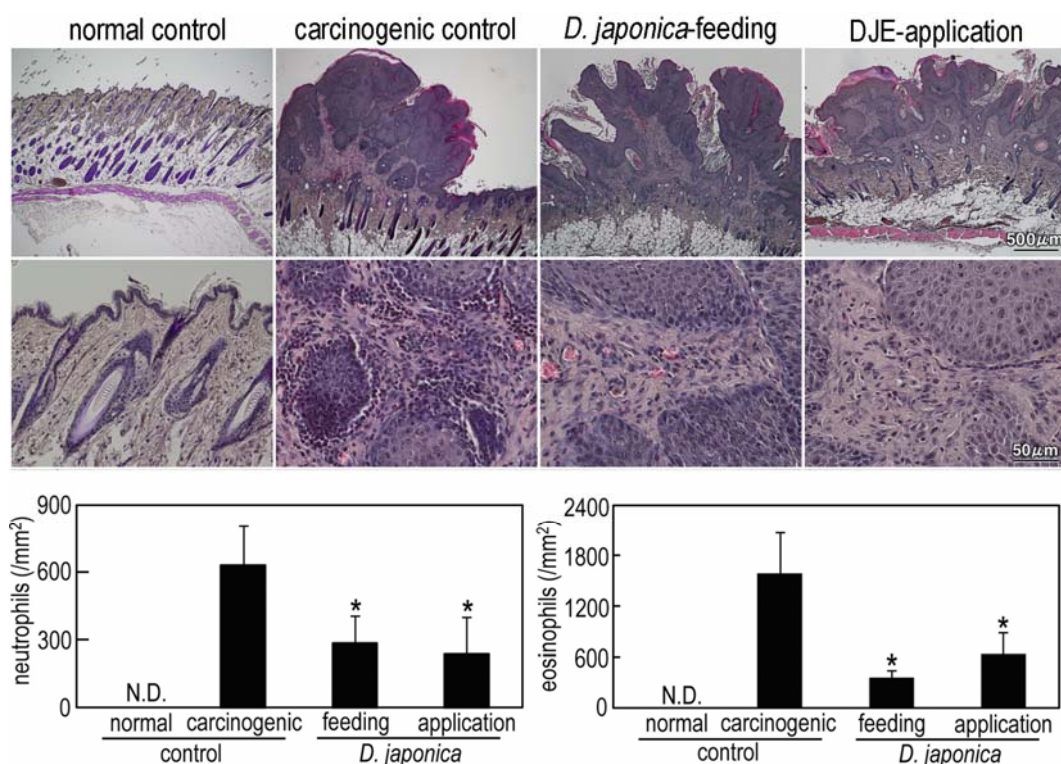


図4. 病理組織解析

* $P < 0.01$ vs 皮膚癌コントロール

IMQのマウス耳介への塗布による乾癬モデルを用いて、RRP局所塗布による効果を検討した。耳介厚の測定から、赤米ポリフェノール (RRP) 塗布によって濃度依存的な肥厚の抑制が認められ、赤米ポリフェノール2500 μ g塗布で乾癬誘導コントロール群の約30%まで抑制された。さらに、HE染色した組織観察より、耳介表皮の有棘層の肥厚も約50%まで抑制されていた(図5, 6)。また、結合組織への浸潤細胞数を計測したところ、乾癬誘導コントロール群と比較すると、その数を約85%減少させた。

乾癬関連遺伝子に対する赤米ポリフェノールの効果を、定量PCRにより解析した。対象とした遺伝子は、乾癬の病態形成に重要とされるTh17細胞が産生するサイトカインの *Il17a* (IL-17A) や *Il22* (IL-22)、乾癬特異的な炎症因子の *S100a9* (S100a9) とケラチノサイト増殖マーカーである *Krt1* (Krt1) である。いずれの遺伝子も乾癬誘導コントロール群で著しい発現上昇が認められたが、赤米ポリフェノール塗布により、濃度依存的な発現抑制が認められ、赤米ポリフェノール2500 μ g塗布で、ほぼ正常コントロール群と同程度までいずれの遺伝子発現も低下した。

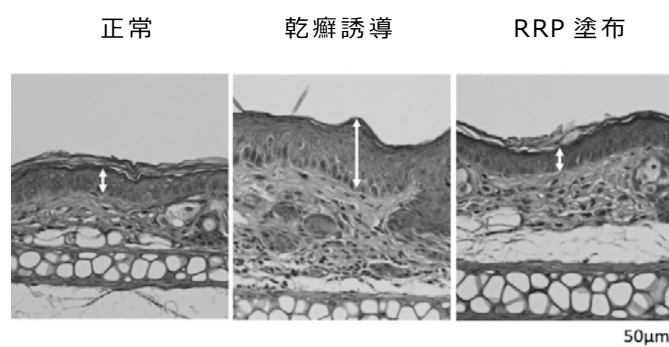


図 5. 病理組織像

両矢印は、耳介の表皮有棘層の厚さを示す。

赤米ポリフェノール塗布による耳介皮膚中の主要な脂質メディエーター含有量を、脂質メタボローム解析により測定したところ、 LTB_4 のみ有意な減少が認められた。乾癬誘導コントロール群で 100 倍程度上昇した LTB_4 は、赤米ポリフェノール塗布で濃度依存的に減少し、2500 μ g 塗布では正常コントロールとほぼ同程度まで有意に減少した。一方、アラキドン酸や $PGF_{2\alpha}$ は、乾癬誘導コントロール群と有意な差は認められず、 PGD_2 や PGE_2 はむしろ上昇傾向を示した。

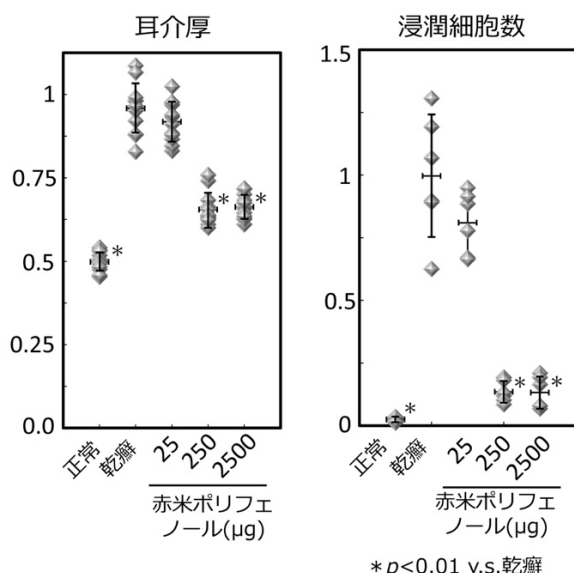


図 6. 耳介厚と浸潤細胞数
いずれも、乾癬誘導群の平均を 1 としたときの値を示す。* $P<0.01$ vs. 乾癬誘導群

4. 考察

自然薯は、癌や炎症のモデルを用いた *in vivo* と *in vitro* の両方の実験で、COX-2 と mPGES-1 発現抑制による PGE₂ 合成低下と、それによる抗炎症・抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。皮膚癌モデルマウスへの投与においては、局所塗布だけでなく、経口投与においても効果が認められたことは、食品機能性として非常に意義深い。さらに、その機能性成分の単離同定を進めたところ、候補制分の一つとして植物ステロールのジオスゲニンに COX-2 抑制効果を見出した。さらに、その作用機序についても解析を進めているところである。

赤米由来プロアントシアニジン（赤米ポリフェノール、RRP）は、*in vitro* で、5-LOX を混合型非拮抗阻害することが明らかとなり、*in vivo* で、乾癬予防効果を示した。5-LOX は、好中球やマクロファージの遊走を活性化し、急性期の炎症や生体防御に関わる LTB₄ の合成に、また、古くよりアナフィラキシー遅延反応物質とされてきたシステイニル LTs（LTC₄, LTD₄, LTE₄）の合成に関与する（図 1）。よって、生体への効果として、急性・慢性炎症、アレルギーやそれによる炎症反応を網羅的に抑制することが期待できる。近年、乾癬の病態誘導に Th17 細胞が重要な働きを持ち、Th17 細胞から多量に産生される IL-17 や IL-22 が乾癬の皮疹を形成することが明

らかとなってきた²⁾。さらに、LTB₄ 受容体の BLT1 はケモカイン受容体の CXCR2 との相互作用によって、乾癬における好中球の走化性を亢進し、ケラチノサイトの活性化を導くことが報告されている⁶⁾。本研究の結果から、RRP の 5-LOX 阻害効果により、乾癬皮膚での LTB₄ 産生を抑え、乾癬の予防あるいは症状の改善につながったものと考えられる。実際に、皮膚中の LTB₄ の有意な減少にともない、好中球を含む浸潤細胞数の減少や、乾癬に特異的なサイトカインの発現抑制も観察されており、これまでの乾癬症状の改善に関する報告と類似の結果を示している。

本研究において、PGE₂ や LTs 合成に関わる酵素の発現抑制あるいは酵素活性阻害に効果を有する食品機能性が明らかとなり、いずれも、慢性炎症性疾患モデルマウスを用いた生体への効果が検証された。現在は、これらの食材を用いて、慢性炎症予防効果を付加した新規嚥下調整食開発に向けた応用研究にも取り組んでいる^{7,8)}。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究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申し上げます。

参考文献

- 1) Modi BG, Neustadter J, Binda E, Lewis J, Filler RB, Roberts SJ, Kwong BY, Reddy S, Overton JD, Galan A, Tigelaar R, Cai L, Fu P, Shlomchik M, Kaplan DH, Hayday A, Girardi M. Langerhans cells facilitate epithelial DNA damage and squamous cell carcinoma. *Science*. 335(6064), 104-108 (2012)
- 2) van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A. M., Florencia, E., Prens, E. P. and Lubberts, E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* 182, 5836-5845 (2009)

- 3) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, H., Murase, R., Taketomi, Y., and Murakami, M. Secreted phospholipase A₂ specificity on natural membrane phospholipids. *Methods Enzymol.* 583, 101-117 (2017) 2016.
- 4) Suzuki-Yamamoto T, Tanaka S, Tsukayama I, Takafuji M, Hanada T, Arakawa T, Kawakami Y, Kimoto M, Takahashi Y. *Dioscorea japonica* extract down-regulates prostaglandin E₂ synthetic pathway and induces apoptosis in lung cancer cells. *J. Clin. Biol. Nutri.* 55(3), 162-167 (2014)
- 5) Tsukayama I, Toda K, Takada Y, Mega T, Tanaka M, Kawakami Y, Kimoto M, Takahashi Y, Kimoto M, Yamamoto K, Miki Y, Murakami M, Suzuki-Yamamoto T. Preventive effect of *Dioscorea japonica* on squamous cell carcinoma of mouse skin involving down-regulation of prostaglandin E₂ synthetic pathway. *J. Clin. Biol. Nutri.* 62(2), 139-147 (2018)
- 6) Sumida, H., Yanagida, K., Kita, Y., Abe, J., Matsushima, K., Nakamura, M., Ishii, S., Sato, S. and Shimizu, T. Interplay between CXCR2 and BLT1 facilitates neutrophil infiltration and resultant keratinocyte activation in a murine model of imiquimod-induced psoriasis. *J. Immunol.* 192(9), 4361-9 (2014)
- 7) 山本登志子, 野村奈央, 山本沙也加, 田中充樹, 目賀拓斗, 津嘉山泉, 戸田圭祐, 川井恵梨佳, 大野智子, 木本眞順美. 高齢者嚥下食の開発に向けた自然薯のレオロジー解析. 岡山県立大学保健福祉学部紀要. 22, 47-56, 2016.
- 8) 目賀拓斗, 田中小百合, 津嘉山泉, 大本安梨紗, 田中充樹, 戸田圭祐, 川井恵梨佳, 吉尾壯兒, 木本眞順美, 山本登志子. 自然薯の保存方法の検討とその高機能性をいかしたレシピの開発. 岡山県立大学保健福祉学部紀要. 22, 39-46,

乳児を養育する親の産後うつと睡眠、生活状況に関する海外との比較研究

岡山県立大学保健福祉学部看護学科

池田 理恵

睡眠に焦点を当て、1 か月児を養育する母親の産後うつに影響を与える要因を明らかにすることを目的とした。

1 か月健診時、母親に、属性、EPDS、PSQI、PBQ、疲労度を問う自記式質問紙調査を実施した。統計パッケージ SPSSver. 22 を用い、産後うつ病が疑われる EPDS9 点以上（以後、高群とする）と 9 点未満（以後、低群とする）に分け、平均値の差の比較には t 検定、カテゴリカルデータにはカイ二乗検定を実施し、その後重回帰分析を行った。睡眠障害は PSQI の下位項目まで検討した。本研究は岡山県立大学倫理委員会の承認を得た（承認番号 17-11）。

研究対象者 112 名のうち回収数 107 名（回収率 95.5%）、欠損データを除く 104 名を分析した（有効回答率 97.2%）。産後うつ病の疑いの有無を従属変数として、重回帰分析を行った結果、育児不安（ $\beta = 0.45$ ）、初産婦（ $\beta = 0.25$ ）、世帯収入（ $\beta = -0.20$ ）が影響を与える因子であった。

I. 研究目的

本研究は、1 か月児を養育する母親の産後うつに影響を与える要因を明らかにし、産後うつを軽減するための基礎資料、また出産後早期から産後の睡眠状態の評価に基づいた介入への示唆を得ることを目的とする。

II. 研究方法

1. 研究対象

A 県内で本研究に協力が得られた 1 産科医院の小児外来において、1 か月児健康診査で来院している母親のうち研究協力が得られた 112 名を対象とした。

2. 調査方法

自記式質問紙調査を 2017 年 9 月から 2017 年 10 月に実施した。医院にて、対象者に研究の趣旨を説明した後に調査票を配布し、その場若しくは郵送にて回収した。個別の回答をもって承諾とした。

3. 調査項目

1) エジンバラ産後うつ病自己評価票（Edinburgh Postnatal Depression Scale : 以下、EPDS）（Cox ら、1987）

EPDS は、産後の母親の抑うつ傾向を測定するためにイギリスで開発された尺度である。10 項目で構成さ

れ、回答形式は 0～3 の 4 件法である。合計点は 0～30 点であり、得点が高いほど産後うつ傾向が強い。産褥期の身体的変化を反映させないよう、身体症状の項目は含まれていない。本研究では、岡野ら（1996）によって作成された日本語版 EPDS を使用した。日本語版 EPDS の信頼性と妥当性は確保されている。産後うつのスクリーニングツールとして広く活用されており、本研究では 9 点未満を正常、9 点以上を産後うつの疑いがあると判断している。

2) ピッツバーグ睡眠質問票（Pittsburgh sleep quality index : 以下、PSQI）（Buysse ら、1989）
睡眠障害の評価として広く使用されており、過去 1 か月間の睡眠を評価するうえで、信頼性・妥当性の高い尺度とされている（Doi ら、2000；駒田ら、2011）。18 項目の質問から構成されており、睡眠の質（C1、1 か月の主観的な睡眠の質）、入眠時間（C2、就床してから入眠するまでの時間）、睡眠時間（C3）、睡眠効率（C4、就床時間に占める睡眠時間の割合）、睡眠困難〔C5、睡眠困難の理由（夜間または早朝覚醒；本研究では授乳等の育児行動を含む、トイレ覚醒、息苦しさ、咳や大きないびき、ひどく寒い、ひどく暑い、悪い夢、痛み、その他）〕、睡眠導入剤の使用（C6）、日中の眠気などによる日常生活への支障（C7）

といった7つの要素から構成されている。各構成要素の得点(0~3点)を加算したPSQI得点(0~21点)が算出される。PSQI得点は、得点が高い程睡眠が障害されていると判断され、5点以下を睡眠障害なし、6点以上を睡眠障害ありとし、6~8点を軽度障害、9点以上を高度障害とした。本研究では、Doiら(2000)によって作成された日本語版PSQIを使用した。

3) 産後愛着尺度 (Postpartum Bonding Questionnaire: 以下, PBQ) (Brockington, 2006)

母親から子どもへの愛着を測定するために開発され自記式質問紙である。PBQは愛着形成 (Impaired bonding)、育児不安 (Anxiety about care)、児に対する拒絶や怒りの感情 (Rejection and pathological anger)、虐待リスク (Incipient abuse) の4要素にカテゴリー化された25の質問項目で構成されており、各項目は「いつもそうである」から「全くない」の6件法で評価される。本研究では、金子ら(2011)により翻訳された産後愛着尺度を使用した。愛着形成のカットオフ値は12点、育児不安のカットオフ値は10点、児に対する拒絶や怒りの感情のカットオフ値は13点、虐待リスクのカットオフ値は3点である。

4) 主観的疲労度

Numerical Rating Scale (NRS)を用い、「全く疲れていない」から「とても疲れている」の11段階で現在の疲労度がどの程度かを質問した。

5) その他

対象者の属性・背景情報 [年齢, 職業の有無, 育児休業取得予定の有無またその期間, 分娩歴, 配偶者の有無, 家族形態, 修学歴, 世帯収入, 精神科既往の有無, 産後うつ既往の有無, 家族(親, きょうだい)の精神疾患既往の有無等]、妊娠・分娩経過(不妊治療の有無, 妊娠中の飲酒・喫煙・服薬の有無, 妊娠合併症の有無, 在胎週数, 分娩様式, 児の出生体重等)、育児状況(授乳方法, 妊娠中および産後におけるサポート者の有無等)を質問した。

4. 分析方法

PSQI得点、PBQ得点、疲労度、対象者の属性・背景情報、妊娠・分娩経過、育児状況を「EPDS9点未満」(以下, EPDS低群)と「EPDS9点以上」(以下,

EPDS高群)の2群に分け、等分散の場合はt検定、不等分散の場合にはWelchの検定で群間比較を行った。カテゴリカルデータと産後うつの関係については χ^2 検定を行った。PSQIの下位項目である「睡眠の質」4群の検討には分散分析を用いた。

以上の結果を踏まえて、産後1か月における産後うつの有無に影響する因子を確認するため、目的変数を「産後うつの有無」とし、分娩歴、世帯収入、産後うつ既往の有無、児の夜泣きの有無、育児休業取得予定期間、疲労度、PBQ4要素、また睡眠に関する事項である就床時刻、入眠時間、睡眠時間、睡眠の質、睡眠効率、睡眠困難、睡眠障害の程度を説明変数としてステップワイズ法による重回帰分析を行った。

統計学的解析は、SPSSVer. 22.0を用い、有意水準は5%未満で解析した。

5. 倫理的配慮

協力施設に依頼文書また口頭にて、研究対象、研究目的、対象者への倫理的配慮について説明し同意を得た。また、調査対象者に対しても依頼文書また口頭にて、研究目的、調査への参加は任意であり研究目的以外ではデータを使用しないこと、データはID番号で管理し個人が特定されないこと、回収した調査票は研究終了後にシュレッダーにて破棄すること、結果は学会等で発表することを明記の上、説明を行った。個別の回答をもって研究への承諾とした。

対象がEPDS得点の区分点を超える得点であった場合は、すみやかに担当看護師へ報告し、施設の指示を受けることとした。

なお本研究は、岡山県立大学倫理委員会の審査・承認を得て実施した(承認番号 17-11)。

III. 結果

研究対象者112名のうち回収数は107名(回収率95.5%)で、そのうち回答に欠損のある者を除いた104名を分析対象とした(有効回答率97.2%)。対象者の平均年齢は、 31.1 ± 4.6 歳、初産婦は54名(51.9%)経産婦は50名(48.1%)また、初産婦の平均年齢は 30.42 ± 4.1 歳であった。

1. EPDS得点と対象者の概要

対象者全体の EPDS 平均得点は 3.4 ± 3.5 点であった。産後うつ疑いありとなる EPDS 高群の者は 10 名で全体の 9.6%であった。

対象者の概要について、EPDS 高群と低群において分析を行った。

EPDS 低群と EPDS 高群で母親の年齢差は見られなかった。EPDS 高群では、母親の育児休業取得予定期間が 2.40 ± 4.20 か月で、EPDS 低群の 6.71 ± 8.61 か月よりも短く、有意差が認められた。分娩歴での比較では EPDS 高群の母親 10 名が全員初産婦であり、これは EPDS 低群における初産婦と経産婦の割合と比較すると有意差が認められた。世帯収入では 200 万円未満 ($p < 0.01$) が、産後うつ既往の有無では既往あり ($p < 0.01$) において、有意に EPDS 高群での割合が多かった。

妊娠・分娩経過においては、在胎週数で有意差が認められた。EPDS 低群では 38.96 ± 1.11 週であったが、EPDS 高群では 39.78 ± 0.97 週と長い結果となった。しかし、両群において正常範囲での結果であった。育児状況では、夜泣きの有無に関し、EPDS 高群で夜泣きありの割合が高く、有意差が認められた ($p < 0.05$)。1 か月児健診時での授乳方法では、EPDS 高群において母乳栄養のみ、人工栄養のみ、混合栄養と回答したのはそれぞれ 5 名 (50.0%)、1 名 (10.0%)、4 名 (40.0%) であり、EPDS 低群では、それぞれ 59 名 (62.8%)、1 名 (1.1%)、34 名 (36.2%) であった。両群において産後 1 か月における児の栄養方法での差は見られなかった。

2. EPDS 得点と睡眠

1) EPDS 得点と PSQI 得点

PSQI 下位項目得点では、C1~C7 についてそれぞれ平均値±標準偏差を示した。下位項目実数では、就床時刻 (時)、入眠時間 (分)、睡眠時間 (時間)、睡眠効率 (%) において PSQI 質問紙よりそれぞれの数値から平均値±標準偏差を算出した。睡眠の質については、「非常に良い」から「非常に悪い」の 4 分類におけるそれぞれの割合を記載した。

対象者全体の PSQI 平均得点は 7.35 ± 2.83 点であった。EPDS 低群の得点は 7.20 ± 2.84 点であり、EPDS 高群の得点は 9.00 ± 2.26 点となった。両群に有意

差は認められなかったが、EPDS 高群の方が PSQI 得点は高い傾向があった。両群において、得点の平均値が障害ありとされる範囲にあるが、特に EPDS 高群では PSQI 得点が高度の睡眠障害に当てはまる結果となっていた。

PSQI 得点により母親全体の睡眠の状況を睡眠障害の程度に 3 区分すると、障害なし 27 名 (26.0%)、軽度障害 37 名 (35.6%)、高度障害 40 名 (38.5%) であり、7 割以上の母親が睡眠障害のある状態であった。EPDS 高群と EPDS 低群で比較すると、EPDS 低群の 94 名では睡眠障害なし、軽度障害、高度障害の割合は約 30%ずつでほぼ等しくなっていたが、EPDS 高群においては、それぞれ 10.0%、30.0%、60.0% となっており、EPDS 高群においては明らかに高度睡眠障害の割合が高かった。

また、就床時刻、入眠時間、睡眠時間、睡眠効率について EPDS 高群と EPDS 低群で比較してみると、それぞれに有意差は認められなかったが、睡眠時間では EPDS 高群が 4.22 ± 1.18 時間であり、EPDS 低群は 5.43 ± 1.78 時間となり、EPDS 高群の方が短い傾向にあった。

EPDS 得点は、PSQI 得点と弱い正の相関が認められた ($r = 0.224, p < 0.05$)。

2) PSQI 下位項目「睡眠の質」における検討

産後 1 か月における睡眠の質について「非常に良い」と回答した人は 7 名 (6.2%)、「かなり良い」38 名 (33.6%)、「かなり悪い」52 名 (46.0%)、「非常に悪い」7 名 (6.2%) であった。EPDS 得点、就床時刻、睡眠効率について睡眠の質 4 群間比較すると、それぞれに有意な差は見られなかった。

睡眠の質と入眠時間では、睡眠の質が「非常に良い」と「非常に悪い」、「かなり悪い」と「非常に悪い」の間にそれぞれ 5%水準で有意差が認められ、睡眠の質が非常に悪いと回答した人は入眠時間が長い傾向にあった。

睡眠の質と睡眠時間では、睡眠の質が「非常に良い」と「非常に悪い」、「かなり良い」と「非常に悪い」の間にそれぞれ 1%水準で、「かなり悪い」と「非常に悪い」の間には 5%水準で有意差が認められ、睡眠の質が非常に悪いと回答した人は睡眠時間が短

い傾向があった。

睡眠の質と PSQI 得点では、睡眠の質が「非常に良い」と「かなり悪い」、「非常に良い」と「非常に悪い」、「かなり良い」と「非常に悪い」の間にそれぞれ 1%水準で有意差が認められた。また、「かなり良い」と「かなり悪い」、「かなり悪い」と「非常に悪い」の間にそれぞれ 5%水準で有意差が認められた。睡眠の質が悪いと PSQI 得点が高い傾向があった(図 3)。睡眠の質は、PSQI 得点と中程度の正の相関が認められた ($r=0.489$, $p<0.01$)。

睡眠の質と疲労度では、睡眠の質が「非常に良い」と「非常に悪い」、「かなり良い」と「かなり悪い」、「かなり良い」と「非常に悪い」の間にそれぞれ 5%水準で有意差が認められた。睡眠の質が悪いと疲労度が高い傾向があった。

睡眠の質と高度睡眠障害の割合をみると、「非常に良い」や「かなり良い」ではそれぞれ 14.3%と 18.4%であったのに対し、「かなり悪い」や「非常に悪い」ではそれぞれ 50.0%と 85.7%と高く、有意な差が認められた(表 5)。睡眠の質は、睡眠障害の程度と弱い正の相関が認められた ($r=0.382$, $p<0.01$)。

睡眠の質に着目し、「非常に良い」また「非常に悪い」と回答したそれぞれ 7 名ずつの育児状況や睡眠環境の特徴を検討したところ、睡眠の質が「非常に良い」と回答した 7 名うち初産婦は 3 名、経産婦は 4 名であった。これは「非常に悪い」と回答した 7 名においても同じ人数となり、睡眠の質に関して分娩歴での違いは見られなかった。

児の夜泣きの有無については、「非常に良い」の中で 2 名が夜泣きありと回答したが、「非常に悪い」では 7 名のうち 5 名が夜泣きありと回答した。

児との添い寝の有無と尋ねると、「非常に悪い」では添い寝すると回答したのは 4 名であったが、「非常に良い」では 7 名のうち 6 名が添い寝すると回答した。

寝室は児と共に父親とも同室であるかという問いにおいては、「非常に悪い」では 2 名が同室であったが、5 名が同室ではなかった。「非常に良い」では 6 名が同室であった。

睡眠の質に着目し検討したところ、睡眠の質が非

常に良い母親は、添い寝をし、児は夜泣きが少なく、また児の父親とも寝室が同じである傾向が見られた。

3. EPDS 得点と疲労度

対象者全体の疲労度の平均は 5.58 ± 2.03 であった。EPDS 高群の疲労度は 7.00 ± 2.20 であり、EPDS 低群の 5.43 ± 1.97 よりも高く、1%水準で有意差が認められた。

4. EPDS 得点と産後愛着尺度

PBQ 尺度 4 要素のうち 2 要素において有意差が認められた。EPDS 高群では、愛着形成が 12.90 ± 7.81 点であり、EPDS 低群の 4.88 ± 4.31 点よりも有意に高かった。育児不安では、EPDS 高群 8.60 ± 5.19 点に対し、EPDS 低群は 2.37 ± 2.72 点となり、高群の方が有意に高かった。また、児に対する拒絶や怒りの感情においては、有意差は認められなかったが、EPDS 高群では 8.60 ± 5.19 点であり、EPDS 低群の 4.97 ± 2.85 点よりも高い傾向にあった。EPDS 高群は、愛着形成に障害があり、育児不安や児に対する拒絶や怒りの感情が強い傾向にあった。

EPDS 得点は PBQ 尺度の 4 要素のうちの愛着形成 ($r=0.617$, $p<0.01$)、育児不安 ($r=0.060$, $p<0.01$)、児に対する拒絶や怒り ($r=0.471$, $p<0.01$) とそれぞれ中程度の正の相関があった。虐待リスクとはほとんど相関がみられなかった ($r=-0.017$, $p>0.05$)。

5. 産後うつの有無に影響を与える因子

産後 1 か月の母親の産後うつの有無に影響を与える因子を検討するため、重回帰分析を行った。目的変数として「産後うつの有無」を、説明変数として産後うつに有意な関連がある因子として上記の結果を参考に、分娩歴、世帯収入、産後うつ既往の有無、児の夜泣きの有無、育児休業取得予定期間、疲労度、PBQ4 要素、睡眠に関する事項である就床時刻、入眠時間、睡眠時間、睡眠の質、睡眠効率、睡眠困難、睡眠障害の程度をステップワイズ法により投入した。その結果、PBQ 尺度の要素の 1 つである育児不安 ($\beta=0.485$, $p<0.01$)、分娩歴 ($\beta=0.247$, $p<0.01$)、世帯収入 ($\beta=-0.194$, $p<0.05$) が影響力を持つ因子であった。その他の因子に影響力は認められなかった。このモデルの決定係数 (R^2) は 0.384 であった。

IV. 考察

1. 発症率および属性

本研究における産後1か月での産後うつがある母親の割合は、9.6%であった。「健やか親子21」における産後うつ病の基準となった鈴宮ら（2004）の調査では、「出産後28日以内」においてEPDS9点以上の者が占める割合は19.2%と報告されており、今回の結果の方が低値を示していた。産後の母親の抑うつに関連する要因については、不妊治療、若年・高年初産婦、双胎、帝王切開術、マタニティブルーズの既往などの精神的に脆弱な因子等が報告されている（原田，2008）。今回の調査の対象者は、初産婦が約半数であり、初産婦の平均年齢は30.42±4.1歳、若年初産婦はおらず35歳以上の高年初産婦も9名のみであったこと、また産後うつの既往のある者は1名のみだったことが低値になったことに影響していると考えられる。また、今回調査を行った産科医院では、施設退院時に今回用いたEPDSにより産後うつのスクリーニングを行い、得点が9点以上の母親に対しては、心理士による面談を行うなど産後うつの早期発見や早期介入を行っているため、9.6%と低値になったと考えられる。

2. 産後1か月の母親の産後うつに関連のある因子

1) 育児不安

産後うつに影響を及ぼす要因の1つ目に育児不安があることが明らかになった。安藤（2009）は、育児上の不安や戸惑いの増加した母親は抑うつ感情が高まりやすいと報告しており、また、佐藤ら（2003）は母親の抑うつと「育児の悩み」とは関連があると報告しており、育児不安が母親の抑うつ感情を高めているという同様の結果が得られた。また、吉田（2005）は、産後うつの母親の養育態度の特徴は、乳児への対応に戸惑い、乳児がなぜ泣くのか分からないといった育児不安が強い、と述べており、産後うつの母親は育児不安を強く感じていることが改めて明らかとなった。母親が抱える育児不安の内容は多岐にわたり、また子どもが成長していくに連れ、新たな不安内容も生じてくることが予測できるため、子どもの成長発達に応じた対応について継続的に支援していく必要がある。医療機関や市町村保健セン

ターなどで行われる乳幼児健診の場のみではなく、保育士に育児相談ができたり、母親同士の交流ができるオープンスペースの機会や場の情報など、支援を必要としている母親のニーズに合った情報を提供し、母親が不安を軽減また解消できる行動がとれる選択肢を専門職は提示していく必要があると考える。

2) 初産婦

産後うつに影響を及ぼす要因の2つ目に初産婦であることが明らかになった。これは、初産婦が経産婦より産後うつのリスクが高い（Sato ら，2009；Tamaki ら，1997）との報告と同様の結果を示していた。初産婦は育児経験がなく、育児に関わるすべてのことが初めてであり、生活自体が出産前の生活と大幅に変化するため、妊娠中から出産後の生活の具体的なイメージが持てるような支援が必要である。特に初産婦である場合は、パートナーとの夫婦役割から子どもの親役割という新しい役割や関係が加わるため、母親のみでなく、父親や家族を含め子どもとの新しい生活をイメージできるような働きかけをしていく必要がある。

3) 経済的問題

産後うつに影響を及ぼす要因の3つ目に経済的困難であることが明らかになった。出産に伴う支出の増大、妻の退職などによる収入の減少による貧困はうつ状態と関連がある（Dearing ら，2004）、経済的不安がある母親は、2.1倍産後うつ傾向を呈した（山中ら，2012）と報告されており、低収入や経済的不安があることは産後うつ状態の背景要因になる可能性がある。また、経済的社会的問題を抱える妊婦は精神的疾患合併が多い（倉澤ら，2010；荻田，2010）、EPDS 高得点者が多い妊娠期の生活背景は経済的困難、妊娠中の喫煙・飲酒であった（金澤ら，2008）との報告もあり、産後だけでなく妊娠期においても経済的問題を抱えている母親はうつと関連することから、経済的問題は妊娠期から産後うつをアセスメントできる情報の1つと言えると考えられる。

世帯の収入に関しては介入しづらい個人情報ではあるが、妊娠期においては就業形態や家族形態、また産後においては赤ちゃん訪問や乳幼児健診など様々な視点から経済的な情報収集を行うなど、行政機関

と医療機関の連携により家庭環境に関する情報を把握する体制を確立し、妊娠期から継続した支援を行うことが重要である。

また、産後うつを未然に防ぐため経済的また社会的な問題を抱える妊産婦に相談窓口や支援に関する情報を分かりやすく確実に伝えるためには、出産施設等の医療機関でポスター掲示や情報提供を行った、母親が今後関わっていくであろう教育機関や地域社会と連携した取り組みも必要であり、地域全体で母子を支えていく体制が必要であると考えられる。

3. 睡眠との関連

1) EPDS 得点と PSQI 得点

産後1か月の母親全体のPSQI得点は、同年代の一般女性(Doiら, 2001)のPSQI得点(20代 5.3 ± 2.5 , 30代 4.4 ± 2.1 , 40代 4.3 ± 2.3)よりも高く、また、産後1か月の母親の約7割に睡眠障害があった。これらのことから、産後1か月においては、多くの母親の睡眠が障害されている状態であることが明らかになった。EPDS高群とEPDS低群においてPSQI得点に差が見られなかったのは、EPDS低群においても睡眠が障害されている状況の母親が多くおり、産後うつの有無に関わらず産後1か月という時期は睡眠が障害されやすい時期であるということが考えられる。

これは特に、産後1か月は児の睡眠覚醒リズムが確立していないため(Shimadaら, 1999)、児が夜間でも起きていたり、夜泣きに対し母親が世話をする状況から、母親の睡眠の評価も悪い傾向になっていると考えられるが、生後2か月から4か月にかけて昼夜の睡眠(昼寝)が減少していく(Shimadaら, 1999)など児の睡眠覚醒リズムの確立に伴い母親の睡眠状況も改善する可能性が考えられる。児の睡眠覚醒リズムの確立や母親が育児に慣れていくことに伴い母親の睡眠の評価が改善すると考えられるため、継続的にアセスメントし続けていくことが必要である。産後1か月という時期は、産後うつではない人も含め、多くの母親が睡眠が障害されていることが明らかになったが、EPDS高群では特に、10人中9人の母親に睡眠障害が見られたため、睡眠障害は産後うつのハイリスクであると考えられる。多くの睡眠障害

の母親の中から産後うつである母親を見逃さないよう、睡眠状況や睡眠環境を含む生活状況をきめ細やかにアセスメントし、支援していく必要がある。

睡眠評価項目C1～C7は、同年代の一般女性(Doiら, 2001)と比較すると、睡眠の質(C1)、睡眠時間(C3)、睡眠効率(C4)および睡眠困難(C5)の得点が悪かった。このことは産後1か月の母親は同年代の一般女性よりも主観的な良眠感がなく、就床していても実際には眠れている時間が少なく、中途覚醒など睡眠に困難をきたしている状況であることがうかがえる。本研究の結果は、妊娠末期から産後1か月、また産後4か月までの母親の睡眠の質に関する縦断研究(乾ら, 2012)における産後1か月の母親の状況と共通していた。特にEPDS高群の母親の睡眠の特徴は睡眠時間が短く、入眠時間が長く、睡眠の質は悪かった。

2) 「睡眠の質」における検討

睡眠の質について「非常によい」と回答した母親は、児と添い寝をしており、児は夜泣きが少なく、寝室は児の父親とも同室であるという特徴がみられた。寝室が父親とも同室である場合、児の睡眠覚醒リズムの不確立は母親の睡眠の評価に影響すると同時に、父親の睡眠にも影響すると考えられる。そのような状況において、父親が母親と児と共に眠っているということは、父親も育児に関心を持っていたり、夜間に児の世話が必要になった時、父親のサポートも受けやすい状態であると考えられる。母親の睡眠の質と、児の父親と寝室が同室であることが関連することから、母親の睡眠の質や母親の睡眠障害の有無をアセスメントするために、睡眠環境についても情報収集していく必要がある。

母親の産後うつをアセスメントする上で睡眠の評価を行うことは必要な支援の1つであるという示唆が得られた。

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、非アルコール性脂肪性肝炎 (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。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検討を進めたところ、NASH モデルマウスの肝臓で酵素活性の上昇が確認された血小板型 12-リポキシゲナーゼが、マウス肝臓の非実質細胞に発現していることを確認した。

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が、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。

我々のこれまでの検討において、NASH モデルマウスの肝臓に 12-ヒドロペルオキシ酸を生成するリポキシゲナーゼの存在が示唆され、本酵素がリポキシゲナーゼアイソザイムの中で血小板型 12-リポキシゲナーゼであることを確認した。しかしながら、本酵素が NASH モデルマウス肝臓のどの細胞に発現しているかについては不明のままであった。本酵素の発現細胞の同定は NASH における本酵素の役割を検討する上で重要である。そこで本研究では、NASH モデルマウスの肝臓における血小板型 12-リポキシゲナーゼ発現細胞の同定を試みた。

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 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) マウス肝臓実質細胞および非実質細胞の調製

マウス肝臓組織は、門脈よりコラゲナーゼを灌流させることにより肝臓組織を分解し、遠心分離 (50 g, 1 分間) により得られた沈殿から実質細胞を調製した。また、このときの上清中の細胞を OptiPrep を用いて精製することにより非実質細胞を調製した。実質細胞と非実質細胞は超音波破碎後、150,000 g で 1 時間超遠心分離し、上清のサイトゾル画分を得た。

(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ズジャパン) を用いて行った。

(4) タンパク質発現解析

SDS-PAGE によりタンパク質を分離した後、ゲル上のタンパク質を PVDF 膜に転写した。この PVDF 膜をスキムミルクにてブロッキング後、抗血小板型 12-リポキシゲナーゼ抗体と反応させた。その後検出のために、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識した二次抗体と反応させ、ECL (GE ヘルスケア) を用いて LAS4000 (GE ヘルスケア) にて検出した。

3. 結果

マウス肝臓から調製した cDNA を用いて、血小板型 12-リポキシゲナーゼの発現量を調べたところ、MCD 食摂取 8 週目の発現量はコントロール群と同程度であった (図 1)。

MCD 食を摂取したマウス肝臓から調製した実質細胞と非実質細胞のサイトゾル画分の血小板型 12-リポキシゲナーゼのタンパク質発現量を調べたところ、非実質細胞で血小板型 12-リポキシゲナーゼの発現が確認され、実質細胞では発現が確認されなかった。

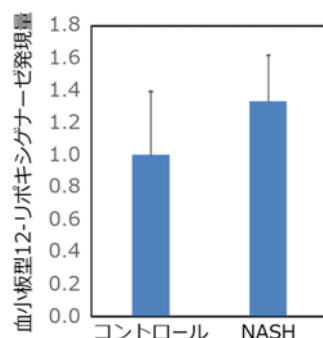


図 1 MCD 食摂取による血小板型 12-リポキシゲナーゼの mRNA 発現量

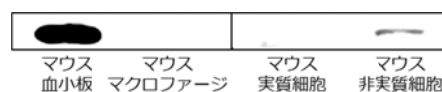


図 2 肝臓実質細胞と非実質細胞の血小板型 12-リポキシゲナーゼのタンパク質発現

4. 考察

これまでの我々の検討で確認された NASH モデルマウスにおける血小板型 12-リポキシゲナーゼの酵素活性の上昇が mRNA への転写調節によるものかを検討するために、NASH モデルマウス肝臓における血小板型 12-リポキシゲナーゼの mRNA 発現量を検討した。しかしながら、NASH モデルマウスでの発現量はコントロールマウスと比べて大きな違いは認められず、転写調節以外のメカニズムによるものと示唆された。また、NASH モデルマウスの肝臓の実質細胞と非実質細胞について、血小板型 12-リポキシゲナーゼのタンパク質発現量を調べると、本酵素は実質細胞ではなく非実質細胞に発現していることが確認された。今後は、免疫組織化学的な手法を用いて血小板型 12-リポ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ポ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。

1. 岡山県立大学, 2. 就実大学

綾部誠也¹, 沖田剛輝¹, 東野祐哉¹, 犬飼義秀¹, 大山剛史¹, 森村和浩²

本研究の目的は、ウェアラブルモニタによる移動形態の判別と生体負荷の推定精度向上のための基礎的研究として、位置情報に基づく生体負荷の推定精度に関する研究（研究1）、腕時計型脈拍計による心拍数の推定精度に関する研究（研究2）を行った。研究1として、位置情報から得られる速度変化の情報の分析により日常生活の活動に即したエネルギー消費量推定法になることを明らかにした。研究2として、日常生活を想定した断続的身体活動において、腕時計型脈拍計によって測定された脈拍数が、主として心拍数を過小評価したし、その背景に光電脈波法の構造的限界があると考えられた。これらのことから、ウェアラブルモニタによる生体負荷の推定法は、その精度を担保するために動作の連続性を含む複数の前提条件が求められると考えられた。ウェアラブルモニタの実際の利用を鑑みれば、利用者の複雑なニーズに対応できるように生体情報取得技術とその分析アルゴリズムの両者の改善が必要である。

1. はじめに

活動的な生活習慣が健康の保持増進に有益であることをエビデンスが集積され、身体活動の実践的な定量法に関心が強まっている。身体活動モニタの限界点は、身体活動の強度を絶対強度（単位あたりの絶対量、安静時の何倍などの毎分値など）として評価するに留まることであるが、運動処方原則に従えば身体活動の強度を個々に相対的に評価する必要がある。心拍数は、年齢、外部環境、投薬などの影響を受けるものの、身体活動の心負担を相対的にモニタできる。

これまで、心拍数の測定は、心電図の電極装着や胸部への機器の装着が必要など煩雑であったが、近年の技術革新によって腕時計型のLEDセンサーによる脈拍測定の精度も飛躍的に向上すると同時に、腰部活動量計の限界点であった入浴時や睡眠時の装着のストレスを軽減した。このような背景から、我々は、ウェアラブル端末は、身体活動のみならず、不活動、身体ストレス、睡眠の質など、24時間全体の生体情報の取得を可能にし、これまでの活動量計の「運動の測定」という概念を超えて、健康モニタリング（ヘルスモニタリング）という視点にて包括的に健康を支援できると考えた。

そこで、本研究は、以下の2点からウェアラブルモニタを用いた身体負荷の定量について検討し

た。実験1として、小型のGPSモニタを利用して呼吸循環応答から評価される消費エネルギーの推定について検討した。また、実験2として、腕時計型脈拍計による心拍数の推定精度に関する研究を行った。

2. 方法

2-1 方法（研究1） 本研究の対象者は習慣的に運動を行なっている男子大学生であった。全ての対象者には、事前に本研究の目的や実験方法、実験に伴う危険性などについて説明した上で、書面による同意を得た。本研究は、全てのプロトコルをヘルシンキ宣言に従って行い、研究実施前に倫理委員会の承認を得た。

全ての対象者は、4条件での1,200 mの間欠的運動負荷試験を実施した。全ての実験は、屋外の陸上競技用400 mトラックにて行なった。

測定は、5分間の座位安静の後、4条件での主運動をそれぞれ10分30秒間実施した。各試行間には10分間の座位安静を設けた。4つの条件は、スプリント走なし（no sprint; NSP）、10m×12（SS10）、20m×6（SS20）、40m×3（SS40）であった。合わせて、全ての対象者は、4条件での1,200 mの間欠的運動負荷試験を実施した。全ての実験は、屋外の陸上競技用400 mトラックおよび天然芝のサッカー競技場

にて行なった。4つの条件は、直進スプリント (straight sprint ; SS), 90° の方向転換を含むスプリント (change of direction ; CD90), 135° の方向転換を含むスプリント (CD135), 180° の方向転換を含むスプリント (CD180)であった。走行距離, 走行速度, 加速度, 心拍数は SPI Pro X (GPSports, キャンベラ, オーストラリア) にて測定した。心拍数は, 心拍数測定胸部ストラップ H10 (Polar Electro, ケンペレ, フィンランド共和国) からの信号を SPI Pro X にて Bluetooth にて接続し, 1/15 秒毎に評価した。呼気ガス分析は, 安静時から実験終了まで呼気ガスを MetaMax 3B (CORTEX, ライプツィヒ, ドイツ連邦共和国) を用いて Breath by Breath 法にて分析した。EE は呼気ガス分析装置から得られた V02 と RER から Weir の式を用いて算出した。

2-2 方法 (研究2) 本研究の対象者は, 重篤な疾患のない若年男女であった。すべての対象者には, 事前に本研究の目的や実験方法, 実験に伴う危険性などについて説明したうえで, 書面による同意を得た。

すべての対象者は, 屋外にて断続歩行負荷試験と連続歩行負荷試験を行った。実験プロトコルは, 10 分間の座位安静, 断続歩行負荷試験, 連続歩行負荷試験にて構成された。断続歩行負荷試験は, 運動時間から計算された 1 回当たりの歩行距離 (17.5 から 70 m) の半分の位置に設置されたマークを 1 往復した。連続歩行負荷試験は, 40 m の直線路を連続で 5 往復した。

断続歩行負荷試験は, 速度を 70 m/min として 3 つの条件を定め, 1 分間の歩行運動と 10 分間の座位安静にて構成された。条件間には 5 分間の座位安静を設けた。条件 1 は, 2 分間の座位安静と 15 秒間の歩行運動を 4 回繰り返し, 2 分間の座位安静を行った。条件 2 は, 3 分 20 秒間の座位安静と 30 秒間の歩行運動を 2 回繰り返し, 3 分 20 秒間の座位安静を行った。条件 3 は, 5 分間の座位安静と 1 分間の歩行運動を行い, 5 分間の座位安静を行った。

3. 結果

3-1 結果 (研究1) スプリント走時の平均速度,

最高速度, 加速度, メタボリックパワーに有意な差が認められた ($p < 0.05$)。SS10, SS20, SS40 が NSP に比して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。スプリント走有条件内での比較において, SS10 は, V02 と EE が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。スプリント走時の平均速度, 最高速度, 加速度には, 方向転換条件内にて有意な差が認められた ($p < 0.05$)。CD180 は, CD90 または CD135 に比して, 平均速度が遅く, 加速度が大きかった ($p < 0.05$)。メタボリックパワーは方向転換条件内での有意な差が認められなかった。V02, VC02, VE, RPE と HR は, SS と方向転換条件にて有意な差が認められた ($p < 0.05$)。方向転換条件内の比較においては, CD180 の EE が CD90 に比して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。SS10 は, V02 が SS40 に比して有意な差が認められ ($p = 0.045$), EE が SS20 に比して有意な差が認められた ($p = 0.021$)。SS20 は, VC02 が SS40 に比して有意な差が認められた ($p = 0.011$)。CD180 は, CD90 と CD135 に比して, V02, EE, VC02 が有意に大きく ($p < 0.05$), VE は CD90 に比して有意に大きかった ($p = 0.042$)。

3-2 結果 (研究2) 断続歩行負荷試験のステージ全体 11 分間での心拍数について, 15 秒間の歩行を 4 回行った条件と 60 秒間の歩行を 1 回行った条件のとき, 胸部心拍モニタに比して, 腕時計型ウェアラブル機器が有意に低値を示した ($p < 0.01$)。断続歩行負荷試験の運動中 1 分間での心拍数について, 15 秒間の歩行を 4 回行った条件, 30 秒間の歩行を 2 回行った条件および 60 秒間の歩行を 1 回行った条件のすべてで, 胸部心拍モニタに比して, 腕時計型ウェアラブル機器が有意に低値を示した ($p < 0.01$)。連続歩行負荷試験の歩行中での心拍数について, 普通歩行と速歩のとき, 胸部心拍モニタに比して, 腕時計型ウェアラブル機器が有意に低値を示した ($p < 0.01$)。腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数と, 胸部心拍モニタによって測定された心拍数について, 断続歩行負荷試験の運動中 1 分間 (A-C), 断続歩行負荷試験の運動終了直後の座位安静 2 分間 (D-F), 連続歩行負荷試験の歩行中 (G-I) の何れも, 両者の間に有意な正の相関関係が認められた ($r = 0.780 - 0.997, p < 0.001$)。機器間での測定値の

誤差の信頼区間 (95 %信頼区間) は、断続歩行負荷試験の運動中 1 分間が、15 秒間の歩行を 4 回行った条件 (A) にて-21.3 から-3.3 bpm, 30 秒間の歩行を 2 回行った条件 (B) にて-24.0 から-0.7 bpm, 60 秒間の歩行を 1 回行った条件 (C) にて-24.4 から 4.5 bpm, 断続歩行試験での運動終了直後の座位安静 2 分間が、15 秒間の歩行を 4 回行った条件 (D) にて-2.5 から 1.6 bpm, 30 秒間の歩行を 2 回行った条件 (E) にて-6.6 から 10.0 bpm, 60 秒間の歩行を 1 回行った条件 (F) にて-2.2 から 5.2 bpm, 連続歩行負荷試験での歩行中が、低速 (G) にて-3.4 から 3.2 bpm, 普通歩行 (H) にて-3.2 から 1.3 bpm, 速歩 (I) にて-5.5 から 0.4 bpm であった。断続歩行負荷試験において、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数が、胸部心拍モニタによって測定された心拍数に比して、すべての条件での運動開始直後 30 秒程度までの範囲にて有意に低く ($p < 0.05$), すべての条件での運動終了直後の座位安静時 30 秒程度までの範囲にて有意に高かった ($p < 0.05$)。連続歩行負荷試験において、すべての条件での運動開始直後の 30 秒程度までの範囲にて、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数が、胸部心拍モニタによって測定された心拍数に比して、有意に低かった ($p < 0.05$)。胸部心拍モニタと腕時計型ウェアラブル機器の測定値の差の説明変数として、運動負荷条件、胸部心拍モニタによって測定された心拍数、胸部心拍モニタによって測定された安静時心拍数が採択された。胸部心拍モニタと腕時計型ウェアラブル機器の測定値の誤差率の説明変数として、運動負荷条件、歩行時間、胸部心拍モニタによって測定された安静時心拍数、胸部心拍モニタによって測定された心拍数が採択された。

4. 考察

本研究は、位置情報に基づいた身体活動のエネルギー消費量の推定方法と腕時計型ウェアラブル機器による脈拍計による心拍数の推定についての妥当性を検討した。本研究の結果は、ウェアラブルモニタによる生体負荷の推定法は、その精度を担保するために動作の連続性を含む複数の前提条件が求められ

ると考えられた。ウェアラブルモニタの実際の利用を鑑みれば、利用者の複雑なニーズに対応できるように生体情報取得技術とその分析アルゴリズムの両者の改善が必要である。

研究 1 においては、エネルギー消費量を明らかにするための基礎的研究として、短距離高頻度の直線スプリント走を含む間欠的運動時に、長距離低頻度のスプリント走を含む間欠的運動時に比して、高い加速度が原因して、エネルギー消費量 (EE) が高くなるとの仮説を立てた。その結果、EE は、スプリント走無し条件に比してスプリント走あり条件で増加し、さらに、直線スプリント走に比して方向転換を含むスプリント走条件にて更なる増加を認め、仮説を支持する結果を得た。加速度は、EE と同様に、スプリント走なし、直線スプリント、方向転換を含むスプリント走の順に大きくなった。さらに、重回帰分析の結果においても、加速度と方向転換の有無が EE の説明因子として採択された。これらの結果は、本研究のオリジナルの知見であり、総走行距離を統一した距離と走行方向の異なるスプリント走条件での間欠的運動時において、スプリント走行時の加速度が EE に貢献することを示唆する。本研究は、スプリントを含めた間欠的運動中の心拍数や主観的運動強度、EE などの身体負担がスプリント走を含まない条件に比して高値を示すことを確認した。本研究の実験で用いた 8 条件は全て走行距離が 1,200m に統一され、間欠的運動全体の移動速度の変動が 3.6%

(114m/分-119m/分) であったにも関わらず、EE がスプリント走により 18.91-36.12kcal (27-41%) 増加した。また、本研究は、方向転換を伴うスプリントが間欠的運動中の EE をさらに増大させる事を確認した。すなわち、方向転換を伴うスプリント走を含む間欠的運動時には、EE と加速度の増大が認められ、重回帰分析の結果も方向転換の有無と加速度が EE の説明要因として採択された。これらの結果は、間欠的運動中において、スプリント走や方向転換に伴う加速度の増加が EE の増大に貢献していることを示し、位置情報から得られる加速度がサッカーの試合中の EE の推定指標として有用となる可能性を示唆している。

研究2においては、日常生活を想定した断続的活動下において、腕時計型ウェアラブル機器によって評価された脈拍数の妥当性を検討した。その結果、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数は、胸部心拍モニタによって測定された心拍数に比して、15秒から60秒の断続歩行運動時において有意に過小評価した。また、同様の比較において、400 mの連続歩行運動時には、運動全体の平均値には有意な差が認められなかったものの、運動開始直後に有意な過小評価が認められた。さらに、重回帰分析の結果においては、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数の過小評価の程度は、運動継続時間（運動負荷条件と歩行時間）が有意な説明因子として採択された。これらの結果は、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数が、断続的活動下での心拍数を過小評価することを示す。これは、本研究のオリジナルの知見の一つであり、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数は、断続的活動が多くを占める日常生活下での心拍数を過小評価することを示唆する。本研究において、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数と、胸部心拍モニタによって測定された心拍数の差は、座位安静時が -0.1 ± 0.4 bpm ($-0.1 \pm 0.5\%$)、連続歩行運動時が -2.6 ± 1.5 から -0.1 ± 1.7 bpm (-2.1 ± 1.1 から $-0.0 \pm 1.8\%$) であった。この結果は、先行研究に支持されるものであり、これまでに腕時計型ウェアラブル機器の誤差として、座位安静時において $\pm 5\%$ 程度、歩行、走行およびトレッドミルやエルゴメーターの運動時において $\pm 10\%$ 程度であることが報告されている。また、本研究を含めた何れの研究でも、腕時計型ウェアラブル機器は比較対照法との間に高い相関性を認めている。これらの結果は、腕時計型ウェアラブル機器が、心拍数に定常状態が得られるような連続的動作（安静を含む）の条件下にて、心拍数の推定法として有用であることを示唆している点で一致している。一方で、断続歩行運動時での、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数と、胸部心拍モニタによって測定された心拍数との誤差範囲は、 $\pm 13\%$ に至った。これは、本研究のオリジナルの知見の一つであ

り、先行研究においてもこのような断続的活動での推定精度の低下が確認されている。成人男女を対象として、それぞれ5分間の実験環境下での日常生活活動（歩行、走行、サイクリング、デスクワーク、家事活動、立ち上がり動作、横たわり動作）を行い、そのときの10秒間について、1種の腕時計型ウェアラブルによって測定された脈拍数が心電図と比較して、誤差範囲が -14.5 から 1.4% であると報告している。さらに、本研究では、断続歩行負荷試験において、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数が、胸部心拍モニタによって測定された心拍数に比して、すべての条件での運動開始直後30秒程度までの範囲にて有意に低くなる時間帯を確認し、すべての条件での運動終了直後の座位安静時30秒程度までの範囲にて有意に高くなる時間帯を確認した。従って、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数と、胸部心拍モニタによって測定された心拍数の差は、運動開始時の心拍数の変動に対する応答時間の遅れが原因していると考えられる。従って、断続的運動時には、間欠的な身体活動に伴う心拍数の変動が大きいと、連続的固定負荷運動時に比して、推定誤差が大きくなると考えられた。このような心拍数の変動に対する腕時計型ウェアラブル機器の脈拍数の探知の時間遅れは、主として、PPGの方法論的限界が原因である。中島らは、10分間の入浴による温熱負荷で変動した心拍数について、光電脈波波形から得られた心拍波形と、心電計から得られた心電図波形の比較を行っている。その結果、光電脈波波形から得られた心拍波形の位相が、心電計から得られた心電波形と比較して遅れていることを明らかにし、この遅れは、心臓が収縮して血液が末梢の指まで送られてくる時間とアナログ回路部のローパスフィルタによるものであると説明している。また、高木は、PPGを用いて指への血液流入による体積変化の記録を行っており、その結果、心臓の拍動ごとに、それよりもやや遅れて血液流入による体積の変動が見られることを明らかにした。これは容積脈波と呼ばれ、血液が心臓から拍出されたエネルギーの一部は、血液を抵抗に逆らって押し流す力となるが、他のエネルギーは血管を押し広げ、血管に

弾性のエネルギーとして蓄えられる。このエネルギーは、次の血管部分へも同様に伝えられ、結局、心臓から離れた指先までも到達するからであると説明している。このような PPG の方法論的限界が、本研究で見られた、腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数が、胸部心拍モニタによって測定された心拍数に比して、遅れて変動が起こる原因に関係しているのだと考えられる。本研究の結果を踏まえれば、腕時計型ウェアラブル機器の健康づくりの現場やスポーツ競技での利用に際しては一定の注意が必要である。運動中の心拍数を評価する主たる目的は、運動中の循環負担を評価して、運動の安全性と効果を担保することである。すなわち、運動強度の変動が著しいスポーツ活動や日常生活など、心拍数と運動強度の関係性が担保されないような運動については、腕時計型ウェアラブル機器による心拍数の推定の精度が確保されるとは考え難い。元来、上述のような間欠的身体活動においては、心拍数と運動強度の関係が担保されないため、胸部電極や胸部ストラップを用いて測定された心拍数であっても、心拍数に基づいて運動強度や身体負担を評価することは容易ではない。さらに、腕時計型ウェアラブル機器については、PPG が持つ脈拍数応答の時間遅れの限界点が合間って更なる精度低下が懸念される。ただし、腕時計型ウェアラブル機器を用いた場合、監視型での運動プログラムや在宅型での機器によって管理された運動プログラムであれば、十分に実用可能であると考えられる。さらに、屋外でのウォーキングやランニングなどの強度の持続性が担保される運動についても同様である。運動処方ガイドラインに従えば、運動実施者の運動状況や健康状態などから、運動強度を年齢推定の最大心拍数の 10% 程度の心拍数の範囲で区分している。運動開始から数分間が経過したのちの測定値であれば、実際の心拍数に対応した数値を計測できるものと考えられる。本研究の成果は、本研究で用いた機器に限らず、他の PPG を用いた腕時計型ウェアラブル機器による検討でも、同様の限界となると考えている。本研究は、単一の腕時計型ウェアラブル機器を対象としたが、我々は、他の機種でも同様の現象が得られることを

確認している。本研究の追従実験として、3 種の腕時計型ウェアラブル機器を対象として、電動式トレッドミルでの多段階運動負荷試験を行った結果、3 種の腕時計型ウェアラブル機器によって測定された脈拍数の誤差範囲は、歩行運動全体では、-2.3 から -1.7 bpm (-1.8 から -1.3 %), 運動開始直後 15 秒間, 30 秒間, 60 秒間では、-17.4 から -7.9 bpm (-14.9 から -6.5 %) であり、さらに、3 種すべての腕時計型ウェアラブル機器が運動開始直後に心拍数を過小評価した。

5. 結論

本研究は、ウェアラブルモニタによる生体負担の評価法の妥当性を検証した。本研究の結果は、ウェアラブルモニタによる生体負担の推定法は、その精度を担保するために動作の連続性を含む複数の前提条件が求められると考えられた。ウェアラブルモニタは、個人利用が主となるため、様々な条件下にも対応できる測定精度が求められる。すなわち、運動の安全・効果を確保するなどの高い精度が求められる場面での利用に際しては、十分な配慮が必要であると言わざるを得ない。本研究の結果に基づけば、現状のウェアラブルモニタは、生体情報取得技術とその分析アルゴリズムの両者に改善が必要である。

謝辞

本研究の実施に際してご支援を頂いた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に御礼を申し上げます。

Cross-Company Defect Predictionにおける 分野外データセットの有用性に関する評価

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-Company Defect Prediction, CCDP）が盛んである。近年は異なるメトリクスを収集したプロジェクト同士でも不具合予測を行えるようなデータ変換を伴う研究が進められてきた。これらの研究ではメトリクスの素性などは一切考慮されておらず、利用するデータがソフトウェア開発プロジェクト由来のものである必要性が乏しい。本研究では、ソフトウェア開発プロジェクト由来でないデータセットを CCDP 手法に適用した場合の予測性能を評価した。その結果、ソフトウェア開発由来でないデータセットを用いた場合においても一定の予測性能が実現されることが確認できた。このことは、CCDP に与えるデータセットに制限を設けず、多種多様な分野からデータセット収集することが予測精度の向上に寄与する可能性を示唆している。

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-Company Defect Prediction (CCDP), もしくは Cross-Project Defect Prediction (CPDP) と呼び広く研究されている[1-9, 11, 12, 15-21, 23, 24, 26]。プロジェクト内部のデータを用いる場合と同程度の精度で予測できると Rahman ら[19]の研究などで示されている。

初期の CCDP に関する研究では、同じ種類の評価尺度（メトリクス）でデータを記録したプロジェクト同士で有用性を評価していた。異なるプロジェクトであっても、ある種類のメトリクスと不具合との関連性は類似していると考えられるためである。例えば、複雑なプログラムほど不具合を含む可能性が高いといった定性的な観測に基づいている。

一方、実際の開発プロジェクトを観察すると、プロジェクト毎に独自のメトリクス集合を定義してデー

タを収集することは往々にしてある。また、Web アプリ開発と組み込みシステム開発といった異なるドメインでは収集可能なメトリクスが異なる。このような状況においても不具合予測に互いのデータを利用できれば有用である。

近年の研究では、互いに異なるメトリクス集合でデータを収集したプロジェクト間における CCDP 手法の研究が盛んである[9][15]。これらの研究では、メトリクスの分布などから類似した別のメトリクスをマッチングするなどの方法が採られる。つまり、同じメトリクスを用いる研究とは異なり、個々のメトリクス間の類似性はデータによってのみ定まり、定義上の意味的な関連性などは一切考慮されない。そのため、原理的には分野外のデータを流用することも可能である。現在、様々な分野で多種多様なデータが収集されている。このようなデータの中には、不具合予測に用いられるプロジェクトデータと類似した特性を持つものが存在する可能性がある。

そこで本研究では、ソフトウェア開発プロジェクトとは異なる分野のデータセットを CCDP 手法に適用して、どの程度の予測精度が実現できるか検証を行った。

以降では、まず第2節で CCDP 手法に適用する分野外のデータセットの特徴などについて述べる。続い

Default Task	
Classification	(316)
Regression	(82)
Clustering	(76)
Other	(54)
Attribute Type	
Categorical	(37)
Numerical	(275)
Mixed	(55)
Data Type	
Multivariate	(327)
Univariate	(19)
Sequential	(45)
Time-Series	(80)
Text	(44)
Domain-Theory	(23)
Other	(21)
Area	
Life Sciences	(98)
Physical Sciences	(47)
CS / Engineering	(150)
Social Sciences	(24)
Business	(27)
Game	(10)
Other	(69)

# Attributes	
Less than 10	(98)
10 to 100	(196)
Greater than 100	(79)
# Instances	
Less than 100	(26)
100 to 1000	(149)
Greater than 1000	(222)
Format Type	
Matrix	(295)
Non-Matrix	(134)

図 1: UCI Machine Learning Repository の特性

て第 3 節では予測精度を評価するための実験方法について述べる．その後，第 4 節では実験結果について考察を行い，第 5 節で本論文での結論と今後の展望について述べる．

2. データセット

2.1. 調査対象及び選択の方法

ソフトウェア工学分野で用いられるデータセットのリポジトリとしては，Promise Repository[13]が有名である．また，近年では，SeaCraft[14]のような大規模なリポジトリも整備されてきている．一方で，本研究ではソフトウェア工学分野以外で収集されたデータの有用性について調査するため，これらのリポジトリは利用できない．

本研究では，ソフトウェア工学分野以外のデータセットを扱っているリポジトリのうち，不具合予測で頻繁に用いられる機械学習手法と親和性の高いデータを多く含むリポジトリとして，UC Irvine Machine Learning Repository[25] を参照した．

現在，UC Irvine Machine Learning Repository では 429 のデータセットが公開されている．公開され

ているデータセットは生命科学や社会科学，工学など様々な分野で収集されたものである．また，図 1 に示すようにデータセットの特徴によって分類が行われており，不具合予測で用いられるデータと類似した特性で絞り込むことができる．

本研究では，以下の基準でデータセットの絞り込みを行った．

- Default Task: Classification
- Attribute Type: Numerical
- Data Type: Multivariate
- # Attributes: 10 to 100
- # Instances: Greater Than 1000
- Format Type: Matrix

不具合予測の結果は，不具合の有無という分類問題のため，Classification を選択した．また，予測時の入力は一変数数などの数値であることがほとんどであり，カテゴリ変数が用いられることはほぼないため，Attribute Type は Numerical としている．そして，通常の不具合予測では 20 個程度の数値が予測時に入力されることから # Attributes は 10 to 100 としている．他の項目はデータ数の多さを基準に選択した．

2.2. 対象データセット

以上の選択方法によってデータセットの数は 48 に絞り込まれた．本研究では，48 の中から以下の 3 つのデータセットを実験に用いた．

- Default of credit card clients (DCCC)
- Wine Quality (WQ)
- Anuran Calls MFCCs (ACM)

それぞれのデータの基本的な特性は図 2, 3 の通りである．DCCC はカード利用者の支払い履歴や年齢などがメトリクスとして記録されており，予測対象は破産の有無である．WQ はクエン酸の量などワインの成分に関する情報が記録されており，予測対象はワインの品質（10 段階評価）である．本研究では不具合の有無を二値で予測するため，10 段階を 2 段階に変換した．ACM はカエルの種類と鳴き声に関するデータセットである．WQ と同様に予測対象の数が多いため，2 段階に変換する処理を施した．

Data Set Characteristics:	Multivariate	Number of Instances:	30000
Attribute Characteristics:	Integer, Real	Number of Attributes:	24
Associated Tasks:	Classification	Missing Values?	N/A

図 2:DCCC の特性

Data Set Characteristics:	Multivariate	Number of Instances:	4898
Attribute Characteristics:	Real	Number of Attributes:	12
Associated Tasks:	Classification, Regression	Missing Values?	N/A

図 3:WQ の特性

Data Set Characteristics:	Multivariate	Number of Instances:	7195
Attribute Characteristics:	Real	Number of Attributes:	22
Associated Tasks:	Classification, Clustering	Missing Values?	N/A

図 4:ACM の特性

3. 実験

3.1. 予測対象プロジェクト

第2節で選択したデータとは別に, 予測対象となるプロジェクトデータが必要である. 先行研究で用いられた公開データセットから次の3つを選択した.

- SOFTLAB
- NASA[22]

前年度の研究調査によって NASA 及び SOFTLAB は CCDP に関する先行研究において広く用いられていることがわかっている. NASA および SOFTLAB では, メトリクスを収集したモジュールの単位は関数単位である. また, それぞれのデータセットには5つのプロジェクトで収集されたデータが格納されている.

3.2. 実験手順

実験手順は以下の通りである.

1. 学習用のデータを選択する
2. 選択したデータに CCDP 手法を適用する
3. 予測モデルを学習する
4. 予測対象プロジェクトの不具合を予測する
5. 上記 1-4 を繰り返す
6. 予測精度を評価する

実験では, まず, 第2節で選択したデータセットの一つを学習用データとして選択する. 次に, 既存研究で提案されている CCDP 手法を学習データに適用

し, 不具合予測モデルを構築する. 不具合予測モデルに予測対象プロジェクトのデータを入力して不具合予測を行う. 全てのデータセットに対して上記の手順を繰り返し, 最後に予測精度を評価する. 適用する CCDP 手法や評価尺度などの詳細については次節以降で説明する.

3.3. 適用する CCDP 手法

現在まで様々な CCDP 手法が提案されている. 異なるメトリクスを用いた CCDP 手法として文献[15]で提案されている手法を用いた. この手法は以下のような手続きに従って第2節で選択したデータから不具合予測モデルを構築する.

1. 学習データセットから分散の小さいメトリクスを除去する
2. 学習データと予測対象データのメトリクスの間で類似したものをペアとして選択する
3. 機械学習モデルを学習する

文献[15]では類似性の判定に3種類の方法が提案されているが, 本研究では, コルモゴロフ=スミルノフ検定を用いた手法を用いた.

3.4. 評価尺度

本研究では予測精度の評価を適合率 (precision), 再現率(recall), F1 値および AUC を用いて行う. これらの評価尺度は先行研究においても広く用いられている.

表 1: DCCC を用いた予測の精度

	precision	recall	F1	AUC
CM1	0.128	1.000	0.228	0.500
MW1	0.107	1.000	0.193	0.500
PC1	0.020	0.033	0.025	0.441
PC3	0.014	0.015	0.014	0.430
PC4	0.129	0.486	0.204	0.481
ar1	0.074	1.000	0.138	0.500
ar3	0.000	0.000	0.000	0.500
ar4	0.187	1.000	0.315	0.500
ar5	0.000	0.000	0.000	0.500
ar6	0.131	0.867	0.228	0.433

表 2: WQ を用いた予測の精度(white)

	precision	recall	F1	AUC
CM1	0.128	1.000	0.228	0.500
MW1	0.107	1.000	0.193	0.500
PC1	0.091	1.000	0.166	0.524
PC3	0.130	1.000	0.230	0.524
PC4	0.196	0.881	0.321	0.653
ar1	0.075	1.000	0.140	0.504
ar3	0.000	0.000	0.000	0.500
ar4	0.000	0.000	0.000	0.454
ar5	0.235	1.000	0.381	0.536
ar6	0.149	1.000	0.259	0.500

表 3: ACM を用いた予測の精度

	precision	recall	F1	AUC
CM1	0.131	1.0	0.232	0.512
MW1	0.109	1.0	0.196	0.511
PC1	0.000	0.0	0.000	0.500
PC3	0.000	0.0	0.000	0.500
PC4	0.000	0.0	0.000	0.499
ar1	0.103	1.0	0.188	0.652
ar3	0.133	1.0	0.235	0.527
ar4	0.196	1.0	0.328	0.529
ar5	0.235	1.0	0.381	0.536
ar6	0.000	0.0	0.000	0.500

4. 実験結果と考察

4.1. DCCC

DCCC を用いた場合の予測精度を表 1 に示す. CM1～PC4 までは NASA のデータに対する予測結果である. また, ar1～ar6 までは SOFTLAB のデータに対する予測結果である. 再現率が高いプロジェクトが一定数ある一方で, 適合率は軒並み低い. その結果, F1 値も低い値に止まっている. AUC は一般に 0.5 以上であることが求められるが, 今回の予測結果で 0.5 を越える性能を示したケースは存在しなかった. このことから, DCCC は不具合予測に用いられるデータセットとは大きく異なり, CCDP 手法の入力として用いることは難しいと言える.

4.2. WQ

WQ を用いた場合の予測精度を表 2 に示す. DCCC と

同様に適合率は低い一方で再現率が高い傾向にある. 全体として F1 値は低い. その一方で, PC4 に対する AUC は 0.653 であり, 一定の精度で予測が行われている. このことから, WQ を CCDP 手法の入力とすることで不具合を予測できる可能性が考えられる.

4.3. ACM

ACM を用いた場合の予測精度を表 3 に示す. 他のデータセットを用いた場合と同様に, 適合率が低い一方で, 再現率が高い場合もある. その結果, F1 値も低い. 一方で, AUC を見ると, ar1～ar5 に対していずれも 0.5 を越える値を示している. このことから, ACM を CCDP 手法の入力とすることで不具合を予測できる可能性が考えられる.

5. まとめ

本研究では, CCDP 手法について, 分野外のデータセットの利用可能性について調査した. その結果, 以下の点が明らかとなった.

- 適合率は低い値を示す傾向にある
- 再現率が高い値を示す場合が一定数ある
- AUC の観点から一定の精度で予測可能なプロジェクトが存在する

以上の調査を踏まえて, 今後の研究で必要と思われるのは以下の点である.

- Jureckzo[10]など, より多くの種類のデータセットによる検証を行う
- 文献[9]など他の CCDP 手法を用いた場合の予測精度を調査する
- 安定して高い予測精度を実現するためのデータ選択手法を開発する

最後の点は他のプロジェクトのデータセットを用いて CCDP 手法を適用する場合においても性能向上が期待できるため, 特に重点をおいて研究を進めていく.

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. Technol.*, vol. 62, no. C, pp. 67-77, 2015.

[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 prediction," *Info. and Softw. Technol.*, vol. 54, no. 3, pp. 248-256, 2012.

[13] T. Menzies, R. Krishna, D. Pryor, "The

Promise Repository of Empirical Software Engineering Data," <http://openscience.us/repo>, North Carolina State University, Department of Computer Science, 2016.

[14] T. Menzies, R. Krishna, D. Pryor, The SEACRAFT Repository of Empirical Software Engineering Data, <http://zenodo.org/communities/seacraft/> (accessed April, 2018).

[15] J. Nam, "Heterogeneous defect prediction," in *Proc. of ESEC/FSE '15*, ACM, 2015, pp. 508-519.

[16] J. Nam, S. J. Pan, and S. Kim, "Transfer defect learning," in *Proc. of ICSE 2013*, IEEE, 2013, pp. 382-391.

[17] 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.

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

[19] 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.

[20] 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.

[21] 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.

[22] 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.

[23] 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.

[24] 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.

[25] UCI Machine Learning Repository, <https://archive.ics.uci.edu/ml/>

[26] 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.

無線ボディアエリアネットワークにおけるデータとノードの優先度に応じた高信頼アクセス制御に関する研究

岡山県立大学 情報工学部 情報通信工学科

高林 健人

近年、人びとの間での健康意識や健康長寿社会を目指す機運の高まり、将来の医療費高騰への対策として、医療・ヘルスケア機器・ロボットを用いた在宅医療や遠隔医療システムを構築するための医療・ヘルスケア IoT (Internet of Things) に注目が集まっている。例えば、2015 年 4 月には、欧州電気通信標準化機構 (ETSI) が進めている医療・ヘルスケア向け標準規格である、「Smart Body Area Networks (SmartBAN)」における、物理層(PHY)、メディアアクセス制御層(MAC)に関するシステム規格書が発行された。本研究課題では、SmartBAN におけるセンサのアクセス制御に着目し、中でも Control and Management Period で用いられるランダムアクセス方式の Slotted ALOHA について、データとセンサノードの両方の優先度を考慮したパラメータの設定方法を提案した。計算機シミュレーションの結果、優先度の高いノードの性能を向上させ、ノードの優先度を設定しない場合と比べて、全体的な性能を向上させることも出来た。

1 はじめに

近年、人びとの間での健康意識や健康長寿社会を目指す機運の高まり、将来の医療費高騰への対策として、医療・ヘルスケア機器・ロボットを用いた在宅医療や遠隔医療システムを構築するための医療・ヘルスケア IoT (Internet of Things) に注目が集まっている[1-6]。例えば、2012 年にはそのシステムの一つとして知られる「無線ボディアエリアネットワーク」(WBAN : Wireless Body Area Networks)の標準規格の一つである「IEEE802. 15. 6」が策定された[7]。また、2015 年 4 月には、欧州電気通信標準化機構 (ETSI) が進めている医療・ヘルスケア向け標準規格である、「Smart Body Area Networks (SmartBAN)」における、物理層(PHY)、メディアアクセス制御層(MAC)に関するシステム規格書が発行された[8-13]。

本研究課題では、中でも SmartBAN に注目した。SmartBAN では、センサ機能を持つノードで生体情報を計測し、コーディネータ機能を持つハブに送信し、ハブから外部サーバや、ディスプレイに情報が送られる(図 1)。SmartBAN の標準化では、IEEE802. 15. 6 で問題となっていた仕様の複雑性を軽減や、低遅延での緊急信号の送受信を含めたハブ-ノード間の無線通信システムが主に検討された[8-13]。

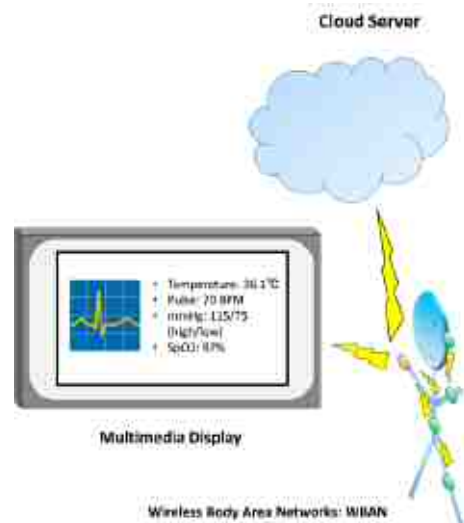


図 1: WBAN の概要。

SmartBAN では取り扱うデータに対して 4 段階の優先度を設定することが可能になっている。しかしながら、これらの優先度に応じた QoS (Quality of Service) の具体的な制御手段は実装依存である。一般に、WBAN ではヘルスケアに必要なバイタルデータや医療機器の制御データといったデータの他、スポーツ用途やエンターテイメント用途、ネットワーク

制御用データなどの幅広いデータを扱う。しかしながら、これらのデータに要求される QoS は各々大きく異なっており、現在の規格では十分対応しきれない。

そこで、本研究課題では、幾つかある QoS 制御の内の、特にセンサ同士のアクセス制御に着目し、データとセンサノードの優先度を考慮した高信頼なメディアアクセス制御 (MAC) 方式を考案する。本研究の特色としては、データの優先度だけでなく、センサノードの優先度まで考慮に入れる点である。というのも、同じ医療用ノードでも、装着者によってどれが一番優先度されるかは各々異なるからである。SmartBAN のアクセス区間は、スケジュールアクセス方式の MAC プロトコルを用いる Scheduled Access Period とランダムアクセス方式の MAC プロトコルを用いる Control and Management (C/M) Period で構成されている。C/M Period で用いられる Slotted ALOHA はデータの優先度によって Contention Probability (CP) の値が変化するが、この値に対してノードの優先度というパラメータを導入することにより、優先度の高いノードの方が各評価指標において高い値を得ることが出来た。

2 SmartBAN における C/M Period の動作と性能評価

図 2 は SmartBAN のアクセス区間を表している。SmartBAN のアクセス区間は、Scheduled Access Period と C/M Period に分かれており、前者では時分割のスケジュールアクセス方式の MAC プロトコルを用い、後者ではランダムアクセス方式の Slotted ALOHA を用いる。

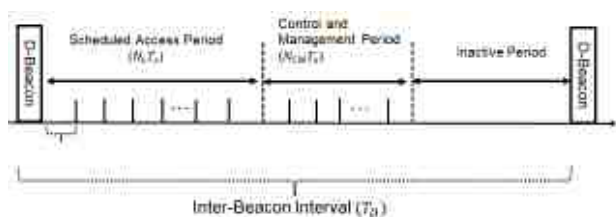


図 2: データチャネルのアクセス区間。

この時、C/M Period で用いる Slotted ALOHA では、表 1 のようにデータの優先度 (User priority: UP) に応じて CP の最大値 (CP_{max}) と最小値 (CP_{min}) が設定されている。

表 1: UP に対する CP_{max} と CP_{min}

UP	CP_{max}	CP_{min}
0	1/8	1/16
1	1/4	1/8
2	1/2	1/4
3	1	1/2

C/M Period の各タイムスロットの開始時に、ノードは以下の規則に従ってその CP を選択する。

- 1 UP を決定する
- 2 表 1 を基に UP に応じた CP の範囲を得る
- 3 もしノードが Slotted ALOHA の動作を始めていないのであれば、CP を CP_{max} に設定する
- 4 もしノードが Slotted ALOHA での送信に成功した場合、CP を CP_{max} に設定する
- 5 もしノードが Slotted ALOHA での送信に失敗した場合、
 - (1) 奇数回目の衝突であれば CP の値を維持する
 - (2) 偶数回目の衝突であれば CP の値を半分にする (ただし CP_{min} は下回らないようにする)

以下に C/M Period における各 UP 毎の計算機シミュレーションでの性能評価を示す。シミュレーションパラメータは表 2 の通りである。前提条件として、各ノードが常に送信データを保持している飽和状態を想定した。また、各優先度の生成確率は UP が 0 から 2 は同じ確率 (0.33) とし、UP3 のみ 0.01 とした (緊急情報のため)。

表 2: 計算機シミュレーションパラメータ

Max number of nodes (N_{node})	10
Frequency spectrum	2401 MHz - 2481 MHz
Bandwidth (BW)	2 MHz
Information bit length (L_{info})	1000 bits
Symbol rate (R)	1.0 Mbps
Slot length (T_{slot})	2.0 ms
Max number of retransmission	4

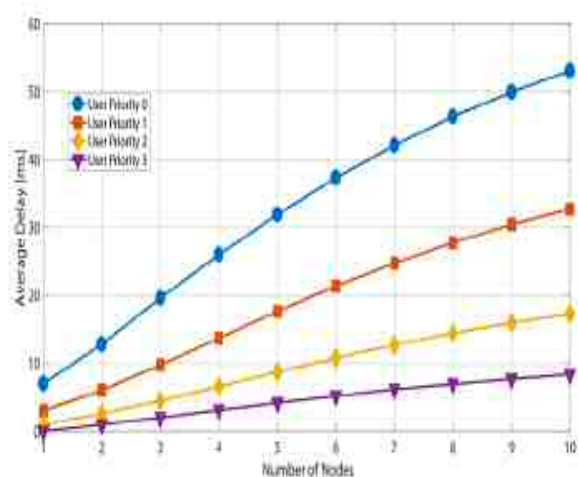


図 3: ノード数に対する平均遅延時間

図 3 はノード数に対しての平均遅延時間を表しており、UP が高くなるにつれて遅延時間が短くなっていることがわかる。これは、UP が高くなる毎に CP の値が大きくなるからである。図 4 はノード数に対しての送信成功確率を表しており、UP が高いデータの方が送信成功確率が高いことがわかる。これは、UP が高い程待ち時間が短いため、待ち時間が長い UP の低いデータよりも空きスロットにアクセスしやすくなるためだと考えられる。図 5 はノード数に対してのスループットを表している。UP が 0 から 2 までのデータはほぼ同じ値を得ているのに対して、UP3

のデータは低い値を取っている。これは、UP3 のデータの生成確率が他の UP のデータの生成確率よりも非常に低いためである。また、全体のスループットを見ると、ノード数が 3 の時に最大値を取っていることもわかった。

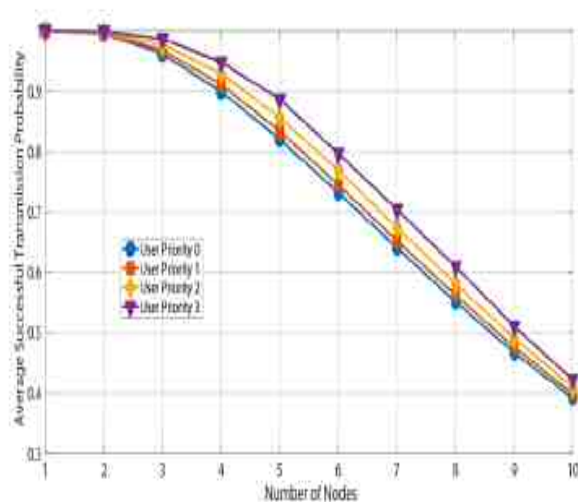


図 4: ノード数に対する送信成功確率

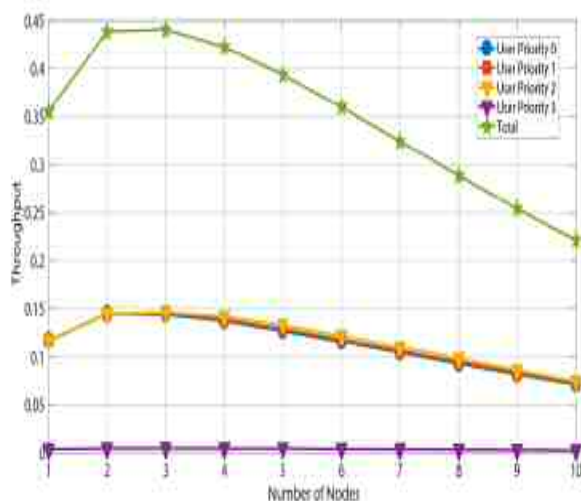


図 5: ノード数に対するスループット

3 ノードの優先度に応じた CP の設定方法

本研究の目的は、データの優先度だけでなく、センサノードの優先度も考慮したアクセス方式の考案し、優先度の高いノード程各性能を上げることである。そのため、ここでは、ノードの優先度 (Node

priority: NP) を High と Low に分け, C/M Period で用いる Slotted ALOHA の動作をノードの優先度に応じて変化させることを提案した.

まず, NP に応じた CP の最大値 (CP_{max}) と最小値 (CP_{min}) を表 3 のように設定した. NP が Low の方が CP の値が高くなるようになっている. 次に CP の選択方法であるが, NP が High のノードに関しては SmartBAN の標準規格と同様である. 一方, NP が Low のノードに関しては一回の衝突毎に CP の値を半分にする. これにより, NP が高いノード程優先的にアクセスが促されることになる.

表 3: NP と UP に対する CP_{max} と CP_{min}

UP	NP: High		NP: Low	
	CP_{max}	CP_{min}	CP_{max}	CP_{min}
0	1/8	1/16	1/8	1/16
1	1/4	1/8	1/4	1/16
2	1/2	1/4	1/2	1/8
3	1	1/2	1/2	1/4

4 計算機シミュレーションを用いた性能評価

本章では計算機シミュレーションを用いた提案方式の性能評価について述べる.

シミュレーションパラメータは表 2 と同じであり, 前提条件も第 2 章の計算機シミュレーションと同様である. 加えて, NP High のノードと NP Low のノードの割合は半分ずつとした. ただし, 全ノード数が奇数の場合は NP High のノードが一つ多いとした.

図 6 はノード数に対しての平均遅延時間を表しており, 高い UP かつ高い NP 程遅延時間が短くなっていることがわかる. また, NP High の UP2 のデータは, NP Low の UP3 のデータや, NP を設定しない場合の UP2 のデータよりも遅延時間が短くなっていることもわかる. 図 7 はノード数に対しての送信成功確率を表しており, 高い NP の方が送信成功確率が高いことがわかる. 加えて, 全体的に NP を設定しない場合と比べても良い性能が得られている.

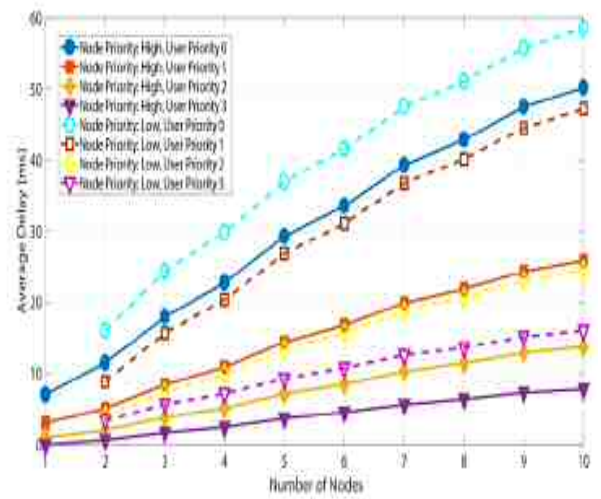


図 6: ノード数に対する平均遅延時間

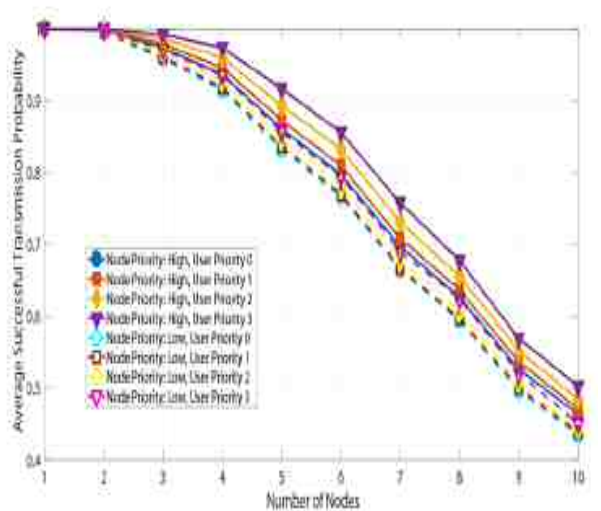


図 7: ノード数に対する送信成功確率

図 8 はノード数に対してのスループットを表している. UP が 0 から 2 までのデータについて値が上下しているのは, ノード数が奇数の場合は NP が High のノードが一つ多いためである. また, 全体のスループットはノード数が 3 の時に最大値を取り, NP を設定しない場合と比べると, ノード数が多い場合に優位な結果が得られた.

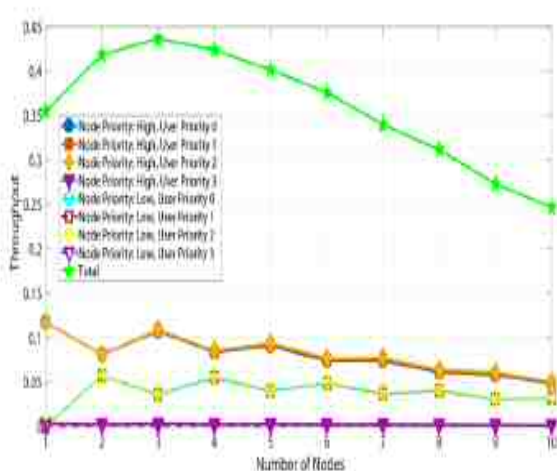


図 8: ノード数に対するスループット

5 おわりに

本研究課題では、ETSI が進めている医療・ヘルスケア向け標準規格である SmartBAN におけるセンサのアクセス制御に着目し、中でも C/MPeriod で用いられるランダムアクセス方式の Slotted ALOHA について、データとセンサノードの両方の優先度を考慮したパラメータの設定方法を提案し、優先度の高いノードの性能を向上させることが出来た。加えて、ノードの優先度を設定しない場合と比べて、全体的な性能の向上も見ることが出来た。

今後の課題としては、CP の設定方法だけでなく、高優先度のノードについては拡散系列を用いて送信成功率を向上させる Spread Slotted ALOHA の導入や、Scheduled Access Period も含めたノードの優先度に応じたアクセス制御方式の検討が挙げられる。

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 ウェスコ学術振興財団に深く感謝を申し上げます。

参考文献

[1] C. R. Costa, L. E. Anido-Rifón and M. J. Fernández-Iglesias, "An Open Architecture to Support Social and Health Services in a Smart TV Environment," IEEE Journal of Biomedical and

Health Informatics, vol. 21, no. 2, pp. 549–560, March 2017.

[2] M. Chen, S. Gonzalez, A. Vasilakos, H. Cao, V. C. M. Leung, "Body Area Networks: A Survey. Mobile Networks and Applications," Mobile Networks and Applications, vol. 16, no. 2, pp. 171–193, Aug. 2010.

[3] H. Cao, V. Leung, C. Chow and H. Chan, "Enabling technologies for wireless body area networks: A survey and outlook," IEEE Communications Magazine, vol. 47, no. 12, pp. 84–93, Dec. 2009.

[4] J. M. L. P. Caldeira, J. J. P. C. Rodrigues and P. Lorenz, "Toward ubiquitous mobility solutions for body sensor networks on healthcare," IEEE Communications Magazine, vol. 50, no. 5, pp. 108–115, May 2012.

[5] R. Cavallari, F. Martelli, R. Rosini, C. Buratti and R. Verdone, "A Survey on Wireless Body Area Networks: Technologies and Design Challenges," IEEE Communications Surveys & Tutorials, vol. 16, no. 3, pp. 1635–1657, Third Quarter 2014.

[6] S. Movassaghi, M. Abolhasan, J. Lipman, D. Smith and A. Jamalipour, "Wireless Body Area Networks: A Survey," IEEE Communications Surveys & Tutorials, vol. 16, no. 3, pp. 1658–1686, Third Quarter 2014.

[7] Wireless Medium Access Control (MAC) and Physical Layer (PHY) Specifications for Wireless Personal Area Networks (WPANs) used in or 12 around a body, IEEE Standard for Information technology – Telecommunications and information exchange between systems – Local and metropolitan area networks – Specific requirements: Part 15.6, 2012.

[8] Smart Body Area Network (SmartBAN); Low Complexity Medium Access Control (MAC) for SmartBAN, ETSI TC Smart BAN TS 103 325 V1.1.1, 2015.

[9] Smart Body Area Network (SmartBAN);
Enhanced Ultra-Low Power Physical Layer, ETSI TC
Smart BAN TS 103 326 V1.1.1, 2015.

[10] 松尾綾子, 鍋谷寿久, ウーシ ハウ チン, ”
高信頼なボディアエリアネットワークを実現する
SmartBAN 標準化への取組み,” 東芝レビュー =
Toshiba review, vol. 70, no. 5, pp. 38-41, May 2015.

[11] 田中宏和, 南重信, 長谷山美紀, 新實朋子,
高橋透, “ボディアエリアネットワークと今後の技術課
題 -ETSI SmartBAN 標準化最新動向から-, ” 電子情
報通信学会総合大会, B-20-12, pp. 659, Mar. 2016.

[12] 田中宏和, 畠山泰貴, “ヘルスケア IoT と
国際標準化動向,” IT ヘルスケア学会 第 11 回学術
大会, 名古屋, IT ヘルスケア 第 12 巻 1 号, pp. 61-62,
May 2017.

[13] 小森達也, 松隈剛, 畠山泰貴, 田中宏和, ”
次世代ボディアエリアネットワーク規格 Smart-BAN
の実装と評価,” IT ヘルスケア学会 第 11 回学術大
会, 名古屋, IT ヘルスケア 第 12 巻 1 号, pp. 63-64,
May 2017.

視線情報が付与された大規模映像データベースの構築と 深層学習に基づく視覚的注意予測の実現

岡山県立大学 情報工学部 情報通信工学科
滝本 裕則

人中心のインタラクティブシステムにとって人の内部状態を推定することは重要な要素技術であり、その重要な手がかりとして視覚刺激に対して人がどこに・どのように注目しているかを簡易に計測・推定する技術の実現が望まれている。その実現を目指して、直接的な視線計測とは異なるアプローチとして、認知心理学の分野で明らかとなっている視覚的注意の知見に基づき、人の注意に影響する視覚特徴を視覚刺激から自動抽出し、その目立ち度（顕著性）を空間的かつ定量的に求めることが可能な視覚的顕著性モデルの研究が国内外を問わず活発に行われている。しかし、視覚的注意に関する人の視覚メカニズムは複雑であり未だ解明されていないことも多い。よって、視覚刺激に対して重要と考えられる視覚特徴を試行錯誤的に抽出・モデル化するこれまでのアプローチには限界がある。我々は、視線計測装置を用いて視線情報が紐付いた画像データベースを構築するとともに、深層学習を用いることにより、実際の人の視覚メカニズムに迫る画像に対する高精度な視覚的顕著性モデルの実現を目的とする。

1. はじめに

コンピュータビジョン研究において、人が視覚情報をどのように処理しているかを解き明かすことは重要な目標である。古くから研究されている視覚メカニズムのひとつに視覚的注意があり、これは目から入力された信号の中から重要と思われる情報を瞬時に判断し、効率的に情報を得るための機能である。視覚的注意の計算モデルを構築することにより、人がどんな物や場所に注意を引かれるか、あるいは引かれないかを推定可能となる。また本技術の応用として、人が気付きにくい箇所に注意を促すためのシステムの実現に繋がる。

視覚的注意の計算モデルとして、Itti らによって提案された顕著性モデル^[1]が広く知られている。顕著性とは画像に対する注意の引かれやすさであり、顕著性の空間分布を表す画像を顕著性マップと呼ぶ。顕著性モデルはこの顕著性マップを予測する計算モデルである。Itti らの計算モデルが登場して以降、自然画像から顕著性マップを予測するための手法が数多く提案されてきた。近年では、実際の画像に対する人の注視点データセットから最適な注視点予測モデルを学習するデータ駆動型のアプローチが一定

の成功を収めている。

代表的なデータ駆動型の手法として Salicon Net^[2]と呼ばれる畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を用いた顕著性モデルが提案されている。この手法では、予測精度を向上させるために2つの工夫がなされている。まず、物体認識のために ImageNet^[3]を用いて訓練された既存の CNN に転移学習を行っている。次に、2つの解像度で画像を処理するネットワーク構造となっている。

我々は、CNN を用いたより精度の高い顕著性マップ予測を実現するため、マルチタスク学習に基づく CNN ベースの顕著性マップ推定技術を提案する。また、視線計測装置を用いて視覚刺激提示時の視線を計測することにより、視線情報が紐づいた画像データベースの構築を行う。

2. 深層学習に基づく視覚的注意予測法の提案

CNN は深層学習の分野で用いられる一般的なアーキテクチャであり、画像認識分野を中心に幅広く利用されている。近年は視覚的顕著性予測においても CNN を用いた手法が提案されており、特徴量を手動で設計していた従来手法を多くの評価指標で上回る

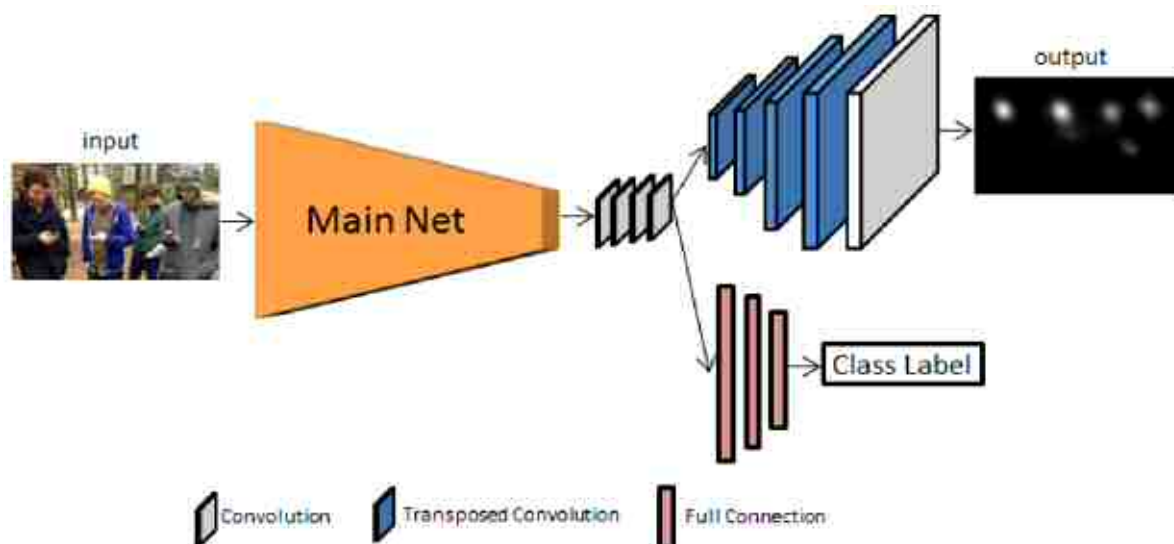


図1 提案モデルの概要

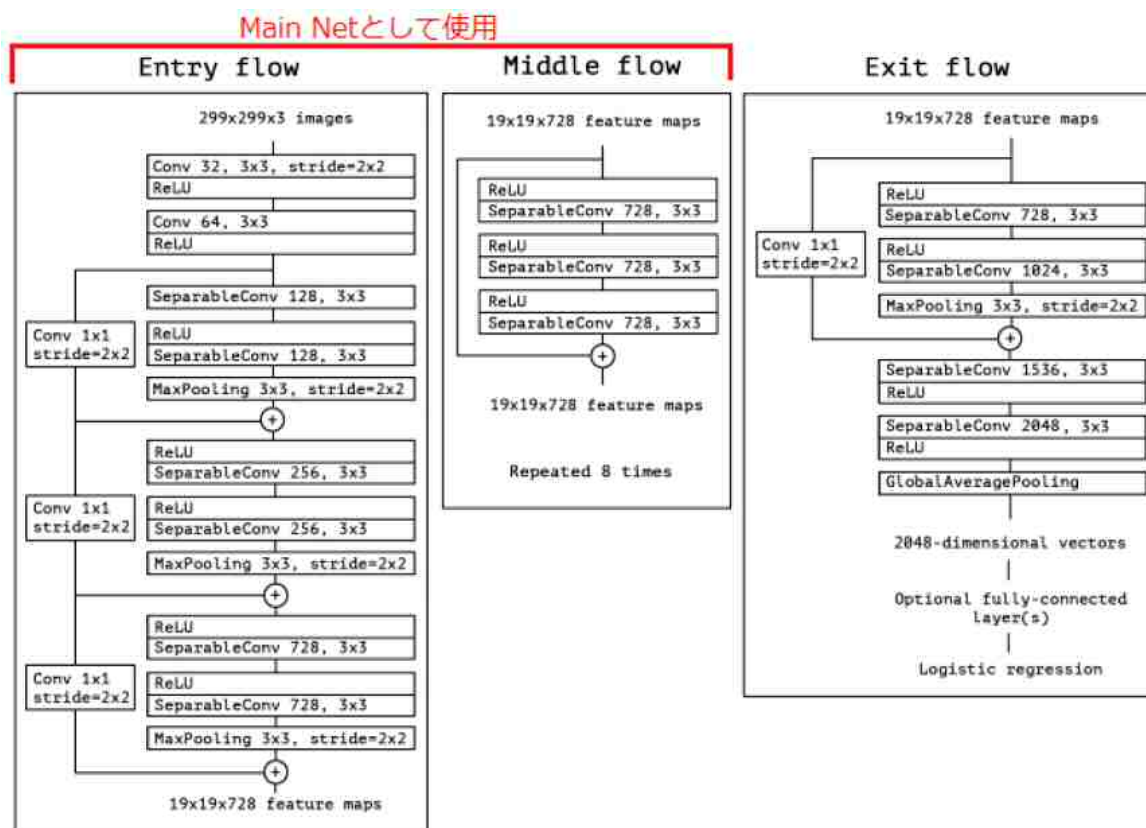


図2 Xceptionモデルの概要

結果を示している。

我々が提案する視覚的顕著性マップ推定モデルのアーキテクチャを図1に示す。提案モデルはResNetの派生モデルのひとつであるXceptionモデル^[4]をに基づいている。Xceptionモデルの概要を図2に示す。Xceptionモデルでは通常の畳み込みの代わりに、depthwise separable convolution（以降

Separable 畳み込み）を用いている。通常の畳み込みが入力特徴マップの空間方向とチャンネル方向に対し同時に畳み込みを行うのに対し、Separable 畳み込みは空間方向とチャンネル方向に独立に畳み込みを行う。図2のように、XceptionはEntry flow, Middle flow, Exit flow の大きく3つの構造に分けられる。我々はEntry flowとMiddle flowを提案モデルの

Main Net として用いている。

次に、既存の CNN を用いた手法では、一般に出力される特徴マップのサイズが入力画像に比べて小さくなるという特徴がある。したがって、学習データとなる顕著性マップを縮小して用いる必要があり、データが持つ情報を削減して学習に用いるため、ネットワークの学習精度が低下する恐れがある。この問題を解決するため、Readout Net において 1×1 の畳み込み層の代わりに、小さくなった特徴マップを段階的に大きくしてから顕著性マップを出力するアップサンプリングネットワークを用いることを提案する。提案するネットワークでは、特徴マップを段階的に大きくするために Transposed Convolution 層を用いる。

最後に、マルチタスク学習について述べる。近年、CNN を用いた画像認識に関する分野においては、2 つ以上のタスクを同時に学習および出力するモデルの研究がなされている。お互いに相関のある情報をマルチタスクとして同時に学習した場合、双方のタスクに共通する特徴が学習され、精度が向上することが知られている^[5]。ここで、人の注意は、知覚刺激による外発的な注意（ボトムアップ注意）と予測や意図による内発的な注意（トップダウン注意）の相互作用によって決まると考えられている。つまり、被験者に対して視覚刺激を提示した際、提示直後はボトムアップ注意が支配的に働くことで注意が特定の領域に向けられる。しかし、時間経過に伴いトップダウン注意が支配的となり、被験者は視覚刺激を理解し、自身の経験・知識に基づいて注意を別の場所へと移動する。したがって、人の視覚情報の処理において、視覚的注意とシーン理解は密接に関連していると考えられる。

そこで、ある視覚刺激に対する視覚的注意とシーンを同時に予測するマルチタスクモデルを構築することにより、視覚的顕著性予測の精度向上を図る。提案するモデル（図 1）では、Readout Net は顕著性マップを出力する畳み込み層と、シーンカテゴリのラベルを出力する全結合層に分岐している。

3. 視線計測

視線計測には、ディテクト社の非接触視線解析装置 QG-PLUS を用いた。被験者の頭部は顎台によって固定し、前方 65cm の位置に視覚刺激を提示する 19 インチ液晶ディスプレイを設置した。なお、視線計測装置の空間分解能は 0.5 deg. で、サンプリング周波数は 60Hz である。

実験に協力して頂いた被験者は、正常な色覚を有する 20 名（男性：12 名、女性：8 名、18-24 歳）である。

提示した刺激は、素材辞典フォトバイブルなどから選んだ画像 180 枚である。なお、画像のサイズは 640×480 pix. であり、ディスプレイの解像度は 1280×960 pix. である。それぞれの画像は 3 秒間ずつランダムに提示し、画像を提示する前に画面中央に固視点を 1 秒間提示した。被験者には、固視点が提示されている間は固視点を注視し、画像が提示されている間は自由に画像を眺めるように指示した。

4. 評価実験

4.1 実験条件

本実験では、視覚的顕著性予測の分野で有名な CAT2000 データセット^[6]と MIT1003 データセット^[7]の 2 つを用いた。CAT2000 データセットは MIT が提供しており、2000 枚の画像およびそれらに対応する顕著性マップが含まれている。各画像には 20 の異なるシーンカテゴリのいずれか 1 つが割り当てられており、各カテゴリに属する画像はそれぞれ 100 枚である。画像サイズはすべて横 $1920 \times$ 縦 1080 pix. である。本実験では CNN への入力を考慮し、画像サイズを横 $512 \times$ 縦 288 pix. にリサイズして利用した。データセットに含まれる 2000 枚の画像のうち、1800 枚を訓練データとしてモデルの訓練のために利用した。また、残り 200 枚を検証データとして訓練からは除外し、モデルの性能評価のために用いた。

MIT1003 データセットは MIT ベンチマークのための訓練データとして利用されているデータセットである。1003 枚の画像とそれらに対応する顕著性マップが含まれており、屋内および屋外の風景画像やポートレート画像等から構成される。画像サイズは縦横ともに $405 \sim 1024$ pix. と様々であり、アスペクト

比は統一されていない．本実験ではこのデータセットをモデルの汎化性能を検証するために利用する．つまり，CAT2000 データセットの 1800 枚の訓練データだけを用いて学習したモデルが，MIT1003 データセットに対し顕著性マップ予測を行った際にどの程度の精度であるかを検証する．MIT データセットの 1003 枚の画像を横 512×縦 288 pix. にリサイズして利用した．

視覚的顕著性の評価指標はいくつか提案されており，視覚的顕著性予測の研究の多くは複数の評価指標によってモデルを評価している．本実験では，顕著性マップ予測のタスクの損失関数として MAE (Mean Absolute Error), CC (Linear Correlation Coefficient), KLD (Kullback-Leibler Divergence), Sim(Similarity) の 4 つをそれぞれ用いるとともに，モデル性能の評価としても利用した．

一方，マルチタスクで学習を行うモデルでは損失関数に重み付けを行っている．顕著性マップ予測タスクとシーン分類タスクの損失関数をそれぞれ $L_{saliency}$, L_{scene} としたとき，各評価指標の重みの比率を表 1 に示す．なお，マルチタスクにおけるシーン分類タスクの損失関数は交差エントロピー誤差関数を用いる．

モデル学習用として設定したハイパーパラメータについて述べる．まず各モデルの学習回数は 50 エポックで固定した．またデータの与え方はミニバッチ学習を採用し，バッチサイズは 8 とした．最適化法には Adadelta を用いた．

4.2 実験結果

算出する評価指標は学習に用いた損失関数と同じものを利用する．よって各モデルに対し 8 種類のスコア（データセット 2 種類×評価指標 4 種類）を求めた．なお，比較手法として，代表的な CNN ベースの視覚的顕著性推定モデルである SalieconNet を用いた．

表 2 に，比較手法と提案手法のスコアを示す．評価指標に関して，MAE と KLD は値が小さいほど，CC と Sim は値が大きいほど視覚的顕著性の推定精度が高いことを意味している．表において，データセットごと，または，評価指標ごとに最良のスコアを太

表 1 損失関数の重み比率

評価指標	$L_{saliency} : L_{scene}$
MAE	1 : 0.01
CC	1 : 0.1
KLD	1 : 0.5
Sim	1 : 0.1

字で示している．結果より，すべての項目において，提案手法の方が視覚的顕著性予測の精度が高いことが確認できる．

一方，図 3 に推定した視覚的顕著性マップの例を示す．注視マップは，視線計測装置により得られる注視停留マップであり，正解データとして用いたものである．また，注視マップ，視覚的顕著性マップともに，白っぽい領域ほどより目立っていることを意味している．結果より，比較手法に比べ，提案手法は高解像度かつ高精度に人の注視マップを推定できていることが確認できる．

5 おわりに

本研究では，CNN を用いたより精度の高い顕著性マップ予測を実現するため，マルチタスク学習に基づく CNN ベースの顕著性マップ推定技術を提案した．提案手法では，特徴マップを段階的に大きくする Transposed Convolution 層に基づくアップサンプリグネットワークの提案，Xception モデルの適用，視覚的顕著性マップとシーン分類の同時学習による精度向上を実現した．また，視線計測装置を用いて視覚刺激提示時の視線を計測することにより，視線情報が紐づいた画像データベースの構築を行った．結果として，提案手法は代表的な従来法である SaliconNet に比べて高精度に視覚的顕著性を推定可能であることを示した．

参考文献

- [1] L. Itti, C. Koch, and E. Niebur: ``A model of saliency-based visual attention for rapid scene analysis'', IEEE Trans. PAMI, Vol. 20, No. 11, pp. 1254-1259, 1998.
- [2] X. Huang, C. Shen, X. Boix, and Q. Zhao: ``SALICON: Reducing the Semantic Gap in

表 2 視覚的顕著性推定の結果に対する評価まとめ

条件		損失関数・評価指標			
モデル	データセット	MAE	CC	KLD	Sim
従来法 SaliconNet	CAT2000 検証用	0.0648	0.717	0.748	0.642
	MIT1003	0.0832	0.513	3.485	0.456
提案手法	CAT2000 検証用	0.0498	0.867	0.480	0.735
	MIT1003	0.0735	0.637	2.843	0.522



原画像

注視マップ (正解)

従来法 (SaliconNet)

提案法

図 3 推定した視覚的顕著性マップの例 (損失関数: Sim)

- Saliency Prediction by Adapting Deep Neural Networks'', Proc. of the IEEE Int. Conf. on Comp. Vision, pp. 262-270, 2015.
- [3] J. Deng, W. Dong, R. Socher, L.-J. Li, K. Li, and L. Fei-Fei: ``ImageNet: A large-scale hierarchical image database'', Proc. of Comp. Vision and Pattern Recog., pp. 248-255, 2009.
- [4] F. Chollet, ``Xception: Deep Learning with Depthwise Separable Convolutions'', arXiv:1610.02357, 2017.
- [5] H. A. Abrar, W. Gang, L. Jiwen, and J. Kui, "Multi-task CNN Model for Attribute Prediction'', IEEE Trans. on Multi., Vol. 17, No. 11, pp. 1949-1959, 2015.
- [6] A. Borji and L. Itti: ``Cat2000: A large scale fixation dataset for boosting saliency research'', Proc. of Comp. Vision and Pattern Recog., 2015.
- [7] T. Judd, K. Ehinger, F. Durand, and A. Torralba: ``Learning to predict where humans look'', Proc. of Int. Conf. on Comp. Vision, 2009.

発表文献

1. Hironori Takimoto, Shogo Katsumata, Sulfayanti F. Situju, and Akihrio Kanagawa: ``Visual Saliency Estimation Based on Multi-task CNN'', Proc. of The Thirteenth International Conference on Industrial Management (ICIM2018), (2018. 9, 投稿済)

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造形デザイン学科

久保田厚子

共同研究「現代日本陶芸のデザインと技法」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で公開することで、陶芸への理解と興味を喚起し文化の振興に寄与することが目的である。2019年1月13日（日）～2月3日（日）瀬戸内市立美術館特別展「現代日本陶芸のデザインと技法 2019」開催が決定した。2017年7月、2018年2月に2回の作品撮影を岡山県立大学で実施した。その作品写真を元に、2018年3月31日にウェブサイト「現代日本陶芸のデザインと技法 2018」をアップロードした。

1 瀬戸内市立美術館特別展

「現代日本陶芸のデザインと技法 2019」瀬戸内市立美術館が2019年1月13日（日）から2月3日（日）に開催が決定した。



図1 岡山県立大学デザイン学作品展示台

岡山県立大学展示ホール改修による展示台廃棄計画を受け、瀬戸内市立美術館館長から岡山県立大学に展示台譲渡依頼を行った。



図2 修繕し梱包された作品展示台

2017年9月25日に廃棄予定の展示台の修繕と梱包を共同研究メンバーが行い（図2）、9月29日にトラック便（図3）で美術館（図4）に移送した。



図3 トラック積み込み状況



図4 瀬戸内市立美術館

2 斎城卓の作品写真撮影

2017年7月15日（土）と2018年2月17日（土）に作品撮影を2回実施した（図5）。



図5 岡山県立大学演習室の作品撮影

3 ウェブサイトの英語翻訳

ミシガン大学美術館インターン Robert Morrissey 氏が、同美術館副館長及部奈津氏の監修で翻訳を行った。専門用語参考文献は同美術館所蔵の富本憲吉著「The World of Japanese Ceramics」1964年を用いた。2018年3月31日にウェブサイトに英文を一部アップロードした。

4 「現代日本陶芸のデザインと技法 2018」

2018年3月31日、デザインと技法を14作を斎城卓の写真でウェブサイトに掲載した。

1. 中西芙美「下絵具による三段階装飾技法」

エアブラシをメインに、筆による彩色、掻き落としによる描画をプラスすることで、モチーフの特徴やカラーを際立たせることを目的とした（図6）。



図6 スイセンをモチーフにした大皿

2. 久保田厚子「ハイブリッド青白磁技法3」

傾けた焼成用棚板に皿を載せて焼成し、釉薬を斜め

に溜める技術をハイブリッド青白磁技法3（図7）とした。



図7 青白磁幾何学文大皿 φ535×h50

4. 久保田厚子「ハイブリッド青白磁技法4」

繊細で複雑なレリーフの青白磁を極薄カップに成形した（図8）。従来は皿の内側だけの表現をカップの外側にレリーフする新しい技術を開発した。



図8 青白磁葎文片口（中央）106×87×86

5. 久保田厚子「ハイブリッド青白磁技法5」

青白磁の鑄込みレリーフが光を通して影絵に見えたことから、青白磁シェードのペンダントライトを制作した（図9）。色に違いは異なる還元焰焼成と酸化焰焼成の窯の違いであり、それ以外は全く同じである。



図9 青白磁豌豆文ペンダントライト、φ145×h165 mm

6. 久保田厚子「ハイブリッド青白磁技法 6」

模様を付けた石膏型に、粘土を押し当てる前に泥漿を塗る方法で緻密なレリーフを実現した(図10)。



図10. 青白磁草花文皿、φ273×h40 mm

7. 久保田厚子「ハイブリッド青白磁技法 7」

植物レリーフ石膏印に磁器粘土を盛り上げて、小さな青白磁のボタンを制作した(図11)。



図11. 青白磁ボタン

8. 栗原慶「波紋鉢制作ノート」

空間を内包したロクロの造形を活かしつつ、波紋と造形が協調する表現を目指した(図12)。



図12. 波紋鉢 51x42x20h (cm)

9. 作元朋子「積層で作る造形」

石膏型を使い、ストライプの幅ごとに分かれたパーツを重ねていく方法で形を生み出す。石膏型の成形方法を見直し、作品の外からは見えない部分に構造としての壁を作った。泥漿にCMC(化学糊)を加

え接着糊にして組み合わせて成形する。接着面は亀裂のきっかけが入りやすいので、十分に境界線をヘラで押さえる（図13）。



図13. Form172From20、D380×W380×H250

10. 齋藤香織「制作雑感」



図14. 「染付山紫陽花文皿」 φ219×h27, φ214×h27

11. 藤内紗恵子「トルコブルー釉を用いた平皿の制作」

トルコブルー釉と磁器の組み合わせは、熱膨張差が大きすぎ、生地にまで割れが入ることが多いため、これからも研究が必要である（図15）。



図15. トルコブルー釉平皿

12. 谷野明夫「堆彩技法による作品の色々」

技法による色化粧の器や陶板、そしてボタン等の作品のバリエーションの色々（図16）。

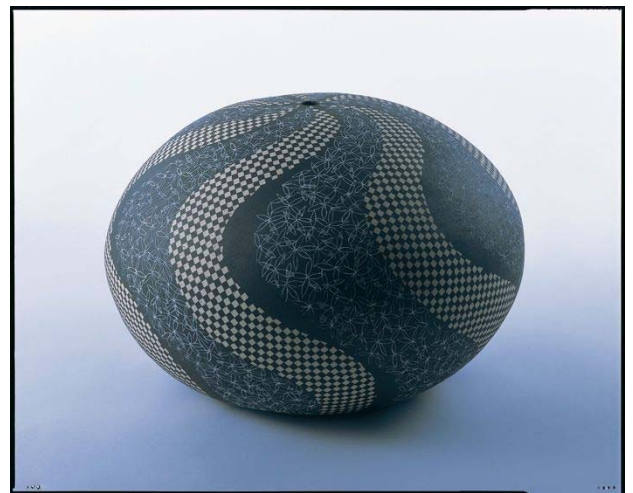


図16. 堆彩技法作品

13. 栄木正敏「呉須象嵌による磁器」

エッチングのような線刻による手描きの模様。呉須象嵌—素焼した器を、線刻した溝に特殊な筆で呉須を埋めて描く。筆屋で売っていない針を仕込んだ筆を自作した（図17）。



図 17. 磁器卓上膳 呉須象嵌と吹き呉須 (1991 年) /伊・フ
アエンツァ国際陶芸美術館蔵、手付中鉢 3 点

14. 今田拓志「美術分野における陶芸表現の独自性について」

電動ロクロ成形によってかたちつくられる形状に焦点を絞り、器のかたちを立脚点として設定して考える。

15. 三浦義広「電気窯によるサヤ鉢を用いた焼成法」
本研究では、サヤ鉢に炭、もみ殻、わら等を入れ、電気窯で焼成した結果を紹介する。



図 18. 猿

5 ウェブサイト kubota@dgn.oka-pu.ac.jp

「現代日本陶芸のデザインと技法 2018」

図 20 は最新版ウェブサイトである。



図 20 ウェブサイト HOME

6 ワークショップ企画

「現代日本陶芸のデザインと技法 2019」展ワークショップとして、作元朋子岡山県立大学講師のワークショップ「虹色の小石」を瀬戸内市立図書館で実施予定である (図 21)。



図 21 虹色の小石の受講生作品

7 今後の展望

斎城卓が展覧会ポスター原案をデザインした (図 22)。

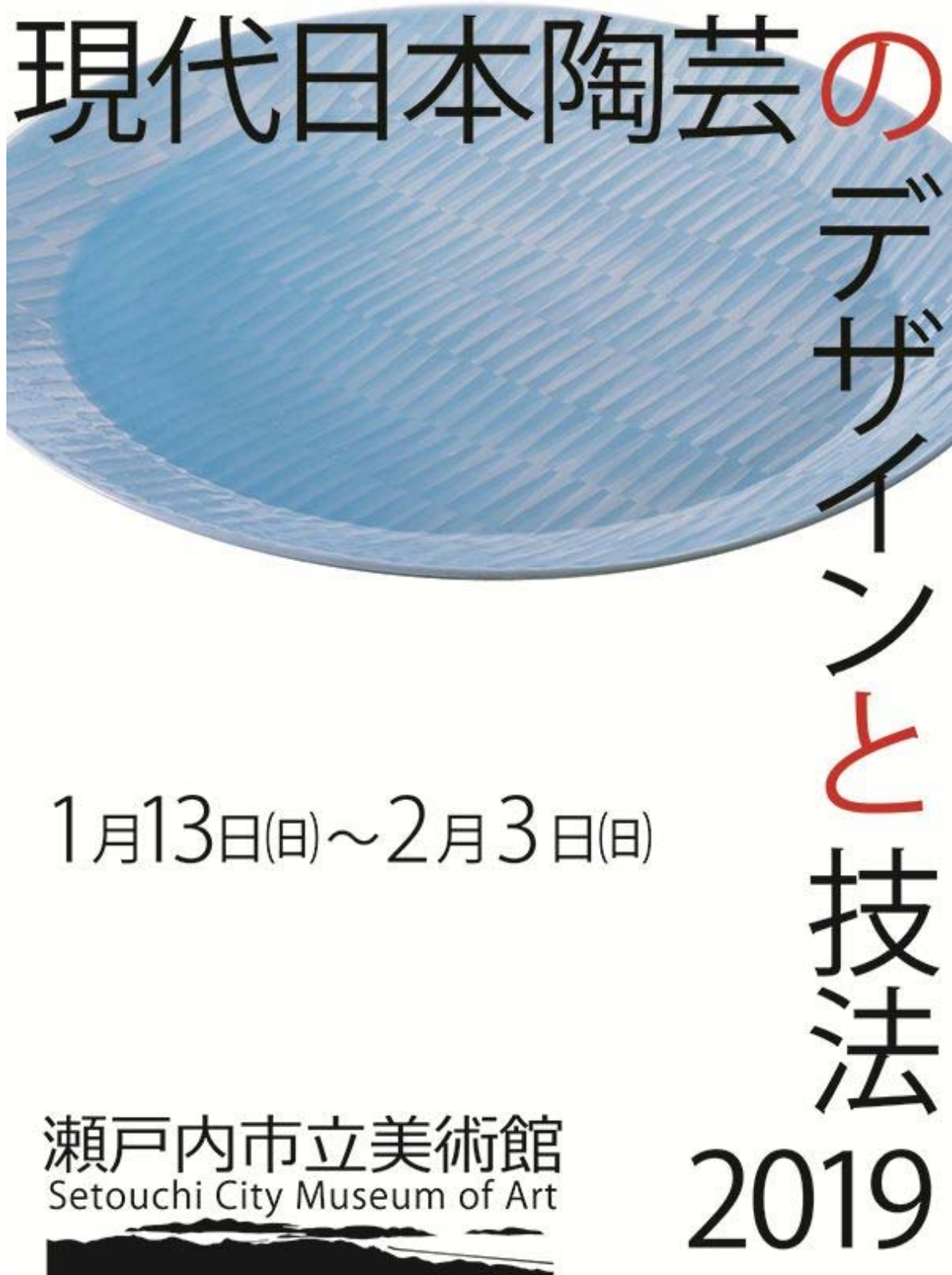


図 22 ポスターデザイン原案

2016 年 4 月スタートの共同研究「現代日本陶芸のデザインと技法」は、2019 年 1 月の瀬戸内市立美術館開催までにウェブサイトを 4 回更新した上で展覧会を開催し、2019 年 3 月に完了する。共同研究のスタート当時は美術館展示について共同研究メン

バーに共有するイメージがほとんどなかったが、岡山県立大学の廃棄作品展示台 65 台が美術館に譲渡されたことがきっかけになり、明快で現代的な斎城卓デザインのポスターによって、具体的な完成形が視覚化され今後の実施が期待できる。

スリランカ新国会議事堂の成立過程と設計手法に関する研究

岡山県立大学デザイン学部

岩 本 弘 光

スリランカ人建築家ジェフリー・バワが設計した「新国会議事堂」は、スリランカの伝統風土と近代技術を融合した国家を象徴するデザインである。わずか3年間の竣工期間を満たすため、スリランカ政府は日本の旧三井建設（現三井住友建設：以下、三井という）に工事を特命発注した。バワは三井設計部の協力を得て設計を完成させたが、両者の作業仕分けや役割りなどの国内外の研究成果は得られていない。また、バワが設計に際して三井に何を要求したのかも不明である。本研究では、直接議事堂の設計や工事に関与した、三井担当者からの「オーラル・ヒストリー」を通して、バワの設計思想や、新国会議事堂の成立要因と設計手法を試論しようとするものである。

1 背景

スリランカ新国会議事堂（以下、議事堂という）が、スリランカ人建築家ジェフリー・バワ（Geoffrey Bawa：以下、バワという）の設計により 1982 年に完成した。議事堂はまた、日本の旧三井建設（現三井住友建設：以下三井という）がバワの設計支援を行い、工事施工した日本と縁の深い建物でもある。これまで同議事堂に関する記録は、主としてスリランカ側の文献によるものが大半であったが*1、設計と施工に直接関わった三井の記録や議事堂の受注経緯など、日本側資料との擦り合わせは未着手であり、議事堂の成立過程や設計プロセスの詳細は不明瞭であった。

イギリスのくびきを逃れて 1948 年に独立したスリランカにとって、議事堂は新生国家像を象徴する、視覚的・空間的アイコンとしての「国家のデザイン」が宿命として負わされていた。議事堂建設は、敷地として選定された古都コーッテの歴史的意味、シンハラ人とタミル人の民族間抗争、ポスト・インディペンデント期「シンハラ・ナショナリズム」の高揚など、島の様々な社会的要素を体現するかたちで実現したのである*2

1-1. バンダラナイク政府案

従来のスリランカ国会議事堂は、オースチン・ウッドソン（Austin Woodeson）の設計により、1929 年コロombo・フォートのベイラ湖南湖畔に完成した古典主義の建築であった。（図 1）



1974 年、バンダラナイク政府は、国会議事堂の対岸に新国会議事堂を計画して、E・R・B 社パートナーのバワが「フラット屋根案」（図 2）を提出した。次いでバワは 1974-79 年に「中折れ屋根案」（図 3）を策定している。この時期バワは『Sinhalese Monastic Architecture』を 1974 年に刊行した、考古学者セナ

図 1：旧国家議事堂（コロombo、現在も使用中）

ケ・バンダラナヤケと意見交換を重ねており、古代シンハラ建築について多くの影響を受けた*3。

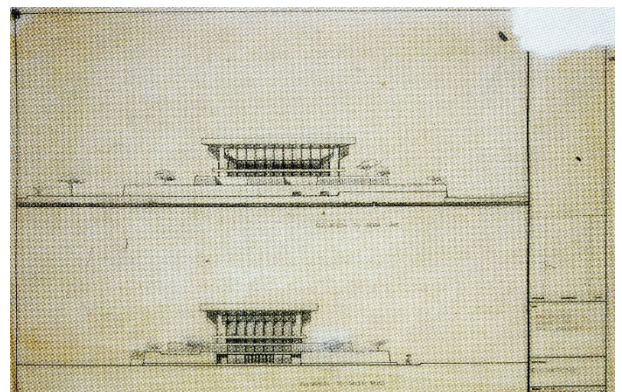


図 2：バンダラナイク政府（フラット屋根案）

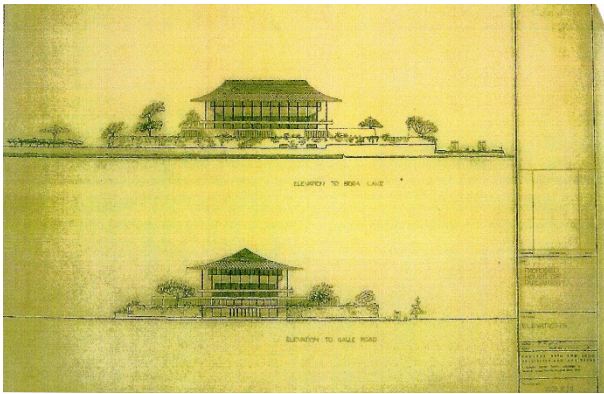


図3：バンダラナイケ政府（中折れ屋根案）

1-2. ジャヤワルダナ政府案

1978 年政権奪取した J. R. ジャヤワルダナ大統領は、新国会議事堂の敷地をコロンボ南東約 10km にあるシンハラ古都コーツェに決定して、1979 年バワに設計を依頼した。政府の唯一の条件は次期大統領選をひかえた 1982 年 4 月までの竣工であった。

2 目的

本研究は次の 3 点を研究目的とする。はじめに、議事堂にみるバワの設計思想と日本の建築から受けた影響の傍証を得ること。次いで、バワと三井による設計仕分け、作業プロセスの実態を明らかにすること。最後に、議事堂の受注・発注経緯や当時のスリランカ建設業界の実情を把握すること、とする。

3 既往研究

バワ作品全般に関する国外文献は、Brian Bruce Taylor, 『GEOFFREY BAWA』, 1986, Concept Media、David Robson, 『geoffrey bawa: the complete works』, 2002, Thames & Hudson、Shanthi Jayewardene, 『Geffrey Manning Bawa: decolonizing architecture』, 2017, The National Trust Sri Lanka などが発表されている。国外建築誌は「The Architectural Review」, may1983 No1035 他がある。同国内文献としては、岩本弘光, 『解説 ジェフリー・バワの建築』, 2016, 彰国社が刊行されている。学位論文としては、高取愛子「ジェフリー・バワの建築思想に関する設計論的研究」, 2012, 京都大学がある。同国内建築誌は、「A+U 141」1982、「A+U 489」2011 他が出版されている。

4 研究方法

三井社員からの「オーラル・ヒストリー」調査と、文献調査による。

4-1 「オーラル・ヒストリー」調査

議事堂建設の設計と工事に直接関わった、旧三井建設社員 3 名に、合計 4 回 11 時間に及ぶ「オーラルヒストリー」調査を実施した。

- ・第 1 回, 在コロンボ営業所所長 杉浦伸一, H30/1/16, 15:00-21:00, 東京ステーション・ホテル
- ・第 2 回, 杉浦伸一, 現場監督磯山英男, 設計部近藤秀次, H30/3/6, 15:00-17:30, AA&SUN 設計事務所
- ・第 3 回, 近藤秀次, H30/3/29, 15:00-16:30, AA&SUN 設計事務所
- ・第 4 回, 磯山英男, H30/3/29, 17:30-18:30, 新宿ルノアール

4-2 文献調査

既往研究を中心に文献調査した

5. バワの設計思想と日本の建築から受けた影響

5-1 バワと自然

バワが議事堂で示した設計上の関心は、外観、プロポーション、そして自然素材の木と石の使用であった*5。議場棟は南北軸線上におかれ、当初、中庭型の議場後部棟もこの棟軸上にあったが、マンゴスチンの木を伐採して建てることを知ると、バワは近藤に建物を 1 スパン 6m 西側へ移動(図4)するよう指示して「建物よりも自然が優先」と述べたという*6。



図4：軸線から 6m スパンずらされた議場後部棟

部屋の配置や内装に興味を示さないバワであったが、議場天井だけは小さな紙に 4 方入隅からのカテ

ナリー曲線を描いて示した。木を好んだバワは 100 年の耐久仕様を求めて、チーク大判無垢材の使用を要求したが、ミャンマー他東南アジア各国を調査しても調達困難であることを知ると、目に涙を浮かべて現場代理人に材料確保を依頼した*5。

5-2 ランドスケープと屋根

多くの言説を残さなかったバワであるが、屋根と風景、自然とランドスケープの関係について記述している*7。議事堂ではこの設計思想が明確に現れた。

・ランドスケープ

議事堂の中央議場と放射状附属建物の有機的複合構成(図 5)は、古都アヌラダプラのウェスタン・モナストリー(図 6)の引用と見なされている*2。

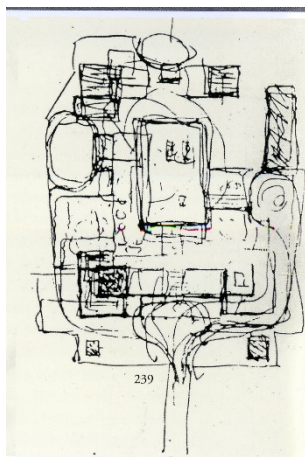


図 5: バワの平面スケッチ

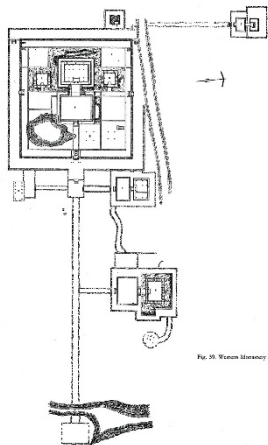


図 6: ウェスタン・モナストリー

ヘリを飛ばして敷地を選定したバワは、沼地を浚渫して議事堂を水に浮かべた。島の中央には岩があり、「水」と「岩」によるランドスケープ構成は古代スリランカの岩屋寺院の記憶を呼び起こしたといえよう。

・屋根

バワは「屋根が風景を決定する」*7 との記述を残しており、こうしたことから、三井に古都キャンディにある「仏歯寺」、「ランカティラカ寺院」(図 7)、「ガダラデニア寺院」(図 8) など、伝統的シンハラ建築の「中折れ屋根」参照を依頼した。屋根材に関してバワは当初、伝統的なルーフタイル葺きを希望したが、漏水、荷重増加、大スパン議場空間を理由に、三井が鉄骨造大屋根、銅板葺きを提案したところ、バワは中折れ屋根、屋根パタン、緑青色の屋根が実現できることを条件にしてこれを了承した。



図 7: ランカティラカ寺院



図 8: ガダラデニア寺院

伝統的シンハラ建築の屋根は中折れ 2 段勾配 (double pitched roof) であったが、議事堂では軒先内樋としたことから、軒先から中央に 16 度、23 度、32 度の 3 段勾配 (triple pitched roof) となった。屋根パタンは漏水懸念から全面平葺きの上に 2 重パタン張りとして要求に応えた。屋根勾配検討時に、バワは近藤に「日本の屋根はこうなっている。」と述べており、日本の風景が念頭にあったようだ。

5-3 バワが日本から受けた影響

一般に建築家は、記述や論考を「書く」か否か、に 2 分されるが、バワは「書かない」建築家の典型である。「建築を文字で記述することはできない。図面も意味なし。建物あるのみ。」との考えから、彼は裏庭で図面を燃やしまとまった論考は残していない。まして日本に関する彼の記述は、知る限り皆無である。とはいえ、バワは日本をどのように捉えていたのだろうか。三井の「オーラルヒストリー」からその一端を伺い知ることができた。バワは日本びいきである。好んで日本へ頻繁に訪れていた。EXP070 で「セイロン館」を設計した折には、京都や奈良を訪れて「城」と「堀」の構成や、寺院の「大屋根」に関心を寄せていた旨、三井関係者に語っている。議事堂建設時

には打合せや製品検査で6-7回程来日して10日間程度滞在し、そのたびに京都や日光などを訪れた。定宿は庭の綺麗な「ホテルニューオータニ東京」を指定したそうだ。お花見の季節は京都丸山公園で桜を愛で、低い軒が連なる木造街並みの先斗町と舞妓さんのコントラストを「美しい」と称賛した。龍安寺石庭など日本文化を熟知していた彼は、議事堂完成時に「吊り鐘」のプレゼントを求め、三井はこれに応じて議事堂正面に吊り下げた。日本製品に絶大な信頼をおいていたバワは、厳しい熱帯気候に耐えうる高い仕様を求め、鉄筋、屋根銅板、塗装、建具、タイル、カーペット、設備機器ほか可能な限り日本製資材を採用した。新国会議事堂が完成した時、バワは望外の出来上りに大いに喜び感謝したそうだ。

6. バワと三井の設計作業

・バワのスケッチ

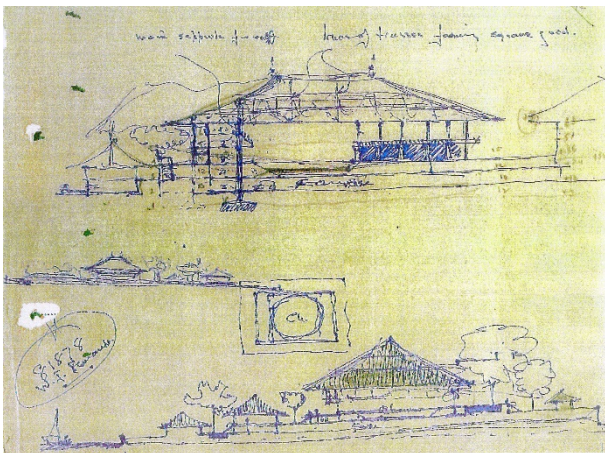


図9：バワの断面スケッチ

三井が受注時にバワから受理した図面は、設計図とは程遠い5-6枚のスケッチのみであった(図5、図9)。バワが屋根を基調にデザインを知った三井は、コロombo初回打合せに吉田五十八の高弟の小杉英男を同伴したが、バワは興味を示さなかった*6。バワのスタッフは主に内装担当V・ヤコブセンと構造担当K・プールガスンドラムの3名(図10)であったが、実施設計能力はなかった。こうした状況で、バワは三井の協力を得て設計を進捗させた。コロomboのバワ事務所(現ギャラリーカフェ)で設計を開始した三井設計部の近藤(図11)らは、夕刻バワが自邸(No. 11)へ帰宅後、深夜まで設計を進めた。

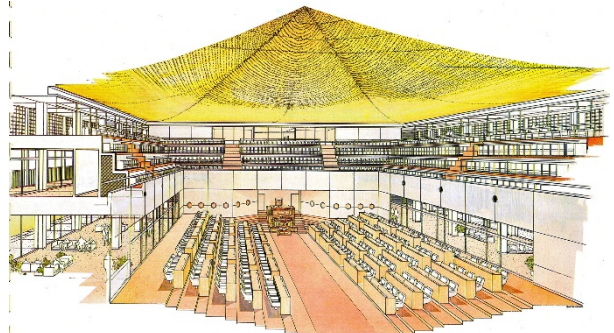
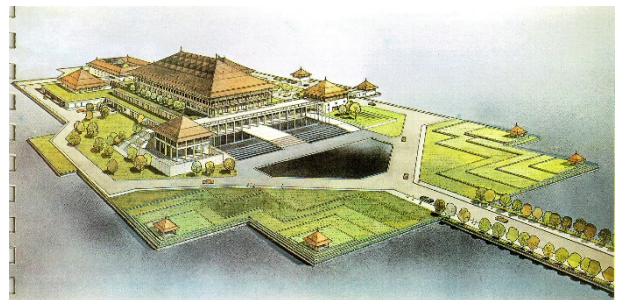


図10：左、バワ 中央、ヤコブセン 右、プールガスンドラム

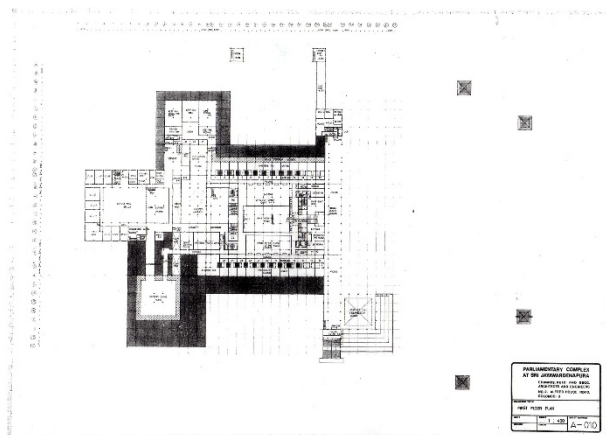
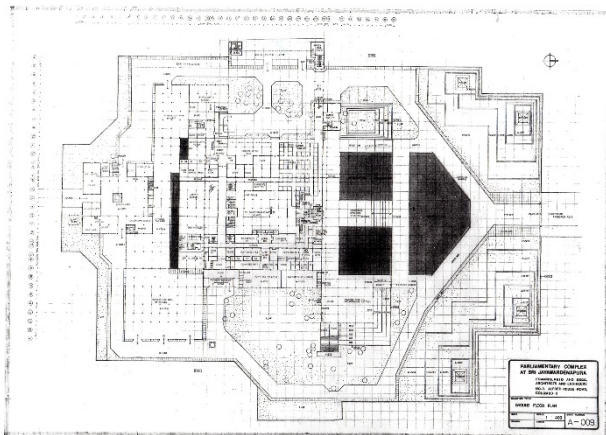
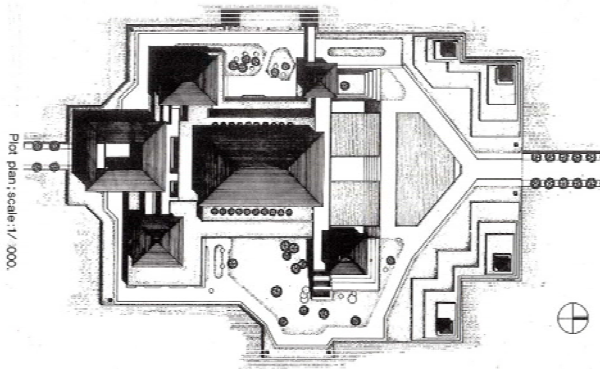
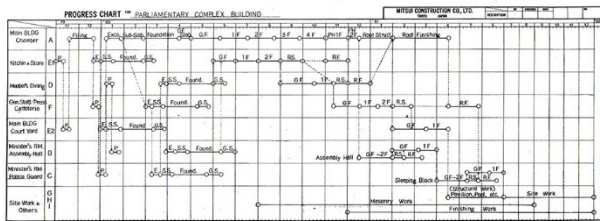


図11：左、バワ 40歳 右、近藤 30歳

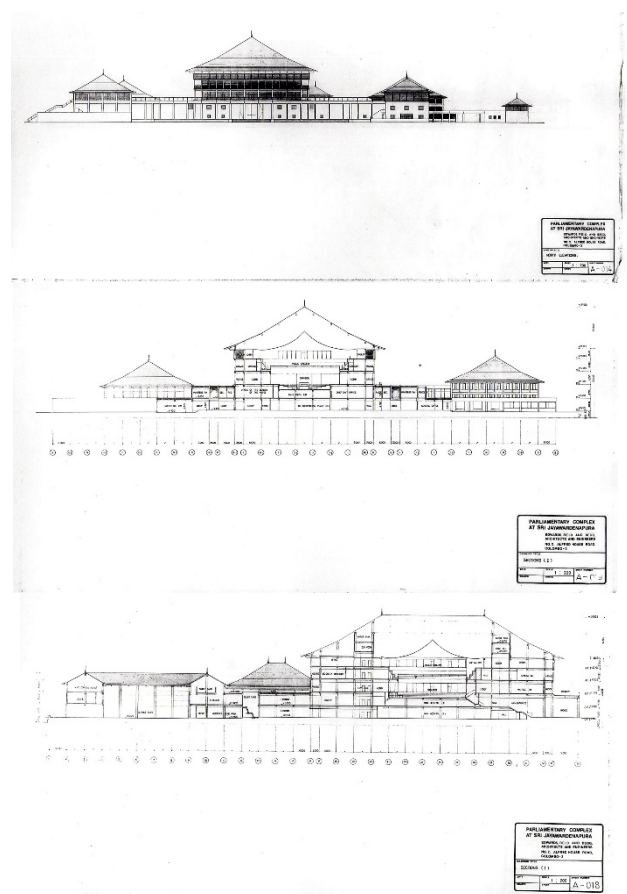
翌朝、近藤がno. 11に持参したA3トレペ原紙(コロomboでは青焼きが不自由)に、ベットの横臥したバワが鉛筆で修正する作業を繰り返して、1978年6月に開始した基本設計が、5か月後の同年11月に完了した(図12-20)。



上 図12：鳥瞰パース 下 図13：議場パース



上から図 14 : 工程表 図 15 : 配置図
図 16 : 1 階平面図 図 17 : 2 階平面図



上から図 18 : 北立面図 図 19 : 断面図 図 20 : 断面図

・6m スパングリッド

打合せ 2 回目には議事堂の基本モジュールグリッド 6m x 6m と階高 5m が決定された。バワのスケッチは 1 cm 程度の方眼紙にノンスケールで描かれていたが、近藤がプランを 20 feet グリッドに作図してバワの了承を得た。20feet x 20feet は、近似値 6m x 6m への読み替えが了承された。バワが天井高 3.3m を要求したことから、階高は 5m に決められた。6m グリッドと階高 5m が決まると、バワは柱の断面寸法を尋ねた。三井が計算した結果、仕上寸法で 2feet x 2feet となり、これを 60 cm x 60 cm に読み替えた。柱躯体寸法は 55 cm x 55 cm であった。現場での寸法は全てメートル法とすることも了承を得た。6m グリッドの決定後、現場では実施設計が未完であったが、余剰見込みで日本製 12m 程度の PC 杭を打込んで工事を開始した。

7. 施工者選定とスリランカの施工技量

・受注の経緯

スリランカ政府により設計者バワ指名と並行して、建設会社の選定がすすめられた。リストに上がったのは、イギリスのバルフォビティー、スウェーデンのスカンセン、日本の戸田建設（以下、戸田という）と三井の4社であった*4。ところが欧州勢は、延床面積約 48,000 m²、工期 2 年半という苛酷な施工条件は不可能、として受注競争から降りてしまった。残るは日本勢であるが、戸田はスリランカで大型物件の受注実績がなかった。一方、三井はインドネシア食品会社のプリマ製粉工場を東洋一の規模でスリランカ東岸トリコンマリーに着工、大阪 EXP070 で「セイロン館」を施工、議事堂と同等規模のマレーシア・サラワク州「クチン議事堂」を直前に竣工、などの実績をスリランカ政府にアピールして特命受注に成功した。この時期、日本の皇太子（平成天皇）が訪島した直後、にわかに工事が成約したがその影響は不明とのことである*3。

請負契約高は 100 数十億円であったが、スリランカ政府の支払能力を疑問視した三井は、リスクヘッジのため工事契約を「杭工事」、「基礎工事」、「全体工事」に 3 分割して受注したが、憂いは杞憂に終わった。なお契約に際しては、日本の戦後賠償や ODA などの政府関係資金は入っておらず、三井物産と三井建設による「三井コンソーシアム」が純粋な民間工事として受注した。

・スリランカの施工事情

1980 年初頭のスリランカの施工事情は、想像を超える厳しさである。島にあるのは、「水」と「砂」そして「砂利」だけであった。水、砂、砂利があったとはいえ、日本のように電話一本で調達できるわけではない。砂はヘリコプターを飛ばして川を見つけ、ジャングルを切り拓いて砂採りした。砂利はロイヤリティーを払って岩の権利を買い、ダイナマイトで発破をかけて自前で作った。島に碎石プラントはなく日本から碎石業者をよんで碎石工場を建設した。セメント、鉄筋、合板はじめとして全ての建設資材は、東南アジアの拠点をシンガポールに置いていた、三

井物産や三井建設のネットワークを活用して、日本、マレーシア、ミャンマーなど海外から輸入したが、コロンボ港で船からの陸揚げができず、荷揚げクレーン設置に始まってその他の建設機械もすべて日本から調達した。このように、建設資材はいうにおよばず十分なインフラも整っていない状態であった。施工時にはスリランカ人の施工技量が追いつかず、急遽マレーシア、フィリピンから大工や鉄筋工を入れ、その下にスリランカのサブコンを配置して工事した。現場事務所は日本人 14-15 人とスリランカ人 30 人の都合 50 人ほどが常駐していた。現場のワーカーは 1 日 500 人が関わった大工事であった。

8. まとめ

スリランカ新国会議事堂は、風土と建築の調和を探究したバワの思想を、三井が設計と施工の両面から協力して実現した。当時、バワ 40 歳、現場所長杉浦と設計近藤は 30 歳、現場監督磯山 40 歳の若い情熱とエネルギーが結実した成果だったといえよう。議事堂完成後、三井現地スタッフが起業した建設会社「MAGA」と「SANKEN LANKA」は、今ではスリランカの大手建設会社となった。議事堂は建物ばかりではなく、スリランカの発展に必要な人材と基幹産業を残したのである。

□参考文献・資料

- *1 David Robson, geoffrey bawa Complete Works, 2002, Thames & Hudson
- *2 Shanti Jayewardene, Geoffrey Manning Bawa, 2017, Sri Lanka National Trust
- *3 拙著、『解説 ジェフリー・バワの建築』, 2016, 彰国社
- *4 杉浦伸一 旧三井建設 コロンボ営業所所長
- *5 磯山光男 旧三井建設 新国会議事堂現場代理人
- *6 近藤秀次 旧三井建設 設計部
- *7 Geoffrey Bawa, BATUJINBAR BARI

□図版提供

磯山光男 図 4

近藤秀次 図 2, 3, 5, 9~20

Sinhalese Monastic Architecture 図 6

効果的ながん治療を目指したホウ素化応物の液液界面における反応挙動

岡山理科大学 理学部化学科

坂江広基

概要

分極された水/1,2-ジクロロエタン (DCE) 界面における 4-ボロノーL-フェニルアラニン (BPA) の反応挙動をサイクリックボルタモグラム (CV) およびアドミッタンス測定によって研究した。BPA の電気化学応答は pH と濃度によって変化した。酸性・塩基性条件下では明瞭な電気化学応答は得られなかったが、中性条件下では電流応答が観測された。この応答は BPA の濃度が増加するにしたがって増大したが、 $100 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ 以上ではほぼ一定となった。CV について、 $\log v$ vs $\log j$ プロットを行うと傾きは 1 に近くなった。さらに、アドミッタンスの最小値がベースラインと比較して変化し、虚数成分が増加した。これらの結果は、BPA の界面を横切るイオン移動よりもむしろ界面吸着性を示している。しかし、実際の医療現場では、BPA が細胞内に取り込まれることを利用しがん治療を行っている。すなわち、BPA は生体膜を通過して細胞内に分配する。今後は、BPA の界面反応機構をより詳細に研究し、膜透過機構を解明する予定である。

1. 序論

二種類の混じり合わない液体の境界領域（液液界面）における化学種の状態分析や物質移動の解明は、溶媒抽出や機能性薄膜合成における反応機構を理解する上で非常に重要である。特に電気化学的に分極された液液界面では、界面電位差が物質輸送の駆動力として作用する。また、生体内では、アミノ酸や糖などの物質輸送が膜内外のイオン濃度勾配に起因して生じる膜電位によって駆動される。そのため液液界面は生体膜のモデル反応場として非常に有用である。

近年、新たながん治療法として注目されているホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、周囲の正常な細胞を傷つけずにがん細胞のみを破壊することができる。そのため、患者への負担が小さい細胞選択的放射線療法として応用が期待されている。BNCT に用いられるホウ素薬剤は、12 個の ^{10}B から成るクラスター型のボロカプテート (BSH) と必須アミノ酸残基を有するボロンフェニルアラニン (BPA) がある。BSH は ^{10}B の運搬効率は高いが細胞選択性がなく、BPA は細胞選択性を有するが ^{10}B の運搬効率が低い。この問題を解決するためには、ホウ素系薬剤の膜輸送機構を解明することは必須である。

そこで本研究では、生体膜のモデル反応場である液液界面を反応場として、ホウ素系がん治療薬剤

である BPA の界面反応挙動について電気化学的に研究した。

2. 実験

BPA (Aldrich、>95.0%) は購入したものを用いた。水相の支持電解質には $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ LiCl}$ を用い、有機相支持電解質には $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ bis (triphenylphosphoranylidene) ammonium tetrakis (pentafluorophenyl) borate (BTTPATPFB)}$ を用いた。BTTPATPFB は bis (triphenylphosphoranylidene) ammonium chloride (BTTPACl) (Aldrich、>97%) と lithium tetrakis (pentafluorophenyl) borate (LiTPFB) ethyl ether complex (TCI、>70 %) のメタセシス反応により合成した。有機相には HPLC 級の 1,2-ジクロロエタン (DCE) (ナカライテスク、>99.7%) を超純水で 3 回洗浄し用いた。水相の pH は HCl、 $\text{LiH}_2\text{PO}_4/\text{LiOH}$ 、LiOH で調整した。

界面におけるサイクリックボルタモグラム (CV) 測定は、水相と DCE 相の界面を四電極式ポテンシオスタット (北斗電工 HA1010mM1A) を用いて分極して実施した。アドミッタンス測定は、直流電位にデジタルロックインアンプ (NF LI5640) を用いて交流電位変調を重畳し得られる応答を実数成分と虚数成分に分けて解析した。

3. 結果と考察

効果的な BNCT の実現のためには、ホウ素系薬剤を選択的に標的がん細胞に濃縮する必要がある。薬剤は pH に依存して官能基のプロトン付加・解離が生じるため電荷状態が大きく変化する。分子サイズや電荷は界面反応特性に大きく影響する。そこで電気化学的に分極された水/DCE 界面における BPA の電気化学応答の pH と濃度依存性を検討した。

Fig. 1a に $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ BPA での CV の pH 依存性を示した。CV は pH に依存して波形が変化した。酸性条件下における正端の電流応答の増加は、高濃度存在する H^+ のイオン移動によるものである。酸性・塩基性条件下と比較し、中性条件下では -0.05 V 付近に電流応答が得られた。この電流ピークに対して $\log v$ vs $\log j$ プロット (v , j はそれぞれ走引速度、電流密度) を行くと、傾きはおよそ 1 となった。また、アドミタンス測定では界面吸着を主に反映する虚数成分がベースラインと比較して増加した。これらの結果から、 -0.05 V 付近に得られた電流応答は BPA の界面吸着によるものであることが示唆された。**Fig. 1b** に pH 7 でのピーク電流値の濃度依存性を示した。電流応答は BPA の濃度増加に伴って増大したが、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 以上ではほぼ一定となった。電流値は通常、反応種の濃度増加に比例して増大する。そのため本研究から、BPA の界面濃度が飽和に達したこと、あるいは会合体を形成することによって、電流応答が一定となったと考えられる。

本研究では、BPA が界面吸着性を示すことが明らかになったが、BPA はがん治療薬剤として臨床利用されている。言い換えれば、BPA は生体膜を透過し標的がん細胞に分配する。これは、液液界面を生体膜のモデル反応場として利用する本研究では、BPA が界面を横切り有機相へと移動することを意味している。しかし、本研究の結果は、BPA が界面に吸着し留まることが示唆している。今後は、BPA の効率的な膜輸送を達成するために、BPA を有機相へと移動させる要因を検討する。まず、界面をより理想的な生体膜へと近づけるために、界面に生体膜を構成するリン脂質であるジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) 膜を展開する。この界面にお

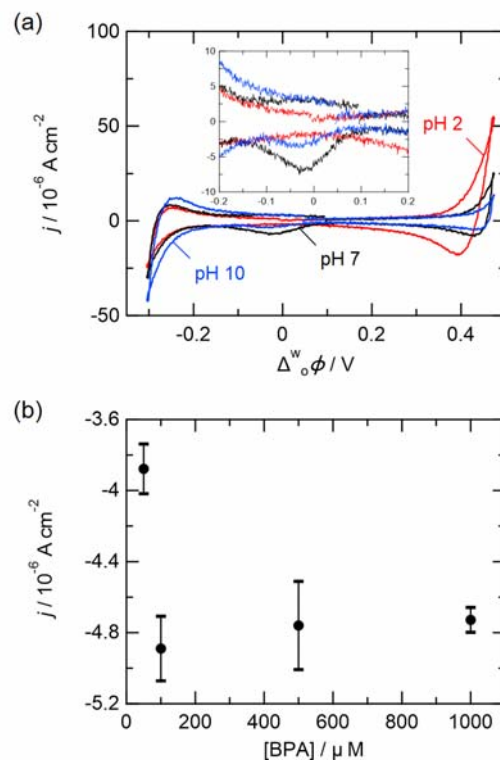


Fig. 1 (a) CVs measured for ferritin at various pHs. The concentration of BPA was $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. (b) Dependence of the current density on the concentration of BPA at pH 7. The potential sweep rate was 100 mV s^{-1}

ける BPA の電気化学応答を検討することで、生体膜上での反応特性を評価する。さらに、分子カプセルを用いた輸送を試みる。内部空孔に分子を取り込むことのできる分子カプセルは、取り込んだ分子を安全・安定に輸送することが期待できる。すでに、生体適合性を有するタンパク質であるフェリチンの分子カプセルとしての応用可能性を見出している[1]。BPA をフェリチンに包接させた高機能な薬剤輸送機構の構築を目指す。

参考文献

[1] **H. Sakae**, Y. Toda, T. Yokoyama, *Electrochem. Commun.* (Accepted).

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いただくことで遂行することができました。心より感謝申し上げます。

ヒトの膜タンパク質の立体構造解析には一般的に、動物細胞、ヒト細胞など、高等生物の細胞を用いて発現系が用いられる。本研究では試験管内発現 (cell free) 系を用いてヒト受容体の発現を行った。市販品のキットは非常に高価で、反応スケールのアップや、安定同位体標識を行うなどの実験が容易ではない。本研究ではタンパク質合成に関わる全ての化合物を購入して用いた。S30 リボソームは大腸菌を培養し、精製したホームメイド標品を用いた。一般的に発現量が増加するとされるタグのうち H-, SER-タグを用いて発現を試みた。反応液 1 ml あたりの発現量は H-tag を用いた場合は 0.21 mg、SER-tag を用いた場合は 0.69 mg となった。通常の細胞培養液 1 L スケールに換算すると、今回発現した受容体タンパク質は 200 ~ 700 mg となり、一般的に培養細胞を用いて得られる膜タンパク質量の約 1000 倍もの高収量となることが示された。

1. 序論

膜タンパク質は脂質二重膜中に存在し、情報伝達、エネルギー合成のみならず、外界からの物質の取り込み、排出などの機能を担っている。膜タンパク質は疎水性の性質を持つために水に溶けにくく、水溶性タンパク質と比較すると取扱いの難易度が高い。またタンパク質は DNA とは異なり、一つ一つに「個性」を持ち、ある膜タンパク質で用いられた方法が目的とする膜タンパク質に適用できることは稀である。さらに、ヒト由来の膜タンパク質はヒト試料から単離・精製することは事実上難しく、ヒト膜タンパク質を得るには分子生物学的手法により微生物や昆虫細胞、動物細胞を用いた発現系を確立し、研究を行う必要がある。膜タンパク質の構造研究は生命科学の重要課題の一つであり、最難関の分野でもある。

オキシトシンは下垂体後葉から分泌されるホルモンで、分娩時の子宮収縮作用などの身体的作用や、精神の安定などの精神的作用を持つことが知られている。近年、オキシトシンの経鼻投与によって、対人場面に現れる自閉スペクトラム症の症状改善と、この症状改善が脳の機能改善を伴うことが報告され、精神医療の治療薬として期待されている。ヒトのゲノム解析によりヒト オキシトシン受容体 (hOXTR) の

DNA の解読が行われ、hOXTR はアミノ酸 389 残基からなることが明らかになっている。ハイドロパシープロットによると7回膜貫通タンパク質と考えられている (Fig.1)。その一方でヒトオキシトシン受容体がオキシトシンをどのように認識するか未だ解明されていない。

研究に必要なタンパク質をその本来の産生細胞から得ることが困難な場合、一般的に大腸菌や酵母などの培養が容易な細胞に目的タンパク質の遺伝子を導入し、組換えタンパク質として生産する方法が用いられる。しかし、これらの細胞は自己の細胞機能を維持するために外来タンパク質を排除しようとする傾向があるため、発現が困難であることも多い。この弱点を回避する方法として試験管内 (cell free) 発現系がある。この系は、タンパク質合成に必要な成分を全て添加し、*in vitro* でタンパク質を合成する方法である。cell free 発現の利点は、タンパク質試料を迅速に調製できることである。cell free 発現は溶液を混合するという簡単な操作でタンパク質の合成が進行し、精製時に煩雑な細胞破碎操作を必要としない。また、同位体標識試料の作成も可能であることから、X 線結晶構造解析法や核磁気共鳴 (NMR) を利用した立体構造解析の試料調整に適している。

本研究ではヒトのオキシトシン受容体を試験管内 (cell free) 発現系の構築を行い、異なる二種類の発現タグについて比較検討を行った。

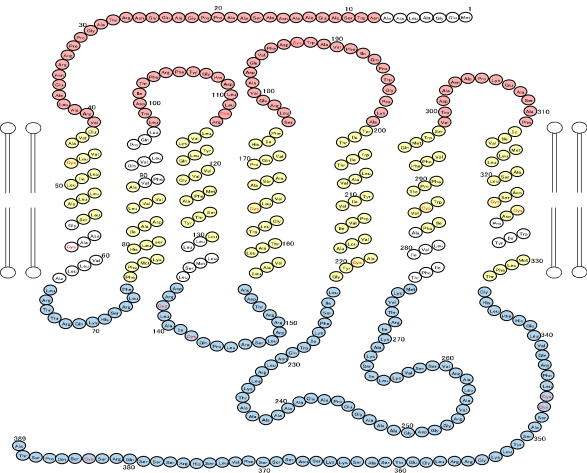


Fig.1 ハイドロパシープロットで予測された hOXR の構造
赤い部分が細胞外、黄色の部分が細胞膜中、青い部分が細胞内に存在すると予測される アミノ酸

2. 方法

使用したヒト由来の遺伝子は化学合成した (GenScript Japan Inc.)。この遺伝子を pIVEX2.3d (biotechrabbit, Germany) に組み込んだ。(Fig.2)

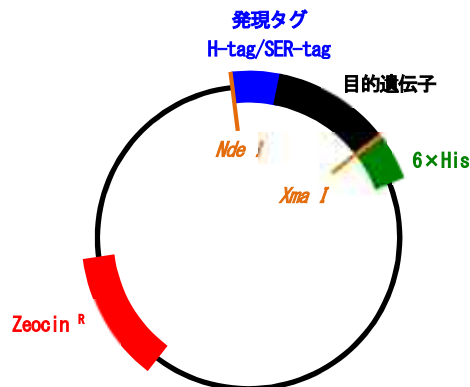


Fig.2 pIVEX2.3d ベクターの
コンストラクト

目的遺伝子上流には発現タグとして H タグと SER タグ (Table.1) の異なる二種類の発現タグを持つベクターを作製した。タンパク質の N 末端には精製用のタグとしてヒスチジンを 6 残基付加した。実験に必要な試薬は購入したものをそのまま用いた。大腸菌 S30 画分抽出液は大腸菌 Rosetta (DE3) 株を

培養した後、精製したものを用いた。

発現タグ	塩基配列	アミノ酸配列
H	AAACCATACGATGGTCCA	KPYDGP
SER	AAATCATCATCATCA	KSSSSS

Table.1 発現タグの塩基配列およびそのアミノ酸配列

透析チューブ内に反応液を準備し、24 時間透析を行い、タンパク質発現を行った (Fig.3)。

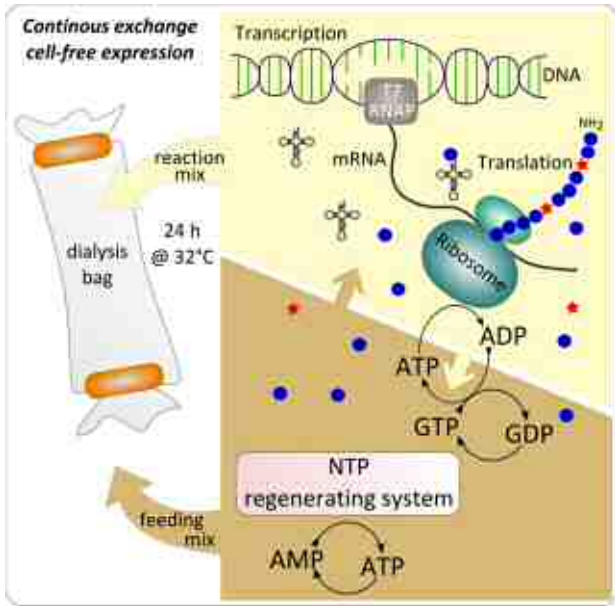


Fig.3 試験管内発現 (cell free) の概要図

結果

マグネシウム濃度の検討

cell free 発現においてマグネシウム濃度は目的タンパク質の発現を左右する重要なパラメーターである。そこで反応容器中のマグネシウム濃度を 14 mM、16 mM、18 mM、20 mM の 4 種類のマグネシウム濃度で cell free 発現を行い、SDS-PAGE で確認した (Fig.4)。SDS-PAGE の結果、マグネシウム濃度 14 mM のサンプルの 30 kDa に特に濃いバンドが確認でき、最適濃度が決定出来た。

発現タグの検討

目的タンパク質上流の N 末端に発現タグを付加すると発現量が増加することが知られている。様々な発現タグが報告されているがこれらの種類によって発現量が大きく異なる。本研究では H-tag と SER-tag のどちらの発現量が多いのかを確認した。

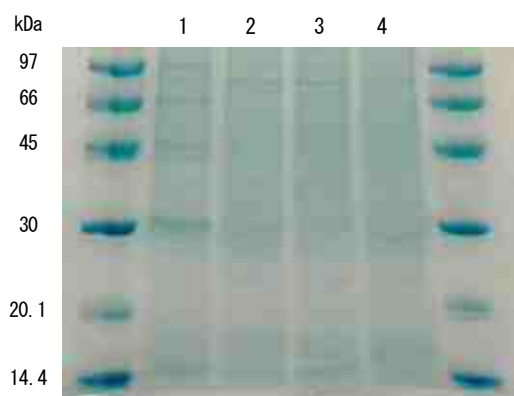


Fig. 4 マグネシウム濃度の検討

lane 1 : Mg^{2+} 14 mM
 lane 2 : Mg^{2+} 16 mM
 lane 3 : Mg^{2+} 18 mM
 lane 4 : Mg^{2+} 20 mM

SDS-PAGE の結果、目的タンパク質の発現を確認することができた (Fig.5)

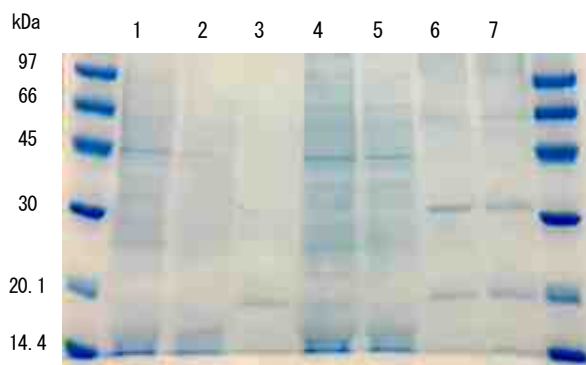


Fig. 5 タグによる発現量の検討

lane 1 : H-tag, before purification
 lane 2 : H-tag, flow thorough
 lane 3 : H-tag, elution
 lane 4 : SER-tag, before purification
 lane 5 : SER-tag, flow thorough
 lane 6 : SER-tag, elution 1
 lane 7 : SER-tag, elution 2

定量を試みたところ、反応液 1 ml あたりの発現量は H-tag を用いた場合は 0.21 mg、SER-tag を用いた場合は 0.69 mg となり、SER-tag は H-tag のおよそ 3 倍の収率だった。

考察

cell free 発現でヒト受容体の発現を確認することができた。構造生物学的視点から見ると、ここに 2 つの利点がある。厳密な品質管理と糖鎖修飾による立体構造の多様性は構造解析に向けて結晶化を試みる時に極めて不利になるが、本研究で使用した cell free 系においては翻訳後修飾されないの心配する必要はない。これは結晶化に非常に大きなアドバ

ンテージとなる。もう一点は量の問題である。典型的なケースでは培養液数 L あたり数 mg の組み換え膜タンパク質が得られる。今回の反応スケールは 1 ml で行った。発現タグによる良し悪しはあれど、0.2 mg ~ 0.7 mg 程度の膜タンパク質の合成に成功している。1 L スケールに換算すると、200 mg ~ 700 mg となり、一般的な細胞培養で得られるタンパク質の ~ 1000 倍もの高収量となることが示された。これだけの量が精製できると、様々な生化学的実験や構造解析に利用することができる。

一方、SDS-PAGE の結果に精製後であるにもかかわらず数本のバンドが確認された。これには①精製タグは C 末端に付けられていることから、N 末端が切断された可能性と、②膜タンパク質である性質上膜貫通部位の疎水性部分が凝集し、見かけの分子量が小さく見えているだけの可能性が考えられる。これらを明確にするためには、N 末端解析や質量分析を用いたさらなる解析が必要と考えられる。

今年度は無細胞発現系を構築し、従来手法に比べ格段に発現効率の良い系を構築することが出来た。前述の問題が解決でき次第、安定同位体標識、固体 NMR 分光法を用いた構造解析へと発展させたい。

RNA による DNA トポイソメラーゼ I の酵素活性制御メカニズムの解析

岡山理科大学 理学部 生物化学科

河野 真二

本研究では、DNA トポイソメラーゼ I (トポ I) の酵素活性制御に対する RNA の影響について解析を行った。まず、酵素活性への影響について解析した。ヒト継代培養細胞由来の total RNA 存在下で酵素反応を行なったところ、加えた RNA の量に依存した酵素活性の抑制が認められた。同様の抑制効果は、ホモポリリボヌクレオチドを使用した場合にも認められ、特に poly(G) が最も高い抑制効果を示した。次に、緑色蛍光タンパク質を融合させたトポ I を使って、細胞核内動態への影響を解析した。無処理の細胞では核質と核小体にトポ I の蛍光シグナルが認められたが、RNA ポリメラーゼ II の阻害剤の 1 つである α -アミニチンで処理した細胞では、核小体に認められていた蛍光シグナルが減少した。これらの結果から、細胞核内におけるトポ I の制御メカニズムの 1 つとして、RNA が直接的に、あるいは間接的に関わっていることが示唆された。さらに、トポ I の RNA 相互作用ドメインの同定を試みたところ、トポ I の N 末端領域が関わっていることを示唆するデータが得られたが、明確にするためには今後のさらなる解析が必要である。

1. はじめに

ゲノム DNA 上にコードされた遺伝情報を読み取る転写反応では、DNA の二重らせん構造をほどこながらその反応が進行する。そのため、反応の進行方向の前後に超らせん型 DNA と呼ばれるトポロジカルな DNA の立体構造が生じる。遺伝情報が正確に滞りなく読まれるためには、この構造を速やかに解消する必要があり、DNA トポイソメラーゼがこれを担っている (文献 1)。最近、神経細胞での長い (200 kb 以上) 遺伝子の発現に DNA トポイソメラーゼ I (トポ I) と II β (トポ II β) が関わっていることが報告された (文献 2)。しかしながら、これらの酵素が細胞核内でどのように働いているのか、その詳細な分子メカニズムについて未だ不明な点が残されている。これまでに、トポ II β の細胞核内動態や酵素活性が RNA によって制御されていることが明らかになった (文献 3)。トポ II β は C 末端領域 (CTD) に、トポ I は N 末端領域 (NTD) に、それぞれ塩基性アミノ酸を多く含んだ、決まった立体構造を取らない disorder な領域が存在する。トポ II β では、この領域に RNA が相互作用することが示されていることから、似たような領域を有するトポ I の細胞核内動態や酵素活性の制御にも RNA が関わっている可能性が

示唆された。本研究では、トポ I の酵素活性への RNA の影響と、細胞核内動態、さらに RNA の相互作用ドメインの同定を目的として解析を行った。

2. 方法と結果

(1) RNA による酵素活性への影響

RNA がトポ I の酵素活性にどのように影響するか、Relaxation assay (弛緩反応) を用いて解析した。基質は超らせん型 DNA であるプラスミド DNA の pUC18 を使用し、酵素は市販のウシ由来の酵素 (TaKaRa Bio) とヒト由来の酵素 (ProteinOne) を使用した。HEK293 細胞由来の total RNA を酵素反応溶液に添加して反応を行なったところ、加えた RNA の量に依存して酵素活性が抑制された。この抑制効果は市販のウシ由来の酵素とヒト由来の酵素の両方に認められた。さらに、酵素活性の抑制に効果のある RNA の塩基配列に特徴があるかどうか、ホモポリリボヌクレオチド [poly(A)、(G)、(C)、(U)] を酵素反応溶液に加えて解析した。酵素はヒト由来の酵素を使用した。その結果、すべてのホモポリリボヌクレオチドにおいて酵素活性の抑制が観察された。しかしながら、その抑制効果には明らかな差があり、poly(G) に最も顕著な抑制効果が認められた。これら

の結果から、トポ I の酵素活性を RNA が抑制し、その RNA には G に富んだ配列が含まれている可能性が示唆された。

(2) 細胞核内局在に対する RNA の影響

間期細胞核内において、トポ I は核質と核小体の間をシャトリングしていることが報告されている(文献 4)。トポ I の核小体局在に RNA が関わっているか、転写阻害剤の 1 つである α -アマニチンを用いて解析した。EGFP タグを付加したトポ I と mCherry タグを付加した核小体タンパク質 C23 を HEK293 細胞に共発現し、蛍光顕微鏡で観察した。無処理の細胞では、トポ I の蛍光シグナルが核質と核小体に認められた。しかしながら、50 $\mu\text{g/mL}$ の α -アマニチンで 5 時間処理した後に細胞を観察すると、核小体に認められていた明瞭なトポ I の蛍光シグナルが認められなくなった。この結果から、トポ I の核小体局在に α -アマニチンによって合成が阻害される RNA が関わっている可能性が考えられた。

(3) RNA 相互作用ドメインの解析

RNA がトポ I のどの領域に相互作用するか、Pull-down assay で解析した。RNA は HEK293 細胞由来の total RNA を使用し、タンパク質は市販のヒト由来のタンパク質である WT (1-765)、NTD (1-197)、CD (197-651)、CTD (651-765) を使用した。市販のタンパク質は His タグを付加した組換えタンパク質であるため、ビーズには His Mag Sepharose Ni (GE healthcare life science) を使用した。100 ng の RNA と 50、または 100 ng のタンパク質を混合し、37°C で 30 分間インキュベートした後、ビーズを混合し、Pull-down した。結合画分と非結合画分に分画した後、SDS と Proteinase K を加えて 55°C で 1 時間インキュベートし、それぞれの画分に含まれる RNA を Qubit HS RNA Assay Kit (Invitrogen) で定量した。タンパク質を加えずに同様の反応を行なったサンプルと比較したところ、WT と NTD において結合した RNA 量に有意な差が認められた。CD と CTD にも RNA が結合していたが、有意差は認められなかった。これらの結果から、トポ I に RNA が結合し得ること、なら

びに RNA の相互作用ドメインが NTD である可能性が示唆された。

3. 考察

試験管内での酵素反応や細胞核内局在の解析結果から、トポ I の制御メカニズムの 1 つに RNA が関わっていることが示唆された。細胞核内には多種多様な RNA が豊富に存在するため、どのような RNA がトポ I のどこに作用するのか、また酵素活性の抑制効果について詳細な作用機序について今後明らかにしていく必要がある。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、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. Wang J.C. DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, 1996, **65**, 635-692.
2. King I.F., *et al.* Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature*, 2013, **501**, 58-62.
3. Onoda A., *et al.* Nuclear dynamics of topoisomerase II β reflects its catalytic activity that is regulated by binding of RNA to the C-terminal domain. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**, 9005-9020.
4. Christensen MO., *et al.* Changes in Mobility Account for Camptothecin-induced Subnuclear Relocation of Topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 15661-15665.

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

有機伝導体は超伝導を始めとする興味深い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、その性質の理解と機能性の開拓を目指し研究を行っている。この転移の実態は伝導を担っていた電子が、水が氷に凍結するかのように結晶化するという電子相転移であるため、イオンの運動によって引き起こされる通常の強誘電相転移とは異なる物理特性や機能性の発現が期待される。本研究ではこの転移に伴う結晶の対称性変化を簡便に検知するとともに、機能性開拓を目的として行う電気測定のための多機能な偏光顕微分光系の構築を実施した。本稿ではこの装置を用いて行った高感度焦電流測定により、電子の結晶化現象によって発現する巨視的電気分極が直接観測された成果について報告する。

1. はじめに

水の結晶を見たことがあるだろうか。冷蔵庫でできる多結晶ではなく単結晶に限るとすると身近で目にする機会は多くない。しかし、雪の結晶がそれだと言えれば見入った経験があるという方も多いだろう。正六角形を基調とする美しい幾何学構造が、あの「への字」の分子から作られていると聞くと意外かもしれないが、調和を好む自然の力はこのへの字から精巧な対称構造を構築してみせる。その結果が美しい結晶のマクロ構造に現れているのである。

しかし、世の中にはこうした対称性を欠いている物質もある。しかもそれらの多くは、科学技術を支える機能性材料として欠くことができない存在となっている。例えば、N極とS極をもつ磁石は明らかに磁極方向の対称性が破れた物質であり、応用上の重要性はいうまでもないだろう。磁石の電子版に相当する、すなわち正極と負極をもつ物質も存在する。水晶がその代表例であり、クォーツ時計やデジタル素子に欠かせない存在である。さらに、この正と負の区別がある温度を境に発生・消滅する不思議な物質「強誘電体」も見つかっており、スマートフォンを代表とする現代の通信機器において極めて重要な役割を担っている[1]。つまり、物性研究者は、あまり美しくない、仲間はずれの物質を見つけた時にこそ、意識を集中させる必要があるといえよう。

さて、我々は、最近、思わぬ物質が強誘電体のような対称性変化を示すことを発見しその性質に興味

を抱くようになった。強誘電体であれば正極と負極をもつ、つまり電気分極する以上、絶縁体である必要があり、事実、現在応用されている強誘電体はすべて高抵抗のセラミックである。ところがその物質は有機の電機伝導体なのである。実際、常温では金属伝導をしめし、その対称性変化が確認された相転移によって絶縁化するのである[2]。

通常の強誘電体は何らかのイオンの変位によって電気分極しているのであるが、この物質の相転移はその実態がウィグナー結晶化とよばれる伝導電子の結晶化現象であるといわれている[3]。つまり、電気分極の起源がことなっているため、通常の強誘電体とは大きく異なる性質や機能性が発現するかもしれないのである。

ただし、その性質の多くは実質的に未解明であり、新規強誘電体群といえるような物質のバリエーションも整っていない。そこで本助成研究では、関連物質の探索のための偏光分光測定とそれらの電気分極特性の測定とを同時に行える多機能な顕微光学系の構築を行い、研究基盤の充実を目指した。本稿ではこの顕微鏡の紹介と、装置を用いて行った上記の有機伝導体における巨視的電気分極の直接観測について紹介する。

2. 有機伝導体の電子型強誘電相転移

図1は注目している有機伝導体である α -(BEDT-TTF)₂I₃

[BEDT-TTF·bis(ethylenedithio)tetrathia-fulvalene] 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 個の割合でドーパされたホールにより電気伝導性を発現する。この有機錯体は常温では金属として振る舞うが、135 K まで冷却すると本稿で注目している金属-絶縁転移が発現する。

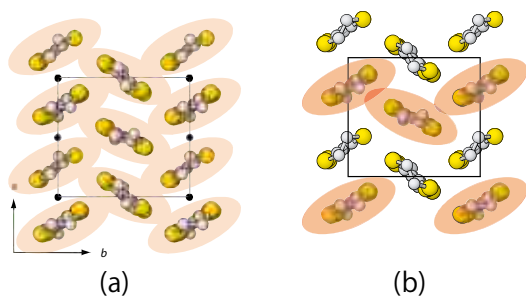


図 1 α -(BEDT-TTF) $_2$ I $_3$ 結晶におけるドナー分子の配列と電荷分布 (a)金属相 (空間群:P $\bar{1}$) , (b)電荷秩序(強誘電)相 (P1)

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二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可能性を指摘した[1]。金属相を原型相として発生する強誘電転移は極めて特殊であり学術的に興味深いが、残留伝導度の影響により誘電率や分極反転測定が難しく、強誘電体の本質である電気分極の確認とその特性の理解は進んでいなかった[5,6,7]。そこで我々は、本研究で構築している偏光顕微分光系を利用して行うことができる焦電流の温度変調測定を計画した。

3. 装置作製と温度変調焦電流測定

3.1 多機能正立型顕微鏡の構成

今回の助成研究では、光学クライオスタットで温度制御した試料に対して様々な偏光分光測定を行うために、入・出射光の偏光を自由に制御できるよう独自設計を施した正立顕微鏡の作製を行った。顕微鏡の光学系が完成した今年度は、温度調整された微小試料に対しビーム形状や周期変調等を自在に制御して光照射できるこの顕微鏡の特性を生かし、下記の

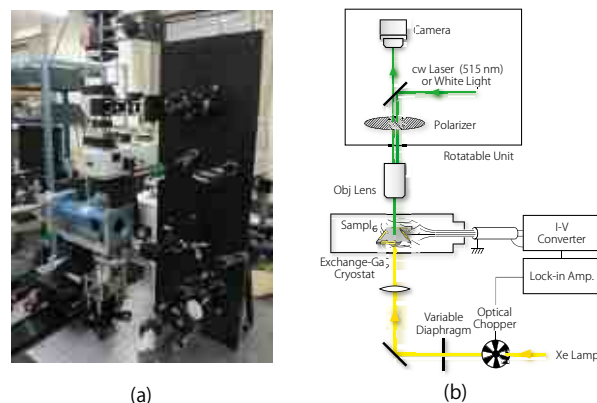


図 2 (a) 多機能正立型分光顕微鏡の全景, (b) ブロックダイアグラム

微小焦電流測定を計画した。

図 2 は、この測定のために改変した顕微光学系の外観とブロックダイアグラムである。試料の有機伝導体は、電流測定の検体としては残留伝導度が非常に高いため、入力インピーダンスの低い検出器が必須となる。本装置は、検出器として用いるロックインアンプの上流に、光電子増倍管の使用時等で利用される低ノイズ電流プリアンプを導入して、微小焦電流を正しく増感検出できるよう構成してある[8]。また、次項で詳述するように、試料冷却に熱交換ガス型のクライオスタットを用いることが本実験の大きなポイントとなっている。

3.2 温度変調焦電流測定

電気分極している物質の正極と負極を電極を介して導通させると、試料の表面電荷を打ち消す電荷が電極に蓄積される。試料温度を変化させて分極を増減させるとこの電荷量が変化し、外部回路には電流が発生する。焦電流と呼ばれるこの電流の密度は、試料温度 T における自発分極を $P(T)$ とすると

$$i(T) = \frac{dP(T)}{dt} = \frac{dP(T)}{dT} \frac{dT}{dt} \quad (1)$$

の関係で表される。つまり、焦電流は試料温度 T における自発分極 $P(T)$ の温度微分と、 T の変化速度との積であり、変化速度を一定にして温度依存性を測定すればその積分から分極 $P(T)$ を求めることができる。

dT/dt 項の存在により試料温度の変化速度を大

きくすれば信号を大きくできることが分かるが、試料の熱緩和によって上限は制限されてしまう。そこで本研究では試料温度を周期光照射によって変調させて行う交流測定法により、背景ノイズの除去によって SN 比を向上させる方針を採用した。

この測定ではクライオスタットによって一定に制御した試料温度を周期光照射によって微小変調し、熱誘起電流のうち温度変調に同期する成分をロックイン検出する。温度変調の角振動数を ω とすると、式(1)の dT/dt から焦電流信号は ω に比例することが分かる。一方、微小電流測定で課題となるゼーベック効果によるノイズは試料の温度不均一性によって引き起こされている。たとえば、電極を接着した 2 点の温度を T_A, T_B とし物質のゼーベック係数 S と置くと、その大きさは

$$V_{\text{Seebeck}} = S(T_A - T_B) \quad (2)$$

と表される。温度を変調しても T_A, T_B の差が一定である限り V_{Seebeck} は変化しないので、変調速度を高めて焦電流信号を増大すればノイズの効果は相対的に抑えることができる。ただし、変調速度は試料の熱緩和、すなわち試料からの熱伝導速度によって制限されるため、熱伝導係数の小さい有機物の場合、高速変調が難しい。そこで本装置には熱交換ガス型クライオスタットを導入し、試料の熱を試料表面全体から熱伝導させることで高速な温度変調を試みた。

4. 温度変調焦電流測定

図 3 は、熱伝導型クライオスタットを用いて予備的に行った α -(BEDT-TTF) $_2$ I $_3$ における熱誘起電流の温度依存性データである。通常、強誘電体の電気分極は強誘電転移温度で現れて臨界的に増大し、低温で飽和する。転移温度以上の常誘電相の分極はゼロで一定しているので、焦電流もゼロのはずである。ところが、得られた熱誘起信号は、相転移温度である 135 K (T_{CO}) よりも高温側からすでに大きな値を示していた。このことは、この信号が焦電流ではなく、ゼーベック効果と考えられる熱誘起信号に帰着されることを示唆している[9]。

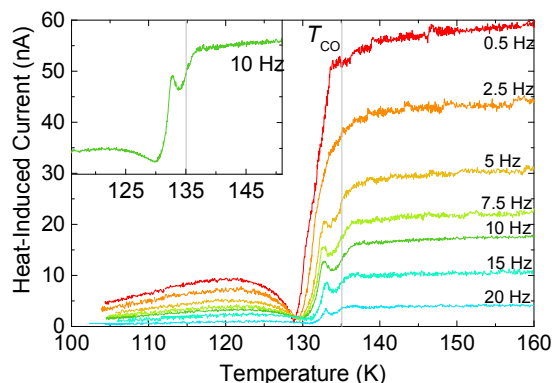


図 3 熱伝導型クライオスタットを用いて測定した α -(BEDT-TTF) $_2$ I $_3$ における熱誘起電流の温度依存性。温度変調周波数 0.5~20 Hz

焦電流信号を識別するために変調周波数を 0.5 Hz から 20 Hz まで上昇させて測定を行ったところ、周波数上昇に従って信号全体の強度が減少する一方、転移点温度の直下にシャープな構造が顕在化した。

信号強度の減少は光照射による熱が緩和されず温度変調の振幅が狭くなり、式(1)の dT/dt 項が小さくなったことを意味している。一方、転移点近くに現れたシャープな構造は背景の信号に対して相対的に増大しているように見える。このことからこの信号が焦電流であると示唆されるが、さらに周波数を上昇させると信号強度は検出感度以下となってしまう詳しい解析を行うことができなかった。

そこで、今回、クライオスタットを熱交換ガスタイプに交換した装置を構築し、同様の実験を行ったところ、変調周波数を約 1 kHz まで高めても支障なく検出できる強度の信号が得られるようになった。

図 4 はこのセットアップを用い温度変調周波数 900 Hz で測定した熱誘起電流の温度依存性である。図 3 との比較から明らかなように、信号の温度依存性は一変しており、低周波の温度変調測定 (図 3) において転移点付近に存在していた信号が、この条件では大きなピークとなって熱誘起電流信号を支配している。信号強度が高周波の温度変調で増大したこと、測定転移点付近で鋭い極大を形成した事実から、この信号の起源が焦電流であると結論できる。

一般に、強誘電転移で発現した分極相の結晶は、原型相で存在していた対称操作で重ね合わせることができる分極ドメインに分かれている。したがって、

ポーリング処理なしのマクロ結晶では分極は平均化されゼロとなっていると考えられる。にもかかわらず、信号が検出されたということは、自発発生するドメインサイズが実験に使用した結晶のサイズと同程度であったことを示唆している。一部の電子物性においてはドメイン壁の影響が強く現れているとの議論が行われているが[5]、このように本物質は単一ドメイン成長の傾向が強いため、伝導性や誘電率など伝導電子全体が関与する物性は単一ドメインの性質が支配していると考えるのが妥当であろう。

同一試料を用いて冷却と加熱を繰り返しながら測定を続けたところ、冷却時と加熱時におけるピーク温度のずれが観測され転移にヒステリシスが伴われることが明らかになった。このことは、転移が1次であるとする他の報告とも整合している[9]。実験結果から見て取れるように、温度履歴を繰り返して行くとこのピークは有意に増大してゆく。これは、強誘電転移によって発生した分極ドメインのうち大きなものが小さなものを吸収して分極の向きがそろって行く過程を反映していると考えられる[10]。この増大分の寄与を考慮に含めれば、転移温度以下のデータは良い再現性を示していると考えて良いだろう。一方、転移温度より高温の領域の信号は、図3の実験データと異なり、測定ごとのばらつきが目立っており気に掛かるかもしれない。しかしこれは、試料の微小な変位によって電極付近の光密度が変化し、電極間の温度差によって生じるゼーバック信号がゆらいだものと理解できるので、焦電流とは無関係と考えられる。

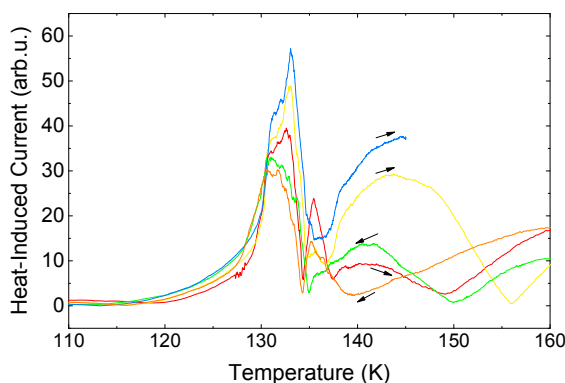


図4 熱交換ガス冷却型クライオスタットを用いて測定した熱誘起電流の温度依存性。温度変調周波数 900 Hz。温度変化速度 ± 5 K/min。矢印は温度変化の方向を示す

以上の議論から、転移点付近以下で観測された熱誘起電流のピークは分極ドメインの性質を反映した焦電流信号であると解釈して間違いなさそうである。したがって、今回の測定により、 α -(BEDT-TTF) $_2$ I $_3$ の電荷秩序が巨視的電気分極を発生する強誘電相転移であることが直接的に確認されたと結論できる。

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偏光分光測定に対応させた自作顕微鏡の構築をおこなってきた。本年度は、前年度、基本骨格を完成させた顕微鏡を微小電流計測に適合させ、有機伝導体 α -(BEDT-TTF) $_2$ I $_3$ における熱誘起電流の温度変調測定を試行した。その結果、この物質における反転対称性消滅を伴った電荷秩序転移が、巨視的電気分極を発現する強誘電性転移であることが直接的に確認できた。強誘電体としては例外的に伝導度が高い上記物質の焦電流検出に成功したことから、本装置は他の微小試料や高伝導度の強誘電体の焦電測定にも広く応用できるだろう。

上記物質で確認されたような電子型の強誘電体は、分極の起源が軽量の電子であるために、従来の強誘電体に比べ大幅に高速な外部刺激応答を示す可能性があるだろう[11,12]。もちろん、熱線を検知する焦電流もその一つに含まれるかもしれない。このような観点から、今後、温度刺激の過渡応答を観測する予定であり、その結果によっては高速熱センサー[13,14]としての候補として材料研究の発展が期待できる。無論、実践的な応用にはより優れた物質探索が不可欠であり、本装置のポテンシャルを生かした旋光性・円二色性測定等の偏光分光観測に期待が寄せられる。

6. 参考文献

- [1] “誘電体/ふしぎな石ころ/村田製作所”
www.murata.com/ja-jp/about/rd/stone/dielectric
- [2] K. Yamamoto et al., *J. Phys. Soc. Jpn.*, **77** (2008) 074709.
- [3] H. Seo, C. Hotta, H. Fukuyama, *Chem. Rev.*, **104** (2004) 5005.
- [4] R. Wojciechowski et al., *Phys Rev. B*, **67** (2003)

224105.

[5] T. Ivek et al., *Phys. Rev. Lett.*, 104 (2010) 206406.

[6] P. Lunkenheimer et al., *Phys. Rev. B*, 91 (2015) 245132.

[7] H. Yamakawa et al., *Sci. Rep.* 6, 20571.

[8] I. Lubomirsky and O. Stafsudd, *Rev. Sci. Instrum.*, 83 (2012) 051101.

[9] K. Bender et al., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 108 (1984) 359.

[10] K. Yamamoto et al., *Appl. Phys. Lett.*, 96 (2010) 122901.

[11] S. Iwai et al., *Phys. Rev. Lett.*, 98 (2007) 097402.

[12] H. Itoh et al., *Appl. Phys. Lett.*, 104 (2014) 173302.

[13] J. Cooper, *J. Sci. Instrum.*, 39 (1962) 467.

[14] S. Lang, *Physics Today*, 58 (2005) 31.

段ボール受動歩行ロボットを用いた実験授業およびその評価

岡山理科大学工学部機械システム工学科

衣笠哲也

(概要) 近年、青少年の理科離れが社会問題となっている。これは技術によって支えられる日本の経済にとって極めて危機的な問題である。このような状況に対し、科学技術教育の充実をめざしたところみが多くなされてきた。我々も、研究成果から派生した3次元2足受動歩行ロボットをプラスチック段ボールにより作製することで安価で小学生でも比較的容易に作ることが可能な教材を開発している。この問題点を解決した新しいモデルの歩行機を設計・製作するとともに従来の歩行機と合わせて工作教室を実施し教材としての有効性を検証することを目的とする。その結果、より簡便に組立を可能とする治具の実現、安定した歩行を可能とするデザイン、大学生を対象としたより高度なプログラムの実践、および小学生を対象とした工作実験教室ならびに大学生を対象とした講義を実施し、教材としての有効性を明らかにした。

1. はじめに

近年、青少年の理科離れが社会問題となっている。OECD（経済協力開発機構）生徒の学習到達度調査（PISA）によると日本の青少年は科学への興味・関心が低いことが示されている。例えば図1は15歳の生徒に「科学を学ぶことの楽しさ」について質問した際の肯定的回答の割合である。図に示すように「理科学習に対する道具的な動機付け」、「理科学習者としての自己効力感」、「科学に関する活動」の項目では2006年と比べて2015年では上昇しているが、「科学の楽しさ」については低下している。これは、日本の高校生が科学について楽しくはないが、学ぶ必要性があることについては理解していることを示している。また、諸外国と比べ科学への興味・関心が低い。

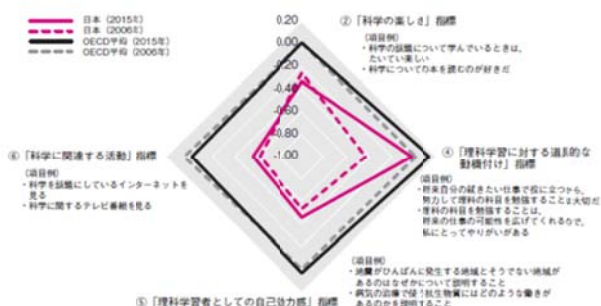


図1. OECD加盟国対象のPISA調査結果比較

我々は、科学への興味・関心を持ってもらうことを目的として、小学生を対象に毎年工作実験教室を

実施している。工作教室で使用している教材は、プラスチック段ボールを用いた3D受動2足歩行機である。プラスチック段ボールを用いた3D受動2足歩行機は、安価で小学生にも簡単に作成可能であるが従来の歩行機は歩行を妨げるいくつかの問題があった。また、大学生を対象にした講義において基本的な力学的知識に基づいたロボットの設計製作をおこなっている。これは理論だけでなくそれに基づいてロボットを設計製作することで知識の定着と深い理解を得てもらうことを期待している。

そこで本研究は、この問題点を解決した新しいモデルの歩行機を設計・製作するとともに従来の歩行機と合わせて工作教室を実施し教材としての有効性を検証することを目的とする。

2. 大学での講義

2017年度は3年生を対象としたロボット工学でプラスチック段ボールによる3次元2足受動歩行機の設計製作をおこなった。15回の講義において半数程度を設計のための基礎的な力学について教科書[2]を用いて講述し、残りの時間で設計、製作を行う。設計指針として正面内の横揺れと遊脚の固有振動数を与え、これらの数値をある程度達成する独自のロボット形状を考案することとなる（図2，3）。



図2. 実現されたロボットと学生諸君



図3. 2017 年度のロボットたち

例年、最初の設計ではうまく歩行しないものもあり、複数回設計製作を繰り返し、歩行できるまで試行錯誤をおこなう。また、設計指針としての理論値と実験結果を比較し、歩行の実現などと合わせて考察する。最終回ではコンテスト形式で歩行のデモンストレーションをおこなう。理論値に近い振動数で歩行するものもあれば、斜面で滑りながら全く別の振動モードで歩行するもの、さらには横向きになって股関節軸の撓みを利用しながら歩行するなど多様な歩行を見せる点も興味深い。3年生講義のアンケートから抜粋（括弧内は前年度）したものを以下に示す。

- この分野への理解が深まった 7/9 (6/7)
- この分野への感心が高まった 4/9 (4/7)
- この分野での技能・技術が高まった 5/9 (2/7)
- 他分野との関連性について理解が深まった 0/9 (1/7)
- 満足 5/9 (3/7), ほぼ満足 3/9 (3/7), 普通 1/9 (1/7)
- 教科書や資料がもう少し平易なほうがよい 1/9

この結果から、講義を通してこの分野における興味関心、理解などが深まり、満足している様子が確認できる。

3. 小学生対象の工作実験教室

2017 年度は岡山理科大学附属中学校オープンス

クール（7/29, 参加者 27 名）および岡山市立高島小学校の高島フェスタ（11/25, 工作参加者 35 名）で工作実験教室をおこなった。



図4. 工作実験教室用ロボット

図4に用いた歩行機のデザインを示す。歩行機は2種類もちいている。当初はデザインの違いによる「歩行の容易性」について調査をする予定であったが、歩行機の差異よりも児童の年齢や器用さなどの影響が強く評価することができなかった。歩行機の性能については次章で議論する。



図5. 組立用治具

図5に歩行機組立のための治具を示す。ロボットが歩くかどうかは組立精度に大きく依存することがこれまでの研究から明らかになっている。ただし、その効果を実証する試験的な運用であったため全ての参加者が利用できる治具を用意できていなかった。



図6. 工作実験教室の様子

今年度は高島小学校における実験教室から全ての参加者が治具を使って組み立てが可能となるように、

2種類のロボット用治具を導入した。図6に理大附属中学校における実験教室（左）および高島小学校における実験教室（右）の様子を示す。図からわかるように、学生が工作の補助を行いながら組立、歩行実験を行っている。図7から図10にアンケート結果を示す。

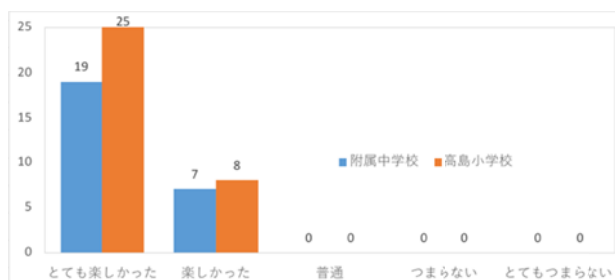


図7. アンケート（楽しさ）

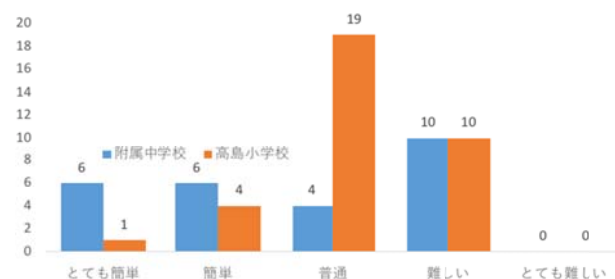


図8. アンケート（難易度）



図9. アンケート（歩行機の出来具合）

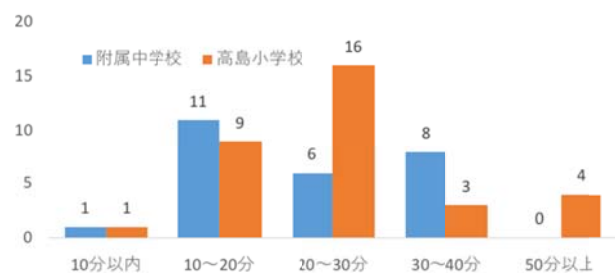


図10. アンケート（作業時間）

アンケート結果から、工作教室を通してロボットを作り、動作させることへの肯定的な感想で占められた点は評価できる。難易度と出来具合および作業時間の結果から工作教室と教材としてのロボットが難易度などで適度な設定であったことが読み取られ

る。ただ、ロボットが全く歩かないという結果が数名見られる点は今後の課題である。

4. 歩行機形状と歩容

歩行機2種類 RW-P03 と RW-P02A（図4右と左）と過去に用いていた歩行機 RW-P02（図4右の踵にアールをつけていないもの）について斜面角度、股関節軸の位置、両脚間の距離をそれぞれ最も歩きやすい条件に設定して歩行させ、歩数と歩行時間の関係を調べた結果を図11に示す。このとき斜面長さは110cmで全ての試行においてこの斜面を途中で停止することなく歩き下ったものを用いている（途中で停止もしくは転倒した場合はデータから排除した）。この図から、それぞれの歩行機は歩行しやすい領域があることがわかる。

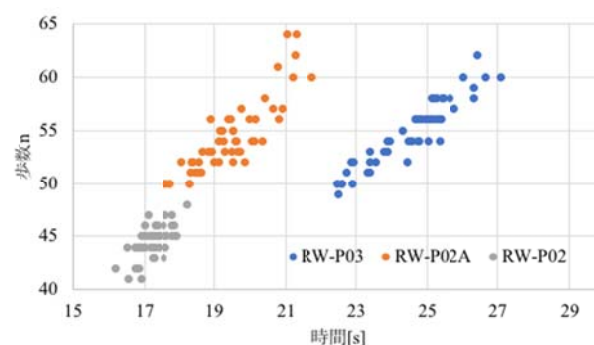


図11. 3種類の歩行機の特徴

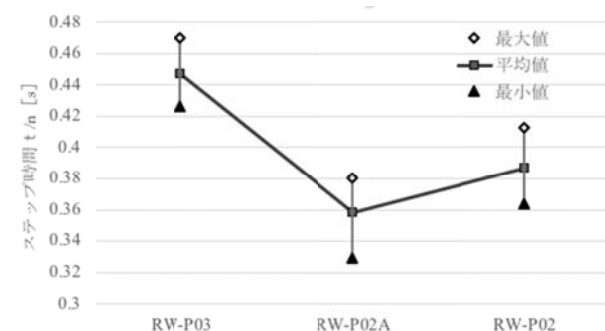


図12. ステップ時間

図12にステップ時間を示す。ステップ時間とは1歩あたりの時間である。この図から、RW-P03が比較的ゆっくりと歩行させたときに安定した歩容が得られる傾向を持つことがわかる。

5. おわりに

本報告では、プラスチック段ボールを利用した3次元2足受動歩行機を教材とした小学生の工作実験教室および大学生の講義を実施し、その効果について検証を行った。また、これまでに明らかとなっていた歩行機の性能（歩かない場合がある）について評価を行い、治具を導入することである程度問題を低減することができた。以上のことから、受動歩行機の教材としての有効性は明らかであり、より歩きやすい歩行機と組立方法を確立したという点が重要である。

今後の予定として、歩行機の製作をレーザ加工から金型によるプレス加工などより安価で効率的な方法にする。こうすることで、工作実験教室の開催機会を増やし、教材としての完成度を高めることが挙げられる。

謝辞

本研究を行うにあたりウエスコ学術振興財団から助成金をいただき、工作実験教室および講義における材料費や補助学生への援助、関連研究の動向調査などに当てることができた。ここに感謝の意を表す。

参考文献

- [1] 文部科学省国立教育政策研究所, OECD 生徒の学習到達度調査(PISA)～2015年調査国際結果の要約～, 2016
- [2] 衣笠, 大須賀, 土師, 受動歩行ロボットのすすめ, コロナ社, 2016

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) によって得られた大規模全球画像群の中からユーザが撮影した画像に最も類似する画像を検索することによって, 画像を撮影した位置を推定することが可能である. しかし, パノラマ展開された全球画像は撮影時のカメラの仰俯角の違いによって画像の歪み方が大きく異なるために, 一般的な画像照合手法では特徴点マッチングに誤検出が多くなる問題がある. さらに画像検索においては画像マッチングを多数の画像に対して繰り返し実行する必要があるために, この処理に時間がかかる問題がある. そこで本研究では, 画像マッチングに魚眼画像変換を適用して, 特徴点マッチングの精度を向上する画像照合手法, および, MMS の画像の類似性を利用した画像検索の高速化手法を提案する. 評価実験の結果, 提案法は従来法に比べて特徴点マッチングの精度が向上し, また, 処理速度においては約 30%高速化されたことが確認できた.

1. はじめに

MMS (Mobile Mapping System; 移動計測システム) によって, 道路周辺の高精度な 3 次元空間情報と全球画像情報から成る大規模データ群が構築され, その活用が進められてきている. 一方で, 大規模画像群からユーザが撮影した画像に最も類似している画像を検索することによって, その画像の撮影位置を推定する研究が行われてきている. この撮影位置推定に MMS で得た大規模全球画像群を利用すれば, 撮影位置をより高精度に推定することが可能である[1,2]. しかし, 全球画像は一般的にパノラマ展開した画像で表されるため, 撮影時のカメラの仰俯角の変化によって画像の歪み方が大きく異なる. そのため, 一般的な画像照合手法ではマッチングに誤検出が多くなる問題がある. さらに, 画像検索においては, 画像マッチングを多数の画像に対して実行する必要があり, 処理に時間がかかる問題がある.

そこで本研究では, 撮影位置推定に全球画像を用いるための改良した画像照合手法, および, 検索の高速化手法を提案する. 提案法はパノラマ展開画像の歪みの影響を減らすため, 画像照合における特徴量記述において魚眼画像への一時的な変換を行っている. また, 画像検索の高速化を図るために, MMS において撮影位置が近い全球画像同士は類似する箇所が多いことを利用して, 画像検索処理を行う際の計算量を減らす[3,4].

2. 全球画像のマッチング方法

本研究ではユーザが撮影した画像 (クエリ画像と呼ぶ) と大規模画像群 (検索対象画像と呼ぶ) とともに全球画像を用いる. 全球画像には任意の視点における全方位の情報が含まれているため, 前方の情報しかない一般カメラ画像よりも位置推定が正確に行える. しかし, パノラマ展開した全球画像は撮影角度によって歪み方が異なる画像になる. 歪みの例を図 1 に示す. 方位角の違いはパノラマ展開画像の平行移動となって表れるので画像照合に特に問題にならないが, 仰俯角の違いは画像上下方向に湾曲した大きな歪みを生み出すため, 特徴点マッチングによって誤対応を生じやすい. そこで提案法は全球画像の歪みの影響を小さくするために, 特徴量記述においてパノラマ展開画像中の特徴点の周辺領域を, 特徴点を中心にした魚眼画像変換 (正距方位図法) によって魚眼画像にして, これを用いて特徴点マッチングを行う. また, 提案法では特徴量記述に BRISK (Binary Robust Invariant Scalable Keypoints) を用いる. BRISK は円形領域で特徴量記述を行うため画像の回転に対して頑健である. そのため, 正方形を用いる SURF (Speeded Up Robust Features) などの手法と比べて魚眼画像に適していると言える.

本研究は検索対象画像に MMS で取得した画像を用いる. 従来よく利用される検索対象画像群は例えば道路交差点付近のみの画像で構成されているため,



(a) パノラマ展開画像



(b) (a)と方位角が異なる画像



(c) (a)と仰俯角が異なる画像

図1 撮影方向の違いによる全球画像の変化

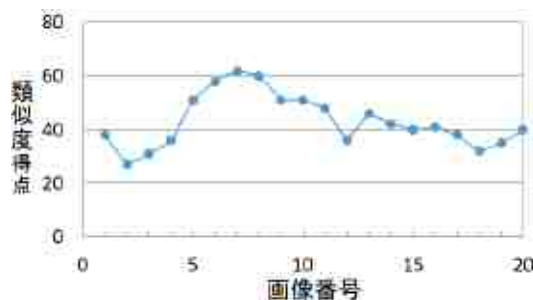


図2 空間的に連続した画像における類似度の推移

交差点間の途中位置のような画像群に存在しない位置を検出することは不可能である。これに対して、MMS で撮影した画像の間隔は高々数メートルであり、MMS で計測した地域内であればどの撮影位置でも検出可能である。また、MMS は走行しながら画像を連続して撮影するため、隣り合う画像同士の類似性が高い。そのため、クエリ画像と連続した全球画像群との類似性を調べてグラフ化すると図2に示すような撮影位置と一致する箇所をピークとする山が得られる。これによって従来法のような画像の連続性がない場合と比べ、撮影位置の検出が正確に行える。

3. 魚眼画像変換

魚眼画像変換は以下の手順で行う。通常、画像の幾何学変換には逆変換を用いるので、魚眼画像の座標 (x, y) からこれに対応するパノラマ展開画像の座標 (X, Y) を求める。まず、式(1)より全球画像を3次元空間の球面とした際の点の座標を求める。ここで、 R は生成する魚眼画像の半径を表す。

$$\begin{cases} \alpha = \arccos \frac{y}{R} \cos \beta \\ \beta = \arcsin \frac{x}{R} \\ z = R \sin \alpha \cos \beta \end{cases} \quad (1)$$

次に式(2)を用いて、パノラマ展開画像上の特徴点座標 (X_1, Y_1) が魚眼画像の中央になるように3次元回転を行う。 θ は x 軸回りの回転角度、 ω は y 軸回りの回転角度を表しており、 $\theta = \frac{2\pi X_1}{W}$ 、 $\omega = \frac{\pi}{2} - \frac{\pi Y_1}{H}$ である。 W はパノラマ展開画像の横幅、 H は縦幅を表す。

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ y_1 \\ z_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \omega & 0 & -\sin \omega \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \omega & 0 & \cos \omega \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \theta & -\sin \theta \\ 0 & \sin \theta & \cos \theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (2)$$

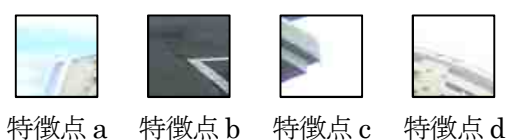
続いて、式(3)、(4)を用いてパノラマ展開画像上の座標 (X, Y) を求める。

$$\begin{cases} \alpha_2 = \arccos \frac{y_1}{R \cos \beta_2} \\ \beta_2 = \arcsin \frac{x_1}{R} \end{cases} \quad (3)$$

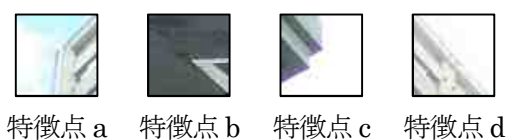
$$\begin{cases} X = \frac{W}{2} \left(\frac{\alpha_2}{\pi} + 1 \right) \\ Y = \frac{H}{2} \left(\frac{\beta_2}{\pi} + 1 \right) \end{cases} \quad (4)$$

4. 画像照合の評価実験

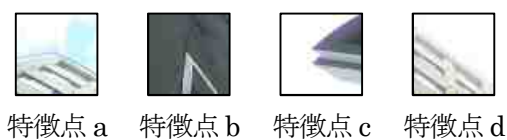
実際の全球画像を用いて、提案法と従来法における特徴点マッチングの精度を比較する実験を行った。ここでは、カメラの仰俯角の影響を考えるために、同じ撮影位置で仰角0度と60度の場合の2枚の画像（それぞれ画像A、画像Bとする）において4点の特徴点検出を正確に行い、全ての特徴点の組み合わせについて特徴量距離を求めた。検出した特徴点の周辺画像を図3(a)、(b)に示す。また、特徴点周辺を魚眼画像変換した後切り出した画像を同図(c)、(d)に示す。実験では、図3(a)と(b)の間の特徴量距離を



(a) 画像 A の特徴点周辺画像



(b) 画像 B の特徴点周辺画像



(c) (a)を魚眼画像変換した画像



(d) (b)を魚眼画像変換した画像

図 3 特徴点の周辺画像

従来法における結果として求め、同図(c)と(d)の間の特徴量距離を提案法における結果として求める。さらに、特徴量距離の値を、正しい特徴点对応を 1 とした距離比に変換して相互に比較する。このとき、誤対応の距離比が 1 より小さければ特徴点の対応付けが誤っていることを意味する。また、誤対応の距離比が 1 より大きくなるほど正対応の距離より差が大きくなるので正対応の検出が行いやすくなることを意味する。

実験結果を表 1 に示す。表の 1 行の中で最小値をとる画像 B の特徴点が同行の画像 A の特徴点に対応する点として検出される。各結果を比較すると、特徴点が正しく対応していたのは、従来法では特徴点 a を除く 3 点だった。これに対して、提案法では 4 点全ての特徴点が正しく対応できた。特徴量距離比を見ると、提案法は仰俯角による画像の歪みの違いが魚眼画像変換によって補正されたことで、従来法に比べて誤対応の特徴量距離比が正対応の 2 倍以上の大きな値をもつ特徴点対が多くなっており、誤検出されにくくなっていることが分かる。これらの結果から、提案法は特徴点マッチングの精度が向上していることが確認できた。

表 1 特徴量距離の比較

(a) 従来法の特徴量距離

		画像 B			
		a	b	c	d
画像 A	a	229	168	211	178
	b	188	65	162	155
	c	187	198	121	156
	d	204	183	168	113

(b) 提案法の特徴量距離

		画像 B			
		a	b	c	d
画像 A	a	71	139	199	158
	b	180	40	142	161
	c	188	214	38	169
	d	195	145	139	60

(c) 従来法の特徴量距離比（正対応を 1）

		画像 B			
		a	b	c	d
画像 A	a	1.00	0.73	0.92	0.78
	b	2.89	1.00	2.49	2.38
	c	1.55	1.64	1.00	1.29
	d	1.81	1.62	1.49	1.00

(d) 提案法の特徴量距離比（正対応を 1）

		画像 B			
		a	b	c	d
画像 A	a	1.00	1.96	2.80	2.23
	b	4.50	1.00	3.55	4.03
	c	4.95	5.63	1.00	4.45
	d	3.25	2.42	2.32	1.00

5. 画像検索の高速化手法

MMS で取得した画像列内で隣接する画像同士は風景に重複部分が多いことから共通の特徴点が多く含まれる。この性質を利用してマッチングの計算量を削減する。隣接する画像間であらかじめ全特徴点のマッチングを行い、次に、画像の特徴点 1 点につき、他方の画像から類似している特徴点を複数個検出してこの情報を記録しておく。マッチング処理の概略を図 4 に示す。画像検索ではまず画像 A とクエ

り画像の全特徴点でマッチングを行う。このとき、点Rと点Pが対応したとする。次に画像Bとクエリ画像のマッチングでは、画像Aとクエリ画像のマッチング結果を利用して、適合すると予想される点Pの類似特徴点 Q_i ($1 \leq i \leq n$) とのみマッチングを行う。このように2枚目以降の特徴点マッチングの計算数を減らすことで検索全体の処理時間を短くすることが期待できる。

6. 画像検索の高速化の評価実験

提案法と従来法においてそれぞれ画像検索の実験を行い、処理時間およびマッチング得点差の比較を行った。表2に画像20枚あたりの計算量と処理時間を示す。計算量はマッチング計算に用いた特徴点の総数である。処理時間は特徴点マッチングに要した時間である。実験結果より、提案法のマッチング計算量は従来法と比べて約86%削減され、処理時間は平均で約34%の短縮が確認できた。提案法においてマッチング計算量の削減に比べマッチング処理時間の削減の割合が小さいのはマッチング処理に特徴点選択が追加されているためであり、処理時間の約30%が特徴点選択の処理に費やされていた。

7. まとめ

本研究は、全球画像群を用いた撮影位置推定のための画像マッチング手法として、撮影時のカメラの仰俯角の違いによる全球画像の歪みの変化の影響を少なくするための特徴点マッチング手法、および、画像検索の高速化手法を提案した。提案法は、特徴量記述の際に特徴点ごとに魚眼画像に変換して特徴量記述を行う。評価実験として提案法と魚眼画像変換しない従来法とで特徴点マッチングにおける正対応の比較を行った結果、正対応数および特徴量距離比が従来法より改善することを確認し、魚眼画像変換によって特徴点对応付けの精度を向上させることができた。また、画像検索では、MMSにおける隣接画像の類似性を利用することで処理時間を約34%短縮することができた。

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。

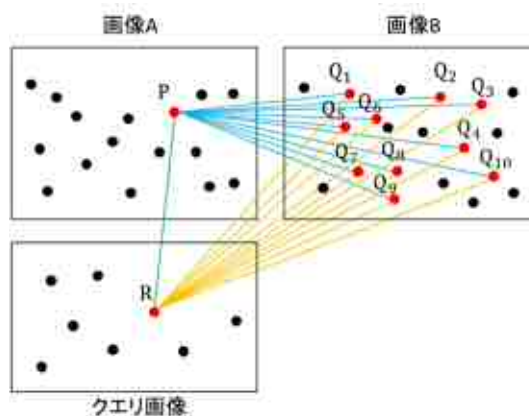


図4 画像マッチングの高速化の概略

表2 計算量と処理時間の比較

(a) 従来法の計算量と処理時間

	計算量	処理時間(ms)
A	200000	2.73
B	200000	2.81
C	200000	2.40
平均	200000	2.64

(a) 提案法の計算量と処理時間

	計算量	処理時間(ms)
A	27466	1.66
B	27588	1.62
C	26948	1.54
平均	27334	1.60

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 妹尾男宜, 多田裕貴, 太田寛志, 道西博之, “連続した全球画像を用いたカメラ位置推定の高速化,” 平成29年度電気・情報関連学会中国史部連合大会講演予稿集, R17-22-01, 2017.
- [4] 妹尾男宜, 多田裕貴, 太田寛志, 道西博之, “全球画像列によるカメラ位置推定の高速化,” 情報処理学会第80回全国大会講演予稿集, vol.2, pp.473-474, 2018.

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、再生医療や創薬における有力な細胞材料として期待される。そのためには十分な機能をもった肝細胞を多く分化誘導することが必要であり、分化誘導法の工夫が必要である。我々はこれまで、細胞分化に必要なミトコンドリア生合成を促進することで細胞分化を効率化できないかと考え、肝臓由来細胞におけるミトコンドリア生合成刺激の検討をおこなった。前年度においてミトコンドリア生合成を検出するレポーターアッセイ系を確立し、栄養飢餓やカロリー制限模倣薬などの刺激を検討した結果、低グルコース濃度処理（0.1mg/ml）やポリフェノールである Resveratrol (RSV) 20μM 以上の処理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。そこで今回、ミトコンドリア生合成刺激が iPS 細胞からの肝細胞分化に与える影響について検討を行った。マウス iPS 細胞の肝細胞分化誘導に対し、RSV 10μM, 20μM の処理を併用したところ、RSV 処理により肝前駆細胞マーカー AFP、肝代謝酵素 CYP1A1 の発現上昇と、未分化マーカー Oct4 の発現低下が認められた。これらの結果からミトコンドリア生合成刺激を利用することにより、肝細胞分化誘導を効率化できる可能性が示された。

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。多能性幹細胞からの肝細胞分化誘導においては、肝細胞様細胞（hepatocyte-like cells）の肝機能が低いことや、残存する未分化 iPS 細胞が腫瘍化する危険性などの問題がある。そのため肝細胞誘導法のさらなる工夫が必要と考えられる。

細胞分化とエネルギー代謝機構の関わりは深く、一般的に未分化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）が起こることが報告されている（文献 1）。したがって細胞内

のミトコンドリア量と活性を高めることで、より細胞分化を促進できる可能性が考えられた。前年度の研究から、肝臓由来細胞 HepG2 を用いてミトコンドリア生合成の刺激条件を検討した結果、栄養飢餓（低グルコース濃度）やカロリー制限模倣薬（Resveratrol : RSV）などが、ミトコンドリア生合成シグナルとして有効であることが示された。そこで今回、RSV 処理が iPS 細胞からの肝細胞分化に与える影響について検討を行った。

研究方法と結果

まず、前年度に同定したミトコンドリア生合成刺激のうち、高いレポーター活性を示した RSV 20μM 処理によってミトコンドリア量が増加するかを検討した。ウェスタンブロット解析によりミトコンドリア指標タンパク質である COX IV 発現を調べたところ、溶媒である DMSO 処理に比べ発現上昇が認められ、ミトコンドリア量の増加が示された（図 1）。そこでマウス iPS 細胞（miPS）の肝細胞分化誘導に加えて RSV 処理を施し、ミトコンドリア生合成刺激が細胞分化に与える影響を検討した。

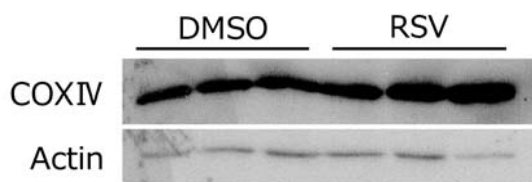


図 1. RSV 処理による COX IV タンパク発現上昇

miPS 細胞からの肝細胞分化誘導には、内胚葉誘導、肝前駆細胞誘導、肝細胞誘導からなる三段階分化誘導法（文献 2）を用い、肝前駆細胞誘導、肝細胞誘導時に RSV 10 μ M, 20 μ M 処理を施した（図 2）。



図 2. 肝細胞分化誘導と RSV 処理のプロトコール

miPS 細胞で作製された胚様体 (embryoid body) に 100 ng/ml activin A 処理を施し、内胚葉誘導をおこなった結果、内胚葉マーカー CXCR4 および AFP の発現がみられ、また分化した細胞では Nanog プロモーターで発現する GFP 蛍光は消失した。続いて、50 ng/ml BMP4, 20 ng/ml FGF2 で刺激することで肝前駆細胞への誘導をおこなうとともに RSV 10 μ M または 20 μ M での刺激を同時におこなった。RT-PCR 解析の結果、RSV 10 μ M 処理により肝前駆細胞マーカー AFP、肝代謝酵素 CYP1A1 の発現上昇が認められた（図 3）。また RSV 20 μ M 処理においては、未分化マーカー Oct4 の顕著な発現低下が認められた。

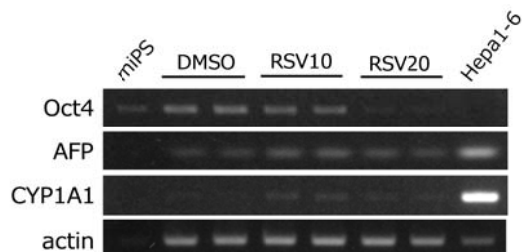


図 4. 肝前駆細胞誘導における RSV 処理が細胞分化に与える影響（control: DMSO, RSV 処理 (RSV10, RSV20), positive control: Hepa1-6（マウス肝癌細胞））

続いて 20 ng/ml HGF, 20 ng/ml OSM による肝細胞誘導をおこなった。前段階と同様に RSV 10 μ M または 20 μ M での刺激を同時におこなったが、成熟肝細胞マーカーである albumin や TAT の発現が認められず、成熟肝細胞に誘導できていないことが考えられた。一方で GFP 陽性の未分化細胞は RSV 処理により顕著に減少していた（図 4）。

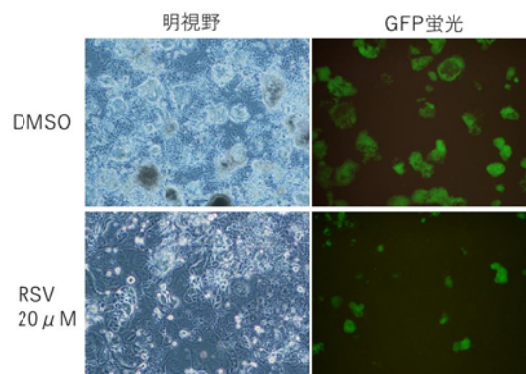


図 4. 分化誘導中の未分化細胞（GFP 陽性）

考察とまとめ

今回、Resveratrol 処理による肝細胞分化促進効果について検討した結果、肝前駆細胞マーカーの発現上昇が認められたことから、ミトコンドリア生合成が iPS 細胞からの細胞分化を促進する可能性が考えられた。細胞内エネルギー代謝を解糖系から酸化的リン酸化にシフトさせたことで、幹細胞性 (stemness) が弱まりより分化を促進したと考えられるが、詳しいメカニズム解明は今後の課題である。また移植後の腫瘍化の原因となる残存未分化細胞が RSV 処理により顕著に減少したと考えられ、より安全性の高い分化誘導法への応用が考えられる。今後、低グルコース濃度と RSV 処理との併用による効果の検討が興味深い。

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ました。心から感謝申し上げます。

参考文献

1. J. Biol. Chem. 1988 263: 7767-7775.
2. J Physiol Biochem. 2013 69: 835-845.

日本産ヤリテンツキ（カヤツリグサ科植物）の系統分類学的研究

岡山理科大学 生物地球学部

矢野 興一

カヤツリグサ科植物のヤリテンツキは多年生草本であり、日本では本州、九州、および南西諸島各島の日当たりの良い海岸沿いの草地に生育している。これまでに申請者の予備的研究から、日本産ヤリテンツキには遺伝的に大きく異なる次の2系統(A, B)があることが分かってきた。しかしながら、なぜこのような遺伝的に異なる2系統があるのか、未だに明らかになっていない。本申請課題では、日本各地のヤリテンツキを収集し、染色体とDNA解析を行い、遺伝的多様性を明らかにするとともに、その形成過程を解明することを目的とした。その結果、ヤリテンツキの染色体数はすべて $2n=20$ であり、染色体の種内変異は見られなかった。また、核DNAでは11のリボタイプ、葉緑体DNAでは3のハプロタイプが認められた。今回解析したヤリテンツキにおいて、系統Aは本州と沖縄本島(リボタイプA・ハプロタイプa)に広域分布する系統であった。系統Bは南西諸島南部と台湾(リボタイプB・ハプロタイプb)に分布しており、南方系統と考えられた。また、その中間型のリボタイプ(C, E~J)が南西諸島中北部で確認されたことから、遺伝的に異なる2系統の交雑が南西諸島中北部で起きていることが示唆された。

はじめに

ヤリテンツキ(*Fimbristylis ovata*(Burm. f.)Kern)は、カヤツリグサ科植物の多年生草本である(図1)。日本では本州(千葉県、神奈川県、和歌山県、山口県)、九州(長崎県、佐賀県、鹿児島県)、南西諸島各島の日当たりの良い海岸沿いの草地に生育している(初島 2004、山口県高等学校教育研究会ほか 2002、星野・正木 2011)。しかしながら、生育地が限られることから、環境省では準絶滅危惧種にされている(環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室編 2015)。本種は国外では新旧世界に広く分布している。



図1. ヤリテンツキの全形。

ヤリテンツキは、同種内で染色体数が倍数化する種内倍数性($2n=10$ と $2n=20$)がインドから報告されている(Nijalingappa 1975)。また、神奈川県と

沖縄県石垣島・与那国島産のヤリテンツキの染色体数は $2n=20$ であるが、神奈川県と沖縄県石垣島・与那国島のヤリテンツキには遺伝的に大きな違いがあることが知られている(Yano and Hoshino 2006)。さらに、申請者の予備的研究から、日本産ヤリテンツキには遺伝的に大きく異なる次の2系統があることが分かってきた。1) 神奈川と沖縄本島国頭郡産ヤリテンツキ、2) 奄美大島・沖縄本島中頭郡・粟国島・石垣島・与那国島産ヤリテンツキ。

しかしながら、他の産地のヤリテンツキの染色体数や遺伝的多型についてはいまだに明らかにされておらず、なぜこのような遺伝的に異なる2系統があるのかも未だに分かっていない。

そこで、本研究では、日本産ヤリテンツキについて、DNAと染色体解析データに基づいて、遺伝的多型やその形成過程を解明することを目的とした。

材料

現在までに神奈川県(1地点)、和歌山県(2地点)、山口県(1地点)、長崎県(2地点)、鹿児島県(4地点)、沖縄県(13地点)、台湾(1地点：おし葉標本)の合計24地点155個体のヤリテンツキ標本を収集した。なお、このうち、本研究助成で

は2017年7月から11月の間に19地点146個体を収集した。

収集した個体のうち、核DNA解析には73個体、葉緑体DNA解析には37個体、染色体解析には13個体を用いた。証拠標本は岡山理科大学標本庫(OKAY)とその一部が東京大学植物標本室(TI)に保管している。

方法

1. 染色体の解析

染色体の解析は、フォイルゲン-アセトオルセイン2重染色法を用いた体細胞分裂中期染色体像で行なった。野外で採集した根端細胞を実験室内で0.002M 8-オキシキノリンで室温1時間の後に4℃で15時間の前処理をし、ニューカマー固定液(Sharma and Sharma 1980)で固定した。その後、アルコールシリーズ(70%, 30%, 15%エタノール)と蒸留水でそれぞれ5分間水和し、60℃の1規定塩酸に10分間浸して解離した後に、シッフの試薬で1時間フォイルゲン染色を行なった。その後、2%セルラーゼとペクチナーゼの酵素混合液に37℃で1時間の処理をし、スライドグラス上で生長点を取り出し、1%酢酸オルセインで染色し、押しつぶし法により観察を行なった。

2. DNA 解析

シリカゲル乾燥させた若い葉(約0.1g)から全DNAを抽出し、PCR法によりDNAの目的領域を増幅させた。目的領域は、葉緑体DNA *rpL16* intron 領域、*rps16* intron 領域、*trnL* intron & *trnL-F* IGS 領域、核DNA ITS 領域を用いた。その後、ダイレクトシーケンス法を用いて塩基配列を決定し、塩基配列を比較した。解析に使用したプライマーおよびDNA解析方法はWhite et al. (1990)、Taberlet et al. (1991)、Hsiao et al. (1994)、Oxelman et al. (1997)、Shaw et al. (2005) およびYano et al. (2014) に従った。

結果および考察

1. 染色体解析

神奈川県、和歌山県、山口県、長崎県、鹿児島県奄美大島・徳之島、沖縄県本島2地点・栗国島・宮古島・石垣島2地点・与那国島から収集したヤリテンツキ13個体の染色体数はすべて $2n=20$ (図2)であり、染色体の種内変異は見られなかった(田村 他 2018)。

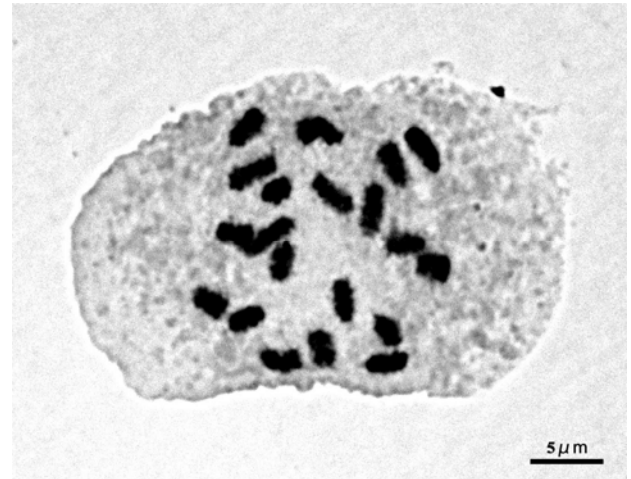


図2. ヤリテンツキの体細胞中期染色体像($2n=20$)。

2. DNA 解析

核DNA解析には73個体を用い、解析したITS領域は、610bpから617bpまで変異があった。このうち、塩基置換は19サイトあり、挿入・欠失は1サイトあった。これらの核DNA ITS領域における塩基配列の変異から、合計で11つ(A~K)のタイプ(リボタイプ)が認められた(図3)。このうち、リボタイプAが神奈川県、和歌山県、山口県、長崎県、沖縄本島に広く分布していることが分かった。また、南西諸島南部と台湾のリボタイプBは、リボタイプAと遺伝的に大きく異なっていることが分かった。しかしながら、南西諸島中北部では、リボタイプAとリボタイプBの中間的な特徴を示す塩基が複数箇所確認された(リボタイプC~J)。長崎県の1箇所では他のリボタイプと異なるリボタイプDが確認された(田村 他 2018)。

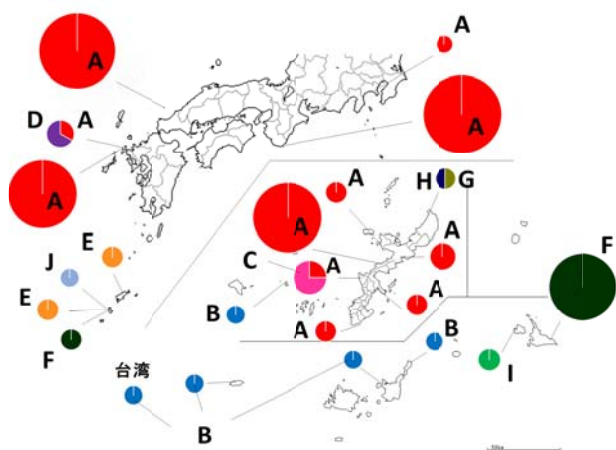


図3. 核 DNA ITS 領域のリボタイプの地理的分布。
11 つのリボタイプが認識された (A~K) 。各タイプ
の円の大きさはサンプル数を示す。

葉緑体 DNA 解析には 37 個体を用いた。解析した *rpL16* intron 領域は、1029bp から 1044bp まで変異があり、塩基置換は 1 サイトあり、挿入・欠失は 1 サイトあった。*rps16* intron 領域は、754bp から 792bp まで変異があり、塩基置換は 5 サイトあり、挿入・欠失は 2 サイトあった。*trnL* intron & *trnL-F* IGS 領域は、1135bp から 1139bp まで変異があり、塩基置換は 9 サイトあり、挿入・欠失は 1 サイトあった。これらの葉緑体 DNA の 3 領域における塩基配列の変異から、合計で 3 つ (a~c) のタイプ (ハプロタイプ) が認められた (図4) 。このうち、神奈川県、山口県、沖縄本島のリボタイプ A をもつ個体は、ハプロタイプ a であった。南西諸島のリボタイプ E~H を持つ個体は、ハプロタイプ b であった。長崎県の 1 箇所 (リボタイプ D) ではハプロタイプ c が確認された。沖縄県の 1 箇所のリボタイプ C をもつ 1 集団では、2 種類のハプロタイプ (a, b) がみられた (田村 他 2018) 。

以上のことから、今回解析したヤリテンツキにおいて、遺伝的に大きく異なる 2 つの系統 A と B が確認された。系統 A は広域分布する系統であり、本州と沖縄本島 (リボタイプ A・ハプロタイプ a) である。系統 B は南西諸島南部と台湾 (リボタイプ B・ハプロタイプ b) に分布しており、南方系統と考えられる。また、その中間型のリボタイプ (C, E~J) が南西諸島中北部で確認されたことから、遺伝的に異なる 2 系統の交雑が南西諸島中北部で起きている

ことが示唆された。一方、長崎県固有の DNA タイプに関しては解析サンプル数が少ないために、その系統についてはさらなる調査が必要である。

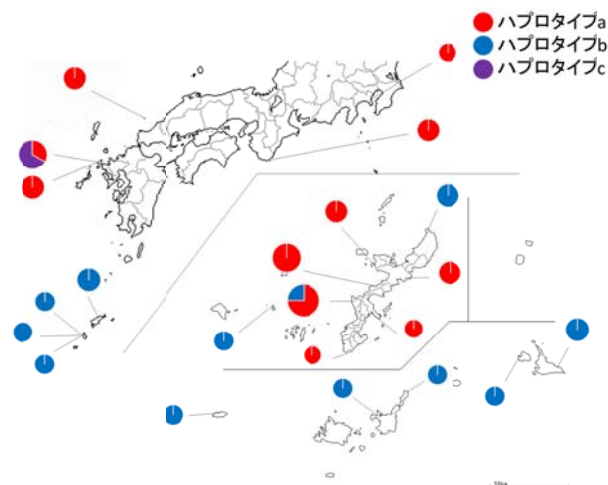


図4. 葉緑体 DNA 領域のハプロタイプの地理的分布。
3 つのハプロタイプが認識された (a~c) 。各
タイプの円の大きさはサンプル数を示す。

今後の展望

ヤリテンツキは南西諸島に遺伝的に異なる系統の境界があると示唆されたが、詳細な境界地域は未だに分かっておらず、また、新たに検出された長崎県の系統がどのような過程で生じたのか未だに明らかにされていない。今後は、遺伝的に異なる系統の境界と考えられる地域や国外の分布域からさらなるヤリテンツキのサンプルを収集し、その遺伝的多様性を調べることによって、1) DNA 系統の地理的境界はどこにあるのか、2) 長崎県の DNA タイプはどのような過程で生じてきたのか、3) 日本の系統と台湾や他の地域との関係性はどのようなものか、を明らかにできると考えられる。

謝辞

本研究は、田村優希氏の協力を得て行いました。また、サンプルの収集には、池田 博准教授 (東京大学)、斉藤由紀子准教授 (琉球大学)、櫻庭知帆氏 (北海道大学)、石橋咲子氏 (岡山理科大学) および矢野研究室の皆様にご世話になりました。記してお礼申し上げます。最後になりましたが、本研究

を行うにあたり、研究助成をして頂きましたウエスコ学術振興財団に深謝いたします。

参考文献

- 初島住彦 (2004) 九州植物目録. 鹿児島大学総合研究博物館研究報告 No. 1. 343pp. 鹿児島大学総合研究博物館, 鹿児島.
- Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB (1994) Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome* 37:112-120.
- 星野卓二・正木智美 (2011) 日本カヤツリグサ科植物図譜. 229pp. 平凡社, 東京.
- 環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室編 (2015) レッドデータブック 2014ー日本の絶滅のおそれのある野生生物ー 8 植物 I (維管束植物). 647pp. ぎょうせい, 東京.
- Nijalingappa BHM (1975) Diploid and tetraploid chromosome races in *Fimbristylis ovata* (Cyperaceae). *Cytologia* 40:557-560.
- Oxelman B, Lidén M, Berglund D. (1997) Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Syst Evol* 206:393-410.
- Sharma AK, Sharma A (1980) Chromosome techniques. Theory and Practice, 3rd. ed., p. 55. Butterworths, London.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92:142-166.
- Taberlet P, Ludovic G, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17:1105-1109.
- 田村優希・齊藤由紀子・矢野興一 (2018) 日本産ヤリテンツキ (カヤツリグサ科) の遺伝的多型. 日本植物分類学会第 17 回大会研究発表要旨集. p. 50. 日本植物分類学会第 17 回大会実行委員会.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols, a guide to methods and applications. pp 315-322. Academic Press, New York.
- 山口県高等学校教育研究会・生物部会・山口県野外植物研究委員会 (2002) 山口県の海岸植物 1999～2001 年の調査報告. 206pp. 山口県高等学校教育研究会・生物部会・山口県野外植物研究委員会, 山口.
- Yano O, Hoshino T (2006) Phylogenetic relationships and chromosomal evolution of Japanese *Fimbristylis* (Cyperaceae) using nrDNA ITS and ETS 1f sequence data. *Acta Phytotax Geobot* 57:205-217.
- Yano O, Ikeda H, Jin XF, Hoshino T (2014) Phylogeny and chromosomal variations in East Asian *Carex*, *Siderostictae* group (Cyperaceae), based on DNA sequences and cytological data. *J Pl Res* 127:99-107.

質問紙と加速度計で評価した小学生の運動時間は一致するか？

岡山理科大学教育学部

笹山健作

本研究では小学4年生を対象に文部科学省の質問紙で評価した1週間の総運動時間（運動時間）と加速度計で評価した中高強度身体活動時間を比較することを目的とした。本研究の対象は岡山県の小学校1校に在籍する小学4年生男女109名とした。調査項目は、質問紙で運動時間を加速度計で中高強度身体活動時間を評価した。その結果、質問紙で評価した運動時間は 55.1 ± 38.7 （分/日）であった。また、加速度計で評価した中高強度身体活動時間の平均値は 41.1 ± 15.0 （分/日）であった。加えて、質問紙で評価した運動時間の平均値と加速度計で評価した中高強度身体活動時間の平均値とを比較した結果、有意な差が認められた（ $p < 0.05$ ）。このことから、文部科学省の質問紙で評価した運動時間は加速度計で評価した中高強度身体活動時間と異なることが示唆された。

1. 背景

子供の身体活動は生活習慣病の危険因子、骨密度、体力といった身体的側面とポジティブな関連が報告されている^{1,2)}。加えて、身体活動はメンタルヘルス、学業成績、社会性といった心理・社会的側面においてもポジティブな影響を与えることが報告されている^{1,2)}。これらのことから、身体活動の心身に対する多面的な意義が報告されており、諸外国では、「中高強度の身体活動を一日総計60分以上行うこと」を身体活動ガイドラインの指標として推奨している^{3,4)}。

子供の身体活動は様々な方法によって評価されている。質問紙は簡便で多人数に対応でき、費用が安いというメリットがある。しかしながら、子供においては妥当性が低くなることが確認されている⁵⁾。一方、最も妥当性の高い身体活動評価法である二重標識水法とメタボリックチャンパー法は、多人数へ対応できないこと、費用が多くかかること、被験者の負担が高いことといったデメリットがある。これらの問題を解決する方法として、子供の身体活動評価は加速度計法が推奨されている⁶⁾。

諸外国では加速度計によって中高強度身体活動を評価し、身体活動ガイドラインの指標の一つである1日合計60分の中高強度身体活動を行っているかどうかの評価が行われている⁷⁾。しかしながら、日本国内では諸外国と比べると大規模な加速度計を用いた調査は行われていない。日本における子供を対象

とした身体活動の大規模な調査は文部科学省の質問紙によって評価されている状況である。文部科学省の全国体力・運動能力、運動習慣等調査⁸⁾では国内の小学5年生に対して、質問紙を用い1週間の総運動時間を評価している。加えて、その後の分析では1週間の総運動時間が420分以上かどうかを一つの基準にして体力との関連を検討しており、1日60分の運動時間を行っているかどうか、子供の身体活動を評価する際の目安の一つとして用いられている。一方で、文部科学省の質問紙で評価した運動時間と加速度計で評価した中高強度身体活動時間との比較は十分に検討されていない状況である。

そこで本研究では、小学4年生を対象に文部科学省の質問紙で評価した運動時間と加速度計で評価した中高強度身体活動時間を比較することを目的とした。また、本研究では質問紙で評価した運動時間と加速度計で評価した中高強度身体活動時間は異なるという仮説を設定した。

2. 方法

(1) 対象者

対象者は岡山県の小学校に在籍する小学4年生男女109名（男子48名、女子61名）とした。

(2) 調査項目

身体活動は質問紙と加速度計によって評価した。質問紙は文部科学省の全国体力・運動能力、運動習

慣等調査⁸⁾で用いられている質問項目を用いて評価した。対象者は「ふだんの1週間について聞きます。学校の体育の授業以外で、運動（体を動かす遊びをふくむ）やスポーツを合計で1日およそどのくらいの時間していますか。それぞれの曜日のらんに記入してください。」の質問に対して、月曜日から日曜日の記入欄に分単位で回答した。本研究では平日の1週間の総運動時間を算出し、1日あたりの運動時間（分/日）を算出した。

加速度計による身体活動の評価は1軸加速度計（Kenz Lifecorder EX:LC）を用いて中高強度の身体活動（分/日）を評価した。中高強度身体活動の基準は先行研究⁹⁾に基づいてLCの活動強度5以上の積算時間を中高強度身体活動時間とした。加速度計は土日を含む連続した8日間で評価し、少なくとも平日2日間加速度計を装着している対象者のデータを用いた。加えて、1日10時間以上加速度計を装着しているデータを採用した。

(3) 統計処理

質問紙で評価した運動時間（分/日）と加速度計で評価した中高強度活動時間（分/日）は対応のあるt検定によって検討した。統計処理にはIBM SPSS Statistics Version 24を用い、有意水準は5%未満とした。

3. 結果および考察

加速度計で評価した中高強度身体活動時間の平均値は41.1±15.0（分/日）であった。質問紙で評価した運動時間の平均値は55.1±38.7（分/日）であった。加えて、加速度計で評価した中高強度身体活動時間の平均値と質問紙で評価した運動時間の平均値とを比較した結果、有意な差が認められた（ $p < 0.05$ ）。このことから、質問紙で評価した運動時間は加速度計で評価した中高強度身体活動時間と異なることが示唆された。加えて、質問紙で評価した運動時間は学校の体育授業の運動時間が含まれていないことを考慮すると、質問紙の運動時間と加速度計で評価した中高強度身体活動時間との差がさらに大きくなる可能性のあることが示唆された。

本研究では、4年生を対象としており、文部科学省の全国体力・運動能力、運動習慣等調査⁸⁾では5年生を対象としている。このことから、今後は5年生以降でも同様の検討を行う必要がある。加えて、国内外では様々な加速度計を用いて子供の中高強度身体活動時間が評価されており、各加速度計で評価した中高強度身体活動時間は異なることが報告されている¹⁰⁾。したがって、今後は国内外で使用されている他の加速度計を用いて検討することも必要である。

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。

5. 引用文献

- 1) Strong WB et al. Evidence based physical activity for school-age youth. *J Pediatr.* 146: 732-737. 2005.
- 2) Janssen I and Leblanc AG. Systematic review of the health benefits of physical activity and fitness in school-aged children and youth. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 7: 40. 2010.
- 3) Bull FC and the Expert Working Groups. Physical activity guidelines in the U.K.: Review and recommendations. Available online at: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/213743/dh_128255.pdf. 2010.
- 4) Tremblay MS et al. New Canadian physical activity guidelines. *Appl Physiol Nutr Metab.* 36: 36-46. 2011.
- 5) Benítez-Porres J et al. Reliability and Validity of the PAQ-C Questionnaire to Assess Physical Activity in Children. *J Sch Health.* 86:677-85. 2016.
- 6) Cain KL et al. Using accelerometers in youth physical activity studies: a review of methods. *J Phys Act Health.* 10:437-50. 2013.

- 7) Belcher BR et al. Physical activity in US youth: effect of race/ethnicity, age, gender, and weight status. Med Sci Sports Exerc. 42:2211-21. 2010.
- 8) 文部科学省. 全国体力・運動能力、運動習慣等調査. Available online at: http://www.mext.go.jp/sports/b_menu/toukei/kodomo/zencyo/1368222.htm.
- 9) 笹山健作, 足立 稔. 青少年男子の歩・走行時における一軸加速度計の活動強度と metabolic equivalents との関連. 体力科学. 65, 265-272. 2016.
- 10) McClain JJ et al. Comparison of Kenz Lifecorder EX and ActiGraph accelerometers in 10-yr-old children. Med Sci Sports Exerc. 39: 630-8. 2007.

石英地質温度計の高温変成岩への適用へ向けて

岡山理科大学 自然科学研究所

今山武志

(概要) 石英チタン濃度を用いた地質温度計の開発のために、富山の飛驒変成岩類の地質調査および試料採取を実施した。これら変成岩類の多くは、苦鉄質変成岩類、珪質石灰質変成岩類、中圧型の砂泥質片岩からなり、地質温度計開発に適した石英に富む高温変成岩類は採取できなかった。そこで、ヒマラヤ造山帯の高温変成岩であるキンセイ石片麻岩を試料として、レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析装置を用いて、石英チタン濃度の測定を試みた。分析値(約 140ppm)は得られたものの、レーザー照射中に石英は割れてしまい、精度よくチタン濃度を測定できなかった。このことは、分析した石英の厚さが薄いことに起因しており、レーザーを照射しても割れないように、今後は試料処置を工夫する予定である。また、同様の試料中のジルコンのチタン濃度を測定し、中心部と縁部から推定した温度はそれぞれ 660–859 °C と 565–820 °C であった。この変成温度は、その他の地質温度計から推定した値の範囲内であるが、推定温度範囲が広すぎるため、今後はより詳細な検討が必要である。

はじめに

近年、石英中のチタン量は温度依存性が強く、火成岩類の地質温度計に利用できることが実験でわかってきた (Wark and Watson, 2006)。また、石英のカソードルミネッセンス (CL) の発光強度は、チタン量と正の相関を示す場合が多く、石英の累帯構造の解析方法として注目されている (Muller et al., 2003)。石英は、変成岩・変形岩中に含まれる最も普遍的鉱物であり、石英による地質温度計が確立されれば、変成・変形温度を推定できる対象試料が大幅に増加して、変成・変形帯の温度構造の理解も進むことが期待される。しかし、高温変成岩や変形岩の石英中に含まれるチタン量は、火成岩類のそれらと比較すると、微量のため、この手法の変成岩や変形岩への適用は、現段階では準備段階に留まっている。

本研究の目的は、石英のチタン量を高精度で決定して、石英地質温度計を高温変成岩へ適用することである。そのため、日本を代表する高温型変成帯の一つである飛驒帯の地質調査を実施して、分析に適した試料の採取を試みた。また、ヒマラヤ造山帯の高温変成岩類に対して、石英とジルコンの地質温度計を適用して、その他の一般的な地質温度計の結果 (ザクロ石—黒雲母地質温度計、相平衡計算など) と比較した。

飛驒変成岩類の地質調査と試料採取

石英地質温度計の推定に適した試料を採取するために、2017 年 10 月に飛驒帯の地質調査を実施した。地質調査は、韓国の全北大学の研究グループと共同で実施した。

飛驒帯は、ペルム紀—三畳紀に変成した飛驒変成岩類と三畳紀—ジュラ紀に形成した飛驒花崗岩類からなる。飛驒変成岩類は、飛驒片麻岩類、飛驒花崗岩類、宇奈月変成帯に細分される。初日は、片貝川流域の、飛驒花崗岩類である眼球片麻岩と飛驒片麻岩類の角閃石ミグマタイトの調査を実施した。前者は、大きなカリ長石の斑晶が見られ、一部は著しく変形を被って、マイロナイト化している (図 1a)。後者は、高温の変成作用で部分熔融したメルト部が見られ、溶け残りの変成岩類と入り混じっているが、その原岩は苦鉄質岩であるために、石英は少量である (図 1b)。2 日目は、富山県宇奈月温泉周辺の宇奈月変成岩類の調査を実施した。黒雲母片岩、十字石片岩、珪岩、塩基性片岩、結晶質石灰岩などが観察された。これらの変成岩類は、十字石を含むことなどから、中圧型の中度変成岩類である (図 1c)。また、岩石が熔融した産状は観察されないため、650 °C 以上の高温には達していないと考えられる。3 日目

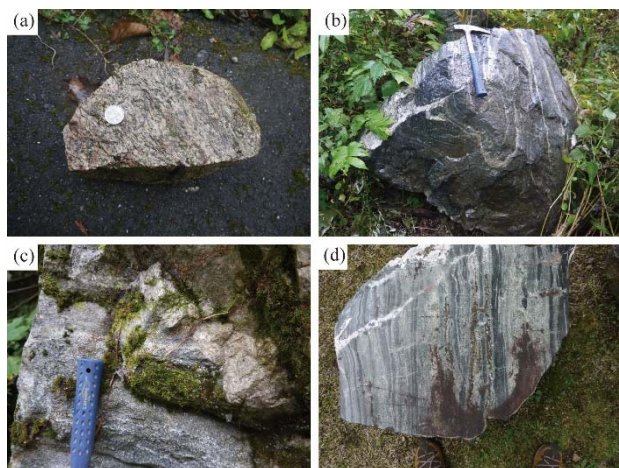


図1 飛騨帯変成岩類の露頭写真 (a) マイロナイト化した眼球片麻岩、(b) 角閃石ミグマタイト、(c) 十字石片麻岩、(d) 単斜輝石片麻岩。

は、和田川流域の片麻岩類を調査した。多くの露頭は、石灰質片麻岩類である単斜輝石片麻岩であった。この片麻岩は、単斜輝石、チタン石を特徴的に含むが、石英は少量である (図 1d)。

上述のように、飛騨帯変成帯の高温変成岩類は、苦鉄質変成岩類や珪質石灰質変成岩類が多く、石英に富む砂泥質片麻岩類は中圧型の中度変成岩類であった。そのため、石英地質温度計の手法を確立するための試料としてはあまり適していない。そこで以下では、申請者がこれまでに研究を実施してきたヒマラヤ造山帯の極東ネパール高温変成岩類中の石英に対して、石英地質温度計の適用を試みた。

キンセイ石片麻岩中の石英の CL 像による累帯構造

分析に用いた試料は、極東ネパールの高ヒマラヤ帯から採取した 2 試料のキンセイ石片麻岩類である。2 試料とも主に、ザクロ石、キンセイ石、黒雲母、カリ長石、斜長石、石英からなる。ジルコンやモナザイトのウラン-鉛年代測定法によれば、これらのキンセイ石片麻岩類は、3500-2500 万年前に高温変成作用を被っており、その後 1700 万年前まで変成作用は続いたと考えられる (Imayama et al., 2018)。

試料の薄片を作成して、ダイヤモンドペースト 1 μm まで研磨した後に、石英について、CL 像観察を実施した。CL 像観察は、岡山理科大学総合機器センター設置の走査型電子顕微鏡 (日本電子社製

JSM-5410) に回折格子分光器 (Oxford Instruments 社製 Mono CL2) を組み込んだ装置を使用した。CL は、物質中の電子が電子線照射によるエネルギーを吸収して励起状態となった後に、基底状態に戻るために光としてエネルギーを放出する発光現象である。不純物元素、結晶内の構造欠陥や試料温度などが、CL に影響を与える主要因である。

図 2 に、キンセイ石片麻岩中の石英の代表的な CL 像を示す。基質部の石英は、累帯組成構造をしばしば示し、中心部に比べると、縁部ではより明るい CL 像を示す。一方で、ザクロ石に含まれる石英は、累帯組成構造は示さない。その CL の明るさは、基質部の石英の縁部と同程度である。

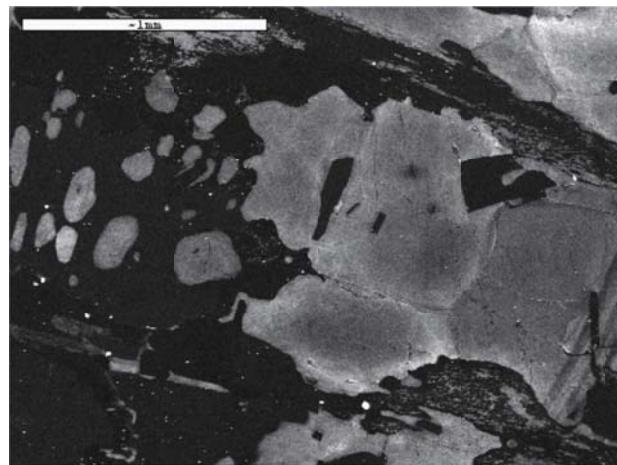


図2 キンセイ石片麻岩中の石英の代表的な CL 像

石英のチタン量測定による変成温度の推定

最初に、岡山理科大学総合機器センター設置の電子プローブマイクロ分析装置 (日本電子社製 JXA-8230) を用いて、石英中の主要元素 Si に加えて、微量元素 Ti、Al、Fe の累帯組成構造マッピングを試みた。しかし、CL で観察されたような累帯組成構造は、確認できなかった。このことは、石英中の Ti、Al、Fe 濃度は微量しか含まれておらず、検出限界以下だったと考えられる。今後は、レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析装置 (LA-ICP-MASS) などのような微量元素の測定に特化した装置で測定する必要がある。

石英チタン量の測定は、秋田大学のエキシマレーザー装置 (ESI NWR193UC) を装備する LA-ICP-MASS (Agilent 7700x) を用いて分析を実

施した。しかし、レーザーを照射中に石英が割れてしまうケースが多く、精度よくシグナルを得ることが難しかった。図 3a は、今回得られた代表的な分析スペクトルである。石英の分析スペクトルが得られたのちに、樹脂とガラスの分析スペクトルが得られ、石英が割れたのちに、ガラスまで到達したことがわかる。わずかに得られた石英の分析スペクトルから推定したチタン量は、約 140 ppm であったが、実際のチタン量よりかなり多めに見積もられていることが考えられる。分析深度を測定してみると、石英の表面の厚さは約 20 μm であり、ガラスに到達するまでの厚さは約 50 μm であった (図 3b)。また、石英が割れない場合は、極表面だけしかアブレートされずシグナルが不十分なため、分析値が得られなかった (図 3b)。このように、石英は脆性的で割れやすく、レーザーを照射しても割れないように、通常の薄片作成ではなく、試料作製を今後は工夫する必要がある。

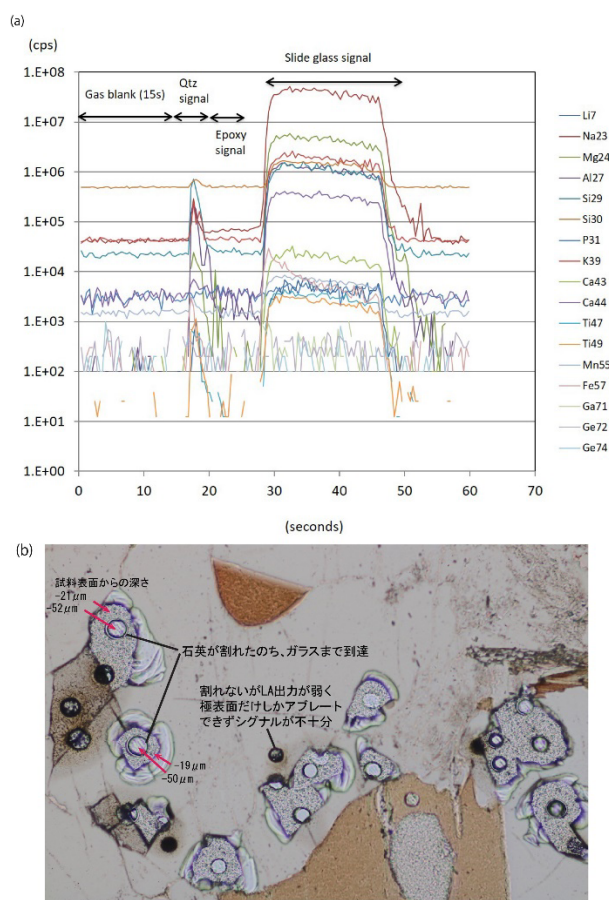


図 3 LA-ICP-MASS 分析によりキンセイ石片麻岩の石英から得られたスペクトル (a) と分析後の偏向顕微鏡写真 (b)

ジルコンのチタン量測定による変成温度の推定

上述のように、石英の脆性的な性質のため、十分な分析スペクトルを得ることはできなかった。そこで、より安定した分析スペクトルを得られる鉱物を対象に、変成温度の推定を試みた。特に、石英のチタン量と同様に、ジルコンのチタン量からも、ジルコンが成長した温度推定できることがよく知られているため (Watson et al. 2006)、同試料においてジルコンのチタン量測定を実施した。

図 4 は、キンセイ石片麻岩中のジルコンの CL 像である。ジルコンのコアは、碎屑性のジルコンであり、1906–483 Ma の原岩年代を示す。一方、ジルコンのリムは、変成作用時に成長したものであり、中新世の年代を示す (Imayama et al., 2018)。秋田大学の LA-ICP-MASS を用いて、ジルコンのコアとリムのチタン量を測定した結果、それぞれ 3.7–33.3 ppm と 0.9–23.1 ppm の値が得られた。Watson et al. (2006) の地質温度計を用いて温度を計算した結果、コアから推定した温度は 660–859 $^{\circ}\text{C}$ 、リムから推定した温度は 565–820 $^{\circ}\text{C}$ であった。

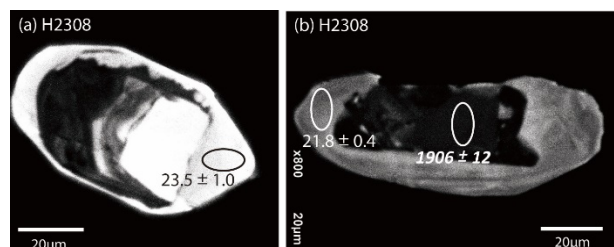


図 4 キンセイ石片麻岩中のジルコンの CL 像と U-Pb 年代

一般的な地質温度計の変成温度との比較

変成岩の変成温度条件の一般的な推定法には、ザクロ石—黒雲母地質温度計がある。キンセイ石片麻岩類試料からザクロ石—黒雲母地質温度計を用いて推定した変成温度—圧力条件は、760–815 $^{\circ}\text{C}$ であった (Imayama et al., 2010)。また、TERMOCALC プログラムを用いて計算した平均温度圧力条件は、767–814 $^{\circ}\text{C}$ 、4.7–5.1 kbar であった。加えて、相平衡解析を用いたシュードセクションの計算結果は、800 $^{\circ}\text{C}$ 、5.5 kbar であった (Imayama et al., 2018)。こ

これらの結果は、概ね一致しており、見積もられたキンセイ石片麻岩の変成圧力温度条件としては、非常に信頼性が高いと思われる。

本研究において、ジルコンのチタン濃度から推定した温度範囲（565–859 °C）は、上記のザクロ石–黒雲母地質温度計や相平衡計算から得られた変成温度を含むものの、温度範囲のばらつきが大きい。特に、いくつかのジルコンのチタン量から推定した変成温度は、一般的な地質温度計や相平衡計算から推定した変成温度に比べると、著しく低い。このことは、高温変成作用によりジルコン内部でチタンの拡散が起きたこと、圧力依存性やその他のチタン鉱物（ルチルなど）の影響を考慮していないことなどの複数の要因が考えられる。

今後の展望

石英から安定したシグナルを得るためには、通常よりかなり厚めの薄片を作成する、あるいは石英を分離して直接樹脂に埋め込むなど、分析前の試料処理を工夫する必要がある。また、石英は CL 像で明確な累帯構造を示すため、これらの組織に対応した分析が好まれる。加えて、ジルコンやルチルなどの他のチタン鉱物との共存関係や圧力依存性などの影響を、詳しく検討する必要があるだろう。

謝辞

飛騨帯の地質調査では、韓国の全州大学の Oh Chan-Wang 教授とその学生にご協力を頂いた。秋田大学の LA-ICP-MASS 分析では、福山繭子講師に大変お世話頂いた。石英の CL 像測定では、岡山理科大学の西戸裕嗣先生とその学生にご助力頂いた。最後に、今回の研究に助成金を頂いたウエスコ学術振興財団に記して感謝致します。

参考文献

Imayama, T., Takeshita, T., and Arita, K., 2010. Metamorphic P-T profile and P-T path discontinuity across the far-eastern Nepal Himalaya: investigation of channel flow models. *Journal of Metamorphic Geology*, v. 28, p. 527-549.

Imayama, T., Takeshita, T., Yi, K., and Fukuyama, M., 2018. Early Oligocene partial melting via biotite dehydration melting and prolonged low P/T metamorphism of the upper High Himalaya Crystalline Sequences in far-eastern Nepal. *Geological Society of London, Special paper*, in press.

Wark, D. A., and Watson, E. B., 2006. TitaniQ: a titanium-in-quartz geothermometer. *Contributions to Mineral and Petrology*, v. 152, p. 743-754.

Watson, E. B., Wark, D. A., and Thomas, J. B., 2006. Crystallization thermometers for zircon and rutile. *Contributions to Mineral and Petrology*, v. 151, p. 413-433.

位置選択的ヒドロシリル化反応を利用したポリマーの合成とその性質

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、テトラキス(エチニルジメチルシリル)シランをコア分子とし、白金錯体触媒存在下、ビス(ジメチルシリル)オリゴチエニレンとを反応させ、多次元ケイ素系ポリマーの合成法を確立した。さらに、合成した化合物の紫外可視吸収スペクトルおよび蛍光発光スペクトルなどの光化学的性質および熱的性質を明らかにすることができた。

1、はじめに

近年、様々なタイプのデンドリマーや星型化合物などの含ケイ素三次元分子が合成されてきており、それらの新奇な性質が報告されてきている[1-6]。我々はこれまで、ケイ素ユニットと様々な π -電子系を有する星型化合物およびH型化合物の合成とそれら化合物の性質を報告してきた[7-9]。その中で、ケイ素-ケイ素結合とビチエニレンユニットを規則正しく交互に有するアームを三方向に持つ分子は、高い蛍光量子収率と遷移状態における長い寿命を示すことを報告した。しかし、これまでのところ四方向にアームを持つ星型化合物の化学については、ほとんど興味を持たれてこなかった。

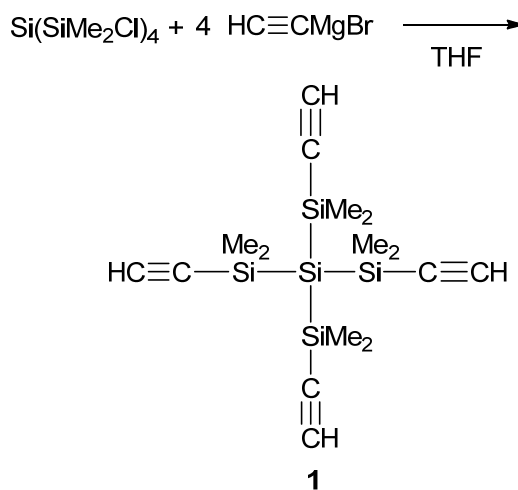
そこで本研究においては、星型化合物の化学についてさらに多くの知見を得ることを目的として、テトラシリルシランをコアとし、オリゴチエニルシリルビニルユニットをアームとして有する新しいタイプの四方向星型化合物およびネットワークポリマーの合成を行った。合成法としては、白金錯体触媒下におけるヒドロシリル化反応を取り入れた。さらに、合成した化合物の光学的および熱的性質を明らかに

したので報告する。

2、結果と考察

まず、テトラキス(クロロジメチルシリル)シランをエチニルマグネシウムブロマイドと反応させることにより、化合物(1)を65%の収率で得た(Scheme 1)。

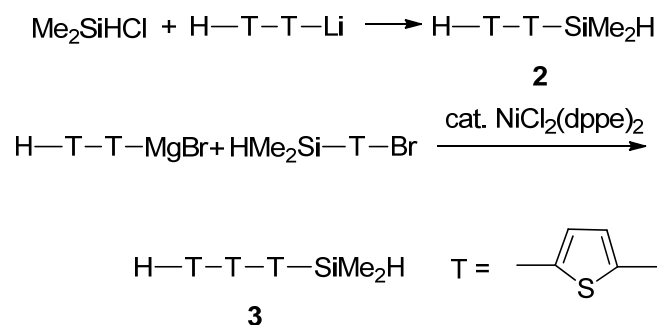
Scheme 1



次に、オリゴチエニルユニットを持つアームの合成を行った。5-ジメチルシリル-2,2'-ビチオフェン(2)は、2-リチオビチオフェンとクロロジメチルシラ

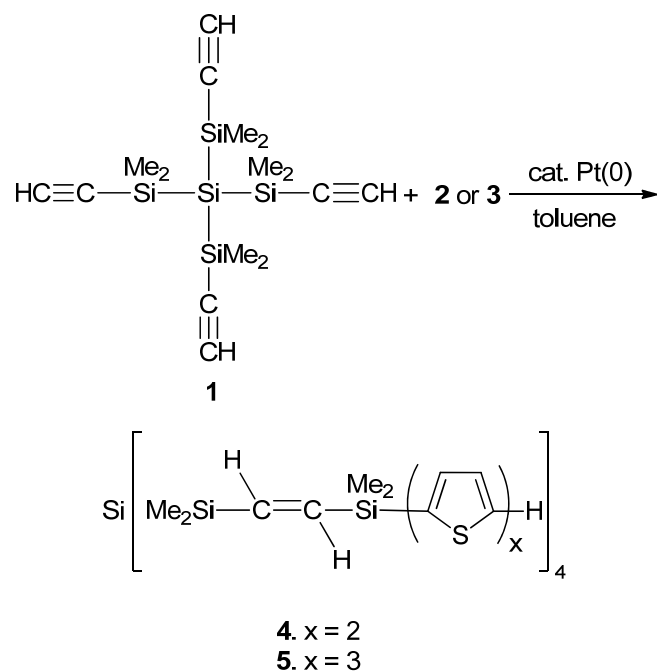
ンの反応により、82%の収率で得られた。また、5-ジメチルシリル-2,2',5',2''-タチオフェン(3)は、ビチエニルマグネシウムブロマイドと2-ブロモ-5-(ジメチルシリル)チオフェンのニッケル錯体触媒存在下での熊田カップリング反応により、33%の収率で得た(Scheme 2)。

Scheme 2



白金錯体触媒存在下、化合物2および化合物3を化合物1と反応させたところ、四方向にアームを持つ星型化合物(4)および(5)がそれぞれ38%、27%の収率で得られた。(Scheme 3)

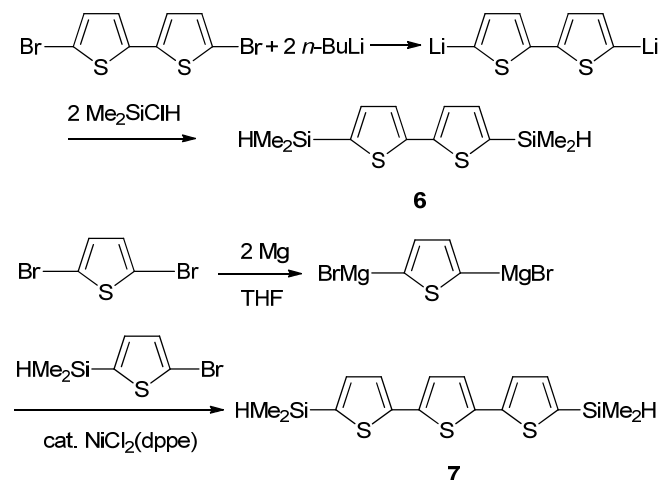
Scheme 3



星型化合物4は淡緑色の液体で、星型化合物5は淡黄色の液体であった。化合物4および5の構造は、質量分析およびNMRスペクトルにより決定した。これらのヒドロシリル化反応は、高い立体選択性でトランス構造の生成物を与えることが明らかとなった。

次に、シリルユニット、ビニルユニット、オリゴチエニルユニットを有するネットワークポリマーの合成を目的として、化合物1を白金錯体触媒存在下、ビス(ジメチルシリル)オリゴチオフェンとの反応を行った。ビス(ジメチルシリル)オリゴチオフェン(6)および(7)の合成は、次のように行った(Scheme 4)。

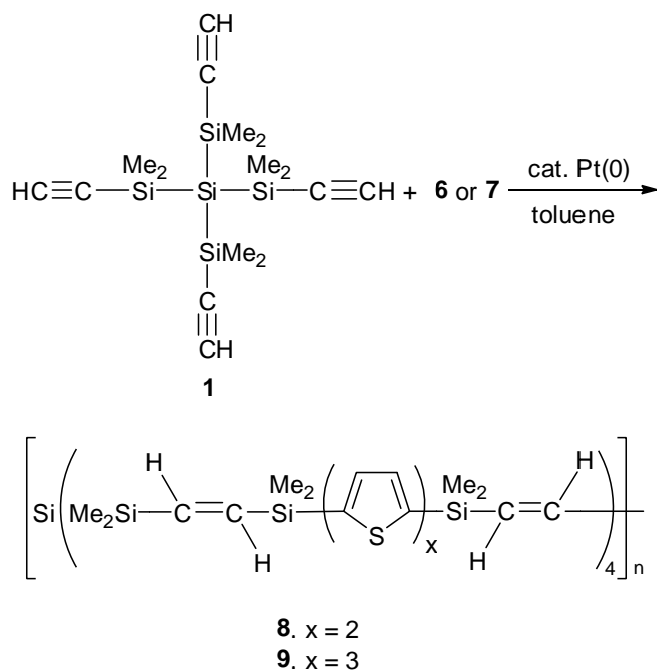
Scheme 4



化合物1と2当量の化合物5を白金錯体触媒存在下、110℃、4時間の条件で反応させると、重量平均分子量222,000で分散が9.2の分岐型ポリマー(8)が34wt%で得られた。同条件下、化合物1と2当量の化合物6を反応させたところ、分岐型ポリマー(9)が32wt%で得られた。このポリマーの分子量は50,000で分散が5.4であった。これらポリマーの分子量測定は、ポリスチレンスタンダードを用いたGPCによ

り、算出した (Scheme 5)。

Scheme 5



ポリマー8および9の構造は、NMR スペクトルの測定により決定した。また、ポリマー8および9は、THFやクロロホルムなどの有機溶媒に溶けることが分かった。

化合物4および5、ポリマー8および9の紫外可視吸収スペクトルおよび蛍光発光スペクトルを Figure 1-3 に示した。ビチオフェンユニットを持つ化合物4およびポリマー8は、それぞれ 311 nm、320 nm に吸収極大を示した。ジオキサン中、化合物4の蛍光発光の極大波長は、372 nm であった。ジオキサン中、ポリマー8の発光の極大波長は、386 nm、固体状態においては、398 nm であった。一方、タチオフェンユニットを有する化合物5およびポリマー9の吸収極大波長および蛍光発光の極大波長は、化合物4およびポリマー8と比較して、長波長シフトしている。化合物5の吸収極大波長は 362 nm、ジオキサン中、化

Figure 1

ジオキサン中、化合物4および5、ポリマー8および9の紫外可視吸収スペクトル

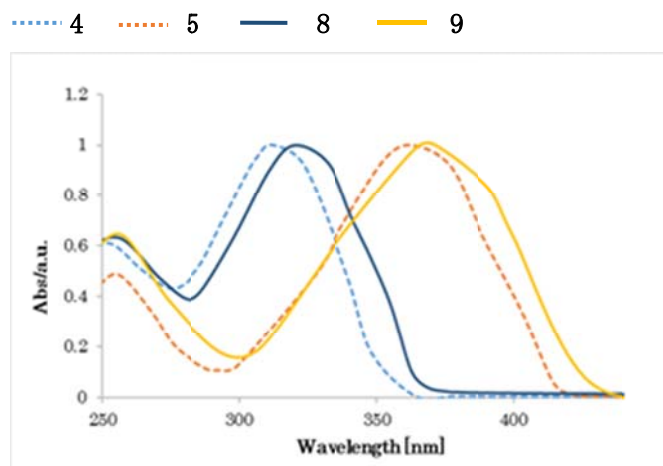
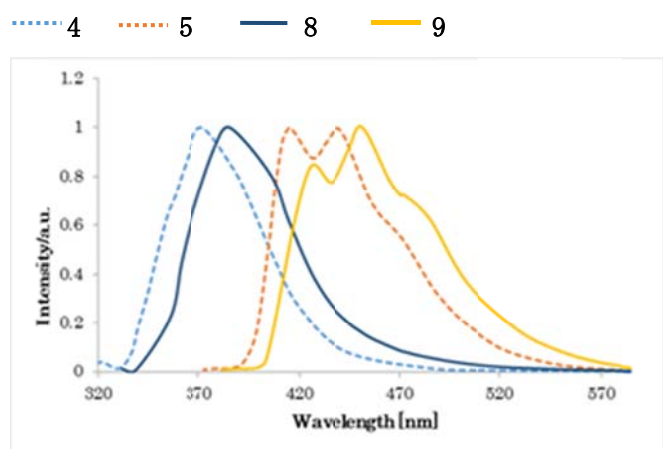


Figure 2

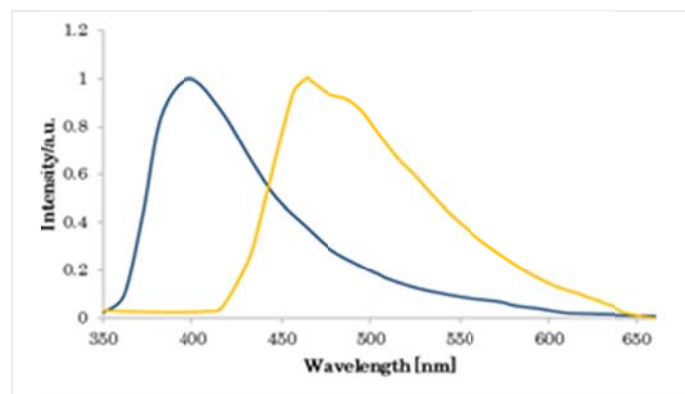
ジオキサン中、化合物4および5、ポリマー8および9の蛍光発光スペクトル



合物5の蛍光発光は、415 nm および 439 nm にピークが見られた。ジオキサン中、ポリマー9の極大吸収波長は 364 nm で、蛍光発光スペクトルでは、426 nm および 452 nm に二つのピークが見られた。ポリマー9の固体状態における蛍光発光スペクトルでは、463 nm および 483 nm にピークが見られた。蛍光の量子収率については、10%程度で、期待したほど大きな値を得ることが出来なかった。

Figure 3

固体状態でのポリマー8 および 9 の蛍光発光スペクトル



次に、ポリマー8 および 9 の窒素気流下および空気中での熱重量測定(TGA)を行った (Table 1)。それぞれ 5%重量損失温度、10%重量損失温度の測定を行った。その結果ポリマー9 において、空気中でさえ、良い熱安定性を示すことが明らかとなった。

Table 1

ポリマー8 および 9 の熱重量測定

	T_{d5}	T_{d10}	T_{d5}	T_{d10}
	窒素	窒素	空気	空気
Compound	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)
8	324	377	339	383
9	379	436	359	402

T_{d5} および T_{d10} は、 5% and 10% 重量損失温度

示差走査熱量測定(DSC)を行ったが、ガラス転移温度を得ることは出来なかった。

以上述べてきたように、ヒドロシリル化反応を利用することにより、テトラシリルシランをコアとし、オリゴチエニルシリルビニルユニットを持つ四方向にアームを有する星型化合物の合成に成功した。ま

た、合成した化合物の光化学的、熱的性質を明らかにすることが出来た。ポリマー8 および 9 の有機溶媒に対する高い溶解性と高い熱安定性は、フォトルミネッセンスやエレクトロルミネッセンス材料として用いることができると考えている。

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] A. L. Kanibolotsky, I. F. Perepichka, P. J. Skabara, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 2695.
- [2] W. Cui, Y. Fu, Y. Qu, H. Tian, J. Zhang, Z. Xie, Y. Geng, F. Wong, Chem. Asian. J. 5 (2010) 932.
- [3] J. Liu, S. Zhang, W.-X. Zhang, Z. Xi, Organometallics, 28 (2009) 413.
- [4] S. Roquet, A. Cravino, P. Leriche, O. Alévêque, P. Frère, J. Roncali, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 3459.
- [5] A. L. Kanibolotsky, R. Berridge, P. J. Skabara, I. F. Perepichka, D. D. C. Bradley, M. Koeberg, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 13695.
- [6] J. Pei, J.-L. Wang, X.-Y. Cao, X.-H. Zhou, W.-B. Zhang, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 9944.
- [7] A. Naka, K. Fujishima, E. Okada, M. Noguchi, J. Ohshita, Y. Adachi, Y. Ooyama, M. Ishikawa, J. Organomet. Chem. 825-826 (2016) 63.
- [8] A. Naka, K. Neishi, M. Nishimoto, M. Ishikawa, J. Organomet. Chem. 791 (2015) 169.
- [9] A. Naka, R. Fukuda, Y. Jahana, J. Ohshita, H. Kobayashi, M. Ishikawa, J. Organomet. Chem. 741-742 (2013) 67.

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生命医科学科

岡田誠剛

(概要)

近年、がん細胞は正常細胞と比べて K⁺チャネルを過剰発現していることが報告されている。これまでの研究で我々は、クモ毒ペプチド (LaFr26) が K⁺チャネル発現細胞に選択的に取り込まれ、細胞膜にポアを形成することを見出しており、これを応用すれば、がん細胞選択的に細胞毒性を示すことが期待される。本研究では、LaFr26 とその類縁ペプチドが、K⁺チャネル発現細胞に同チャネル電流依存的に選択的に毒性を示すこと、及び、肺がん細胞に毒性を示すことを認めた。しかし、ペプチドは医薬品としては薬物送達に弱点があり、通常の投与法では腫瘍内に送達することは困難である。この弱点の克服のため、我々はこれらのクモ毒ペプチドを発現するレンチウイルスベクターを開発し、がん細胞自身に毒ペプチドを発現させ、このウイルスベクターが K⁺チャネル発現依存的に細胞毒性を発揮することを見出し、がん治療の新たな可能性を見出した。

(諸言)

近年、がん細胞では K⁺チャネルの発現が周囲の正常細胞と比べて増加していることが報告されている (1)。例えば、内向き整流性 K⁺チャネル (Kir2.1) は肺がん細胞で (2)、2 ポアドメイン型 K⁺チャネル (TREK-1) は前立腺がん (3) で過剰発現していることが報告されている。この以外にも様々ながん細胞での過剰発現が報告されており、その役割についても抗がん薬抵抗性 (4)、転移、増殖、細胞周期への関与 (1) などが推測されている。

我々は、選択的な遮断薬が存在しない Kir2.1 の遮断薬を見出す目的で、従来の研究で様々なイオンチャネルの遮断薬が発見されているクモ・サソリ毒液をスクリーニングした。その過程で、細胞での Kir2.1 発現に依存して細胞にポア (孔、イオノフォア) を形成すペプチド LaFr26 を見出した (5)。このペプチドは塩基性のペプチドであり、Kir2.1 の発現によって K⁺イオンが流出し、細胞膜電位がマイナスになった細胞に選択的に取り込まれ、細胞にポアを形成した。これらの知見から、我々は、LaFr26 は、K⁺チャネルを過剰発現するがん細胞に選択的に取り込まれ、ポアを形成し、細胞毒性を示し、がん治療応用できるのではないかと考えた。

しかし、ペプチドは医薬品として用いるには、薬物送達に弱点がある。すなわち、これらのペプチドは経口投与では消化管で分解され、静脈注射では心臓など K⁺チャネルを発現する細胞にも取り込まれることが予想され、そのままでは生体に応用することは困難である。そこで、我々はこれらのクモ毒ペプチドの cDNA を組み込んだレンチウイルスベクターを調製し、がん細胞に感染させ、がん細胞自身に同ペプチドを発現させることを試みた。

本研究で我々は、1) 化学合成した LaFr26 及びその類縁ペプチドが K⁺チャネル依存的に細胞毒性を示すか、2) LaFr26 及び類縁ペプチドががん細胞に毒性を示すか、3) これらのペプチドを発現するレンチウイルスベクターが毒性を示すかを検討し、それぞれ期待に沿った結果を得た。

(結果と考察)

Kir2.1 を発現させたヒト腎由来の 293T 細胞の培地に化学合成した LaFr26 を添加し、Kir2.1 チャネルを選択的に遮断する Ba²⁺ (0.3 mM) の存在下・非存在下で 37°C 30 分間培養し、生存細胞数を Cell Counting Kit-8 (Dojindo) で測定した (図 1)。

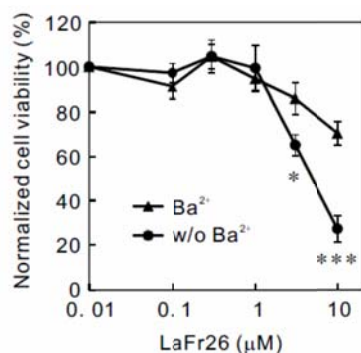


図 1. LaFr26 の Kir2.1 電流依存性の細胞毒性

Ba²⁺の存在下ではLaFr26 高濃度でわずかな毒性を示したのみであったが、非存在下では有意な細胞毒性を示し、同ペプチドがK⁺チャネル電流依存的に毒性を示すことが示された。LaFr26 の類縁ペプチド Oxyopinin-2b も同様の毒性を示した。この細胞毒性がK⁺チャネル電流依存的であることは、他のチャネル TREK-1、HERG-1 を発現する細胞への毒性によっても確認した。

次に、K⁺チャネルを内在性に過剰発現する肺がん LX22 と BEN 細胞に細胞毒性を示すかを検討すると、濃度に依存した毒性が認められた(図 2)。

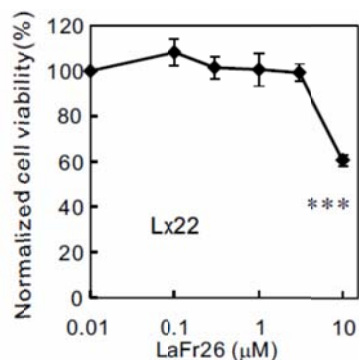


図 2. 肺がん細胞 LX22 に対する細胞毒性

次に、ペプチドの薬物送達の弱点を回避するため、LaFr26 と Oxyopinin-2b の cDNA を調製し、それらを発現するレンチウイルスベクターを作成した (Lv-LaFr26、Lv-Oxy-2b)。対照として赤色蛍光タンパク (mCherry) の cDNA を組み込んだものを調製した (Lv-mCherry)。そして、これらのウイルスベクターを細胞に感染させ、細胞自身にこれらのポア形成ペプチドを発現させた(図 3)。

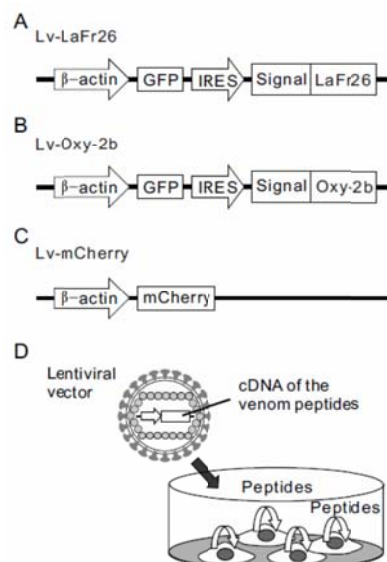


図 3. ペプチド発現レンチウイルスベクターの構築と細胞毒性発現機序の模式図

その結果、期待通りに Lv-LaFr26 は Kir2.1 発現細胞には毒性を示したが、対照の緑色蛍光タンパク (GFP) を発現する細胞には毒性を示さなかった(図 4)。また、対照ウイルスベクターの Lv-mCherry はいずれの細胞にも毒性を示さなかった。

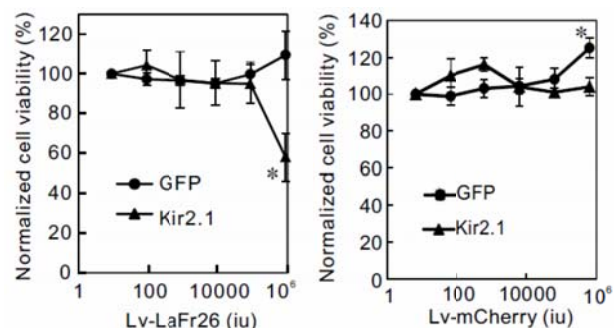


図 4. Lv-LaFr26 は K⁺チャネル電流依存的に細胞毒性を示したが、Lv-mCherry は示さなかった。

次に、これらのレンチウイルスベクターが肺がん細胞にも毒性を示すかを LX22 及び BEN 細胞で検討したところ、Lv-mCherry は生存細胞数に影響を与えなかったが、Lv-LaFr26 と Lv-Oxy-2b は各々生存細胞数を 70%、60%にまで減少させた。

最後に、これらのレンチウイルスベクターがポアを形成していることを確認するため、ウイルスベクターに感染した細胞の全細胞抵抗をパッチクランプ法で測定したところ、Lv-mCherry では 417 ±

110. 6.1 M Ω と正常のものと変わらなかったのに対し、Lv-LaFr26 では、 100.4 ± 33.2 M Ω 、Lv-Oxy-2b では 98.3 ± 59.1 M Ω に有意に減少しており ($p < 0.05, n = 6$)、細胞にポアが形成されていることが示唆された。

本研究では、がん細胞が K⁺チャネルを過剰発現することと、クモ毒ペプチドが K⁺チャネル発現細胞選択的に取り込まれポアを形成するという性質を利用して、LaFr26 とその類縁ペプチドが同チャネル電流依存的にがん細胞選択的な細胞毒性を持つことを明らかにした。また、これらのペプチドを発現するレンチウイルスベクターも K⁺チャネル発現に依存した毒性を示し、ペプチドの弱点であった薬物送達の問題を回避し、一回の腫瘍内接種によって、がん細胞自身にペプチドを発現させ、周辺の正常細胞に影響を与えずに、がん細胞自身を死滅させる可能性が期待される。

(参考文献)

1. Huang X, Jan LY. Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol.* 2014;206(2):151-62.
2. Liu H, Huang J, Peng J, Wu X, Zhang Y, Zhu W, et al. Upregulation of the inwardly rectifying potassium channel Kir2. 1 (KCNJ2) modulates multidrug resistance of small-cell lung cancer under the regulation of miR-7 and the Ras/MAPK pathway. *Molecular cancer.* 2015;14(1):59.
3. Voloshyna I, Besana A, Castillo M, Matos T, Weinstein IB, Mansukhani M, et al. TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer. *Cancer research.* 2008;68(4):1197-203.
4. Tan G, Sun S-q, Yuan D-l. Expression of Kir 4.1 in human astrocytic tumors: correlation with pathologic grade. *Biochemical and biophysical research communications.* 2008;367(4):743-7.
5. Okada M, Corzo G, Romero-Perez GA, Coronas F, Matsuda H, Possani LD. A pore forming peptide from spider *Lachesana* sp. venom induced neuronal depolarization and pain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.*

竹久夢二の美人画作品のインタラクティブコンテンツ制作研究

倉敷芸術科学大学芸術学部メディア映像学科

中川浩一

(概要)

岡山ゆかりのアーティストにして近代イラストレーションの先駆けでもあった竹久夢二の美人画作品をアニメーションとして構成した上で、それを仮想空間に配置し、その作品と対峙する鑑賞者の動きを把握してインタラクティブに動くコンテンツとして再構築することを目指し研究を行った。

ベースとなる開発環境としてはTouchDesignerを、プログラミングにはPython v3をアニメーション作業にはLive2D v3を使用しインタラクティブコンテンツ化を実現した。

このことは、竹久夢二作品の世界観を新しいかたちで発見することをも意味し、「元祖美少女イラストレーション」作家でもある夢二を再発見する契機になり、また絵画鑑賞の「体験」化という作品と対峙するものとのありようの新たに提案するものとなった。

● 竹久夢二作品インタラクティブコンテンツ化の基本コンセプト

近年、イラストレーション界では美少女を描いた作品が多くファンを獲得している。イラストレーターの多くがネット上で投稿し支持を競っているSNS「ピクシブ」は全会員数約2200万人で一日あたりの投稿数が2万件で、「美少女」あるいは「女の子」のタグづけされた作品はそれぞれ約2万6000余作品、約108万作品（2017年9月18日時点調査）と人気が高いことがうかがえる。（注1）

現在のこの活況をみると「竹久夢二」描くところの可憐な美少女、美人の絵画作品群はいまの状況を先取りしたものであるといえよう。

本研究では、本来的に平面的表現である絵画を最新のCG技術とプログラミングによりアニメーションおよびインタラクティブ化し、新しい鑑賞のありようを再定義することが目的となる。絵画という静止しているのが当然であるものを動くもの＝アニメーション化し、その動きさえもインタラクティブに制御できるなら、もともとの絵画鑑賞というスタンスに新しい要素を付加することが可能となる。

視覚的な体験から「体感」としての体験が芸術作

品と鑑賞者との関係性を大きく揺さぶることになることを期待してのことである。

● インタラクティブコンテンツ化のための技法

アニメーション化するにあたってよくされることは絵画作品をそのままトレースし、アニメーション動画として制作する方法である（近年のマンガ原作のアニメーションあるいはイラストレーションが原案となったアニメーションなどはこの手法による）。ここでは作品としての芸術性および作家性をなるべく損なわない方法であるべきと考えるためこの手法はとらない。

すなわち作品をそのままに、画面上にポリゴンメッシュを張りめぐらせ、それを動かすことで静止画でありながらそのニュアンスを伴ったままで動画としても存在し得るものをまずは制作する。

それは竹久夢二作品の世界観を新しいかたちで発見することをも意味し、「元祖美少女イラストレーション」作家でもある夢二を再発見する契機にもなりうるだろう。

● アニメーション化のためのコンセプト

夢二作品の独特の世界観やタッチは、夢二の魅力そのものでもあるので元の作品世界を損なうことなく実現したいが大きな問題点も存在している。

つまり静止画は動かないがために動きを前提とする必要ないので立体であれば当然描かれるべき部分が描かれず省略あるいは矮小化されていることである。(要するに見えている部分みえていない部分が存在する)

しかしアニメーションとして描くためには基本的には立体としての対象物がどう動くかを考えて動画させるため、見えないものをみえないままで制作するなら元の作品の世界観が大きく変わってしまうことになりかねない。竹久夢二が描いた絵画の世界観のままで表現できないのであればわざわざ夢二作品をアニメーション化する意味合いがない。

筆者はこれまでアニメーターとしてまたイラストレーターとして多くの観客の鑑賞に訴え、なおかつ印象に残る絵画表現を追究し、どうすればそれが実現できるかについての技術的素地や視覚的な効果などを培ってきた。そうした研究をバックグラウンドとしつつ、動画でも静止画でもない新しい表現を試みることによって新しい鑑賞方法を提案したいと考えている。

そこでアニメーション化にあたっては 3DCG モデルなども一切使用せず、平面状態の作品をそのまま使用し、夢二の描いた絵画世界を損なうことなく動画化することを目指した。

また夢二作品のうちのどの作品をその対象とするかについては、動いた時の色の対比が鮮やかであること、また構図が明確であること、描かれているパーツが入り込んでいるためそれらが動いた場合、逆に新鮮な驚きを覚えやすいもの、という点も考慮した。

結果、アニメーション化の対象作品として「秋のいこい」(1920)(夢二郷土美術館所蔵作品)を選んだ。(図1)

紅葉と木綿縞の着物、さらには信玄袋との対比の鮮やかさ、複雑な表情がたいへん魅力的でキャラクター性を表現したときのおもしろさが際立つであろうこと、縞模様が揺れるような動きをすれば鑑賞者

に新鮮にうつるだろうと考えられたからである。

本来、動かないキャラクターが動いた場合の新鮮さや生き活きたキャラクター性を伴うと判断したからでもある。

● アニメーション化の技法

次にアニメーション化に至る具体的な技術についてである。

作品の世界観を損なわず平面そのものをアニメーション化する技術として今回は国内メーカーである株式会社 Live2D が開発した、2D のモーフィングによるシームレスアニメーションをベースにしたアニメーション技術である「Live2D」を活用することとした(注*1)。

これは絵画データのファイル形式(PSD 形式)との互換性が高く活用性に幅が出ることを考慮した。

「秋のいこい」の動きについては下記を考慮して設計した。

- ・ キャラクターの動くパーツ部分を選定。
- ・ 女性の表情や仕草が印象的な作品であるため、顔の各パーツや手、また傘の持ち手をパーツ化した。
- ・ 着物の袖の部分なども動くことを前提とするが、動くということは現在の位置(座標)から別の位置(座標)に移動することを意味するので作品のなかに描かれてない箇所が表面に現れ出てくる。その元の作品には存在しなかった(みえていなかった)部分ももともとあったかのようにするため修復(描き足す)作業を追加する。

例えばキャラクターがもっともキャラクターとして生きていると感じやすくなる「瞬き」について考えると、作品内では女性は目を開いているが、「瞬きはいったん顔を閉じることになるため「目を閉じたときの顔」が必要となる。しかしこれは元の作品には描かれていない。また傘の持ち手を握り直すような動きをつけるのであれば作品内では見えてない指が現れる。また見えていない傘の柄の部分も現れるだろう。

こうしたことも考慮し、あらかじめ動かす部分、

そして動いた結果、元の作品には描かれていなかった空白の部分をリストアップしていく。(図2)

当然ながらみえない部分はもとの作品の世界観を損なわないかたちで補正追加していく必要がある。ここではその補正のためにAdobe PhotoshopCCの「コンテンツにあわせた補正」ツールとスタンプコピーツールによって補正していった。(図3)

最終的には目視による確認が必要であり、ひとつひとつ手作業での修正作業していく。修正はパーツの数だけ必要となってくるので膨大な作業工程が必要で、パーツはすべてレイヤー(重ね構造)のある形式のファイルを生成していく。(図4)

● アニメーション化作業

アニメーション化のために修正済 PSD ファイルにポリゴンメッシュを貼り付けていく。どのパーツにどのようなポリゴンメッシュを張るかで可動範囲・動きの微妙なニュアンスが異なってくるので、動きの設計を念頭にメッシュを張っていく。

細かく動かす必要のあるパーツ(目、瞳、睫毛の上下、口、鼻など表情用パーツ)は細かいメッシュで、大きく動くパーツ(腕、手、傘、袖など)は大きめの面のメッシュをはってメリハリをつけていった。(図5~7)

こうした作業を「リグ」作業という。

しかしながらリグ作業をいくら細やかに施そうともそれだけでは絵画世界のキャラクターは「生きて」動いてくれない。これはアニメーション制作の現場で何度も筆者自身がいつも直面してきた状況であり、この問題をクリアするために「絵画は平面な存在ではあるが、生きているものは立体物として存在しており、平面として描いていても動きは立体物として振る舞う」と考えることが重要である。

できあがったリグを用いて次にアニメーション出力作業を行う。

アニメーションとは時間軸の内での動きそのものであるのでリグができたからといって終わりではない。ここでは Live2D のアニメーションモード Animator に移行し、タイムラインにリグの入ったモ

デルを配置し、操作・制御するかたちでアニメーションを生成した(図8)

ここでの注意点は、この時代の女性に相応しい動きとなるよう、配慮しつつ制御することである。現代的なスピードのある、また直線的な動きでは度絵画世界が破綻してしまうだけでなく、アニメーションの動きとしても成立しない。

動きを設定しキーフレーム(アニメーションでいう「原画」にあたるもの)を設定、トゥーイーンという処理でつないでいく。これが「モーフィングによるシームレスアニメーション」といわれるものである(注*2)。

こうして動きを確認しつつ出力すると連番といわれるファイルが生成される。これが今回、主なインタラクションにあわせて動く部分となる。

● インタラクションの埋込

生成されたアニメーションをインタラクティブに動かすため、インタラクションを担う開発環境が必要となる。基本的には鑑賞を前提としており、さらに特に説明などなくとも鑑賞者は似インタラクションを認識することを今回の目的とした。

そのため開発環境としては日本国内ではまだ馴染みが少ないものの海外メディアアートやテクノロジーアートのインストールでは可活用例が増えている TouchDesigner を導入した。

鑑賞は長時間に渡って行われるものであり、今回の新しい鑑賞法の提案に即して考えるなら、安定的に長時間に渡って投影されていなければならない。つまりは途中でエラーやトラブルを起こす危険性が極力少ないものを使用する必要がある。海外での大規模展示などにも使用され安定性については評価の高い TouchDesigner を使用したいちばんの理由はこれである。

またインタラクティブを実現するためのプログラミング部分については Python v3 を使用することにした。これは TouchDesigner と親和性が高いこと、また Python はライブラリーが充実しておりその導入が容易で、なおかつ今回の研究のより発展型とし

て学習機能を取り込んだインタラクティブコンテンツへの展開をも見込んだ故である。

また鑑賞者の動きを捕捉するセンサーとしては Kinect v2 を導入した。(図 9)

kinect のボーン認識から鑑賞者の関節をポイントして認識しその座標変化を読み取ってアニメーションが動くという仕組みにしている。

鑑賞者の背の高さもあるので単純に鑑賞者の位置や高さなどでインタラクティブを発動させるのではなく、右手首の 3D 座標を取得、続いて脊椎の 3D 座標を取得、両者の位置の広がり具合、また値の正負関係などから、動きとして認識し、それに応じてアニメーション動画を再生するものとしている。

このことによる鑑賞者が身長の高い大人であろうと、低い子供であろうと、同様にインタラクションを起こすことが可能になっている。(図 10)

ただ実施に動作させてみると微妙な動きも捕捉してしまうためアニメーションが小刻みにゆれる現象が生じた。これは位置観測時の小数点以下の数値も動きにあわせようとしていたため、細かい数字を切り捨てることでこの問題点は解消することができた。

Kinect を使用したことで最大 6 人まで認識できるので複数人数を描いた作品で今回のようなインタラクティブコンテンツ化を試みるならば、それぞれの登場人物を特定の鑑賞者とリンクさせ、その鑑賞者が動いた時には絵画のなかの特定の人物が動く、という展開への応用もきくようになっている。

● むすび

今回、絵画作品のアニメーション化を通じて新しい絵画の見え方、描かれた人物の見え方の再定義にひとつのきっかけを与えることができたとも自負している。当初は VR 機器として鑑賞者が装着するデバイスをもとに仮想空間を展開させることも考えていたが、それでは作品と鑑賞者との関係性が 1 対 1 となってしまう、想定していた美術館などの広いスペースでの通常の美術鑑賞とは異なることになるため今回はとくにデバイスを必要としないもので構築した。ただコンテンツとしては 1 対 1 の鑑賞法もあり

得るので引き続きのこの点については研究を継続したい。

また本研究をもっと発展的に推し進めた展開も構想中である。特に今回導入した Python 環境と学習ライブラリの活用ができれば、鑑賞者が作品前で実施した動きを学習することでその場での鑑賞者の作品鑑賞のスタンスがひとつのアーカイブとして記録できるので、この場所での展示では鑑賞者はこうした傾向の動きをしがちであるが、また別の場所ではこうした傾向を示したなど、「作品」と「場」を繋ぐことが出来る可能性もある。それはまた作品鑑賞と鑑賞者、そしてインタラクティブを前提とした時の場との関連性をも含んだ新しい鑑賞法として視覚化できるだろうと考えている。

注 *1

株式会社 Live2D <http://www.live2d.com/ja/>

注 *2

日本の場合、手描きのアニメーションでは一秒あたり六〜八枚の作画を行い、動いているようにみせている。そのためどうしてもコマ飛びのように「カクッ」となる箇所が発生する。それに対してシームレスアニメーションは一秒あたり約三〇枚の絵が生成される。そのため極めて滑らかな動きが実現可能となっている。

参考文献

高橋 晴子 著『年表近代日本の身装文化』三元社 東京 (2007)

竹久夢二『竹久夢二』夢二郷土美術館 邑久町(1981)
NHKサービスセンター 編『竹久夢二展』NHK サービスセンター 東京 (2009)

栗田勇 編集、竹久夢二 撮影『竹久夢二写真館「女」』新潮社 東京 (1983)

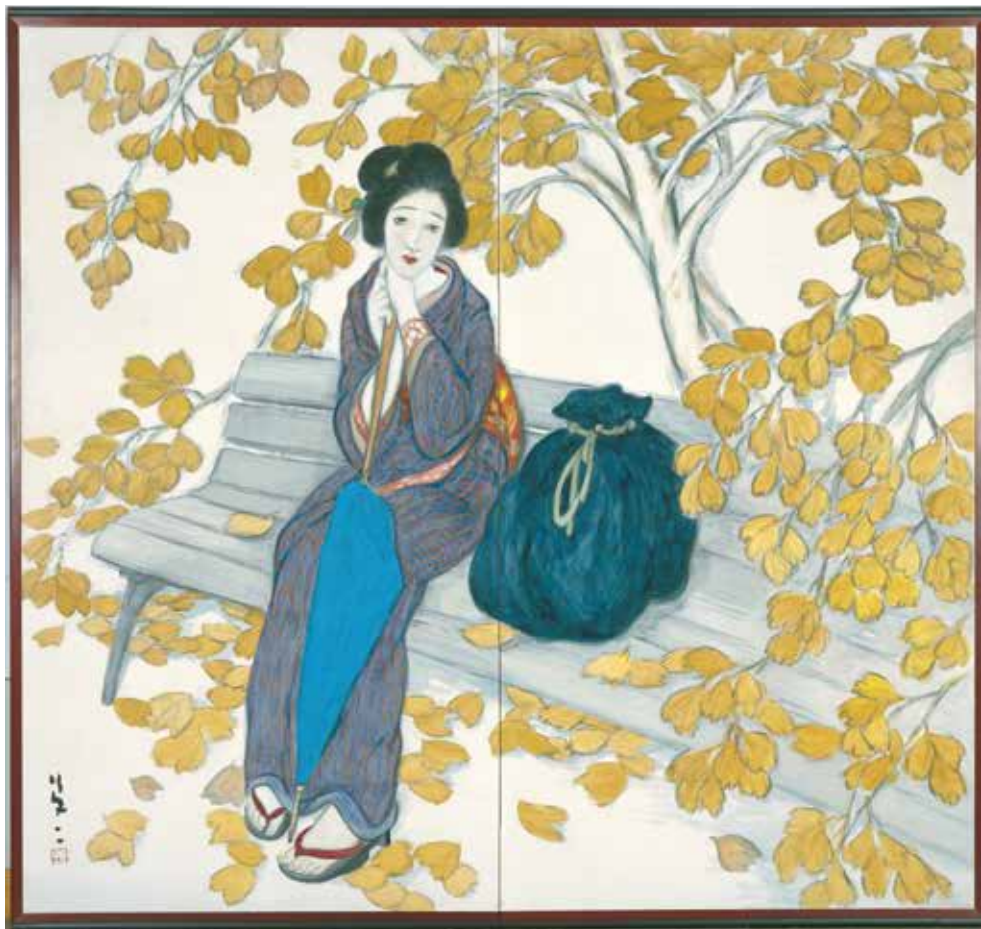
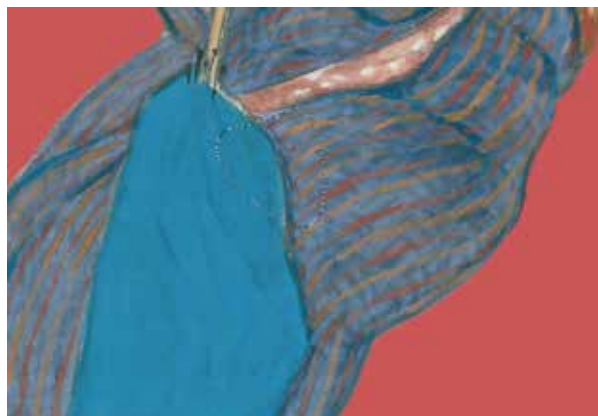


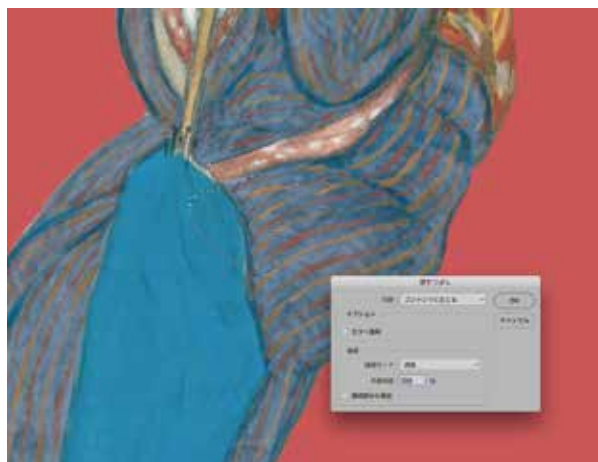
図1 秋のいこい（一九二〇）紙本着色（夢二郷土美術館所蔵）



図2 アニメーションの動きの設計と見える部分見えない部分の切り分け



傘と着物の境目を補正する



周囲の色情報などを参考に塗りつぶしを実施



境目が縞模様で塗りつぶされる。
こうした細やかな作業を
何度も繰り返しさらに
傘が完全に消えるまで
修正を重ねていく。

図3 AdobePhotoshopCC による補正作業



図4 レイヤー生成された画像ファイル



図5 顔へのポリゴンメッシュ処理

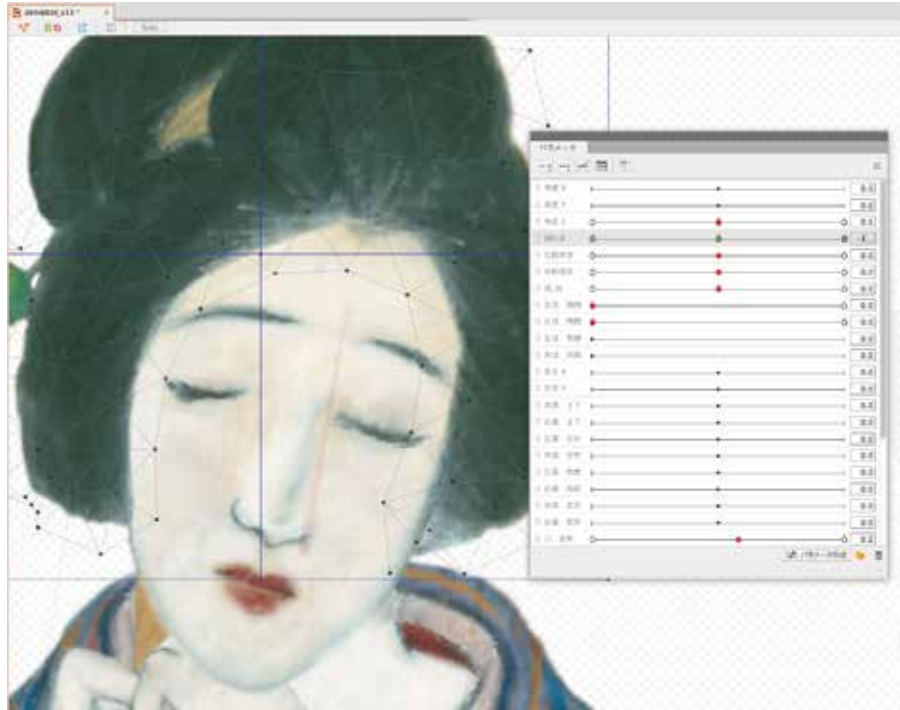


図6 顔のポリゴンメッシュ編集

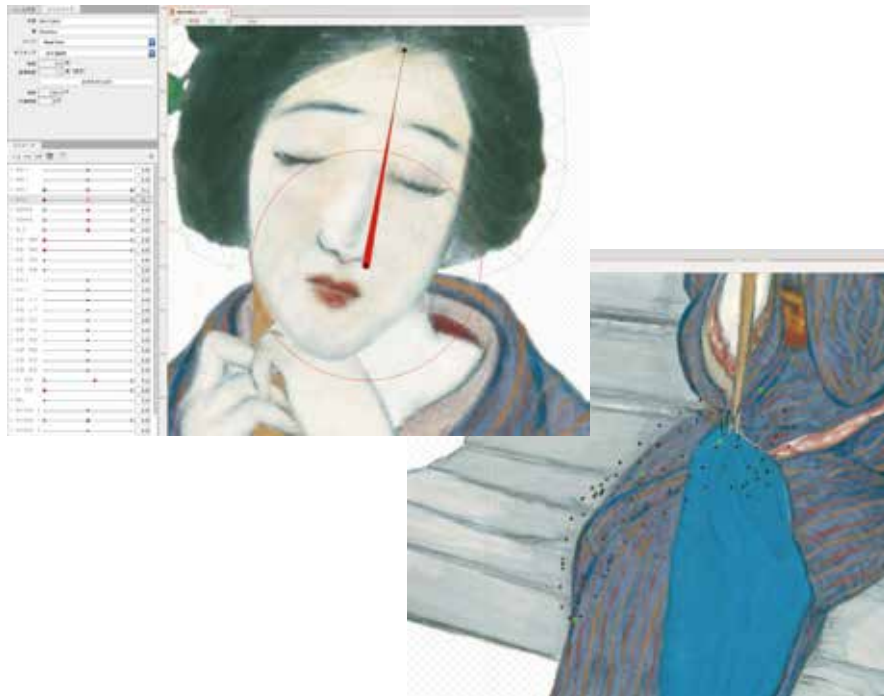


図7 ポリゴンメッシュの張り付け作業

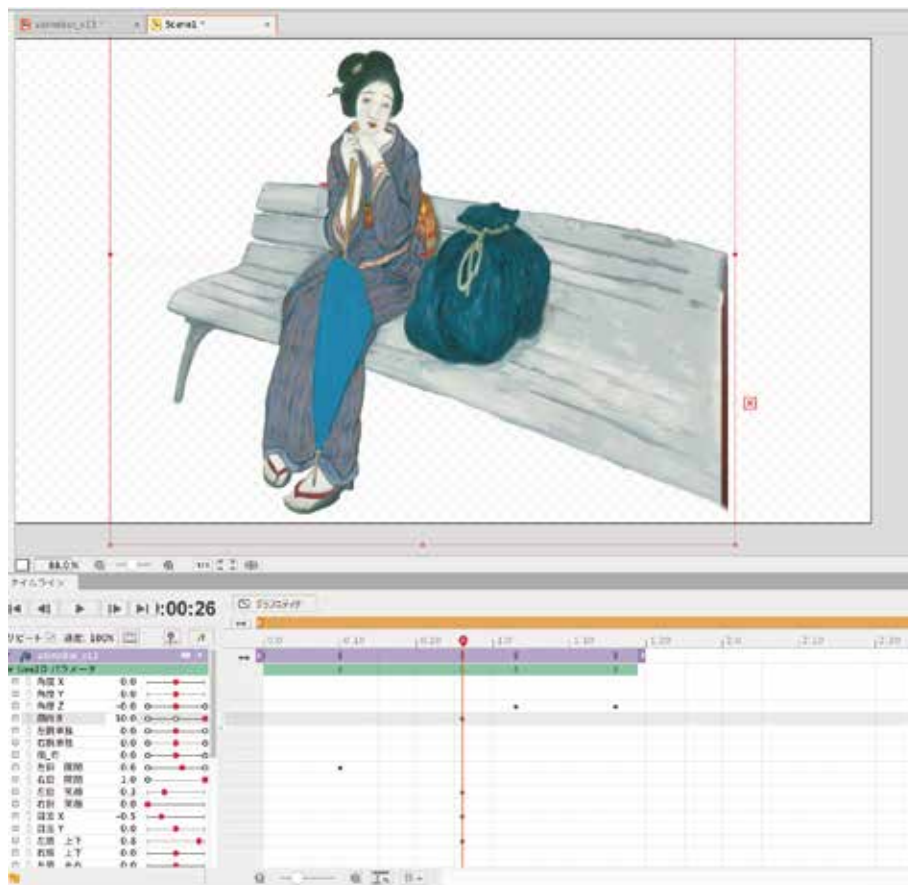


図8 タイムライン上のリグつきモデル

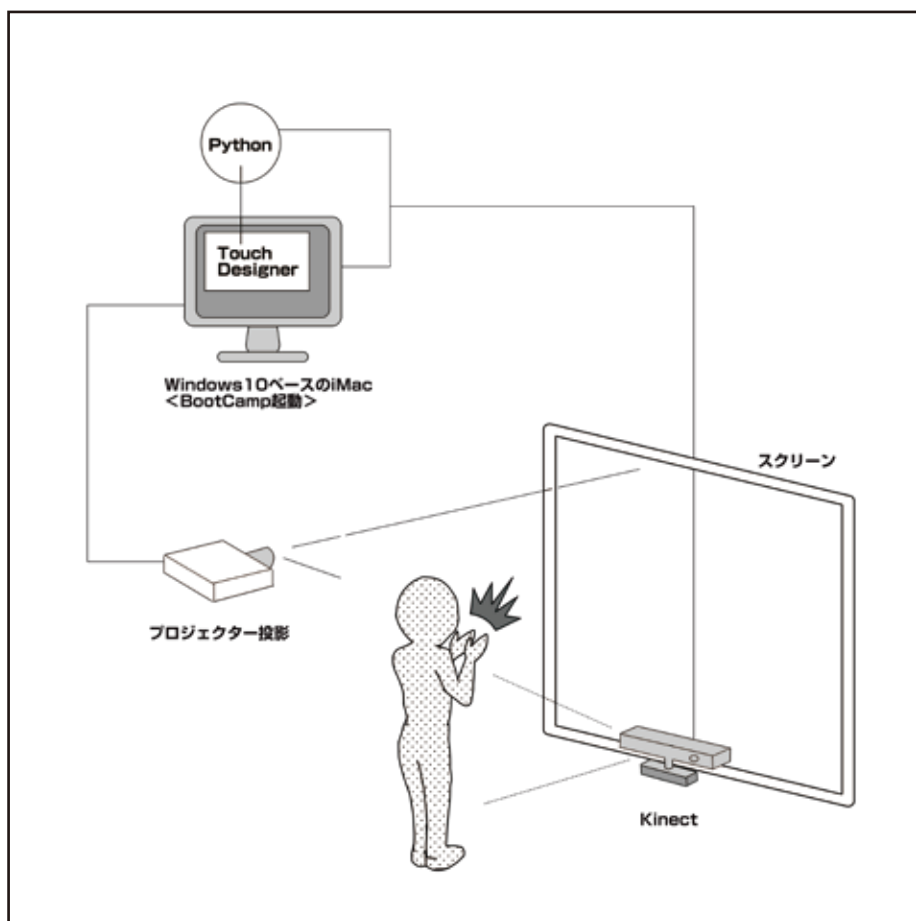


図9 インタラクティブコンテンツ化のためのワークフロー図

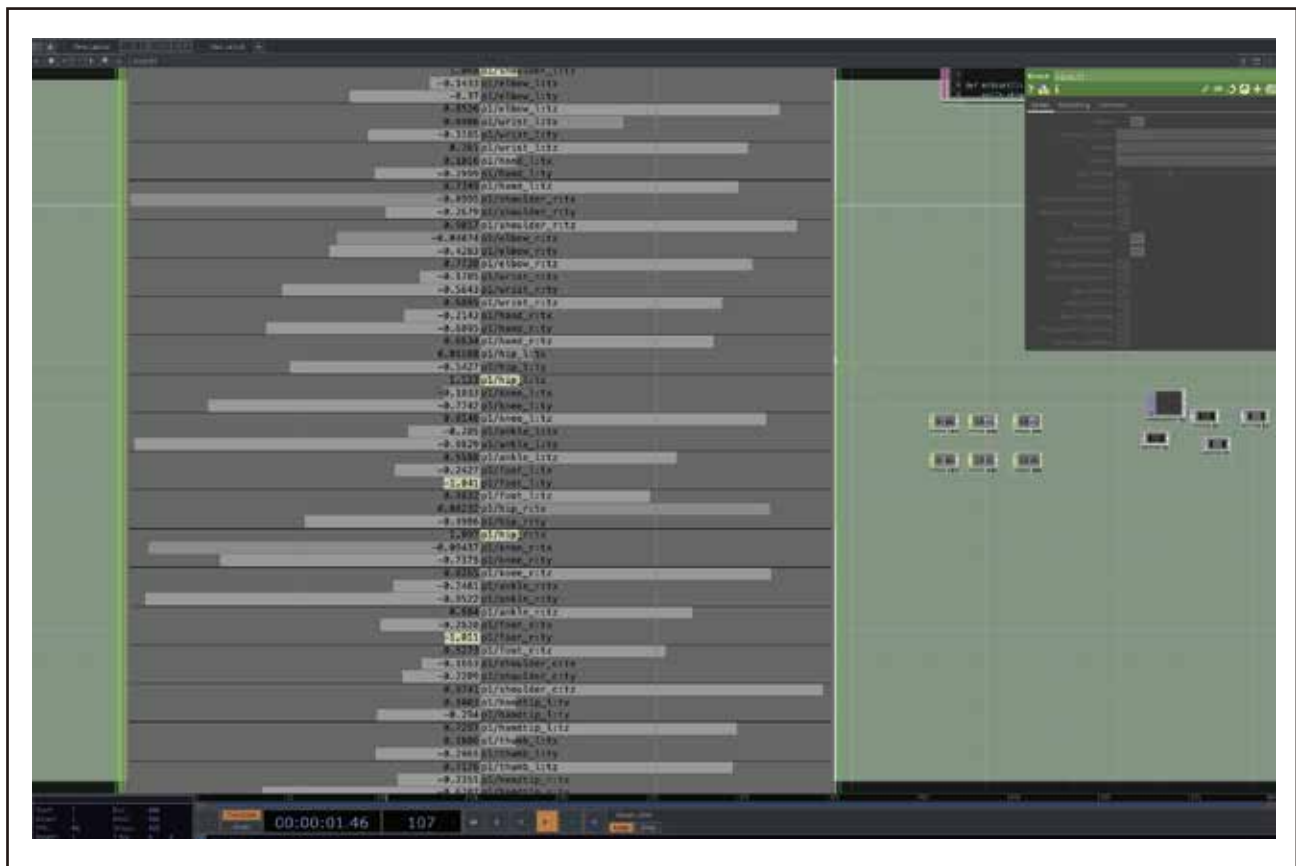


図 10 TouchDesigner で Kinect を設定



<https://vimeo.com/267814289>

パスワード ; yumejiaki

図 11 作品動画の実際「秋のいこい」(夢二郷土美術館所蔵作品)

下記は参考作品作品動画の実際 (複数人数化のためのトライアル動画。
当初研究目標にはなかったためまだ実装はできていない)



「こたつ」(夢二郷土美術館所蔵作品)
<https://vimeo.com/267814289>

パスワード ; yumejiaki

プラナリア多能性幹細胞集団内での生殖系列決定機構

津山工業高等専門学校 総合理工学科 先進科学系

前澤 孝信

生体内の細胞は体細胞系列と生殖系列に大別される。生殖系列は次世代に受け継がれる点で特殊であり、発生過程において体細胞系列とは別の運命をたどる。胚発生後に生殖系列が決定される動物においては、その決定機構はほとんど分かっていない。プラナリアでは、成体の全細胞の 30% を占める全能性幹細胞が体細胞と生殖系列へと分化できる。本研究では、生殖系列マーカーを用いて全能性幹細胞から生殖系列への分化挙動を解析することを目的とした。そこで、複数のマーカーを用いた発現解析を行うため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察系を立ち上げることにした。まず、全能性幹細胞と生殖系列細胞のマーカーである *Drpiwi-1* タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色法による蛍光シグナルの検出に成功した。次に、Whole mount *in situ* hybridization (WISH) 法による生殖系列細胞のマーカー *Dr-nanos* RNA の検出を試みた。しかしながら、条件検討を重ねたが、検出するには至らなかった。今後、さらなる条件検討を行い、マーカー遺伝子の多重染色を成功させ、プラナリア生殖系列の分化過程を明らかにしたい。

1. はじめに

生体内の細胞は体細胞系列と生殖系列に大別される。生殖系列は次世代に受け継がれる点で特殊であり、発生過程において体細胞系列とは別の運命をたどる。多くの動物において生殖系列は胚発生期に決定され、そのメカニズムの解析は進んでいる。一方で、胚発生後に生殖系列が決定される動物においてその決定機構は不明な点が多い。

プラナリアにおいては、成体の全細胞の 30% を占める全能性幹細胞が体細胞と生殖系列へと分化できる (文献 1、2)。しかしながら、全能性幹細胞の中のどの集団が生殖系列に分化するかは分かっていない。プラナリアの 1 種ナミウズムシ (*Dugesia japonica*) の無性個体において、背側の正中線領域に多能性幹細胞のマーカーである *Piwi* 遺伝子ファミリーの 1 つ *DjPiwi-1* 陽性の特殊な多能性幹細胞集団が存在する (文献 3)。また、前澤らは近縁種のリュウキュウナミウズムシ (*D. ryukyuensis*) において、アミノ酸トランスポーターホモログ *Dr-SLC38A9* が卵巣原基と共に背側の正中線領域にも強く発現することを見出した (Maezawa et al. in preparation)。このことは、卵巣原基と背側の正中線領域の多能性幹細胞に共通性があることを示唆している。このことから、背側

の正中線領域に、他の動物の始原生殖細胞と性質の似た、生殖系列へ運命づけられた多能性幹細胞が存在するのではないかと予想される。

本研究では、生殖系列マーカーを用いて多能性幹細胞から生殖系列への分化挙動を解析することを目的とした。まず、複数のマーカーを用いた解析を行うため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察系の開発を試みた。

2. 材料および方法

2-1. 実験動物

実験には淡水生プラナリアの一種リュウキュウナミウズムシ (*Dugesia ryukyuensis*) の無性クローン集団 OH 株を使用した。脱塩素した水道水を用い、20℃のインキューベータ内で飼育した。通常の飼育では、1、2 週間ごとに餌として鳥レバーを与えた。また、水交換は毎週行った。組織観察には 1 週間以上絶食させた個体 (体長 5-10 mm) を使用した。

2-2. 固定法

プラナリアの粘液を除去するために 2% 塩酸を含む 5/8 Holtfreter 氏液にて 4℃で 5 分間攪拌した。その後、4%PFA (パラホルムアルデヒド) および 5% メタノールを含んだ 5/8 Holtfreter 氏液を用いて室温

で30分固定した。メタノールで脱水した後、蛍光灯下において6%過酸化水素を含むメタノール中で室温で一晩処理をして脱色を行った。次に、メタノール：キシレン＝1：1の溶液に室温で1時間に置いた後、再びメタノールに置換して-30℃で保存した。

2-3. 免疫染色法

固定したプラナリアをPBT (0.1%Tween20を含む生理食塩水 PBS) を用いて室温で水和した。次に、プロテイナーゼ K 処理 (20ng/mL、37℃、12分) した後、4%PFA を含む生理食塩水にて室温で30分、再固定した。PBT にて室温で20分3回洗浄した後、ブロッキング液 (5-10% ヤギ血清を含む PBT) を用いて室温で1時間反応させた。次に、抗 Drpiwi-1 抗体 (文献4) の原液で4℃にて一晩反応させた。PBT を用いて室温で20分3回洗浄後、1/500に希釈した抗 Mouse IgG (Alexa 594) 抗体を含むブロッキング液にて4℃にて一晩反応させた。PBT にて室温で20分3回洗浄した後、ヘキスト 33342 で DNA を染色し、フルオロキーパー (ナカライテスク社) を用いてサンプルをスライドガラスに封入した。蛍光観察は共焦点レーザー顕微鏡 FV10i (オリンパス社) を用いて行った。

2-4. Whole mount *in situ* hybridization 法

2-2と同様の処理を行って再固定した後、*Dr-nanos* の RNA プローブを用いて56℃、16時間ハイブリダイゼーション反応を行った。次に、ホルムアミドを含む溶液にて56℃で複数回洗浄した。その後、1% Blocking Reagent (Roche 社) のみ、もしくは、1% Blocking Reagent および10% sheep serum、を含むマレイン酸バッファーもしくは TNT バッファーを用いて室温で1時間ブロッキングした。1/100に希釈した抗 DIG-POD (ジゴキシゲニン-ペルオキシダーゼ) 抗体を含むブロッキング液にて室温で3時間反応させた。マレイン酸バッファー (0.1% Tween 20を含む) もしくは TNT バッファー (100 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.3% Triton X-100) にて20分3回洗浄した後、TSA 増感システム (Perkin Elmer 社) を用いて蛍光 (Alexa 488) ラベルした。ヘキスト

33342 で DNA を染色した後、フルオロキーパー (ナカライテスク社) を用いてサンプルをスライドガラスに封入した。蛍光観察は共焦点レーザー顕微鏡 FV10i (オリンパス社) を用いて行った。

3. 結果

3-1. 免疫染色法の確立

多能性幹細胞と生殖系列細胞のマーカーとして Drpiwi-1 タンパク質が知られている (文献4)。中川らは Drpiwi-1 タンパク質に対するモノクローナル抗体を作成し、プラナリアの組織切片において検出に成功している。今回、個体まるごとで蛍光観察するために共焦点レーザー顕微鏡を用いた実験系を立ち上げることにした。個体の内部のタンパク質を検出するためには、抗体の浸透性を高める必要がある。通常、浸透性を高めるためには、PFA 固定した個体をプロテイナーゼ K 処理する方法が行われる。しかしながら、プロテイナーゼ K 処理だけでは免疫染色が上手くいかなかった。そこで、固定後の個体をメタノール：キシレン＝1：1で処理し、脂分を除くことにした。それにより、無性個体の卵巣原基で発現する Drpiwi-1 タンパク質の検出に成功した (図1)。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いることで卵巣原基全体を観察できることがわかった。

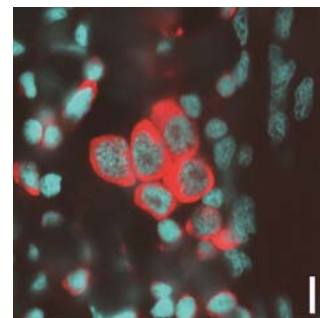


図1. 抗 Drpiwi-1 抗体による免疫染色

無性個体の卵巣原基における DrPIWI-1 タンパク質 (赤色) の検出に成功した。ヘキスト 33342 により DNA (青色) を染色している。腹側から見た図。上が頭部側。スケールバー：10 μ m。

3-2. Whole mount *in situ* hybridization 法の確立

Whole mount *in situ* hybridization (WISH) 法の確

立にあたり、生殖系列マーカーである *Dr-nanos* RNA の検出を試みた。ハイブダイゼーションまでの行程における条件はアルカリフォスフォターゼによる発色法で確立されている方法と同様に行った（文献 6）。その後のステップは、DIG-POD（ジゴキシゲニン-ペルオキシダーゼ）抗体と TSA 増感システムを組み合わせる方法に変更した。また、免疫染色法で成果のあった固定後の個体をメタノール：キシレン＝1：1 で処理する方法も採用した。しかしながら、*Dr-nanos* RNA は検出できなかった。興味深いことに、この WISH 条件後に *Drpiwi-1* の免疫染色を実施したところ、うまく検出できなかった。このことより、WISH のいずれかのステップで抗体反応が阻害されていると考えられた。そこで、抗体反応前のブロッキングの条件が強すぎる可能性を考え、DIG-POD 抗体の反応に用いるブロッキング液を 1% Blocking Reagent および 10% sheep serum から 1% Blocking Reagent のみに変更した。しかしながら、それでも WISH および免疫染色ともにシグナルを検出できなかった。次に、別種 *Schmidtea mediterranea* を用いて、King らが成功している条件を参考にして抗体反応のバッファーをマレイン酸バッファーから TNT バッファーに変更した。しかしながら、これでも WISH および免疫染色ともにシグナルを検出できなかった。

4. 考察

今回、共焦点レーザー顕微鏡を用いて *Drpiwi-1* タンパク質の蛍光シグナルの検出に成功した。また、この方法で卵巣原基全体を観察できることがわかった。今回の成果は、卵巣原基において遺伝子発現を解析していく上で大きな土台となる。また、免疫染色では、メタノール：キシレン＝1：1 で処理することが効果的であった。脂分を除くことで抗体の透過性が向上して検出感度へ影響を与えたと考えられる。

次に、WISH 法の検討を行ったが、実験系の確立には至らなかった。また、この WISH の条件では免疫染色もうまくシグナルが検出できなかった。今回、ブロッキング処理やバッファーを検討したが

改善は見られなかった。ナミウズムシや *S. mediterranea* における WISH 条件を参考にしてさらなる条件検討を行い、リュウキュウナミウズムシにおける WISH の蛍光検出系の確立を目指したい。そして、マーカー遺伝子の多重染色を成功させ、プラナリア生殖系列の分化過程を明らかにしていきたい。

5. 参考文献

- (1) Wagner DE, Wang IE, Reddien PW. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science*. 2011. 332, 811-6.
- (2) Sato K, Shibata N, Orii H, Amikura R, Sakurai T, Agata K, Kobayashi S, Watanabe K. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of *nanos*-related gene in planarians. *Dev Growth Differ*. 2006. 48, 615-28.
- (3) Rossi L, Salvetti A, Lena A, Batistoni R, Deri P, Pugliesi C, Loreti E, Gremigni V. *DjPiwi-1*, a member of the PAZ-Piwi gene family, defines a subpopulation of planarian stem cells. *Dev Genes Evol*. 2006. 216, 335-46.
- (4) Nakagawa H, Ishizu H, Hasegawa R, Kobayashi K, Matsumoto M. *Drpiwi-1* is essential for germline cell formation during sexualization of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Dev Biol*. 2012. 361, 167-76.
- (5) Nakagawa H, Ishizu H, Chinone A, Kobayashi K, Matsumoto M. The *Dr-nanos* gene is essential for germ cell specification in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Int J Dev Biol*. 2012. 56, 165-71.
- (6) Maezawa T, Tanaka H, Nakagawa H, Ono M, Aoki M, Matsumoto M, Ishida T, Horiike K, Kobayashi K. Planarian D-amino acid oxidase is involved in ovarian development during sexual induction. *Mech Dev*. 2014. 132, 69-78.
- (7) King RS, Newmark PA. In situ hybridization protocol for enhanced detection of gene expression in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *BMC Dev Biol*. 2013. 13:8.

高演色LED光源を用いた農産物の外観色評価装置の開発

津山工業高等専門学校

眞鍋 由雄

農作物などの出荷や品質検査において外観検査は重要であり、光学的な方法が有用である。また、農作物の外観色としてよくみられる色彩として、イチゴの赤色、リンゴの赤色部分、トマトの赤色、ブドウの赤色成分、食肉の赤色部分など赤色が重要な食品がある。これらの赤色成分を高感度に検査するには、照明光源として演色性（平均演色評価数の R_a や特別演色評価数 R_9 ）が高いものをよしとされる。ところで、照明光源は、電球や蛍光灯から、省エネを考慮したLED光源に移行している。しかしながら、蛍光灯やLEDの演色性は、電球に比べると非常に低い。光源の演色性は、光源の発光スペクトルの分光分布と関係があり、本研究では、加法混色法によってLED光源の発光スペクトルの分光分布を計算して、演色性の改善を図った。その結果、白色LED、緑色、赤色LEDによる簡単な構成で高い R_9 を得られる色度座標範囲がある事がわかった。本研究は、プロトタイプの高演色LED光源を設計し、高い R_9 値（ >90 ）を得る事を実験で確認した。

1. はじめに

農作物などの出荷や品質検査は、人間によって良否を決める官能検査で行われている。この外観検査は、照明光源が重要である。農作物の外観色の色彩としては、赤色が重要視される。赤色を重要視される農作物は、イチゴ、トマト、リンゴ、桃や、食肉などがある。このように赤色成分を高感度に検査するには、演色性が重要とされている[1]。この光源の演色性を評価する指標に平均演色評価数（ R_a ）や赤色の特別演色評価数（ R_9 ）があり、高い指数ほど赤色を評価する照明光源を良いとされる。第1図に、平均演色評価数が80と90の光源で、トマトを撮影した写真を示す。



第1図 R_a の違う光源によるトマトの撮影写真

$R_a=80$ の写真（左）の赤色は、少しどす黒さがあり、右の R_a が90で撮影された方が、赤色は鮮やかにみえる。このような事は、例えば、百貨店内の試着室で選んだ衣服が、試着室外で見ると、衣服の色の鮮やかさが違う事を体験するのと同じである。

ところで、最近、光源は電球や蛍光灯からLED光源へと移行している。LED光源の消費電力は、電球の $1/4$ 、蛍光灯の $1/2$ となり、省電力に向いている。しかし、LED光源は、赤色成分を評価する

R_9 の高いものがなかった。第1表に、電球、蛍光灯、および既存のLED光源における平均演色評価数や赤色の特別演色評価数を示す。さらに比較のために、赤色、緑色、青色の単色LEDで構成したLED光源（RGB三原色LED）の R_a 、 R_9 も示す。平均演色評価数や赤色の特別演色評価数は基準光による試験色の見えを100としているので、電球の R_a 、 R_9 は共に高い値であり、蛍光灯の R_a 、 R_9 は86.5、40.1であり、 R_a は高いが R_9 は低い。LED光源の場合、 R_a は80、90と高いが、 R_9 は8.0、72.6と低い。

第1表 各種光源（電球、蛍光灯、 R_a の違う既存白色LED、RGB三原色LED）の R_a 、 R_9

	R_a	R_9 (赤)
蛍光灯	86.5	40.1
LED光源 (R_a80)	82.2	8.0
LED光源 (R_a90)	94.6	72.6
電球	97.4	93.9
RGB三原色LED	10.9	-179.1

赤色、緑色、青色の単色LEDで構成したLED光源（RGB三原色LED）の R_a 、 R_9 は、10.9、-179と非常に低い値であった。

さらに、映像分野であるが、高精細度4K、8K映像や次世代移動体通信の第5世代において、映像のあざやかさは技術の発達に伴い、撮影照明に演色性の高い（とくに、赤色を鮮やかに見える）高演色光源が要望されている[2]。

本年度の研究では、演色性の改善する、とくに赤色

を鮮やかに見えるLED光源を開発し、プロトタイプ
の光源で実証することを目的とする。

2. 光源の演色性

2.1 光源の演色性評価方法

一般に光源の演色性は平均演色評価数Raで表わせる。LED電球のパッケージにはRa80などと記載されている。現在の演色性評価方法は、CIE（国際照明委員会）が定めた方法で、相関色温度ごとに決められた基準光による試験色の見えを100としたとき、演色性を評価する光源の下では試験色がどの程度ずれているかを数値化したものである。CIEでは14種類の試験色を用いるが、日本では平均的な日本人女性の肌の分光反射率をもとにNo.15の試験色を追加し、第2表に示す15種類の試験色を用いる。試験色iに対して計算される演色評価数Riは、次式により計算される[3]。

$$R_i = 100 - 4.6\Delta E_i \quad (\text{式1})$$

ここで、 ΔE_i ($i=1\sim15$) は、CIE1960均等色空間における色差であり、CIE1960uv色度座標上での基準光源下の色度と試験光源下の色度との差である。

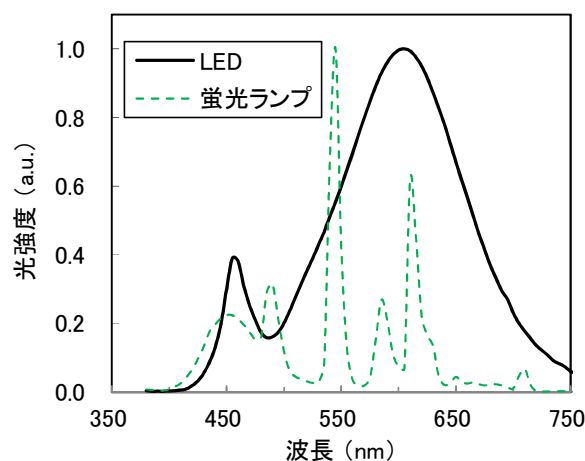
第2表 演色評価数の計算に用いられる試験色

試験色番号	色名	備考
No. 1	くすんだ黄みの赤	
No. 2	明るい灰みの黄	
No. 3	くすんだ黄緑	
No. 4	くすんだ緑	
No. 5	くすんだ青緑	
No. 6	明るい紫みの青	
No. 7	明るい青紫	
No. 8	明るい赤みの紫	
No. 9	赤	
No. 10	黄	
No. 11	緑	
No. 12	こい青	
No. 13	明るい灰みの黄赤	西洋人女性の顔色
No. 14	暗い灰みの黄緑	木の葉の緑
No. 15	灰みの黄赤	日本人女性の顔色

これらの15種類の試験色に対して計算されたRiのうち、平均演色評価数Raは、R1～R8に対する演色評価数の平均値であり、2010年に改訂されたJIS Z9110 照明基準総則に加えられた。例えば、事務所の執務空間の場合はRa80以上と明記されている。演色評価数は色の見えの良さを表すのではなく、基準光の演色性をどれだけ忠実に再現しているかという色再現の忠実性を表す指標である。よって試験光源の下では何色があざやかにみえるのか、またはくすんでみえるのか、どの色相が変化するのかといったずれの方向はわからない。しかし、電球や外光などの基準光に近い光源で、今まで外観色の差異を検査してきたので、LED光源の演色性は大事と判る。また、平均演色評価数Raは、8種類の試験色に対して計算された各演色評価数の平均値であることに注意する必要がある。例えば、既存の白色LEDは青色LEDに黄色蛍光体を用いて白色化している。この白色LEDの場合、平均演色評価数Raが80以上であっても、試験色R9（赤）に対する各演色評価数は、他の試験色に対する各演色評価数に比べて極端に低いものである。

2.2 演色性の改善

演色性は、光源の発光スペクトルの分光分布の形状と関係している。LED光源は、従来光源に比べて発光スペクトルの分光分布の形状の制御が容易といわれている。第2図に、白色LEDと蛍光ランプの発光スペクトルを示す。蛍光ランプは、管内にアルゴンと水銀を封入し、低圧放電によって水銀を励起し、紫外線を発生させて、その紫外線によって、青色、緑色、赤色の蛍光体を発光させる。一般的なLED光源は、青色LEDと、青色LEDによって励起された1種類以上の蛍光体で発光させている。発光スペクトルの分光分布の形状が単純なので、LED光源の方が制御しやすいと考えられている。



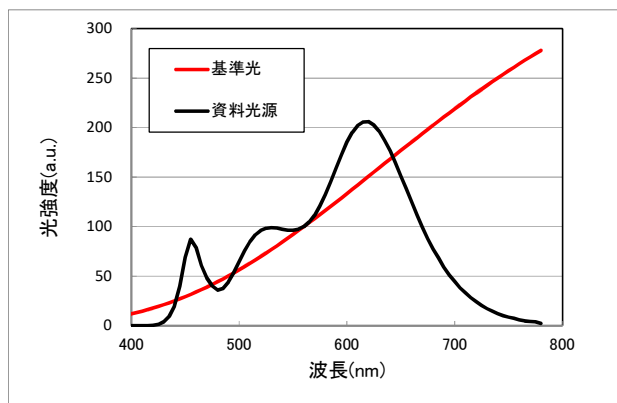
第2図 LED、蛍光ランプの発光スペクトル

LED光源の演色性についてさらに詳細を述べる．平均演色評価数 R_a が90以上のLED光源における，平均演色評価数と特殊演色評価数($R_9 \sim R_{15}$)を第3表に示す．LED光源の発光スペクトルと，演色評価数を計算するときの基準光の発光スペクトルを第3図に示す．第3表の中段がLED光源の発光スペクトルと基準光との各演色評価数の試験色から求めた色差を表現する値，下段が演色評価数 R_i の数値である．

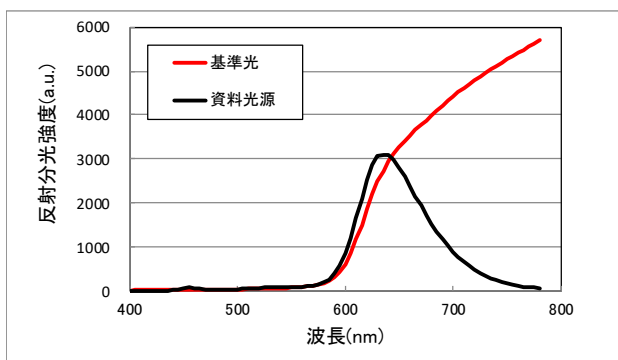
第3表 既存LED光源における演色評価数と色差

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R_a	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15
Ei	0.3	0.6	1.1	0.4	0.5	2.3	2.4	4.2	8.5	1.3	2.0	3.3	0.6	0.4	1.6	
Ri	98.5	97.0	94.9	98.3	97.6	89.5	88.9	80.9	93.2	60.8	93.9	90.6	84.7	97.4	98.2	92.7

平均演色評価数 R_a は，93.2と高いが，赤色の特殊演色評価数(R_9)は，60.8と低く，色差も8.5と大きい．第3図において，資料光源(R_a が93.2の既存LED光源)と基準光のスペクトルを比較すると，資料光源は630nm以上の光強度が低いことがわかる．さらに，第4図に，資料光源と基準光で R_9 の試験色に照射したときの反射分光スペクトルを示す．第4図のスペクトルから色差を求めるので，第4図のスペクトルの形状は，第3表中の R_9 の色差に反映している．波長が630nm付近まで，2つのスペクトルの挙動は，同じ動きであったが，630nmを超えた波長で，資料光源の値は小さくなった．630nm付近の値を増加させること，すなわち，赤色を増加させることが重要とわかる．第5図に白色LED，赤色LED

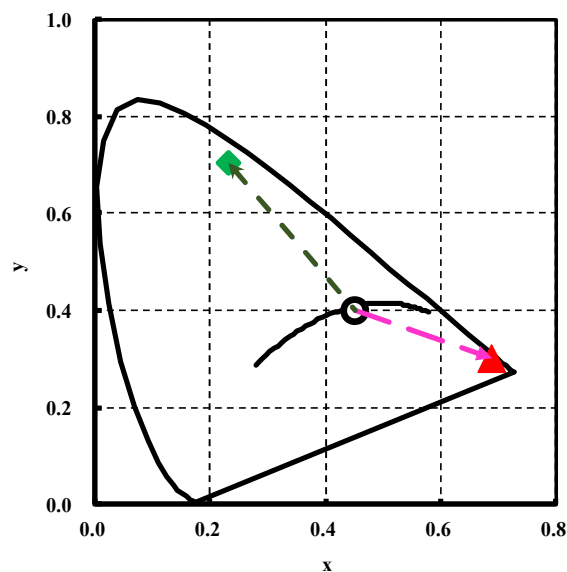


第3図 LED光源(資料光源)と基準光の発光スペクトル



第4図 LED光源(資料光源)と基準光を試験色(R_9)に照射して反射した時の反射分光スペクトル

D，緑色LEDの色度座標を， $x y z$ 系色度座標で，発光スペクトルの形状の制御について説明する．



第5図 各LEDの $x y z$ 系色度座標

既存の白色LEDの発光スペクトルの形状に，赤色領域の発光を追加する．そうすると，第5図で示すように，白色LEDの色度座標(\circ)に赤色LEDを加えると，赤色LEDの色度座標(\blacktriangle)方向に色度座標が動く(ピンク色の矢印)．この赤色への動きの補正として，緑色LEDを加えると，元の白色LEDの色度座標に保つことができる(深緑色の方向の矢印)．以上の説明の方法を用いると，白色LED，赤色LED，緑色LEDの各色度座標で囲まれた領域で，白色LED，赤色LED，緑色LEDの3つの発光スペクトルを混合させて，LED光源の発光スペクトル形状の制御が可能となる．このように複数の光源による発光スペクトルを混合する方法を加法混色法という．

2.3 加法混色法による発光スペクトルの制御

本研究で開発されるLED光源は，白色LED，緑色LED，赤色LEDを用いて，LED光源の発光スペクトルを制御する．まず，各LEDを受光器で測定し，3つの等色関数を用いて得られる測光値を，LEDごとに X_i, Y_i, Z_i (各LEDを $i=w, g, r$ とする)とすると，色度座標(x_i, y_i)との関係は以下ようになる[3]．

$$x_i = \frac{X_i}{X_i + Y_i + Z_i}, \quad y_i = \frac{Y_i}{X_i + Y_i + Z_i} \quad (i = w, g, r) \quad (\text{式2})$$

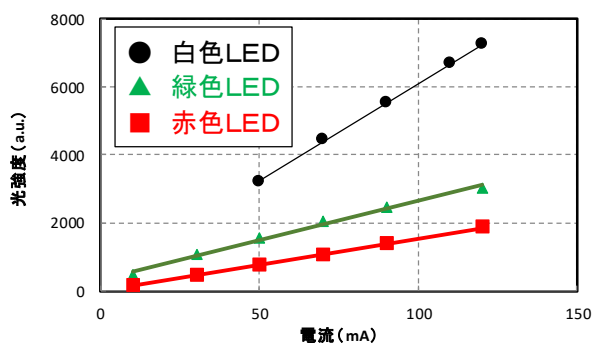
白色LED，緑色LED，赤色LEDの光強度を変化しても，それぞれの発光スペクトルの形状が変化しないと仮定すると，各LEDを加法混色して得られた発光スペクトルの形状で，式2で得られた色度座標を x, y とする．ここで，白色LED(w)，緑色LED(g)，

赤色LED (r) の各LEDを混色するための光強度の比率係数 $a_i(w, g, r)$ とすると、加法混色した発光スペクトルの色度座標 (x, y) は、

$$x = \frac{\sum_i a_i \cdot X_i}{\sum_i a_i \cdot (X_i + Y_i + Z_i)}, \quad y = \frac{\sum_i a_i \cdot Y_i}{\sum_i a_i \cdot (X_i + Y_i + Z_i)} \quad (\sum_i a_i = 1) \quad (式3)$$

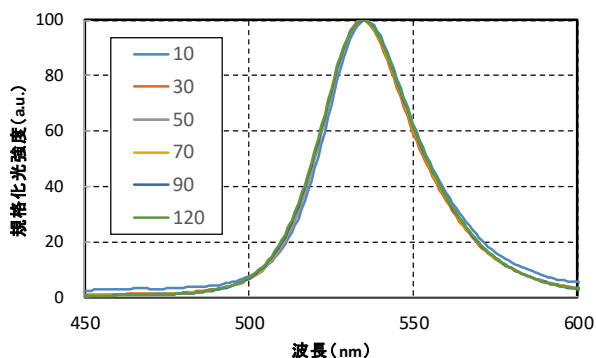
となる[3]．各LEDの光強度から得られる測光値を X_i, Y_i, Z_i (各LEDを $i=w, g, r$ とする) とし、加法混色した発光スペクトルの色度座標を (x, y) とすると、各LEDの光強度係数 a_i が求めることができる．

赤色LED、緑色LEDの発光スペクトル特性について述べる．第6図に白色LED、赤色LED、緑色LEDの光強度の電流依存性を示す．使用した各LEDの定格電流である120mAまで増加させた．この電流範囲で、3つのLEDは電流値に対して線形性がある．



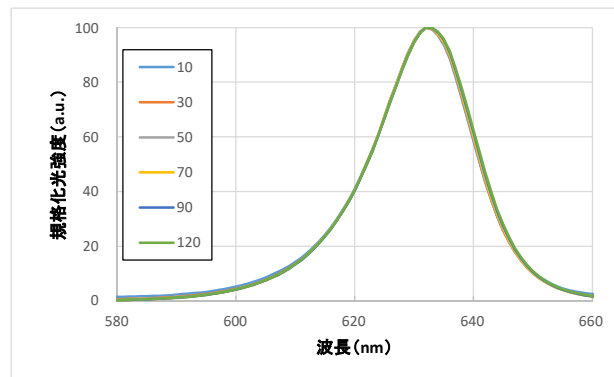
第6図 白色、赤色、緑色LEDの光強度の電流依存性

第7図、第8図に、赤色、緑色LEDにおける電流値ごとの光強度の最大値で規格化した発光スペクトルを示す．第8図に同じく電流値ごとにおいて光強度の最大値で規格化した赤色LEDの発光スペクトルを示す．緑色LEDの発光スペクトルの場合、10～120mAの電流値で535nm付近に最大となり、各電流値の発光



第7図 光強度の最大値で規格化した
緑色LEDの発光スペクトル

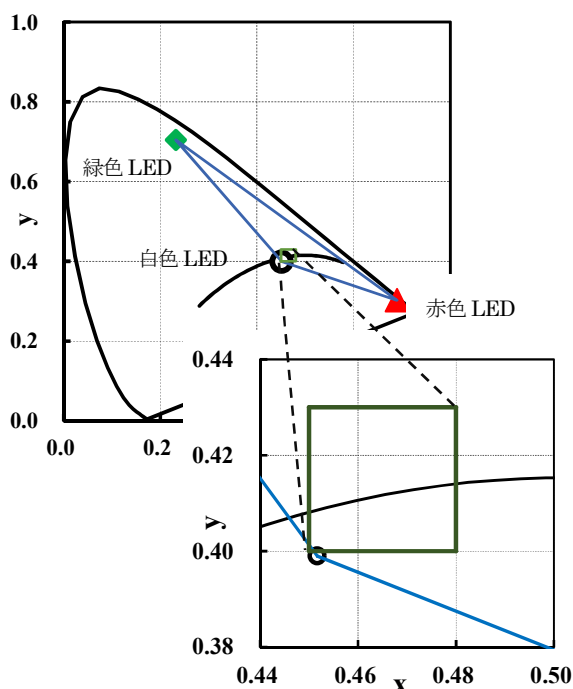
スペクトルの形状は、ほぼ同じであった．一方、赤色LEDの場合でも、10～120mAの電流値範囲で、発光スペクトルの光強度の最大値の波長は、632nm付近であった．各電流値における発光スペクトルの形状は、電流値の変化に係わらずほぼ同じであった．



第8図 光強度の最大値で規格化した

赤色LEDの発光スペクトル

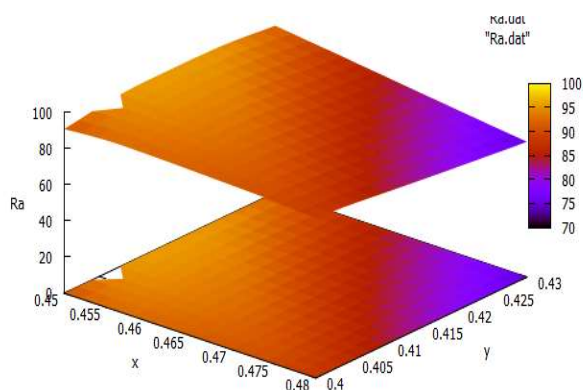
以上の実験結果から、赤色、緑色LEDの定格電流値である120mA以下において、発光スペクトルの形状は、電流値に関係なくほぼ同形であるので、色度座標 (x, y) を与えれば、式3の各LEDの光強度係数 a_i を求めて、各LEDの光強度が得られ、第6図から、各LEDを駆動する電流が求めることができる．すなわち、各LEDに上記方法で求めた電流値を供給すれば、色度座標 (x, y) となる発光スペクトルが得られ、演色性を求めることができる．演色性を求める色度範囲として、 x 座標を0.45～0.48、 y 座標を0.40～0.43であり、その範囲を第9図に示す．



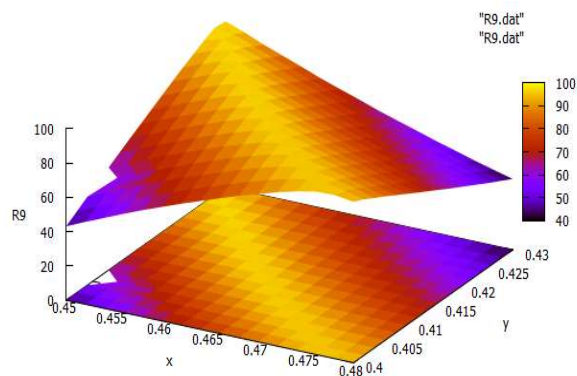
第9図 計算する色度座標 (x, y) の範囲

2.4 計算結果

色度座標(x, y)をパラメータとして、第9図に示す色度座標範囲で、式(3)を用い各LEDの光強度係数 a_i が求めて、色度座標ごとに、発光スペクトルを合成し、平均演色評価数、特殊演色評価数を求めた。各LEDは、日亜化学工業製の白色LED(NF2L757GRT)、緑色LED(NE2G757GT)、赤色LED(NCSR119BT-V1)を使って、白色、緑色、赤色LEDの電流値を、70mA、30mA、50mA引加した時の発光スペクトルを初期値とした。白色LEDの平均演色評価数 R_a 、特別演色評価指数 R_9 の実測値は、92.8、61.8であった。第10図に色度座標(x, y)の範囲(第9図)における平均演色評価数 R_a を示し、第11図に特殊演色評価数 R_9 (赤色)を示す。



第10図 計算結果 平均演色評価数 R_a



第11図 計算結果 特別演色評価指数 R_9

平均演色評価数 R_a の値は、色度座標(x, y)の範囲内においてほぼ80以上であり、色度座標(x, y)の x, y の色度座標値の大きな領域で、減少傾向であった。一方、赤色の特別演色評価指数(R_9)は、色度座標(x, y)の範囲内において、白色LEDの測定値である61.8以上であった。その最大値は、97.7に達した。演色性は大きく改善された。第4表に R_9 が最大になった時のその他の演色評価数の値を示す。

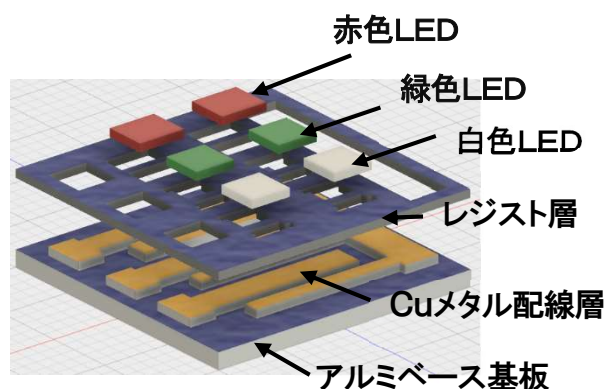
第4表 R_9 値が最大時のその他の演色評価数

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R_a	R_9	R10	R11	R12	R13	R14	R15
既存	98.5	97.0	94.9	98.3	97.6	89.5	88.9	80.9	93.2	60.8	93.9	90.6	84.7	97.4	98.2	92.7
本研究	90.4	98.7	86.2	85.8	93.3	96.9	95.0	94.4	92.8	97.7	93.7	79.7	80.4	91.9	89.8	95.8

特別演色評価数 R_9 は97.7の最大値となり、その他の平均演色評価数、特殊演色評価数も80以上を示した。この演色性の特性は、高精度4K、8Kテレビの撮影用照明の演色性の条件を満たしている[2]。

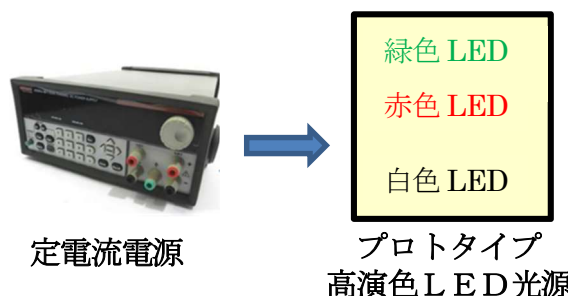
3. プロトタイプ高演色性LED光源の作製

第2章で示したように、白色LEDに赤色、緑色LEDを加えた構成で、白色LEDの演色性を改善できる可能性を示した。この構成を実現するために、白色、赤色、緑色の各色LEDを2個並列接続した構成のプロトタイプ高演色性LED光源を作製した。第12図にその光源の構成を示す。アルミ板の基板の上に、絶縁性



第12図 プロトタイプ高演色性LED光源の基板

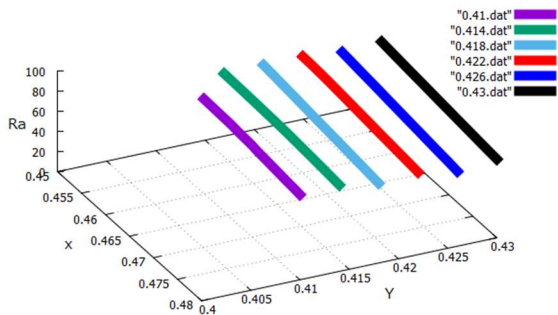
薄膜を作製し、その上に銅箔のCuメタル配線層を作製した。各LEDの配線パッドと銅箔と接続させるためのレジスト層をCuメタル配線層の上に構成した。各LEDの配線パッドと銅箔とを半田を介して接続して、プロトタイプ高演色性LED光源を作製した。第13図に実験方法を示す。プロトタイプ高演色性LED光源を、白色、赤色、緑色LEDを三元の定電流電源で駆動させた。



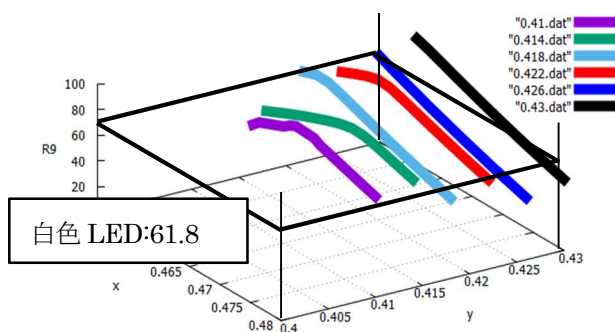
第13図 実験方法の説明

プロトタイプ高演色性LED光源に、2章で求めた電流値を、三元の定電流電源で供給してLED光源を発光させた。発光スペクトルをミノルタ製照度計にて、色度座標、平均演色評価数、特殊演色評価数を測定した。第14図、第15図に、平均演色評価数(R_a)、

赤色の特殊演色評価数 (R 9) の測定値を示す。y 座標を一定して、x 座標を変化させて、R a, R 9 を求めた。R a は、計算結果の結果とよく一致し、80 以上であった。



第 1 4 図 測定結果 平均演色評価数



第 1 5 図 測定結果 赤色の特殊演色評価数 (R 9)

赤色の特殊演色評価数 (R 9) は、計算結果で最大値となる色度座標で、最大値 96 を得た。測定した色度座標の範囲において R 9 は、計算結果と同様の挙動を示した。既存白色 LED に赤色、緑色 LED を加えて、演色性の改善ができた[1]。

4. まとめ

既存白色 LED の演色性は低い、とくに、特殊演色評価数の R 9 (赤色) は低い。この既存の白色 LED に赤色、緑色単色 LED を加える単純な構成で、演色性の改善することを、加法混色法を用いて検討し、高い R 9 を得ることを示した。既存 LED 光源の R 9 が 61.8 である光源を、本提案の構成で R 9 が 90 を超える色度座標の領域にあることを示した。この計算結果を基に、白色 LED に、赤色、緑色 LED を同一アルミベース基板上に配置したプロトタイプ高演色 LED 光源を作製した。定電流電源によって、プロトタイプ高演色 LED 光源の電流値を制御して R 9 が 90 を超える色度座標領域を示した。最大値は 97 であり、この値は計算結果とほぼ一致した。

今後、高光束の高演色 LED 光源を設計・作製し、現実の農作物の評価を実施する予定である。

5. 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。

参考・引用文献

- 1) 平成 29 年度 (第 64 回) 電気・情報関連学会中国支部連合大会論文集, R17-11-05 (2017.10.21).
- 2) T.Hayashida, et al., "Appropriate indices for color rendition and their recommended values for UHDTV production using whiteLED lighting," Optics EXPRESS, vol. 25, no.13, pp. 15010-15027, 2017.
- 3) 大田登 色彩工学 第 2 版, 東京電機大学出版局出版

再生を保証する自己複製/分化スイッチング機構の解明

津山工業高等専門学校 総合理工学科 先進科学系

柴田典人

本研究では再生能力の非常に高いプラナリアをモデル生物として用い、ES 細胞や iPS 細胞に代表される分化全能性幹細胞の in vivo における自己複製/細胞分化のスイッチング機構の分子メカニズムを明らかにすることを

目としている。分化全能性の細胞は我々哺乳類では発生過程のごく初期に一過的に現れるため、in vivo での解析が困難である。一方プラナリアは、成体を構成する全細胞の約 30%が全能性幹細胞である新生細胞であり、in vivo における全能性幹細胞研究において優れたモデルとなる。申請者はこれまで、プラナリアの全能性幹細胞が成体でどのように維持され、またどのように分化細胞を生み出すのか分子レベルで解析してきた。本研究では、プラナリア Plac8 相同遺伝子の発現の有無が細胞分裂を定常型（自己複製）と細胞分化に向かわせるための誘導型とに分ける可能性に着目した。その結果、Plac8 を起点とし、転写因子を介したスイッチング機構の存在が示唆された。

1. はじめに

iPS 細胞の樹立により、組織、器官の作成による再生医療に対する期待が大きくなってきた（文献 1）。しかしながら in vitro で組織を作成する場合、厳密な分化誘導法の開発や適切な大きさの組織を作る必要があるなど、克服すべき点が数多く存在するのも実情である。成体に iPS 細胞自体を移植してその場で組織を作ることができれば最も手間がかからない究極の再生医療となるが、実際には腫瘍化してしまう。我々ヒトが in vivo で iPS 細胞のような体を構成するすべての細胞種に分化できる能力（分化全能性）を有する細胞をコントロールできない理由の一つに、有尾両生類を除く四足動物の再生能力の低さ、が考えられる。

無脊椎動物には、個体の一部から新しい個体を再生させる無性生殖によって増殖する種が多く存在する（文献 2）。これらの中には成体になっても、体の中で分化全能性幹細胞を正常に維持し、恒常性や無性生殖時に必要とされる分化細胞を正確に供給できる種が多く存在している。なぜヒトは分化全能性幹細胞を生体内でコントロールできないのか、という疑問に答えるためには、実際に成体内で維持されている全能性幹細胞がどのような特徴を持っているのか、維持のメカニズムはどのようなものか、などを

理解し、ヒトと比較することが重要となる。我々は成体の全身に分化全能性幹細胞を持つプラナリアを実験動物とし、その全能性幹細胞の維持、分化の分子機構を明らかにすることを目的としている。



図1 日本産プラナリア、ナミウズムシ (*Dugesia japonica*)。体長は約 1cm で、日本全国で普遍的に見られる。

日本産プラナリアのナミウズムシ (*Dugesia japonica*) は淡水産で非寄生性の扁形動物である（図 1）。体長は約 1 cm 程度で日本全国からユーラシア大陸の比較的流れの緩やかな小川や池などに生息している。このプラナリアは雄性・雌性の生殖細胞の受精による有性生殖とは別に、個体がある程度成長すると体の中央付近でくびり切れ、それぞれの断片が完全な個体へと再生することで増殖する無性生殖を行うことが知られている。人為的にメスでプラナリ

アを切断することでも、この個体再生を惹起することができる。我々が実験に用いているプラナリアは姫路工業大学（現兵庫県立大学）の渡辺憲二博士が1991年に岐阜県で採集した1匹を、個体再生による無性生殖で26年（！）にわたり維持し続けているクローン集団である。この驚くべき再生能力は、プラナリアの全身に分布する全能性幹細胞である「新生細胞」によって支えられている（図2）。

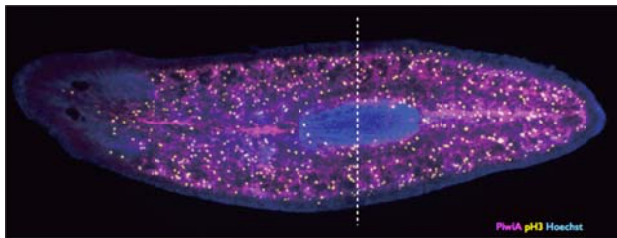


図2 プラナリアの分化全能性幹細胞である新生細胞の分布。マゼンタはすべての新生細胞を示し、黄色は細胞周期のM期の新生細胞を示す。

新生細胞は恒常的に分裂し、恒常性の維持において分化細胞を供給している（文献3）。個体を切断し、再生を促すとこの分裂が一過的に増強され、速やかに必要とされる分化細胞を産生することが報告されている。細胞分裂には幹細胞の維持に必要な自己複製と、細胞分化に必要な分裂の2種類（厳密にはこれを同時に行う非対称分裂の3種類）が存在している。我々が研究に使用しているプラナリアのクローン集団は26年にわたり、これらの分裂様式の制御を精妙に行うことで、新生細胞を枯渇させることなく、かつ必要な分化細胞を供給し続けている。近年、多くの新生細胞特異的遺伝子の解析が行われているが、新生細胞の細胞周期の自己複製と細胞分化のスイッチングに関する研究はほとんど行われていないのが現状である（文献4）。そこで本研究ではプラナリアの新生細胞が成体内でどのようなメカニズムで自己複製/細胞分化のスイッチングを行っているのか、について明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

(1) 実験動物

ナミウズムシ (*Dugesia japonica*) のクローン系統である SSP 系統 (Sexualizing Super Planarian)

を用いた ($2n=16$)。プラナリアはオートクレーブ滅菌した飼育水で24度で飼育し、餌としてトリまたはウシのレバーを1~2週に1回与えた。実験前1週間は絶食させた。再生を惹起するために、氷上に湿らせたろ紙3枚を重ね、その上にプラナリアを静置し、メスを用いて切断し、飼育水に戻した。

(2) 2重鎖RNA合成

T7プロモーターを持つpBluescriptベクターのT7配列を含む位置にプライマーを設計し、ベクターのマルチクローニングサイトの逆側の配列にT7配列を付加したプライマーとで間に挿入されている目的遺伝子をPCRによって増幅した。PCR産物を鋳型として、MEGAscript (T7) キットを用いて両方向のRNAを合成し2重鎖RNAを形成した。DNAase処理、フェノール/クロロホルム処理した2重鎖RNAを2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になるよう水に溶かした。

(3) RNA干渉法 (RNAi)

コントロール用の gfp または Djplac8 遺伝子の2重鎖RNAをレバー抽出液に加え、アガロースによって固めたものを1シャーレあたり15匹のプラナリアに与えることでRNA干渉法を行い、Djplac8遺伝子の機能阻害個体を作出した。

(4) JNK阻害剤実験

JNKシグナリングの特異的な阻害剤であるSP600125を100 mMの濃度でDMSO中に溶かしたものをストック溶液とした。切断直後のプラナリアを最終濃度25 μM のSP600125入りの飼育水で飼育しJNKシグナルを阻害した。

(5) RNA抽出

ISOGEN-LSを用いてコントロール個体、RNAi個体、阻害剤処理個体からトータルRNAを抽出した。抽出したトータルRNAはSera-Mag Oligoを用いてmRNA精製した。

(6) トランスクリプトーム解析

精製したmRNAを用いてcDNAライブラリーを作成

し、Miseq によりシーケンス解析を行った。

3. 結果と考察

これまでの解析から、我々はプラナリア plac8 相同遺伝子 (Djplac8) が再生過程における新生細胞の一過的な細胞増殖の促進に関与していることを明らかにしてきた。plac8 遺伝子はマウスで胎盤特異的遺伝子として最初に報告された遺伝子で、その後植物を含む多くの生物種で、その相同遺伝子が同定され、多岐にわたる機能が報告されている。プラナリアを切断すると切断面付近で JNK シグナルが速やかに上昇する。この JNK シグナルが増強される場所で新生細胞特異的な Djplac8 遺伝子の発現が一過的に減少する。RNAi で人為的に Djplac8 の発現を減少させると新生細胞の細胞周期が促進され、その結果、個体の成長速度が速まり自切頻度が上昇する。また、切断したプラナリアを JNK シグナルの特異的阻害剤である SP600125 で処理をすると Djplac8 の発現が維持され、一過的な細胞周期の促進が抑制され、さらに再生不全を起こした。これらのことから、切断刺激→JNK シグナルの増強→Djplac8 の新生細胞での発現低下→細胞分裂の促進→細胞分化への誘導、と言う一連の流れが示唆された。本研究では Djplac8 の上流、または下流で働く遺伝子を探索し、プラナリア新生細胞の自己複製/細胞分化のスイッチングの分子メカニズムの解明を目指した。

切断したコントロール個体、Djplac8 の RNAi 個体、JNK シグナル阻害個体、で遺伝子発現の変化を、Miseq を用いたトランスクリプトーム解析によって調べた。その結果、多くの遺伝子発現が変動することが明らかとなった。Djplac8 の RNAi による機能阻害個体で発現量が変動する遺伝子群のうち、細胞分裂に関係する遺伝子を除いたものを候補遺伝子とした (表 1)。

候補遺伝子の中にはチューブリンなどのハウスキーピング遺伝子が含まれていたが、Histone RNA-binding protein 遺伝子や転写因子である Sox19a 相同遺伝子、HMG-box 遺伝子など転写制御、または転写後制御に関与する遺伝子が Djplac8 遺伝子と自己複製/細胞分化のスイッチングに関与して

c23267.g1.i1.354	sp P09642 TBA3_CHICK_Tubulin_alpha-3_chain_(Fragment)_OS=Gallus_gallus_PE=3_SV=1
c2768.l.g1.i1.448	sp Q8WQ47 TBA_LEPDS_Tubulin_alpha_chain_OS=Lepidoglyphus_destructor_PE=1_SV=2
c33362.g1.i1.865	sp A4IH24 TPX2_XENTR_Targeting_protein_for_Xklp2_OS=Xenopus_tropicalis_GN=tpx2_PE=2_SV=1
c3533.g1.i1.1007	sp Q9VAN6 SLBP_DROME_Histone_RNA_hairpin-binding_protein_OS=Drosophila_melanogaster_GN=Slbp_PE=1_SV=1
c35765.g1.i1.1638	sp P47792 SX19A_DANRE_Transcription_factor_Sox-19a_OS=Danio_rerio_GN=sox19a_PE=1_SV=2
c36050.g1.i2.1713	sp Q9CWH4 R114L_MOUSE_Meiotic_recombination_protein_REC114-like_OS=Mus_musculus_PE=1_SV=1
c36316.g1.i1.1187	sp Q5M7K4 RBBP4_XENTR_Histone-binding_protein_RBBP4_OS=Xenopus_tropicalis_GN=rbbp4_PE=2_SV=3
c36701.g1.i2.901	sp B4JTV9 SUR8_DROGR_Leucine-rich_repeat_protein_soc-2_homolog_OS=Drosophila_grimshawi_GN=Sur-8_PE=3_SV=1
c38103.g1.i2.1086	sp Q5ZMQ0 ARMCL_CHICK_Armadillo_repeat-containing_protein_1_OS=Gallus_gallus_GN=ARMCL_PE=2_SV=1
c43584.g1.i1.1620	sp P52171 IMAI_XENLA_Importin_subunit_alpha-1_OS=Xenopus_laevis_GN=kpna2_PE=1_SV=2
c44437.g2.i2.19_2213	sp Q9NXL6 SIDI1_HUMAN_SIDI1_transmembrane_family_member_1_OS=Homo_sapiens_GN=SIDI1_PE=2_SV=2
c44627.g1.i2.2909	sp Q8BVE8 NSD2_MOUSE_Histone-lysine-N-methyltransferase_NS2_OS=Mus_musculus_GN=Whsc1_PE=1_SV=2
c45718.g1.i7.13648	sp O13046 WDHDL_XENLA_WD_repeat_and_HMG-box_DNA-binding_protein_1_OS=Xenopus_laevis_GN=wdhd1_PE=1_SV=1

表 1 Djplac8 機能阻害個体において発現が変動した遺伝子。

いる可能性を示唆することができた。Histone RNA-binding protein に関しては、ヒストン遺伝子が細胞周期特異的に転写されることが知られており、細胞周期とリンクした発現変動である可能性も考えられるが、ヒストン修飾による遺伝子発現調節などとの関連も考えられ興味深い。また、転写因子は遺伝子発現を直接制御するため、これらの遺伝子の機能阻害個体の解析によって新生細胞の自己複製/細胞分化のスイッチングがどのように変化するのか詳しく調べる必要がある。

さらに我々は、JNK シグナル阻害個体においても発現量が変化する遺伝子を同定することができた。Leucine rich repeat protein 遺伝子や Histone lysine N-methyltransferase などは JNK シグナル阻害によって Djplac8 遺伝子の発現低下が起こらなくなった個体で発現量が変化した。これらの遺伝子に関して Djplac8 遺伝子の発現低下の抑制によって発現が変動したのか、Djplac8 とは無関係に JNK シグナルの下流として発現が変動したのか、を注意深く解析する必要があるが、ここでもヒストン修飾に関

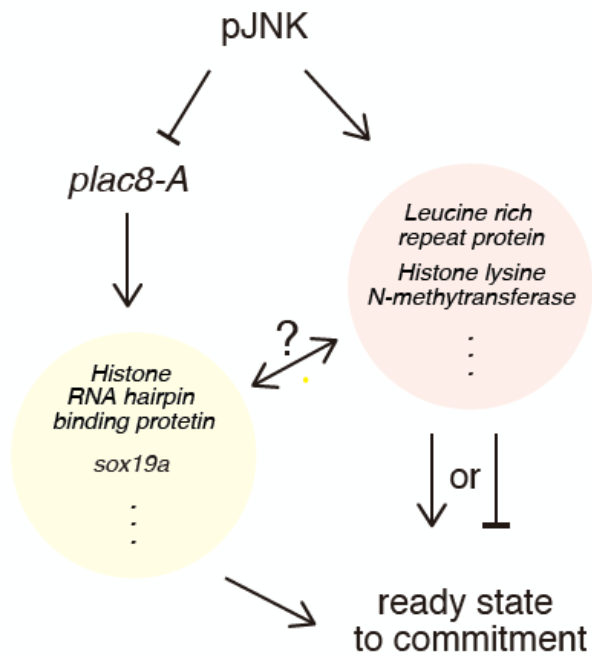


図3 今回の実験結果のまとめ

係することが期待される Histone lysine N-methyltransferase が候補遺伝子として同定されたことから、グローバルな遺伝子発現の変化が、JNK シグナルに依存して起こっていることが強く示唆された (図3)。

今後は、これらの遺伝子群がどのように相互作用することで新生細胞の自己複製/細胞分化のスイッチングの分子メカニズムを形成しているのか、を機能阻害の組み合わせ実験などから明らかにしていきたい。

4. 謝辞

本研究を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。また、学習院大学の阿形清和教授、京都大学の李河映氏、にも感謝申し上げます。

5. 参考文献

1) Takahashi, K and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. 2006 Cell 127(4):663-76

2) Agata K, Nakajima E, Funayama N, Shibata N, Saito Y, Umesono Y. Two different evolutionary origins of stem cell systems and their molecular basis. 2006 Semin. Cell Dev. Biol. 17:503-9.

3) Shibata N, Rouhana L, Agata K. Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. 2010 Dev Growth Differ. 21:27-41

4) Sakurai T, Lee H, Kashima M, Saito Y, Hayashi T, Kudome-Takamatsu T, Nishimura O, Agata K, Shibata N. The planarian P2X homolog in the regulation of asexual reproduction. 2012 Int. J. Dev. Biol. 56:173-82

銅製熱交換器の温間酸化被膜が及ぼす濡れ性への影響

津山工業高等専門学校総合理工学科

竹村明洋

熱交換器用材料として多く使用されている銅の伝熱性能を向上させることを目的に研究を行った。簡便な表面処理方法である 200～500℃の温間域における酸化の影響について検討を行った。材料表面の濡れ性と伝熱性能は相関性が深い¹⁾。本研究では材料表面の濡れ性を評価することにより伝熱性能を評価した。

温間酸化処理を行った銅試験片表面は酸化温度と酸化時間が増加するのに伴い、酸化物が成長することで金属光沢を失い、黒色に変色した。温間酸化物が生成した場合、銅材料表面の濡れ性が向上した。濡れ性の向上効果は酸化による銅材料表面の粗度変化が影響することによると考え、粗度測定を行った。しかし、酸化が著しく促進された条件を除き、材料表面の粗度の変化は確認されなかった。SEM による材料表面微視組織観察の結果、ナノサイズの酸化物が成長していた。ナノサイズの酸化物粒子の生成による材料表面の粗度変化により濡れ性が向上したと考えた。またナノサイズの微細な酸化物は酸化の促進に伴って、粒成長し、堆積していた。この微細酸化物粒により構成される酸化物構造が濡れ性を向上させたと考えた。

1. 緒言

近年、電子機器の高性能化に伴い、発熱量増加の問題がある。しかし、その一方で装置自体の軽量化や小型化の動向もあり、冷却装置の高性能化による効率的な冷却設定が求められている。これらの社会的な需要に対応するため、熱交換器の性能向上を目的とした新製品や新技術の研究開発が行われている。表面の濡れ性と伝熱性が関連していることが報告されている¹⁾。構造体からの伝熱性能評価は難しい。そこで簡便な方法である濡れ性評価による伝熱性評価がなされている。本研究においても伝熱性の評価は構造体の濡れ性を評価することにより行った。

熱交換器の性能向上の研究は2種類に大別される。1 つは冷却水の性能向上である。熱輸送媒体である冷却水を部材から熱を受け取り易い性質に改善する方法である。もう1 つは熱交換器自体の性能向上である。熱交換器の性能向上は熱交換器材料を伝熱性能の高いものに代替する方法や、構造を変化させる方法が主流である。表面性状をナノ粒子バイポーラス構造にすることで伝熱性が向上することが報告されている^{2,3)}。ナノ粒子バイポーラス構造の施工には沸騰蒸着法が用いられる。沸騰蒸着法はナノ粒体を溶かした液体を施行面に垂らした後に、沸騰蒸散させることでナノ粒体を材料表面に施工するものであ

る。熱交換器に使用する金属材料の場合、施工表面に沸騰蒸着時の加熱により酸化相が生成する。これまでの研究で銅酸化物が濡れ性を向上させることが報告されている³⁾。ナノ粒子バイポーラス構造施工時に得られる酸化物が濡れ性を向上させた場合、積極的な酸化物構造の生成は粒子バイポーラス構造との相乗効果によって更なる伝熱性能が向上する期待がある。また、ナノ粒子バイポーラス構造は長時間使用により施工面からの剥離が問題視されている積極的な酸化物構造の施工はストライクめっきとしての作用によりナノ粒子バイポーラス構造の長寿命化が得られる期待がある。

施工は 500℃以上の熱間でなく、銅製熱交換器が積極的利用される 200～500℃の温間で行う。そこで本研究では銅製熱交換器を温間酸化した場合に生成する銅温間酸化被膜が濡れ性に及ぼす影響について研究を行った。また、銅の温間酸化被膜が及ぼす濡れ性向上機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

2. 実験方法

供試材には無酸素銅を供した。無酸素銅板より 30^W×30^Lmm を切出し、試験片に供した。また、試験片板厚は 3^tmm とした。作製した試験片表面は受入時の表面傷等による粗度変化の影響を無くす目的

で、研磨を行った。研磨は#500のエメリー紙を用いて一方向 30 往復の乾式研磨を行った。これにより算術平均粗さを約 $0.2\mu\text{m}$ に調整した。乾式研磨後、エタノールによる洗浄を行った後に温間酸化処理を施した。Fig. 1 に温間酸化処理の熱履歴を示す。温間酸化処理は大気雰囲気中にて行った。温間酸化処理温度は 200, 250, 300°C とした。炉温を予め目的温間酸化処理温度まで昇温した後に試験片を投入した。温間酸化時間は 2, 5, 10, 15, 20, 25, 60, 180min とした。温間酸化処理後、試験片を炉から取り出し、30min の空冷を行った。温間酸化処理した試験片上に高さ 10mm の距離から純水を滴下し、液滴側面から撮影を行い、試験片と液滴との接触角を測定する。測定した接触角により温間酸化処理された試験片の濡れ性を評価する。

また、濡れ性向上機構を明らかにする目的で表面粗度を測定した。粗度測定は乾式研磨方向に対して法線方向に測定を行った。測定幅は 10mm とした。

さらに、表面の酸化物の生成状況を観察する目的で巨視観察と微視観察を行った。巨視観察は実体顕微鏡による外観観察により行った。また微視観察は走査型電子顕微鏡（以下、SEM と略称）を用いて行った。SEM の観察条件は SS60, 作動距離 10mm, 加速電圧 20kV とした。

3. 実験結果

3.1 外観観察結果

Fig. 2 に温間酸化無処理の試験片外観観察結果を示す。本研究に用いた全ての試験片は表面性状を統一する目的で、エメリー紙#500 を用いて 30 回の往復乾式研磨を行った。温間酸化を施していない場合、試験片表面は乾式研磨による一方向への加工痕が確認された。また、銅特有の金属光沢を有した材料表面であった。

Fig. 3 に各条件で温間酸化処理を行った試験片の外観観察結果を示す。全ての試験片で温間酸化処理により酸化物の生成が確認された。温間酸化処理温度 200°C の場合、酸化時間が 60min までで金属光沢が残った。酸化温度 250°C 以上では短時間酸化でも十分な酸化物が生成することで金属光沢がなくなった。特に温間酸化温度 300°C では酸化が進行するた

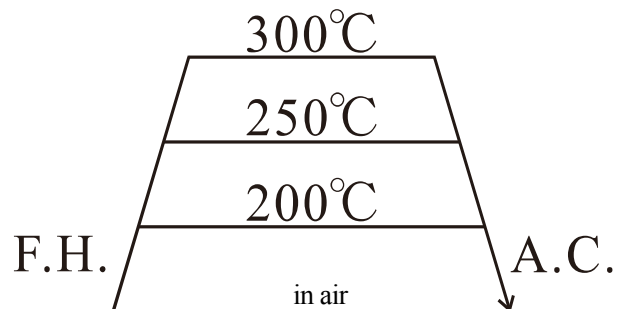


Fig. 1 Thermal history of the warm oxidation process.

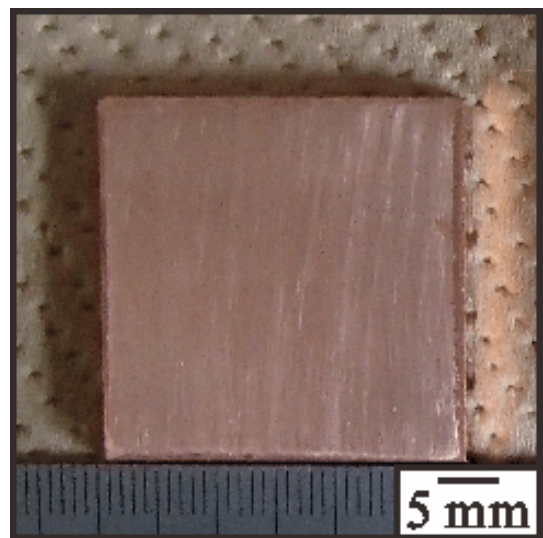


Fig. 2 Appearance of the bare specimen.

め表面色は酸化物を示す黒色を呈していた。

3.2 接触角測定結果

Fig. 4 に代表的な液滴外観観察結果を示す。Fig. 4(a)は温間酸化無処理の場合の液滴外観を示している。Fig. 4(b)は温間酸化 $300^{\circ}\text{C} \times 25\text{min}$ 処理した場合の液滴外観と接触角を示している。温間酸化を施すことによって液滴は平たく広がるような形状となり、接触角が小さくなっていた。この他、全ての温間酸化処理された試験片で接触角が小さくなった。

Fig. 5 に接触角測定結果を示す。液滴外観より接触角を測定した。温間酸化無処理の場合、接触角は 65° だった。温間酸化を行うことで接触角は著しく減少し、濡れ性が改善した。接触角は温間酸化温度の上昇と温間酸化時間の増加に伴って減少していた。

3.3 粗度測定結果

Fig. 6 に温間酸化無処理と温間酸化処理した試験片の表面粗度測定結果を示す。濡れ性は材料表面の



Fig. 3 Appearances of the warm oxidized specimens.

粗度によって変化する。温間酸化無処理材では表面粗度が $0.227\mu\text{m}$ だった。温間酸化処理された試験片では材料の表面粗度は温間酸化条件に関わらず約 $0.125\mu\text{m}$ だった。外観観察の結果では酸化物の成長が確認されたが、表面粗度では大きな変化が見られなかった。ただし、温間酸化 $300^\circ\text{C}\times 180\text{min}$ の条件では局所的に著しく成長した酸化物のため表面粗度が大きかった。

3.4 表面の微視観察結果

Fig. 7 に温間酸化無処理と 300°C で温間酸化処理した試験片の SEM による微視観察結果を示す。温間酸化無処理の場合では一方向へ沿って伸張する加工痕が確認される。温間酸化処理によって表面にナノサイズの非常に微細な酸化物粒が生成していた。微細な酸化物粒は温間酸化 2min の場合で最も微細だった。温間酸化時間が長くなるのに伴い、生成した酸化物粒が成長していた。酸化物粒は温間酸化 180min までで数十 nm 程度まで成長していた。また、生成した酸化物粒の間隙部が確認された。間隙部を矢印で示す。局所的な間隙部が複数確認されたことより生成した酸化物相は局所的に多孔質構造を有することがわかった。

4. 考 察

4.1 温間酸化物の成長

外観観察の結果、温間酸化の温度と時間が増加するのに伴い、表面色が変化した。銅材料の表面色は生成する酸化物の厚さにより変化することが報告さ

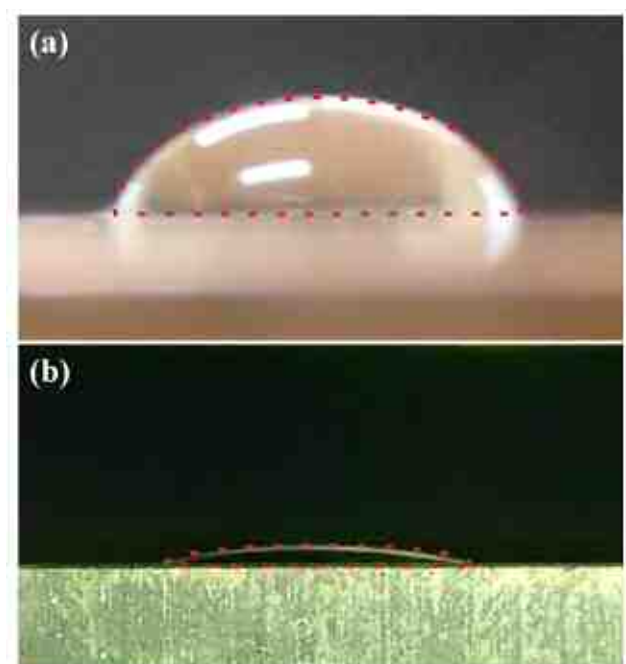


Fig. 4 Appearances of the water droplets: (a) bare surface, (b) 25 min oxidation at 300°C .

れている⁴⁾。最終的に表面色が黒色を呈したことより酸化物相は $1.3\mu\text{m}$ 以上になったと考えられる。SEM 観察の結果、生成した酸化物粒が数十 nm 程度であることから酸化物相は微細な酸化物が積層した形態であったと考えられる^{5,6)}。微細な酸化物粒の成長と積層により温間酸化物相が形成されたと考えた。

4.2 濡れ性に及ぼす表面粗度の影響

液滴接触角測定結果より温間酸化により接触角及び濡れ性が著しく改善されることがわかった。材料の濡れ性と表面粗度は密接な関係があることが報告されている¹⁾。式 1 に Young と Wenzel の式を示す。

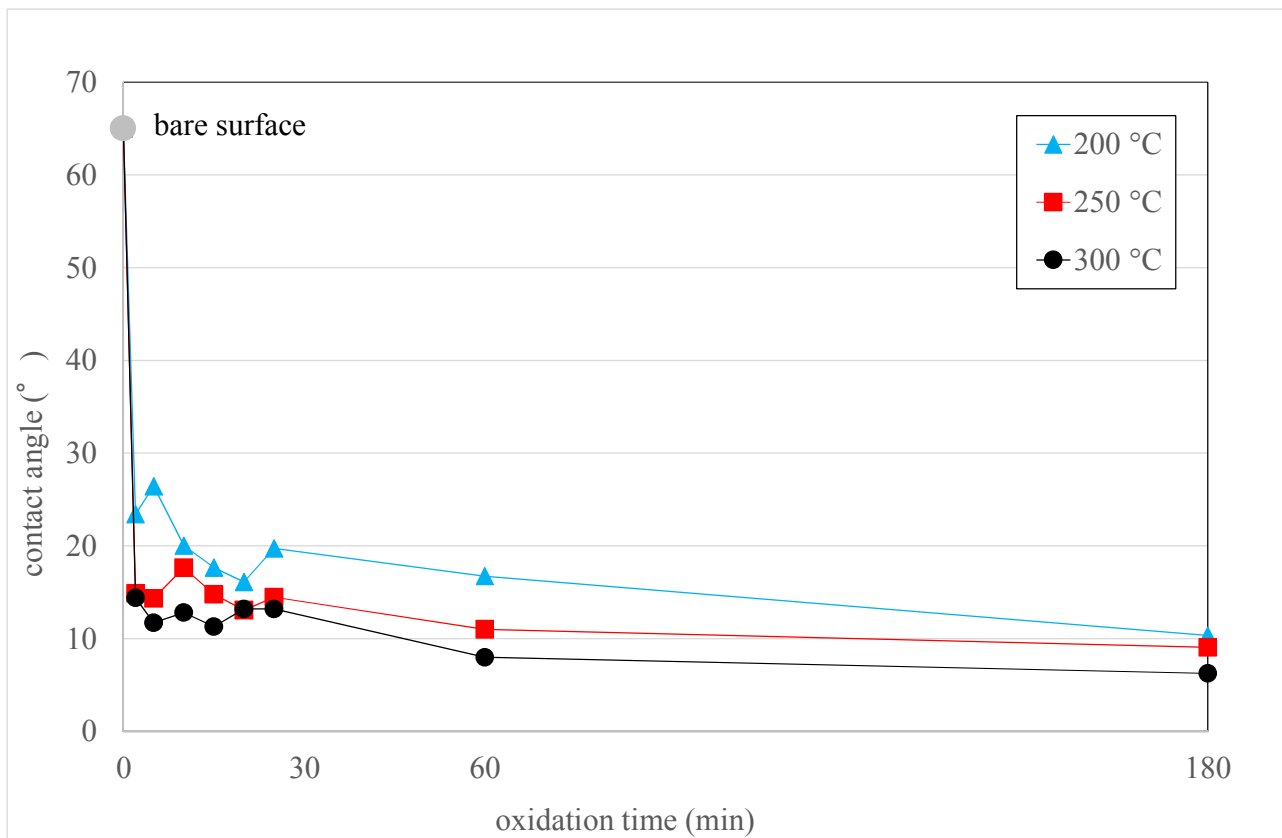


Fig. 5 Results showing the oxidized contact angles of the water droplets on the warm oxidized copper specimens.

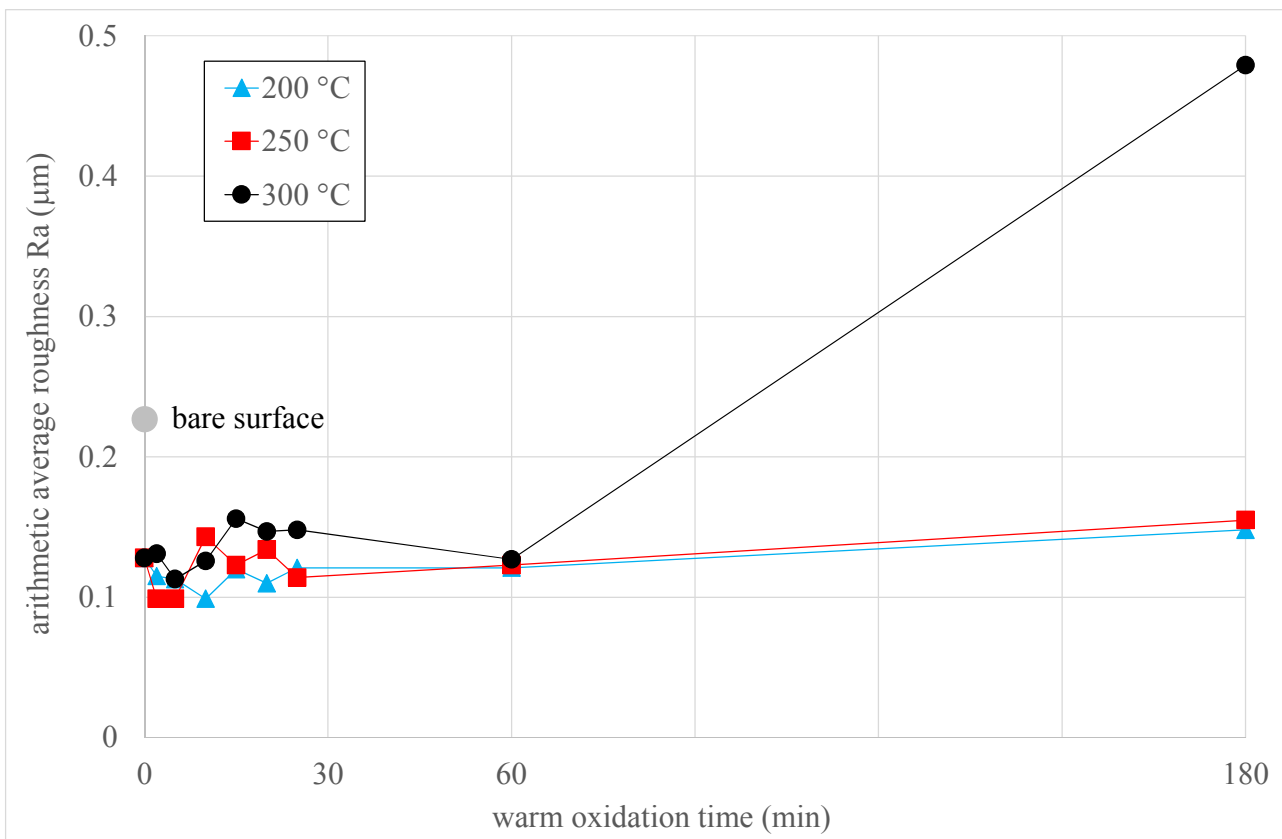


Fig. 6 Results of the surface roughness test.

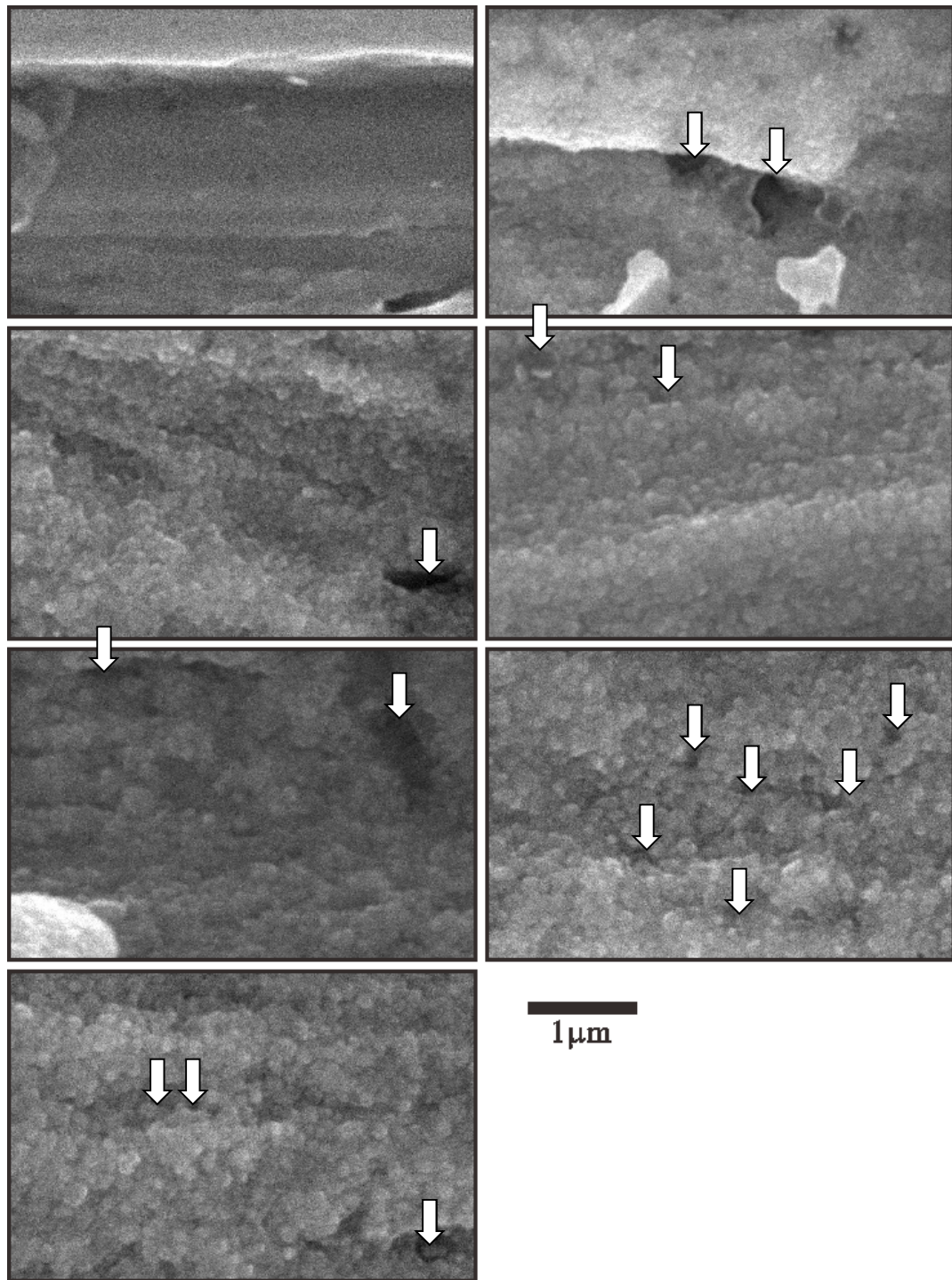


Fig. 7 SEM observation results of specimens oxidized at 200 °C: (a) bare surface, (b) 30 min oxidized, (c) 60 min oxidized, (d) 90 min oxidized, (e) 120 min oxidized, (f) 150 min oxidized, (g) 180 min

$$r \cos \theta_r = \cos \theta = \frac{\gamma_S - \gamma_{SL}}{\gamma_L} \quad (1)$$

r は実際の表面積を見かけの表面積で除した値, θ は平滑面における液滴の接触角, θ_r は粗面における液滴の接触角, γ_S は固気界面エネルギー, γ_L は気液界面エネルギー, γ_{SL} は固液界面エネルギーを示している. 表面積が粗面化した場合, $r \geq 1$ となり, θ は小さ

くなることを示している. Fig.6 に示すように温間酸化により材料表面粗度は変化しなかった. しかし, Fig.7 に示すように温間酸化により数十 nm 程度の酸化物粒が生成していた. つまり, 材料表面は温間酸化によりナノサイズの粗面化が起こったと考えられる. 本研究では触針式の粗度測定試験機により測定を行った. 粗度試験機触針先端が生成した酸化物粒

よりも大きいため、ナノサイズの粗度測定ができなかったことで粗度変化が確認できなかったと考えられる。今後は AFM 等の試験機を用いた精密な粗度測定を行う予定である。ナノサイズの粗面化が発生することで濡れ性が向上したと考えた。

4.3 擬似的な毛細管現象の発現

4.1 節でも先述したように生成した酸化物はナノサイズの酸化物粒が積層することにより生成したと考えられる。Fig.7 に示す SEM 観察結果より生成した酸化物に局所的な多孔質構造が見られた。多孔質構造は濡れに対して液滴を引き込むように作用する。この液滴を間隙に引き込む毛細管現象により伝熱性能が向上することが報告されている⁷⁾。温間酸化被膜の局所的な多孔質構造が毛細管現象として作用する場合、見かけの濡れ性向上効果よりも伝熱性能が向上する期待があり、実際の伝熱性能の測定は今後の課題である。

4.4 酸化物の親水性

銅は熱処理工程によって CuO もしくは Cu₂O へ酸化する⁴⁾。また、水酸化物として Cu(OH)₂ が生成する。金属は大気暴露状態でも酸化物を生成する。生成する酸化物の有する固液界面エネルギー γ_{SL} が小さい場合、接触角が小さくなり濡れ性が向上する。つまり生成する酸化物自体が母相の Cu よりも親水性である化学的性質を有していることで見かけの濡れ性が向上したことが考えられる。今後生成する酸化物の同定を行う。

5. 結 言

本研究では熱交換器用材料として使用される銅材料に対して温間酸化処理を施した場合の濡れ性及び親水性向上効果について検討を行った。得られた結果を以下に示す。

1. 温間酸化処理によって材料表面に酸化物相が生成した。生成した酸化物は酸化の時間と温度の増加に伴い、成長していた。
2. 試験片の液滴接触角測定より、温間酸化処理によって接触角が著しく減少し、濡れ性が向上した。
3. 触針式の粗度測定では温間酸化処理による粗度変化は確認されなかった。
4. SEM により微視観察の結果、生成した酸化物は

ナノサイズの酸化物粒の積層と結合によって生成していた。

5. 温間酸化による濡れ性向上効果はナノサイズの粗度化及び局所的な多孔質構造の形成によると推察される。

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いたします。

参考文献

- [1] Pierre-Gilles de Gennes, Françoise Brochard-Wyart, David Quere. *Capillarity and Wetting Phenomena: Drops, Bubbles, Pearls, Waves*. Springer-Verlag New York.
- [2] K.Yuki; K.Fukushima; A.Takemura and Koichi Suzuki, “Wettability and evaporation enhancement for heat transport devices by high performance oxide layer”, 2015 International Conference on Electronics Packaging and iMAPS All Asia Conference (ICEP-IAAC), 4(2015).
- [3] K.Yuki, T.Sugiura and K.Suzuki, “Boiling/Evaporation characteristics of a droplet on a nanoparticles-assembled biporous layer”, Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers, 81(2015), 824.
- [4] Goro Ito, Corrosion science and corrosion control technology, Corona, p263.
- [5] Akihiro Takemura, Yasuhiro Tanaka, Ryouta Takabata, Shuji Okaguchi and Kazuki Fujiwara, Effects on the initial oxidation mechanism of the shot peening treatment for the suppression of surface hot shortness, Tetsu-to-Hagane, 100 (2014), 3, 366-375.
- [6] L.Xingeng, H.Jiawen: Material Letters, 60 (2006), 339.
- [7] Dong Eok Kim, Dong In Yu, Dong Wook Jemg, Moo Hwan Kim and Ho Seon Ahn, Review of boiling heat transfer enhancement on micro/nanostructured surfaces, Experimental Thermal and Fluid Science, 66 (2015), 173–196.

Streptomyces cinnamoneus ゲノム情報を利用した有用酵素の探索

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・酵素機能研究グループ

畑中 唯史

(概要) グラム陽性菌である放線菌属は、抗生物質に代表される複雑な有機化合物群を生産する能力を有し、これらを変換する様々な酵素遺伝子をもつ。また、土壤中に豊富に存在する放線菌属は、植物バイオマスを栄養源とするために、セルラーゼ等様々な酵素を菌対外に放出することでも知られる。筆者はこれまでに、独自の放線菌を宿主とした発現系を構築しているが、本研究ではこの発現系に加え、次世代シーケンシング技術を用いて、放線菌 *Streptomyces cinnamoneus* NBRC13864 株ゲノム配列を取得し、この情報を用いて食感を改善することに役立つ酵素トランスグルタミナーゼを発現させ、既報酵素との性状比較を行った結果について報告する。

1. はじめに

放線菌は、山野などに生息する土壤微生物で、目立たないながらも抗生物質などの有用化合物の生産者として我々の生活を支えている。放線菌から抗寄生虫薬としてエバーメクチンが発見されたが、この功績により北里大学・大村智先生が、2015 年ノーベル生理学・医学賞を受賞されたことは記憶として新しいだろう。また、放線菌属は、土壤の中で最も多く存在する微生物種であり、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ等様々な酵素を分泌し、植物バイオマスの優秀なデコンポーザーとしても知られている。このようなことから、放線菌から有用酵素を見出すことが近年注目されつつあるが¹⁾、放線菌はゲノムの GC 含量が約 70% と高く、酵素の大量生産は大変難しいため、生産性の高い新たな酵素生産技術の開発が望まれている。

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所では、独自の放線菌 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株を土壌より単離しており、本菌株を 2% のグルコース及び 0.8% のリン酸を含む PG 培地で培養すると、培養 3 日目以降に培養上清中に大量のプロテアーゼ (SCMP) を分泌する。この SCMP をコードする遺伝子 *scmp* のプロモーター領域 (*scmp* プロモーター) は、非常に特異な DNA 塩基配列を示し、近縁株などのゲノム情報上には類似の配列は見られなかった。そこで、この塩基配列を利用して、放線菌由来酵素を大量に生産させる発現ベクター pTONA を創出し

た²⁾。このベクターを用いた放線菌酵素生産法は、他にない強力な技術と認められ、すでにナガセケムテックス株式会社の放線菌酵素生産に利用されている。具体的な酵素としては、放線菌由来キチナーゼ・グルカナーゼなどがあり、食品加工に利用されている³⁾。これら酵素は、セルフクロニングおよびナチュラルオカレンス (組み換え体と同等の遺伝子構成をもつ生細胞が自然界に存在する) の概念にあてはまり、食品添加物として使用できるグレードである。

従来からの有用酵素の探索では、土壌からの有用菌株のスクリーニングが主たる方法であった。金銭では、シーケンシング技術の発達により、微生物のゲノム情報は、比較的たやすく得られる状況になってきた。実際、先の大村先生が取得したエバーメクチン産生株もそうしたスクリーニングの結果得られた放線菌である。そこで本研究では、我々が開発した放線菌発現系を利用して、食品の食感改善に役立つ酵素トランスグルタミナーゼの探索を行うものである。

厚労省で、遺伝子源として、安全であるとされた放線菌属種は、*S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. cinnamones* の 3 種である。このうち、TGase 遺伝子をゲノム上に有するのは、*S. cinnamoneus* のみである。申請者は、*S. cinnamoneus* の公開・非公開の TGase 遺伝子配列を、既に 4 種得ている。本報告では、市販酵素である *S. mobaraensis* と *S. cinnamoneus* 由来

TGase 遺伝子を放線菌を宿主に発現させ、比較検討を行った結果について記載する。

2. 実験方法

(1) 次世代シーケンサーによるゲノム解析

S. cinamomeus NBRC13864 株から、ゲノム DNA を調整し、オックスフォードナノポア・テクノロジー社の方法に従い、ライブラリーを作成した。これについて、MiniON シーケンサー（オックスフォードナノポア・テクノロジー社製）により、1 本のコンティグ配列につながったドラフトゲノム配列を得た。市販品である *S. mobaraensis* NBRC13819 株由来 TGase (SMTG) 遺伝子の相同配列検索を行い、*S. cinamomeus* NBRC13864 株由来 TGase (SCTG) 遺伝子情報を得た。これを PCR により増幅し、Topo クローニング（サーモフィッシュサイエンティフィック社製）を行い、SCTG 遺伝子配列を確定した。SCTG は、SMTG と同様に分泌シグナルを有し、SCTG と SMTG の 1 次配列の相同性は、約 75%であった。

(2) *S.lividans* 1326 株を宿主とした発現

商業生産用 *scmp* プロモーターは、全長 424 塩基対のものを使用しているが、培地成分の制限等、研究用途としては、不便な点を有している。申請者らは、これまでの研究で、*scmp* プロモーターの 3'側 63 塩基対のみを使用することにより、培地成分の制限がなくなり、発現量も向上することを明らかにしてきた（論文準備中）。この改良型 *scmp* プロモーターの下流に、SCTG および SMTG 遺伝子を挿入した放線菌用発現でベクターを作成し、常法⁴⁾により、*S.lividans* 1326 株形質転換体を得た。形質転換体を、Tryptic soy broth (TSB) で種培養を行った後、本培養をバッフルフラスコで、30℃、150rpm、5 日間培養を行い、活性を含む培養上清を遠心にて回収した。

(3) TGase 活性測定法

アシルドナーとして、Z-Gln-Gly を用い、37℃ で反応を行った後、酵素反応液を、0.1%ギ酸を含

む水で希釈したものを、逆相カラム（ウォーターズ社製 Symmetry C18）を装着した HPLC にて、0.1%ギ酸を含む水及び 0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを溶媒とし、アセトニトリルのグラジエントにて溶出した。254nm の波長で分析することにより、反応産物を検出し活性測定した。反応産物は、別途 LC-MS を用いて、当該ピークの質量分析を行い、プロダクトであることを確認した。

(4) 酵素簡易精製法

培養上清を 70%飽和硫酸で処理し、遠心にて得た沈殿物を、20mM リン酸バッファー (pH8.0) に溶解し、同バッファーに対して透析した。これを遠心にて分離・精製できる陰イオン交換体（ザルトリウス社製 Vivaspin Q）にかけ、夾雑タンパクを吸着させ、非吸着画分を精製酵素として用いた。

3. 結果と考察

(1) 発現用培地の検討

放線菌 TGase は、菌体外に分泌された後、プロ配列が、宿主由来のペプチダーゼにより切り離されて初めて活性を示すことが知られている。

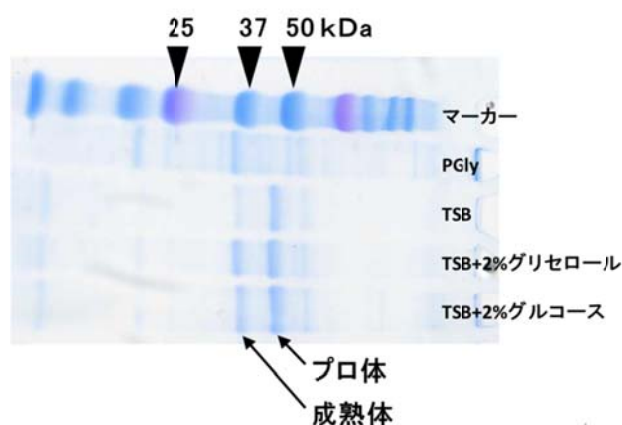


図1 発現用培地の検討

SCTG 発現用形質転換体を、2%グリセロール、0.8% K_2HPO_4 、0.05%MgSO₄·7H₂O、0.5%ポリペプトン、0.5%酵母エキス(=PGly)、TSB、2%グリセロール添加 TSB、2%グルコース添加 TSB で、5 日間培養した上清タンパク (5μg) を電気泳動した。図1に示すように、TSB を主体とする培地では、いずれもプ

ロ体と思われるバンドが確認され、ペプチダーゼによる成熟化が、完璧ではないことが判明した。一方、PGly 培地では、プロ体は検出されず、成熟体のみとなったため、PGly 培地を採用することとした。

(2) 諸性質の比較

SCTG は、SMTG と比較して、著しく比活性が低いことを記載した論文がある⁵⁾。それによれば、アシルドナーとして Z-Gln-Gly を、アシルアクセプターとしてヒドロキシルアミンを用いた方法で、*S. mobaraensis* 由来 TGase が 3.9U/mg、*S. cinnamoneus* 由来 TGase は 0.18U/mg と、20 分の 1 以下の比活性と記載されている。そこで我々の発現系で、我々がクローンした SCTG、SMTG の比活性を、同様な基質の組み合わせで比較した。その結果、SCTG が 4.5U/mg、SMTG は 9.3U/mg となり、SCTG は 2 分の 1 程度と低いものの実現場で十分使用できる比活性を示すことが判明した。放線菌の分類は、かつて混迷を極め、*S. cinnamoneus* NBRC13864 株は、古くは *S. hachijoensis* と分類されており、Langston らの論文⁵⁾でも、*S. hachijoensis* 由来 TGase の比活性は、1.9U/mg と、*S. mobaraensis* 由来 TGase 比活性の約半分であり、我々の結果と矛盾していない。

次いで、精製酵素の至適 pH の比較を行った (図 2)。

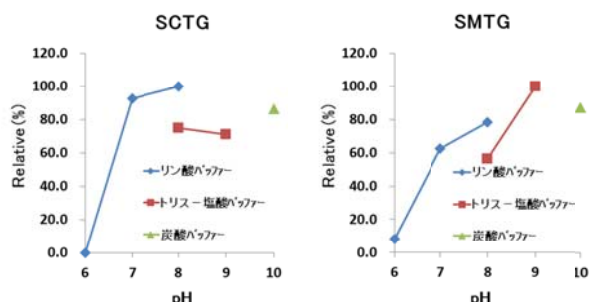


図 2 至適 pH の比較

図 2 に示すように、SCTG の至適 pH は、8.0 で、SMTG は、9.0 と若干中性よりであった。タンパク質を酵素処理する実現場では、苦味の発生を抑えるために弱酸性から中性域での使用が多く、この点で

も SCTG は、多少有利であると推察された。

商業用酵素にとって、熱安定性は重要な因子である。そこで、精製酵素の耐熱性 (10 分加熱後の残存活性) を比較した (図 3)。

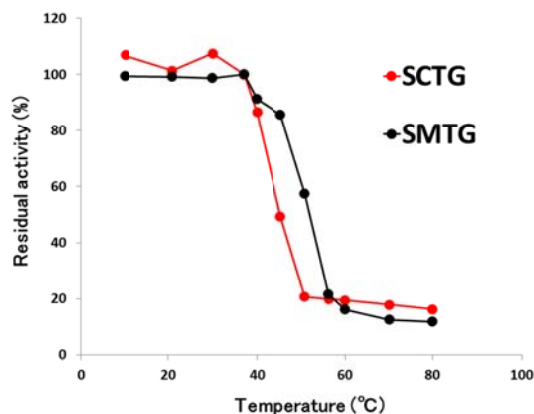


図 3 耐熱性の比較

図 3 に示すように、SCTG は、若干耐熱性の点で劣ることが判明した。50% 残存活性を示す温度 (=Tm) を算出したところ、SCTG が 45.8°C、SMTG は、51.7°C と 6°C 程度の差があるが、実用上問題ないレベルと判断している。

最後に、アシルドナーとして Z-Gln-Gly を、アシルアクセプターとしてヒドロキシルアミンを用い、両酵素のカイネティックス・パラメーターの比較を行った (表 1)。

表 1 カイネティックス・パラメーターの比較

酵素	アシルアクセプター	K_m for Z-Gln-Gly (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	V_{max}/K_m
SCTG	ヒドロキシルアミン	68.49	24.39	0.36
SMTG	ヒドロキシルアミン	11.00	17.54	1.59

SCTG は、一般的に酵素触媒の性能を表す V_{max}/K_m (値が大きいほど、触媒効率が良いことを示す) を比較すると、SMTG の 4 分の 1 以下であった。しかしながら、SMTG と比較して、 V_{max} の値では、勝っており、基質濃度等環境が整えば、現在市販されている SMTG に勝る性能を発揮する可能性も唆さ

れた。アシルドナーとして Z-Gln-Gly を、アシルア
クセプターとしてヒドロキシルアミンを用いる
TGase 活性測定法は、厚労省の公定法でもあるが、
実際のタンパク質同士の架橋は反応では、アシルド
ナー、アシルアクセプターともに、分子の大きさ、
配列等大きく異なる反応であり、より応用に近い条
件での活性測定法の確立が必要であると思われる。

4. まとめ

次世代シーケンサー技術により、*S. cinnamoneus*
NBRC13864 株のドラフトゲノム配列を得て、この
情報から、食感改善に役立つ酵素トランスグルタミ
ナーゼ遺伝子を同定した。この遺伝子を、独自放線
菌発現系を用いて分泌発現に成功した。*S.*
cinnamoneus 株由来で、この系により作成された酵
素は、食品加工用に耐えうるグレードの製法である。
これを現在市販されている *S. mobaraensis*
NBRC13819 株由来トランスグルタミナーゼと諸性
質の比較を行った。

5. 参考文献

- 1) Anné J. *et al.*, Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**(8): 1750-1761 (2014)
- 2) Hatanaka T. *et al.*, pTONA5: a hyperexpression vector in streptomycetes. *Protein Expr. Purif.* **62**:244-248 (2008)
- 3) 畑中唯史ら, プロモーター及びその活性化方法. 特許第4586149号
- 4) Hopwood DA. *et al.*, Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. Norwich: The John Innes Foundation, (1985)
- 5) Langston J. *et al.*, Substrate specificity of *Streptomyces* transglutaminases. *Appl. Biochem. Biotech.* **136**:291-308(2007)

謝辞

本研究をご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。

モモ花粉稔性を支配する遺伝子の同定とマーカ化

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

小田賢司

モモの一部の品種は花粉が形成されず、安定して着果させるには人工授粉が必要になる。生産者は可稔品種の育成を強く求めるため、不稔の原因となる遺伝変異を解明することを目指して研究を行った。花粉の形成不全は液胞期に起こり、遺伝的には一遺伝子座で支配される劣性形質であると報告されている。これらの情報から条件を設定し、全条件を満たす遺伝子をモモの稔性遺伝子の候補として、花粉稔性との関連性を調査した。シロイヌナズナの相同遺伝子欠損変異体は花粉壁合成に異常を示し、モモと同様に花粉稔性がない。そこで、この変異体を用いて相補実験を行い、モモの候補遺伝子が花粉稔性に関わることを、モモ不稔品種に見られるこの遺伝子上の SNP 変異が不稔性を引き起こすことを明らかにした。さらに、この SNP 変異を簡便に検出する系を確立し、日本の栽培品種に見られる稔性の違いが SNP 変異の有無と遺伝的に相関することを明らかにした。これらの結果から、モモ雄性不稔性の原因が分子レベルで初めて明らかとなった。この研究で開発した変異検出系を利用することで、着花前に花粉稔性の予測が可能になり、モモ育種を効率化できるようになった。

1. はじめに

4 月になると岡山県内各地でモモの花が咲き誇り、農家の方々が授粉作業を行う姿を目にする (図 1A)。これは、モモには単独で受精できない不稔品種が存在しており、可稔品種の花粉を人工的に授粉させるためである。担い手不足の農家に可稔品種からの花粉収集と不稔品種への授粉作業という余分な負担を強いる不稔形質は、新しく開発される次世代品種から排除されるべき形質である。不稔は、同じバラ科果樹であるナシやリンゴなどでも問題にされるが、それらは自家不和合が原因であるのに対し、モモの不稔現象は花粉ができない雄性不稔によって引き起こされるという点で基本的に異なっている (図 1B)。モモ不稔花粉の形成異常については、細胞学的観察が古くから行われており、不稔品種である‘白桃’の花粉形成は減数分裂後の四分子形成や小孢子形成まで正常品種と変わらず進むものの、その後の液胞期に収縮や破裂が起こり消失していくことが報告されている(1)。また、遺伝学的解析も進んでおり、一つの遺伝子座に支配される質的形質であること(2)、不稔形質が遺伝学的に劣性であること(2)、原因遺伝子は第 6 連鎖群末端付近に座上すること(3)などが明らかにされている。しかしながら、不稔になる分子

メカニズムや不稔を引き起こす原因遺伝子は不明である。

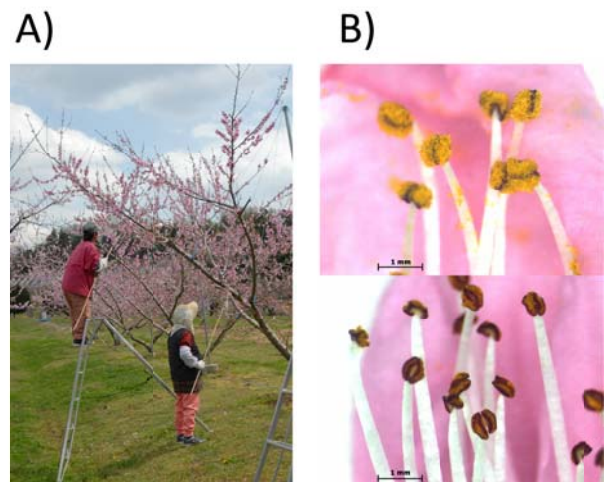


図 1. モモの不稔 A) 不稔品種の人工授粉作業、B) 可稔品種 (清水白桃、上) と不稔品種 (大和白桃、下) の開花時の葯

モモは植物体のサイズが大きく、着果まで 3 年以上かかるため、育種が容易でない。そこで、モモの新品種育成の効率化を目指して、育種目標となる重要農業形質を支配する遺伝子を同定し、マーカ化する研究を進めている。稔性はモモの重要な農業形質であるため、不稔個体を早期に排除する高精度マ

一カーの開発を目指し、モモの稔性の有無を決める遺伝子の同定に取り組んできた。不稔を引き起こす遺伝子は、1) 第 6 連鎖群末端付近に座する、2) 葯で発現する、3) 不稔品種特異的に塩基配列に変異が存在するという 3 つの条件を満たすと考えられる。そこで、これまでの研究で、染色体組み換え品種を利用し、原因遺伝子が座する遺伝子座を約 1Mb の領域に絞り込み、続いて、その領域にコードされる 82 遺伝子に対して、葉および果実に比べて葯で 5 倍以上強く発現することを指標に 9 遺伝子に候補を絞り込んだ。さらに、ヘテロ型可稔品種 ‘清水白桃’・‘白鳳’にヘテロであり、かつ、不稔品種 ‘白桃’にホモの遺伝変異があることを基準にさらなる絞り込みを行った。その結果、一つの遺伝子を不稔原因遺伝子の候補として単離することに成功した。そこで、本研究では、この候補遺伝子の変異が不稔性を引き起こすことを明らかにすること、および、この遺伝子変異の簡便な検出系を確立し、着花前に稔性

の有無を予測可能にすることを目指した。

2. 研究内容

① シロイヌナズナ花粉壁合成変異体の相補実験

花粉形成は顕花植物に共通の生理現象であり、モモ不稔現象を引き起こす遺伝子と同じ機能を持つ遺伝子が他の植物にも存在すると推察される。実際、単離した不稔候補遺伝子と相同性の高い遺伝子がモデル植物のシロイヌナズナやイネのゲノムに見出される。シロイヌナズナ相同遺伝子 *ABCG26* はアミノ酸レベルで 74% の高い一致を示す。*ABCG26* 遺伝子は葯中で花粉壁形成に関わる花粉形成の必須遺伝子と報告されており (4, 5)、この遺伝子の機能欠損変異体 *abcg26-1* は、モモ不稔品種と同様に、花粉が作れず不稔になる。モモ候補遺伝子は、シロイヌナズナの *ABCG26* と同様の機能をもつと推察されることから、シロイヌナズナの *abcg26-1* 変異体にモモ候補遺伝子を導入する

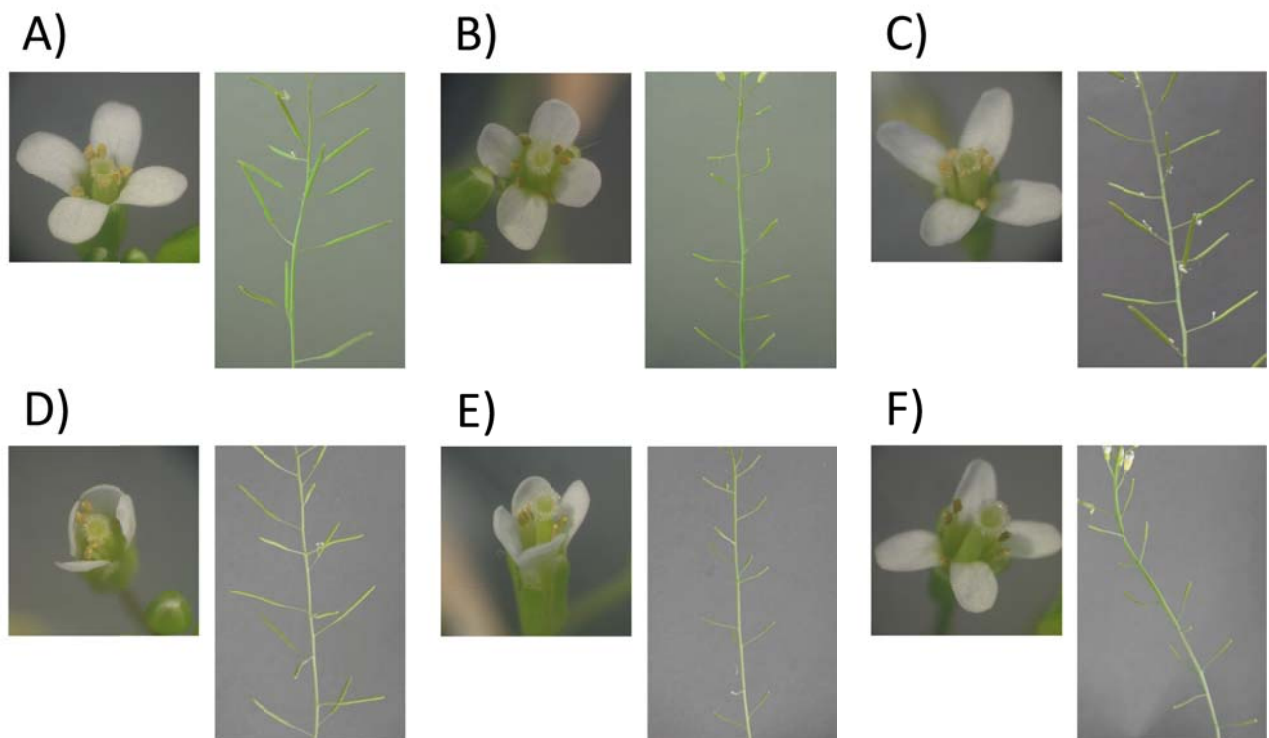


図 2. シロイヌナズナ *abcg26-1* 変異体の相補性試験 A) 野生型シロイヌナズナの花とさや、B) *abcg26-1* 変異体、C) シロイヌナズナ *ABCG26* 遺伝子を導入した形質転換 *abcg26-1* 変異体、D) モモ稔性遺伝子を導入した形質転換 *abcg26-1* 変異体、E) モモ不稔品種の変異型稔性遺伝子を導入した形質転換 *abcg26-1* 変異体、F) 人為的に改変した変異型シロイヌナズナ *ABCG26* 遺伝子を導入した形質転換 *abcg26-1* 変異体

と稔性が回復すると期待される。そこで、*ABCG26* 遺伝子のプロモーターにモモ候補遺伝子をつなぎ、*abcg26-1* 変異体に導入して稔性が回復するかを調べた。

図 2 に示すように、シロイヌナズナ野生株は開花時に花粉ができ、自家受粉を経てさやが長く成長する。一方、*abcg26-1* 変異体は開花時に花粉ができず、受粉することなくさやが未発達で短いままとなる。まず、*abcg26-1* 変異体に、*ABCG26* 遺伝子のプロモーターに *ABCG26* 遺伝子をつないだコンストラクトを導入すると、稔性形質が相補されて、花粉ができさやが長く成長した (図 2C)。これは、論文の報告通りである (5)。次に、*ABCG26* プロモーターにモモ候補遺伝子をつないだコンストラクトを導入すると、*ABCG26* 遺伝子をつないだ時と同様に、花粉ができさやが長く成長した (図 2D)。このことは、モモ候補遺伝子がシロイヌナズナ *ABCG26* 遺伝子と同じ生理機能を有し、花粉形成に関与することを示している。

モモ不稔品種の‘白桃’はこの遺伝子に一つの一塩基置換 (SNP) 変異をもつ。*ABCG26* プロモーターにモモ不稔品種の変異型遺伝子をつないだコンストラクトを導入したところ、*abcg26-1* 変異体と同様、開花時に花粉がなく、さやは未発達で短いままであった。また、シロイヌナズナの *ABCG26* 遺伝子に‘白桃’が持つ変異と同じ変異を人為的に導入した変異型 *ABCG26* 遺伝子を作成し、*ABCG26* プロモーターにこの変異型 *ABCG26* 遺伝子をつないだコンストラクトを導入したところ、*abcg26-1* 変異体の不稔形質を相補できず、花粉がなくさやが短いままであった。以上のことから、‘白桃’がもつ SNP 変異は植物に花粉形成不全を引き起こすものであり、不稔現象の原因であると考えられた。

② 簡便な遺伝子変異検出法の確立

この遺伝子の SNP 変異がモモの不稔の原因であるならば、SNP 変異の有無と花粉稔性の有無は様々な品種で一致することが期待される。そこで、まず、この変異の簡便な検出法の確立を試みた。この変異

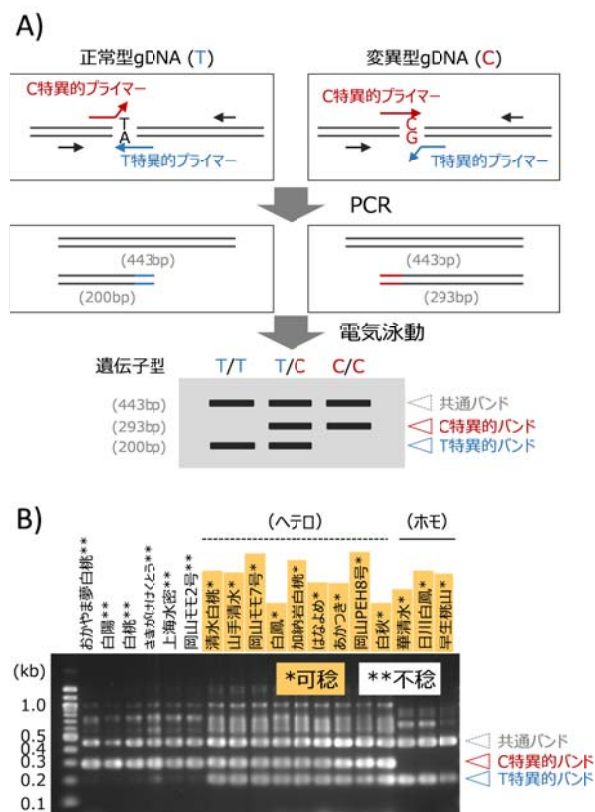


図 3. SNP 特異的プライマーを用いた変異の検出

A) 検出法の原理、B) 栽培品種を用いた検出例

は T から C への SNP である。そこで、SNP 特異的なプライマーを作り、PCR による増幅の有無で検出する方法を試みた。図 3A に示すように、この検出系では、それぞれのアレルに特異的なプライマーを逆鎖の位置に設計し、さらにそれぞれのプライマーの上流にもプライマーを設計した。これら合計 4 種類のプライマーを混ぜて PCR を行くと、テンプレートに用いたゲノムの遺伝子型に応じて、アレル特異的なバンドが増幅する。すなわち、正常型遺伝子をホモに持つと T 特異的なバンド (200bp) が増幅し、変異型遺伝子をホモに持つと C 特異的なバンド (293bp) が増幅する。正常型と変異型をヘテロに持つと、T 特異的なバンドと C 特異的なバンドの両方が増幅する。図 3B に具体的な実験結果の一例を示す。設計通り、品種によって T 特異的なバンドと C 特異的なバンドの片方または両方が増幅した。増幅パターンは、実験に用いた 18 品種の全てにおいて、観察された稔性形質から予想される稔性遺伝子の遺伝子型と完全に一致しており、この遺伝子変異が不稔の原因であ

pollens in sterile peach. 京都府立大学學術報告 農学, **26**:21-26

- (2) DH Scott and JH Weinberger (1944) Inheritance of pollen sterility in some peach varieties. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci., **9**:187-188
- (3) Ellsabeth Dirlewanger, Enrlque Grazlano, Tarek Joobeur, Francesc Garrlga-Calderé, Patrick Cosson, Werner Howad, and Pere Arús (2004) Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**:9891-9896
- (4) Teagen D. Quilichini, Michael C. Friedmann, A. Lacey Samuels, and Carl J. Douglas (2010) ATP-binding cassette transporter G26 is required for male fertility and pollen exine formation in Arabidopsis. Plant Phys., **154**:678-690
- (5) Hyunju Choi, Jun-Young Jin, Setbyoul Choi, Jae-Ung Hwang, Yu-Young Kim, Mi Chung Suh, and Youngsook Lee (2011) An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen. Plant J., **65**:181-193

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、細胞内の酸化還元状態の制御、毒物や薬物の解毒など様々な生理作用を有している。我々は、これまでに酒粕加水分解物に細胞内グルタチオン量上昇作用があることを明らかにしてきた。アセトアミノフェン (APAP) は解熱鎮痛剤と広く使用されているが、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。そこで、マウスを用いて酒粕加水分解物の APAP 誘導肝障害抑制作用について検討した。APAP を腹腔内投与することにより、血清中の AST、ALT、LDH および ALP は有意に上昇したが、酒粕加水分解物を摂取することにより、上昇が有意に抑制された。肝臓中のグルタチオン量は酒粕加水分解物摂取により濃度依存的に上昇していた。また、中心静脈周囲の肝細胞の壊死の抑制がみられた。次にグルタチオン合成の律速酵素である γ -GCS と抗酸化酵素である HO-1 の発現量を調べたところ、濃度依存的に発現の誘導が見られた。以上の結果から、酒粕加水分解物はグルタチオン合成および抗酸化酵素を誘導することにより APAP 誘導肝障害の抑制作用を示すことが示唆された。

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。

アセトアミノフェン (APAP) は解熱鎮痛剤と広く使用されており、大部分が硫酸抱合またはグルクロン酸抱合をうけ無毒化されるが、その一部がシトクロム P450 により *N*-アセチルベンゾキノンイミン (NAPQI) へと代謝され、さらにグルタチオン抱合されて尿中へと排泄される。しかし、APAP を過剰に摂取すると肝臓中のグルタチオンが枯渇し、親電子化合物である NAPQI と肝細胞のタンパク質が共有結合し、急性肝障害を引き起こすことが分かっている^{3,4)}。よって、肝臓中のグルタチオンを上昇させることにより、肝障害を軽減できると考えられる。

実際に、*N*-acetyl-L-cysteine はグルタチオンの前駆体として APAP 肝障害の軽減に使用されている。

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⁵⁾。 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⁶⁾。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リ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、酒粕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。本研究では、酒粕加水分解物の APAP 誘導肝障害抑制作用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（SLH）を調製した。

動物実験

4 週齢 ICR 雄性マウスに 7 日間、酒粕加水分解物を 0、250、500 mg/kg 経口投与した。アセトアミノフェン 700 mg/kg 腹腔内投与し、6 時間後に採血し、肝臓を採取した。なお、本研究は就実大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

血清分析

採取した血液は、37℃で 30 min 保温し、750×g、10 min 遠心して血清を回収した。血清中の AST・ALT 活性はトランスアミナーゼ CII テストワコー（和光純薬）を、LDH 活性は Cytotoxicity Detection Kit（ロシュ）を、ALP 活性はラボアッセイ ALP（和光純薬）を用いて測定した。

肝臓中グルタチオン量の測定

肝臓をホモジナイズし、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。

組織病理学的評価

採取した肝臓をホルマリン固定後、病理標本を作製し、HE 染色により組織病理学的評価を行った。

ウェスタンブロッティング解析

肝臓に 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-GCSh)、anti-γ-GCS light subunit (γ-GCSL)、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。

3. 結果と考察

マウスを用いて酒粕加水分解物による APAP 誘導肝障害抑制作用の影響を調べた。肝臓の逸脱酵素で

ある血清中 AST、ALT、LDH、ALP 活性を分析した結果、APAP 投与群は、コントロール群に比べて AST、ALT、LDH、ALP 活性が上昇した（図 1A-D）。一方、酒粕加水分解物摂取群は、その上昇が有意に抑制された。

グルタチオンは APAP 代謝によって生じる親電子化合物である NAPQI を無毒化するのに重要な役割を果たしている⁷⁾。そこで、肝臓中のグルタチオン量を調べた。酒粕加水分解物を摂取することで APAP によるグルタチオンの枯渇の回復が見られた（表 1）。また、肝臓の病理組織学的評価を行った結果、APAP 投与群（図 2C）では中心静脈周辺

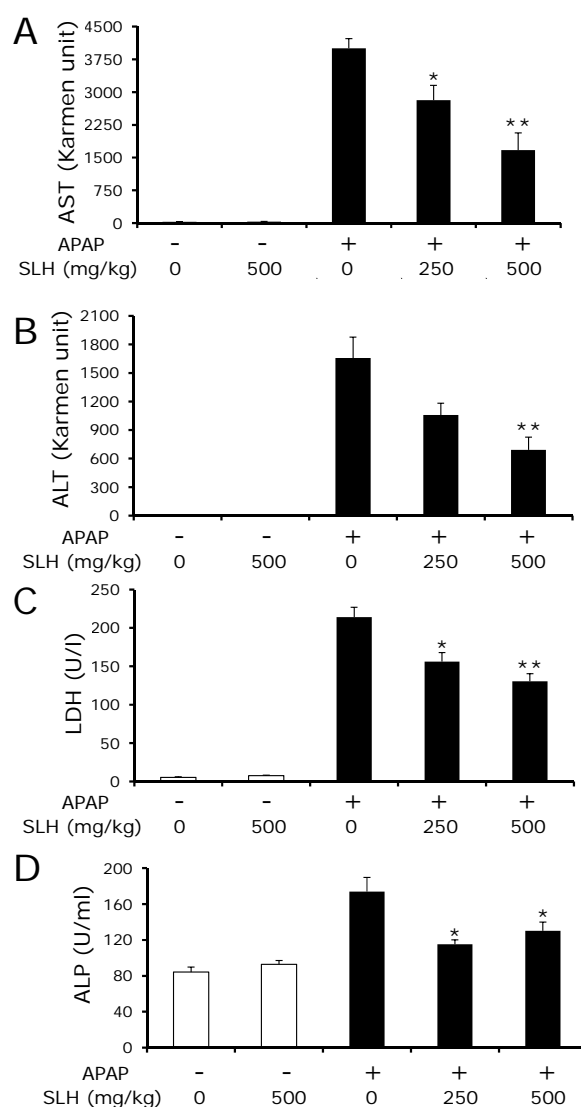


図 1 APAP 誘導肝障害マウスにおける酒粕加水分解物による血清中の AST (A)、ALT (B)、LDH (C)、ALP (D) への影響（平均±SE、n = 5-6、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. APAP 投与群）

表 1 肝臓中のグルタチオン量

Groups	Total glutathione ($\mu\text{mol/g liver}$)
control	3.8 ± 0.3
SLH 500 mg/kg	3.5 ± 0.6
APAP	$0.012 \pm 0.001^{##}$
APAP + SLH 250 mg/kg	$0.047 \pm 0.008^{*,##}$
APAP + SLH 500 mg/kg	$0.040 \pm 0.009^{*,##}$

(平均 \pm SE、 $n = 5-6$ 、* $p < 0.05$ vs. APAP 投与群、## $p < 0.01$ vs.コントロール群)

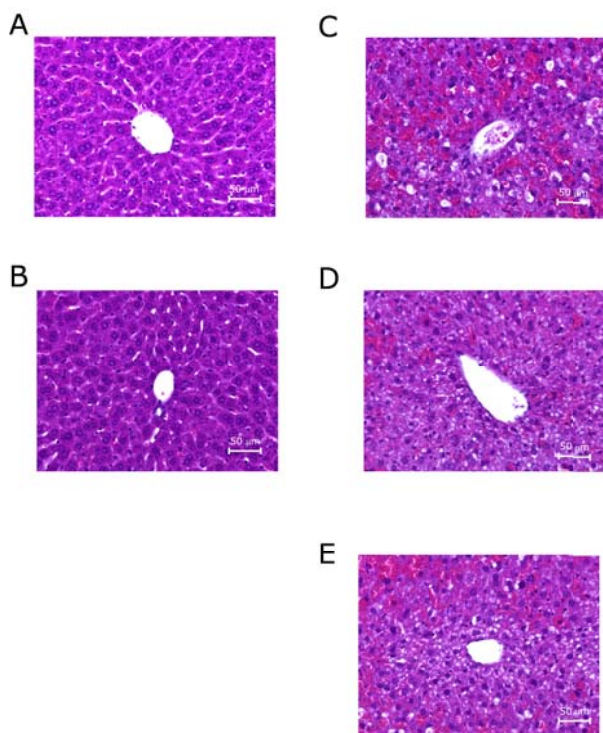


図 2 肝臓切片の HE 染色による病理組織学的評価

(A) コントロール群、(B) SLH 500 mg/kg 投与群、
(C) APAP 投与群、(D) APAP+SLH 250 mg/kg 投与群、
(E) APAP+SLH 500 mg/kg 投与群

に肝細胞の壊死が見られたが、酒粕加水分解物を摂取することにより、肝細胞の壊死の抑制が見られた (図 2D、E)。

次に酒粕加水分解物の APAP 誘導肝障害抑制作用に Nrf2 やその制御下にある抗酸化酵素が関与しているか調べた。Nrf2 は APAP 誘導肝障害抑制作用に対して重要な役割を果たしていることが報告されている⁸⁾。さらに、 γ -GCS と HO-1 は転写因子 Nrf2 によって制御されている生体内の抗酸化酵素である⁹⁾。 γ -GCS は触媒作用を有する γ -GCSH と調節作用を有する γ -GCSI からなる二量体であり、活性発現には

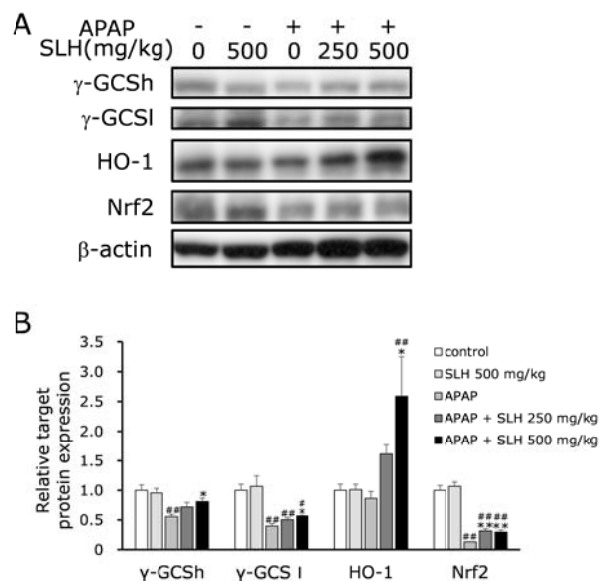


図 3 肝臓の γ -GCS、HO-1、Nrf2 タンパク発現量 (平均 \pm SE、 $n = 5-6$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. APAP 投与群、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ vs.コントロール群)

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。APAP 投与により、肝臓中の γ -GCSH と γ -GCSI および Nrf2 はコントロール群に比べて有意にタンパク発現量が低下していることが分かった (図 3A、lane3)。HO-1 の発現は APAP を投与してもコントロール群と同程度であった。一方、酒粕加水分解物を摂取することにより APAP 投与群に比べて γ -GCSH、 γ -GCSI、HO-1、Nrf2 の発現は濃度依存的に上昇していた (図 3B)。特に、500 mg/kg の酒粕加水分解物を投与し、APAP による肝障害を誘導した群では、HO-1 の発現が APAP 群に比べて 2.6 倍上昇していた。酒粕加水分解物を 1 週間摂取しただけではコントロール群と比較して γ -GCSH、 γ -GCSI、HO-1、Nrf2 の発現は変動が見られなかった (図 3A、lane2)。以上の結果から、酒粕加水分解物が Nrf2 抗酸化経路を介して APAP 誘導肝障害抑制作用を示すことが示唆された。

本研究により、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、APAP 誘導肝障害抑制作用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。よって、酒粕加水

分解は Nrf2 を介して酸化ストレスが起因する疾病の予防に役立つ可能性が示唆された。

Biol Med. **47**, 1304-1309 (2009).

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) Laskin DL, Pilaro AM.: Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. I. Isolation and characterization of activated macrophages from rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* **86**, 204-215 (1986).
- 4) Hazai E., Vereczkey L. and Monostory K.: Reduction of Toxic Metabolite Formation of Acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**, 1089-1094 (2002).
- 5) Seelig GF, Simonsen RP, Meister A. Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem.* **259**, 9345-9347 (1984).
- 6) Bryan H. K., Olayanju A., Goldring C. E. and Park B. K.: The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol.* **85**, 705-717 (2013).
- 7) Mitchell JR, Thorgeirsson SS, Potter WZ, Jollow DJ, Keiser H.: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.* **187**, 211-217 (1973).
- 8) Gum SI, Cho MK.: Recent updates on acetaminophen hepatotoxicity: the role of nrf2 in hepatoprotection. *Toxicol Res.* **29**, 165-172 (2013).
- 9) Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK.: - Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic*

慢性炎症を駆動する「AGEs-RAGE 系」の活性化メカニズムの解明

就実大学 薬学部

渡邊 政博, 豊村 隆男, 森 秀治

社会の高齢化に伴い、生活習慣や加齢に伴って進行する疾患のメカニズムの解明と治療戦略の構築が強く求められている。近年、これらの疾患の基盤として慢性炎症が注目を集めている。生体内において生成・蓄積する終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) は、受容体 (Receptor for AGEs, RAGE) を介して持続的に炎症反応を活性化し、慢性炎症の要因となる可能性が示唆されている。このことから、AGEs-RAGE 系は慢性炎症の治療標的候補として有望と考えられるものの、その活性化メカニズムには不明確な点が残されている。AGEs は、RAGE 以外の受容体 (Toll-like receptor, TLR) のアゴニストとしても作用する可能性が示唆されている。そのため、AGEs-RAGE 系に焦点をあてた解析を行うためには TLR を介した作用を除外することのできる細胞評価系が必要と考えられる。そこで本研究において我々は、ゲノム編集により TLR を欠損させた免疫担当細胞を作製した。作製した細胞は、欠損させた受容体のアゴニストに対する応答性が低下しており、今後 AGEs-RAGE 系の解析を進める上で有用なツールとなると考えられる。

1. 背景と目的

本邦は世界に類をみない高齢人口の増大局面を迎えており、健康寿命の延伸が喫緊の課題である。この課題を解決するためには、メタボリックシンドロームをはじめとする生活習慣や加齢に伴って進行する疾患のメカニズムの解明と治療戦略の構築が重要と考えられる。近年、これらの疾患の形成に非感染性の炎症の遷延 (慢性炎症) が寄与している可能性が指摘されている。また、慢性炎症が生じる要因として、加齢や高血糖に伴い生体内に蓄積することが知られている終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) が注目を集めている [1, 2]。AGEs は糖類と生体分子が非酵素的に結合することによって生じ、マルチリガンド受容体である Receptor for AGEs (RAGE) を介して炎症反応を活性化することが報告されている。この知見は、生体内に蓄積した AGEs による持続的な AGEs-RAGE 系の活性化が、慢性炎症の本体である可能性を強く示唆している [3]。

しかし一方で、RAGE が AGEs を認識するメカニズムや、RAGE 下流のシグナル伝達に関与する分子は完全に明らかになっていない。慢性炎症病態を理解し、治療戦略を構築するためには、これらの分子メカニズムを解明する必要がある。これまでに我々

は、AGEs と相互作用する内在性分子のスクリーニングを試み、AGEs と複合体を形成する可能性をもつ分子を複数同定している。これらの分子の一部について解析を進めたところ、AGEs と相互作用する分子の共存により AGEs-RAGE 系の活性が変化する可能性が示唆された [4]。この知見は、AGEs が単独で RAGE に作用するメカニズムに加え、AGEs が他の分子と複合体を形成して AGEs-RAGE 系を活性化するメカニズムが存在する新たな可能性を示唆している。

AGEs が複合体を形成して RAGE に作用することを検証するためには、RAGE が発現しており、AGEs 刺激に応答する RAW264.7 細胞等の免疫担当細胞を用いることが望ましい。しかしこれらの細胞には、AGEs が RAGE と同様にリガンドとして作用することが示唆されているマルチリガンド受容体 Toll-like receptor (TLR) が発現している。従って免疫担当細胞を AGEs-RAGE 系の機能解析に供する場合、TLR を介した作用が同時に生じるため解析が困難となる。

そこで本研究では、ゲノム編集により TLR を欠損させた免疫担当細胞を作製し、AGEs の作用を RAGE のみに焦点をあてて解析することが可能な評価系の構築を試みた。

2. 方法

遺伝子欠損細胞の構築

エレクトロポレーション法 (Neon Transfection System, サーマサイエンティフィック) により Cas9 タンパク質 (GE ヘルスケア・ジャパン), crRNA (GE ヘルスケア・ジャパン, IDT), tracrRNA (GE ヘルスケア・ジャパン, IDT) を, 5×10^6 個の RAW264.7 細胞に導入した. 細胞への変異導入効率は, ミスマッチ切断アッセイ (Guide-it Mutation Detection Kit, タカラバイオ) により検討した. 続いて, 限界希釈法により変異の導入が確認された細胞集団のクローニングを行った. 得られた複数のクローンについて, 変異導入が推定される領域周辺のゲノム DNA 配列を PCR により増幅し, シーケンス解析に供した (ユーロフィンジェノミクス). 解析結果より, 変異導入によりフレームシフトが生じているクローンを選択し, 以下の解析に供した.

遺伝子欠損細胞の性状の評価

TLR4 アゴニストとして E. coli K12 株由来 Lipopolysaccharide (LPS) (Invivogen), TLR2 アゴニストとして Pam3CSK4 (Invivogen), RAGE 等のアゴニストとして glyceraldehyde (Sigma) と BSA (ナカライテスク) から調製した AGEs を培地 (10%FBS (Gibco) を添加した DMEM (Sigma)) に混合し, 野生型 RAW264.7 細胞および各 KO クローンに与えた. 6 時間培養後, FastGene RNA 精製キット (日本ジェネティクス) により total RNA を抽出し, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) により逆転写し cDNA を合成した. 続いて, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (タカラバイオ) による real time PCR 解析に供した. プライマーは, タカラバイオより購入した (β -actin, MA050368-F および-R; TNF α , MA154015-F および-R).

統計解析

統計解析は R (version 3.1.3, The R Foundation for statistical computing) を用い, Student の t 検定により

行った. P 値 < 0.05 を統計学的有意差ありとした. 全てのデータは平均値 \pm 標準誤差にて表記した.

3. 結果と考察

遺伝子欠損細胞の構築

本研究では, ゲノム編集により TLR4, TLR2, RAGE および TLR4-TLR2-RAGE を欠損した RAW264.7 細胞の構築を試みた. ゲノム編集において変異導入箇所のガイドとなる crRNA は, その設計位置によっては, 十分に機能しない場合があることが知られている. そこで, クローニングを行う前の段階で, ミスマッチ切断アッセイ (図 1) により変異導入効率の確認を行うことで crRNA の優劣を判断した. 各遺伝子について複数の crRNA を用いて検討を行い, 最も変異導入効率が高かった crRNA を用いて以下の検討を行った. ミスマッチ切断アッセイにより算出された各遺伝子の crRNA による変異導入効率は以下の通りであった. TLR4 : 30%, TLR2 : 32%, RAGE : 9%.



図 1. ミスマッチ切断アッセイによる TLR4 遺伝子への変異導入の確認 変異導入領域周辺のゲノム DNA を PCR により増幅し, PCR 産物をミスマッチ切断酵素 (Guide-it Resolvase) により消化し, アガロースゲル電気泳動に供した. 酵素消化により, 変異導入により生じたミスマッチ部分が切断され, 消化断片 (矢印) が検出される.

引き続き, ミスマッチ切断アッセイにより変異導入が確認された細胞を限界希釈法によりクローニングした. 得られたクローンについて, ゲノム DNA

の crRNA の設計領域周囲を PCR により増幅し、シーケンス解析に供した。その結果、塩基の挿入や欠損が生じており、変異導入に成功したクローンが見出された。一方で、変異導入が確認された場合であっても、アミノ酸残基単位の変異にとどまるクローンも存在していた。このような場合、標的遺伝子より発現するタンパク質は、一部のアミノ酸残基のみが変異した分子となり、本来の機能を保持している可能性が考えられる。そのためシーケンス解析結果を

精査し、変異導入によりフレームシフトが生じたクローンを選別し、標的遺伝子の KO クローンとして採用し、以下の解析に供した。また、TLR4-TLR2-RAGE KO クローンについては、TLR4 KO クローンにおいて TLR2 遺伝子に対する変異導入により TLR4-TLR2 KO クローンを作製し、このクローンに RAGE 遺伝子に対する変異導入を行うことにより作製した。

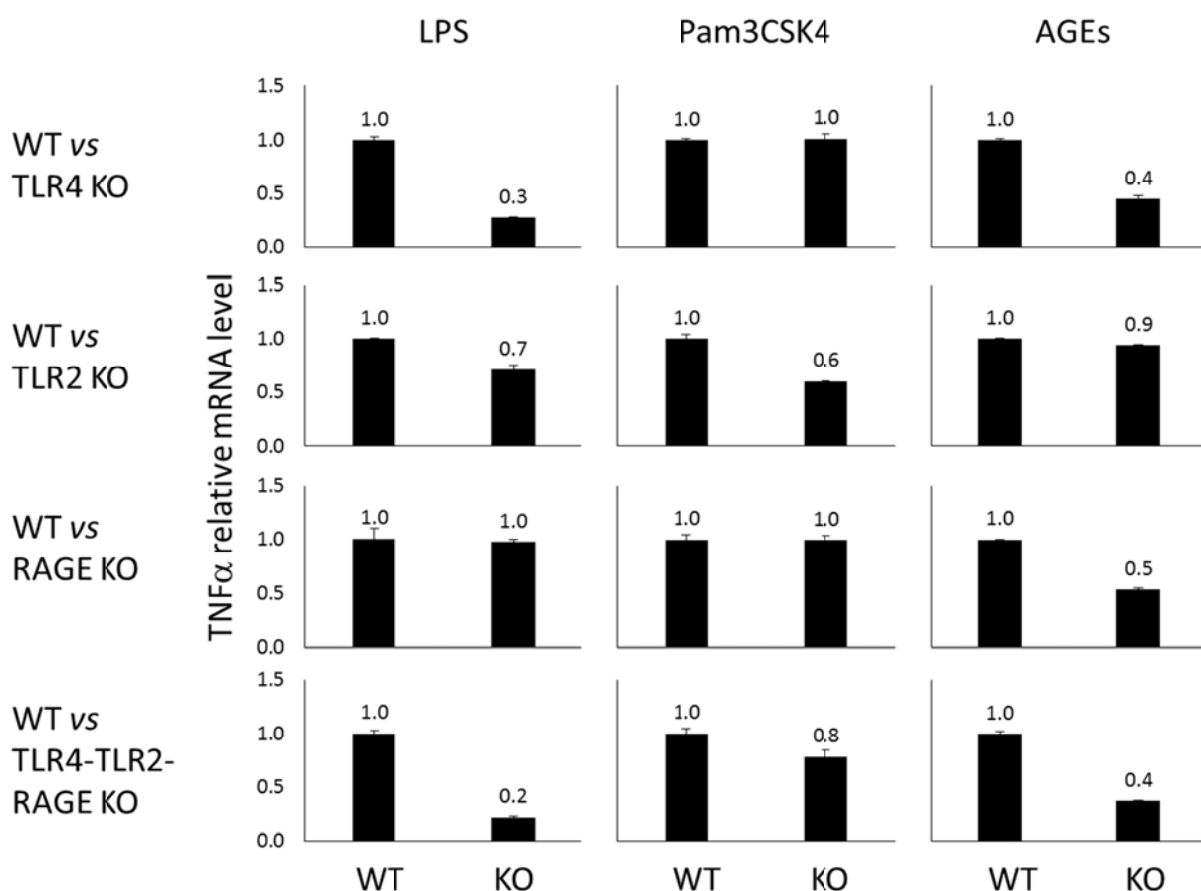


図 2. 各種アゴニストに対する KO クローンの応答性の比較 1 μ g/mL LPS, 300 ng/mL Pam3CSK4 および 500 μ g/mL AGEs により野生型細胞 (WT) および各 KO クローン (TLR4 KO, TLR2 KO, RAGE KO および TLR4-TLR2-RAGE KO) を刺激し, real time RT-PCR により TNF α の mRNA レベルを相対定量した。

遺伝子欠損細胞の性状の評価

続いて、作製した各 KO クローンの性状を評価するために、TLR4, TLR2 および RAGE のアゴニストに対する応答を検討した。本研究では、TLR4 アゴニストとして E. coli K12 株由来の LPS, TLR2 アゴニストとして細菌由来のリポタンパク質の N 末端ア

ナログである Pam3CSK4, RAGE 等のアゴニストとして AGEs を用いた。これらのアゴニストで野生型細胞と KO クローンを刺激した際の応答を、TNF α の mRNA 量にて比較した (図 2)。その結果、TLR4 KO クローンにおいて LPS に対する応答性が低下していることが確認された (図 2, 1 行目左)。この結

果は、このクローンにおいて TLR4 が機能していないことを示しており、想定通り TLR4 KO クローンは得られたことが確認された。一方で、このクローンは AGEs 刺激に対する応答性も低下していることが見出された (図 2, 1 行目右)。この結果は、AGEs が TLR4 のアゴニストとして作用する可能性を示唆している。

また、TLR2 KO クローンにおいて Pam3CSK4 に対する応答性が低下していることが確認された (図 2, 2 行目中)。この結果は、このクローンにおいて TLR2 が機能していないことを示しており、想定通り TLR2 KO クローンは得られたことが確認された。さらに、このクローンは LPS に対する応答性も低下していることが見出された (図 2, 2 行目左)。この原因として、TLR4 アゴニストとしての LPS の特異性が低く、本研究の実験条件では TLR2 を介した細胞応答が生じた可能性が考えられるものの、今後より詳細な検討が必要である。一方で、このクローンは AGEs 刺激に対する応答が大きく変化しておらず、AGEs は TLR2 のアゴニストとして作用しない可能性が考えられた (図 2, 2 行目右)。

また、RAGE KO クローンでは AGEs に対する応答性が低下していることが確認された (図 2, 3 行目右)。一方で、LPS と Pam3CSK4 に対する応答性は変化しないことが見出された (図 2, 3 行目左, 中)。これらの結果は、RAGE は AGEs の受容体として機能し、他の TLR アゴニストの受容体としては機能しないことを示唆している。

また、TLR4-TLR2-RAGE KO クローンについては、それぞれの標的遺伝子を個別に欠損させたクローンにおいて得られた上述の結果を支持する結果が得られた (図 2, 4 行目)。

以上の検討により、TLR4, TLR2 および RAGE の各受容体を欠損した RAW264.7 細胞、および 3 つの受容体を全て欠損した細胞を得ることができた。これらの細胞を AGEs-RAGE 系解析のための評価系として確立するためには、本研究において検討した TNF α の mRNA レベル以外の方法によって各細胞の性状をより詳細に評価する必要がある。今後の検討

により評価系を確立し、AGEs の複合体形成が AGEs-RAGE 系の機能に与える影響の解析につなげたいと考えている。

4. 謝辞

本研究をご支援いただき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。

5. 引用文献

- [1] Kaji, Y., Usui, T., Oshika, T., Matsubara, M., Yamashita, H., Araie, M., Murata, T., Ishibashi, T., Nagai, R., Horiuchi, S., 2000. Advanced glycation end products in diabetic corneas. *Investigative ophthalmology & visual science* 41, 362–368.
- [2] Li, S.-Y., Du, M., Dolence, E.K., Fang, C.X., Mayer, G.E., Ceylan-Isik, A.F., LaCour, K.H., Yang, X., Wilbert, C.J., Sreejayan, N., Ren, J., 2005. Aging induces cardiac diastolic dysfunction, oxidative stress, accumulation of advanced glycation endproducts and protein modification. *Aging Cell* 4, 57–64.
- [3] Takeuchi, M., Yamagishi, S., 2004. TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases. *Medical Hypotheses* 63, 449–452.
- [4] Watanabe, M., Toyomura, T., Wake, H., Liu, K., Teshigawara, K., Takahashi, H., Nishibori, M., Mori, S., 2017. Advanced glycation end products attenuate the function of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis to regulate the inflammatory response. *Molecular and Cellular Biochemistry* 434, 153–162.

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) サブファミリー間の触媒機能の相違の原因を明らかにすることを目的とし、第 2 年度である本年度は、初年度に引き続き、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 $[V_{\max}]$ 、Michaelis 定数 $[K_m]$ など）及び阻害定数を算出した。また、CYP2C9 では遺伝子多型の影響も検討した。トルブタミド水酸化活性では CYP2C サブファミリー間及び CYP2C9 変異体間で V_{\max} 及び K_m の相違が確認された。各種ステロイドホルモンの影響の CYP2C サブファミリーに対する阻害活性を比較したところ、テストステロン及びプロゲステロンは CYP2C9 に対して同程度の阻害活性を示した。一方、テストステロンは CYP2C19 による活性をほとんど阻害しなかったが、プロゲステロンは CYP2C19 活性に対して強い阻害作用を示した。コルチゾールには CYP2C9 及び CYP2C19 活性の阻害は認められなかった。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

ヒトに投与された薬物は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。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、医薬品の約 30%の代謝に関与している 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（CYP2C9.1）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、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。第 2 年度である本年度は、初年度に引き続き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。特に、今年度は、CYP2C9 の変異体である CYP2C9.2 (Arg144Cys) 及び CYP2C9.3 (Ile359Leu)³⁾ も加えて、CYP2C9 の 1 アミノ酸変異の影響も検討した。

2. 方法

1. 材料

大腸菌に発現した CYP2C8、CYP2C9.1、CYP2C9.2、CYP2C9.3 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

トルブタミド水酸化活性は既報⁴⁾の HPLC 法で測定し、CYP2C8、CYP2C9 と変異体及び 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ては、各種濃度の 3 種ステロイドホルモン（テストステロン、プロゲステロン及びコルチゾール）を添加した時の

トルブタミド水酸化活性を、添加しない時の代謝活性と比較し、阻害様式及び阻害定数 (K_i) を算出した。

3. 結果

トルブタミド水酸化活性においては、CYP2C19 による K_m は 346 μM 、 V_{\max} は 13.7 nmol/min/nmol P450、 V_{\max}/K_m は 39 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{nmol}$ P450 であり、CYP2C19 における K_m 、 V_{\max} 及び V_{\max}/K_m 値は CYP2C9.1 より大きいことが示された (表 1)。一方、CYP2C8 では、基質濃度 (S) 500 及び 1000 μM での活性値 (v) が 0.13 及び 0.41 nmol/min/nmol P450 であり、 v/S は 0.3-0.4 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{nmol}$ P450 となり、CYP2C9 及び CYP2C19 の K_m に比べ非常に低い値であった。したがって、以降のトルブタミド水酸化活性における各種阻害剤の影響の検討では、CYP2C8 は用いないこととした。また、CYP2C9 変異体では、CYP2C9.2 の K_m 、 V_{\max} 及び V_{\max}/K_m 値は CYP2C9.1 と同程度であったが、CYP2C9.3 の K_m 値は CYP2C9.1 の約 3 倍、 V_{\max} 値は約 1/2 であり、 V_{\max}/K_m 値は約 1/8 であった。CYP2C9.3 の K_m 値は CYP2C19 と同程度であった。

表 1. CYP2C8、CYP2C9 及び CYP2C19 によるトルブタミド水酸化活性

	K_m (μM)	V_{\max} (nmol/min/nmol)	V_{\max}/K_m ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{nmol}$)
CYP2C8	—	—	(0.3-0.4) ^{a)}
CYP2C9.1 ⁵⁾	98	2.1	21
CYP2C9.2 ⁵⁾	130	2.3	18
CYP2C9.3 ⁵⁾	335	0.91	2.7
CYP2C19	346	13.7	39

a) v/S 。基質濃度 500 及び 1000 μM での活性値は 0.13 及び 0.41 nmol/min/nmol であった。

CYP2C サブファミリーによるトルブタミド水酸化活性に対する各種ステロイドホルモンの影響を比較した (表 2)。テストステロンは CYP2C19 に対して 100 μM までほとんど影響しなかったが、CYP2C9 に対しては 100 μM で約 1/2 に活性が低下した。プロゲステロンは CYP2C19 に対して 1 μM で 32% 阻害し、CYP2C9.1

に対しては 10 及び 100 μM でそれぞれ 40% 及び 79% 阻害した。テストステロン及びプロゲステロンは CYP2C9.2 に対して CYP2C9.1 と同程度の阻害活性を示したが、CYP2C9.3 に対しては 100 μM においても顕著な阻害は認められなかった。一方、コルチゾールは CYP2C9 及び CYP2C19 によるトルブタミド水酸化活性の阻害は示さなかった。プロゲステロンの CYP2C19 に対して最も強い阻害を示したので、種々の基質濃度及び阻害剤濃度を用いて阻害様式及び K_i 値を検討したところ、プロゲステロンは競合阻害を示し、 K_i 値は 1.11 μM であった (図 1)。

表 2. CYP2C9.1、CYP2C9.2、CYP2C9.3 及び CYP2C19 によるトルブタミド水酸化活性に対する各種ステロイドホルモンの阻害活性

ステロイド	P450	% of control		
		1 ¹⁾	10 ¹⁾	100 ¹⁾
テストステロン	CYP2C9.1	82.3	86.8	46.4
	CYP2C9.2	100.3	84.7	42.3
	CYP2C9.3	96.0	104.2	(<74)
	CYP2C19	103.8	89.5	86.7
プロゲステロン	CYP2C9.1	92.2	60.1	21.4
	CYP2C9.2	88.8	69.1	33.7
	CYP2C9.3	102.2	84.3	77.5
	CYP2C19	68.0	24.1	7.8
コルチゾール	CYP2C9.1	—	—	88.3
	CYP2C19	—	107.8	89.2

1) 阻害剤 (ステロイド) 濃度 (μM)

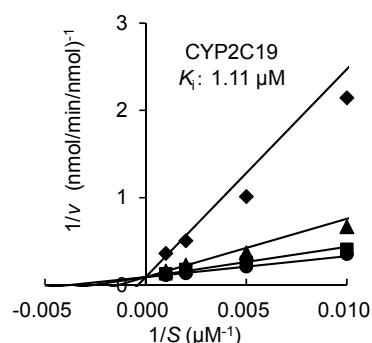


図 1. CYP2C19 によるトルブタミド水酸化活性に対するプロゲステロンの阻害

プロゲステロン濃度 : 0 μM (●)、0.5 μM (■)、2 μM (▲)、10 μM (◆)

4. 考察

初年度より、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）を用いて検討してきたが、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。一方、トルブタミド水酸化活性では、CYP2C19 における K_m 、 V_{max} 及び V_{max}/K_m 値は CYP2C9 より大きく、CYP2C8 では非常に低い活性しか認められなかった。さらに、CYP2D6 が強いことが報告されている *p*-チラミンからドパミンの生生活性⁶⁾は、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、初年度は、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、アモキシシリン及びピペラシリンは 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、CYP2C8 と CYP2C9 の間に相違が認められた。また、アゾール系抗真菌薬であるケトコナゾール及びミコナゾールの CYP2C8 に対する K_i 値 (0.86–1.98 μM) は CYP2C19 での報告値 (0.33–28 μM)⁸⁾と同程度かそれより低い値であった。

今年度は、ヒトにおいて分泌され体内で循環しているステロイドホルモンが CYP2C サブファミリーの活性に対して影響するののかという観点も勘案して、代表的なステロイドホルモンの影響を検討した。ステロイドホルモンとしては、男性ホルモンであるテストステロン、黄体ホルモンであるプロゲステロン及び糖質コルチコイドであり、ストレスホルモンとしても注目されているコルチゾールを用いた。テストステロンは CYP2C19 による活性をほとんど阻害しなかったが、プロゲステロンは CYP2C19 活性に対し

て 1 μM で強い阻害を示した。テストステロン及びプロゲステロンは CYP2C9.2 に対して CYP2C9.1 と同程度の阻害活性を示したが、CYP2C9.3 に対しては顕著な阻害は認められなかった。一方、コルチゾールには CYP2C9 及び CYP2C19 活性の阻害は認められなかった。プロゲステロンの CYP2C19 に対して最も強い阻害を示したので、種々の基質濃度及び阻害剤濃度を用いて阻害様式及び K_i 値を検討したところ、プロゲステロンは競合阻害を示し、 K_i 値は 1.11 μM であった (図 1)。

このように、ステロイドホルモンの間で CYP2C サブファミリーに対する阻害活性に差が認められた。この一因としては、これらのステロイドホルモンの主要代謝酵素の相違が関係していると思われる。テストステロンは、2 β -及び 6 β -水酸化反応には主に CYP3A4 が関与するが、16 α -水酸化反応には CYP2C9 及び CYP2C19 が寄与しており、プロゲステロンは、2 β -、6 β -及び 16 α 水酸化反応には主に CYP3A4 が関与するが、21-水酸化反応には CYP2C19 が寄与している⁹⁾。一方、コルチゾールでは 6 β -水酸化反応には主に CYP3A4 が関与すると報告されている⁹⁾。したがって、コルチゾールには CYP2C サブファミリーに対する阻害活性が認められなかったが、テストステロン及びプロゲステロンでは CYP2C9 及び CYP2C19 の反応部位においてトルブタミドと競合するため、競合阻害が起こっていたものと推察された。このことは、さらに多くのステロイドホルモンを用いて詳細に確認していく必要があり、生体内でのステロイドホルモンの薬物代謝酵素に及ぼす影響という観点からも考察していきたいと考えている。

今年度、トルブタミド水酸化活性に対する 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ステロイドホルモンの阻害活性を検討した。今後、さらに多くの基質及び阻害剤の影響を検討し、*in vitro* 実験で得られた結果と Docking simulation 法⁷⁾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詳細に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, 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).
- 5) Niwa T, Hata T. The effect of genetic polymorphism on the inhibition of azole antifungal agents against CYP2C9-mediated metabolism. *J Pharm Sci.* 105: 1345-1348 (2016).
- 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) 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).
- 9) Niwa T, Murayama N, Imagawa Y, Yamazaki H, Regioselective hydroxylation of steroid hormones by human cytochromes P450, *Drug Metab Rev*, 47: 89-110 (2015).

発酵乳ホエーより単離した睡眠を誘導するペプチドの作用機序の解明

就実大学 薬学部

坪井 誠二

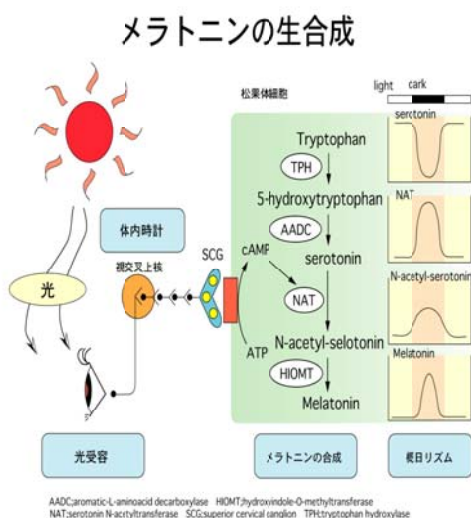
睡眠は、人が生存する上で衣食住とともに重要な課題である。不眠に悩んでいる現代人は多く、鬱病をはじめとする自律神経性の疾患や、睡眠不足に起因するあらゆる疾患の原因となっている。睡眠不足の原因は、不規則な生活様式を強いられることで、睡眠異常等の概日リズム障害や、その要因のひとつとして考えられる、脳内で作られる睡眠ホルモンであるメラトニン分泌リズムの異常が考えられる。我々は、睡眠ホルモンであるメラトニンを作り出す酵素セロトニン N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) 活性が、内因性トリペプチドであるグルタチオンによってレドックス制御をうけることを明らかにした。乳酸菌による発酵乳ホエーをラットに与えることにより、内因性メラトニン分泌リズムの位相調整又は振幅増強作用があることをみいだしており、この作用は、発酵乳ホエー成分が細胞内グルタチオンレベルを上昇させ、メラトニン合成の律速酵素である NAT 活性を増強させていることによっていると考えている。

1. はじめに

概日リズムを司る松果体ホルモンであるメラトニン、その生合成は律速酵素であるセロトニン N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) を介して複雑に制御されている。ここでは、今まで報告されているタンパク質レベル及び転写調節レベルでの制御と、我々が明らかにしたレドックス制御機構について述べる。

2. 概日リズムとメラトニン合成機構

生物は、広く地球の自転周期に適応するため、約 24 時間周期の生物リズム（概日リズム）を持っている。概日リズムは、睡眠・覚醒だけでなく自律神経や代謝系といった全身の生理活動に影響を与え、生物が 1 日の昼夜リズムに伴って効率よく快適に生活していく上で重要なシステムである。このリズムを生み出す生物時計は、単細胞生物からヒトに至るまで広く存在しており、様々な活動や代謝の日内変動を制御している。哺乳類において、生物時計は視床下部の「視交叉上核」と呼ばれる神経細胞集団に存在している。この視交叉上核は、本来約 25 時間の自律的な内因性のリズムを持っているが、網膜で光刺激を受け、網膜視床下部神経経路を介して時間をリセットする事で、約 24 時間周期の外界リズムに同調させている。視交叉上核で形成された概日リズムは、上頸部交感神経節の交感神経を介して松果体と呼ばれる内分泌器官に伝えられる。松果体は、概日リズムに応答してメラトニンを合成している。すなわち、



松果体のメラトニン量は、昼間は非常に低レベル（ほとんど 0）に抑えられているが、夜間に劇的に上昇して真夜中頃にピークとなり、その後急速に減じ、朝方には消失する。メラトニンは合成後直ちに血中に放出され、体中を循環し、メラトニン受容体を介して時間情報を全身に伝える。メラトニンは時間情報ホルモンであり、松果体は時間情報を液性情報に変換する装置である。

メラトニンは血中より供給される L-トリプトファンを前駆物質としてトリプトファンヒドロキシラーゼと芳香族 L-アミノ酸カルボキシラーゼの 2 つの酵素によりセロトニンに変換された後、NAT とヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼにより合成される。これらの酵素のうち NAT が最もよく時間情報に応答し、その活性は強いリズム性を示す。つまり、NAT 活性の変動とメラトニンの合成量はほぼ対応しており、NAT はメラトニン合成の律速酵素である。従って、概日リズムの形成と維持機構を明らかにする上で、松果体における NAT 活性の調節機構の全貌を明らかにする事は極めて重要である。NAT 活性の調節機構を明らかにするために、まず、NAT の構造について説明する。

3. NAT の構造

NAT は、207 個（ラットは 205 個）のアミノ酸からなる分子量 23,076 の可溶性タンパク質である^{1,2)}。基質はセロトニンとアセチル CoA であり、N-アセチルセロトニンを生成する反応を触媒する。NAT は全体的には球状であり、5 つのアルファ・ヘリックス及び 7 つのベータ・シートを持っている。3 つのポリペプチド鎖（ループ 1, 2 及び 3）がアセチル CoA 結合部位の上にあり、漏斗状の形をとっている。NAT が活性化するためには、まずアセチル CoA が NAT のアセチル CoA 結合部位に結合することが必要である。その結果、ループ 1 に存在する Phe 56 及び Pro 64、ループ 3 に存在する Val 183, Leu 186 及び Phe 188

により疎水性のポケットが形成される。セロトニンはこの疎水性のポケットに入り込み、アセチル CoA よりアセチル基を受け取り、N-アセチルセロトニンとして NAT から離れていく。すなわち、セロトニンが NAT の基質となるためにはアセチル CoA による疎水性ポケットの形成が必修条件であり、NAT の安定化剤としてアセチル CoA が報告されているのはこの理由からである。

さらに、NAT と 14-3-3 ζ タンパク質との複合体の構造が報告されている³⁻⁵⁾。14-3-3 タンパク質は現在 9 つのサブタイプ（α, β, γ, δ, ε, η, σ, τ, ζ）が同定され、松果体には ε, ζ が発現しており、特に ζ は NAT との複合体形成に重要である^{6,7)}。リン酸化された Thr 31 のリン酸基部分が 14-3-3 ζ タンパク質の Arg 56, Arg 127 及び Tyr 128 残基と水素結合することにより、複合体を安定化しており、この結果は、14-3-3 ζ タンパク質と NAT との結合にリン酸化が重要であることを示している。

4. NAT の制御機構

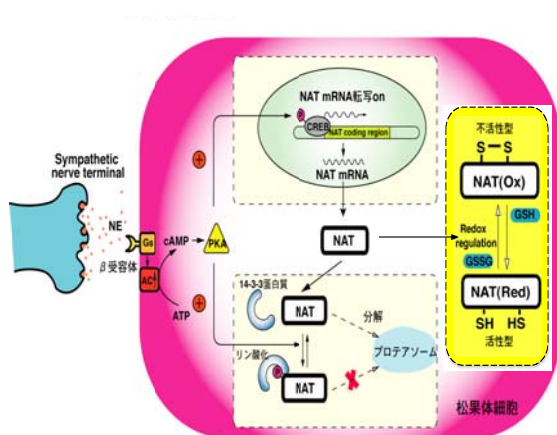
1) 転写調節レベルでの制御

生体時計による NAT 活性の制御機構の研究は、転写調節制御とタンパク質レベルでの活性制御の両方向から研究が進められてきた。転写調節による制御については、ラットやヒトの細胞を用いてこれまでに次のカスケードが明らかになっている。すなわち、時間情報により夜間に交感神経末端より放出されたノルアドレナリンは、松果体細胞上の β 受容体に結合し、Gs タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し細胞内の cAMP 濃度を上昇させる。その結果、A キナーゼが活性化され、転写因子 CREB がリン酸化される。リン酸化 CREB は NAT 遺伝子の転写量を増加させ、その結果、NAT 活性が上昇しメラトニン出力が増加する。この一連のカスケードは夜間にのみ起こる。明け方には交感神経からのノルアドレナリン入力がなくなり、NAT 活性上昇とメラト

ニン出力もなくなる⁸⁾。ヒツジ等の有蹄類においても、同様に NAT 活性は昼低く（ほとんど検出されない）夜高いというリズム性を示すが、NAT 遺伝子の転写量は昼と夜の間でほとんど差がない。従って、この場合はラットやヒトで見られるような転写調節による活性制御より、後述するタンパク質レベルでの活性制御が優勢であると考えられる。

2) タンパク質レベルでの制御

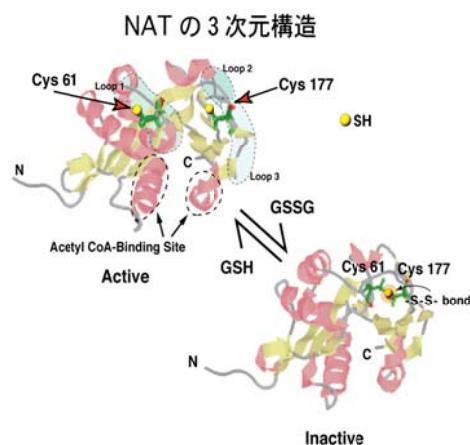
タンパク質レベルでの制御は次のように理解されている。すなわち、ノルアドレナリン刺激により活性化された A キナーゼは NAT タンパク質自体をもリン酸化する。NAT タンパク質は、昼間はプロテアソームにおいて分解されているため検出できないが、夜間、リン酸化された NAT にはシャペロンである 14-3-3 タンパク質が結合する。そのためこの複合体はプロテアソームで分解されず、活性を維持していることが明らかとなっている⁹⁾。



5. グルタチオンによる NAT のレドックス制御機構

NAT 活性制御が cAMP を介して転写及びタンパク質レベルで行われていることを述べてきた。しかし、実際の生理現象はもっと複雑である。例えば、夜間に強い光を受けると NAT 活性は急速に消失する。この現象を cAMP を介する制御だけで説明することは困難である。そこで、全く別の制御機構の存在が示

唆された。以前より、NAT は *N*-ethylmaleimide (NEM) のような SH 基修飾試薬によって活性が阻害される事から、活性発現に重要なシステイン残基を有していることが予想されていた¹⁰⁾。我々は NAT をアセチル CoA で前処理した場合、NEM による活性阻害が抑制されることから、¹⁴C-NEM を用いてアセチル CoA 存在下または非存在下における ¹⁴C-NEM の取り込みを比較することにより、このシステイン残基を同定した。その結果 Cys 61 及び Cys 177 が活性発現に重要であることがわかった。この 2 つのシステイン残基の間で -SH/-S-S- の交換反応が起こり、還元型 (-SH 型) で 100% の活性を示す一方、酸化型 (-S-S- 型) では活性がゼロになることが判明した¹¹⁾。NAT の立体構造からこの現象を考えると、Cys 61 と Cys 177 のシステインの間での -S-S- 結合の形成が、触媒部位へのアセチル CoA の結合を阻害していると考えられる。つまり、-SH/-S-S- 結合の変換がアセチル CoA の触媒部位への入り口を開閉するスイッチの役割を果たしており、基質が活性中心に到達することをここで制御していると考えられる。-S-S- 結合が解裂して 2 つのシステイン残基が還元型になることで NAT 活性がオンとなり、酸化型については -S-S- 結合が形成され、アセチル CoA 結合部位の上部を閉じたため NAT 活性が消失したと考えられる。



さて、重要なことは、NAT の分子内 -SH/-S-S- 結

合の変換（スイッチング）は細胞内においても観察されたことである。すなわち、過酸化水素を加えて酸化型グルタチオンを増加させてやると NAT は酸化型に変換され活性はなくなるが、細胞内環境を還元状態にしてやると NAT は活性型になった¹¹⁾。更に、最近の研究結果より酸化型 NAT はアセチル CoA が結合できないだけでなく A キナーゼによるリン酸化を受けないことが明らかとなった（未発表）。このことは、NAT の分子内 -SH/-S-S- 結合の変換がタンパク質レベルでの制御に影響を及ぼしていることを示している。夜間において NAT が酸化型になった場合、活性が消失するだけでなくプロテアソームによる分解を受けることが示唆された。

我々の得たこの結果は NAT の制御について重要な意味があると考えられる。すなわち、既知の cAMP を介した制御機構だけでなく細胞内の酸化・還元状態によっても制御されている可能性があるわけである。

6. 終わりに

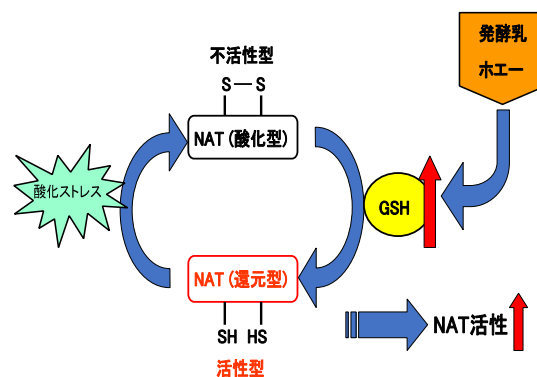
グルタチオンは種々の生物に高濃度に存在するトリペプチドであり、細胞内の主な非タンパク性チオールである。グルタチオンは抗酸化作用等種々の生理活性を持つことが知られており¹²⁻¹³⁾、生体防御機構において重要な役割を果たしている。また、脳内グルタチオンは睡眠リズムに一致したサーカディアンリズムをもって変動することから内因性睡眠物質であることが知られており、この睡眠作用は N-メチル-D-アスパラギン酸レセプターを介するものである¹⁴⁾。

我々は、細胞内の酸化・還元状態でオン・オフが切り替わるという NAT 活性の分子内スイッチを同定した。このスイッチの切り替えにグルタチオンが重要な働きをしており、前述した睡眠効果とは異なったメカニズムでのグルタチオンによる概日リズム制御であった。今回明らかにした成果は、細胞内の酸

化・還元状態により NAT 活性が制御できること、即ち、細胞内中のグルタチオンの酸化・還元状態を調節することによりメラトニンの合成を制御し、最終的に人工的に概日リズムを制御する方法の開発につながるものと考えており、実際、細胞中グルタチオン量を増加させる物質が報告されている^{15, 16)}。我々の研究室においても、発酵乳ホエーを用いて睡眠を誘導するペプチドの開発を行っており、臨床への応用が期待されている。

発酵乳ホエーより単離した NAT 活性ペプチド

- ① VPP
- ② IPP
- ③ MHQPHQPLPPTVMFPPQSVL
- ④ SWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVL
- ⑤ LQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVL
- ⑥ APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
- ⑦ MHQPHQPLPPTVMFPPQ
- ⑧ SWMHQPHQPLPPTVMFPPQ
- ⑨ LQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQ



★ 発酵乳ホエーはグルタチオンを介して NAT のレドックス制御による活性を調節することが示唆された。

引用文献

- 1) Hickman, A.B., Namboodiri, M.A., Klein, D.C., and Dyda, F.: The structural basis of ordered substrate binding by serotonin N-acetyltransferase: enzyme complex at 1.8 Å resolution with a bisubstrate analog., *Cell*, **97**, 361-369 (1999).
- 2) Hickman, A.B., Klein, D.C., and Dyda, F.: Melatonin

- biosynthesis: the structure of serotonin *N*-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism., *Mol. Cell*, **3**, 23-32 (1999).
- 3) Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H., and Liddington, R.: Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein., *Nature*, **376**, 191-194 (1995).
 - 4) Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Cntley, L.C.: The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity., *Cell*, **91**, 961-971 (1997).
 - 5) Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., and Dyda, F.: Crystal structure of the 14-3-3 zeta: serotonin *N*-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation., *Cell*, **105**, 257-267 (2001).
 - 6) Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., and Patel, Y.: 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. *In vivo* stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF., *J. Biol. Chem.*, **270**, 5706-5709 (1995).
 - 7) Ganguly, S., Gastel, J.A., Weller, J.L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M.A.A., Coon, S.L., Hickman, A.B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Bontin, J.A., and Klein, D.C.: Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine *N*-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 8083-8088 (2001).
 - 8) Klein, D.C., Coon, S.L., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Iuvone, P.M., Rodriguez, I.R., Begay, V., Falcon, J., Cahill, G.M., Cassone, V.M., and Baler, R.: The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin *N*-acetyltransferase in the pineal gland., *Recent Prog. Horm. Res.*, **52**, 307-358 (1997).
 - 9) Gastel, J.A., Roseboom, P.H., Rinaldi, P.A., Weller, J.L., and Klein, D.C.: Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin *N*-acetyltransferase regulation., *Science*, **279**, 1358-1360 (1998).
 - 10) Namboodiri, M.A.A., Favilla, J.T., and Klein, D.C.: Pineal *N*-acetyltransferase is inactivated by disulfide-containing peptides: insulin is the most potent., *Science*, **213**, 571-573 (1981).
 - 11) Tsuboi, S., Kotani, Y., Ogawa, K., Hatanaka, T., Yatsushiro, S., Otsuka, M., and Moriyama, Y.: An intramolecular disulfide bridge as a catalytic switch for serotonin *N*-acetyltransferase., *J. Biol. Chem.*, **277**, 44229-44235 (2002).
 - 12) Joachim, D.U., Patrick, J.M., and Danyelle, M.T.: Glutathione and redox signaling in substance abuse., *Biomed. Pharmacother.*, **68**, 799-807 (2014).
 - 13) Ji, L.L., Fu, R.: Response of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide., *Am. J. Physiol.*, **189**, 549-554 (1992).
 - 14) 塩見浩人, 睡眠誘発機構と痛覚制御機構 –睡眠誘発へのオピオイドペプチドの関与, 井上昌次郎, 山本郁男 編, 睡眠のメカニズム, 74-102, 朝倉書店 (1997).
 - 15) Yama, K., Sato, K., Abe, N., Murao, Y., Tatsunami, R., and Tampo, Y., Epalrestat increase glutathione, thioredoxin, and heme oxygenase-1 by stimulating Nrf2 pathway in endothelial cells., *Redox Biology*, **4**, 87-96 (2015).
 - 16) Lou, H., Jing, X., Ren, D., Wei, X., and Zhang, X.: Eriodictyol protects against H₂O₂-induced neuron-like PC12 cell death through activation of Nrf2/ARE signaling pathway., *Neurochem. Int.*, **61**, 251-257 (2012).

ラマン分光法を利用した鼻腔内投与型粉末製剤最適化システムの開発

就実大学 薬学部 薬学科

古林呂之、井上大輔

鼻腔内投与製剤の剤形として、高用量の有効成分投与が可能で、製剤添加物により粘膜付着性や溶解補助効果を付与できる粉末状製剤の利用が検討されることがある。しかし、鼻粘膜表面の水分量は少なく、薬物の鼻粘膜透過に対して、粉末製剤の鼻粘膜上での広がりや各成分の分布状態、さらに有効成分の溶解が重要となる。本研究では、鼻腔環境における粉末製剤からの主薬の経時的な溶解パターンを評価するための測定板の作成及び得られたデータの *in vivo* 吸収性との整合性について検討した。ムチンを含ませたろ紙上に噴霧した薬物粒子を経時的にラマン分光器により測定し、そのイメージング画像から薬物の溶解プロファイルを作成した。このプロファイルは、薬物の培養細胞層透過性及びラット *in vivo* 吸収性で得られた結果を十分に説明できることが明らかとなった。また、測定板に装着するろ紙を培養細胞層に変更することで、より高精度に測定できる可能性が示された。本検討により、簡便な *in vitro* 実験から粉末状薬物の鼻腔内投与後の *in vivo* 吸収性を予測し、さらに、経鼻吸収性改善を目的とした製剤の最適化が可能な評価システム構築の可能性が明らかとなった。

鼻腔内投与製剤は、投与方法が比較的簡便なことから、嚥下困難な高齢患者、消化器疾患や寝たきりなど薬物の経口服用が困難な高度要介護患者に対して、介護者による簡便な反復投与が可能であり、ペプチド医薬品などの投与部位として期待され、多くの研究成果が報告されているが、実用に至った例は少ない。その理由として、鼻腔内容積が小さいために投与製剤量が制限されること、また、投与した製剤の鼻腔内滞留時間が確保できないために薬物の治療濃度への到達が困難な場合が多いことが挙げられる。これらへの対応策の一つとして、高用量の有効成分を投与でき、製剤添加物により粘膜付着性を付与できる粉末製剤の利用が検討される。粉末製剤からの有効成分の溶出及びその後の粘膜透過は、製剤添加物と有効成分の物理化学的性質の関係で決まり、水分量が少ない鼻粘膜からの有効成分の良好な膜透過を確保するためには、投与後の粉末製剤の鼻粘膜上の広がりや有効成分の分布状態が重要となる。一方、ラマン分光法では、物質を非破壊的に直接同定することができるため、粘膜表面における粉末状製剤の分布状態及び製剤からの主薬の溶解過程の経時的なイメージング解析が可能と考えた。そこで、本研究課題では、種々の物理化学的性質を有する薬物の鼻腔を模倣した低水分環境における溶解プロファ

イルをラマン分光法により測定し、その薬物の粘膜透過性との *dynamic* な関係について検討を行った。

【方法】**モデル薬物** 医薬品の *in vivo* 経口投与における血中薬物動態予測を目的として、Amidon ら (Pharm. Res., 12, 413–420, 1995) により提唱された Biopharmaceutics Classification System (BCS*) の分類 (表 1) に基づいて選択した。

表 1 BCS 分類

		溶解性	
		高	低
膜透過性	高	Class I	Class II
	低	Class III	Class IV

*BCS は、原薬の溶解性および膜透過性の科学的データに基づき薬物をクラスに分類する概念で、溶解性および膜透過性の両方が高い医薬品を Class I、溶解性が低く、膜透過性が高い医薬品を Class II、溶解性が高く、膜透過性が低い医薬品を Class III、両方が低い医薬品を Class IV としている。

Class I : levofloxacin, antipyrine

Class II : griseofulvin

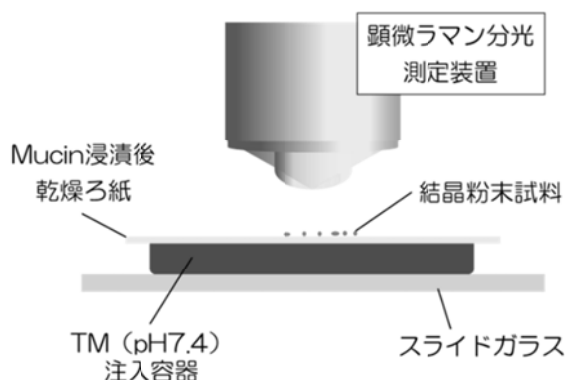
Class III : acyclovir

ラマン分光法によるイメージング解析

装置：顕微ラマン分光光度計 (inVia Raman Microscope, RENISHAW)

測定条件：レーザー波長 785 nm
レーザー出力 100%
レンズ倍率 20 倍
レーザー照射時間 1.375 秒

測定板①：スライドガラス上に透過実験用緩衝液 pH7.4 (TM) を保持する枠を固定し、その枠の上に予めムチンを含ませて乾燥したろ紙を弛み



ができないように貼り付けた (図 1)。

図 1 測定板①

測定板②：スライドガラス上に、TM を十分に浸み込ませたろ紙を置き、その上にポリカーボネート製多孔質フィルター上に培養したヒト気道上皮由来培養細胞株 Calu3 細胞層**を重ねた (図 2)。

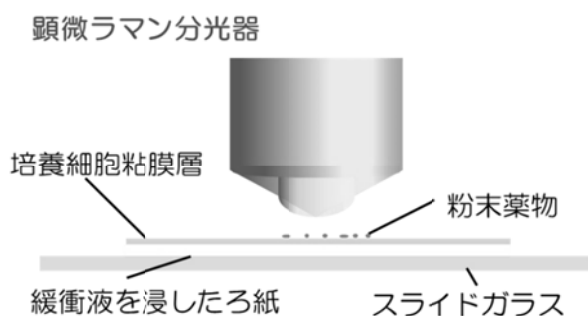


図 2 測定板②

測定：測定板① モデル薬物を測定板のろ紙上に噴霧した後、ラマン分光装置のステージにセットする。測定する薬物粒子にフォーカスを合わせた後、緩衝液を液面がろ紙に接するまで枠内に加え、緩

衝液がろ紙上面に滲み出して薬物粒子に触れたことを確認してから、経時的にラマン測定を開始した。

測定板② Calu3 細胞層上に薬物を噴霧した後、ラマン分光装置のステージにセットし、観察する薬物粒子にフォーカスを合わせて 5 分間隔で 25 分まで経時的にラマン測定した。

****Calu-3 培養** 定法に従い培養した Calu-3 細胞の懸濁液をポリカーボネート製多孔質フィルター上に播種し、その後 3 日目から air-interfaced culture 法により、7 ~ 14 日間培養して Calu-3 単層膜を作製した。培地を除去した後、apical 及び basolateral 側に透過実験用緩衝液を加えて pre-incubate した。20 分後、apical 側の緩衝液を除去し、30 分間 CO₂ インキュベータ内に静置した後に実験に使用した。

解析：各時間に測定したイメージング画像から方眼法により薬物粒子の面積を算出し、その値を時間に対してプロットした。測定開始時 (0 分) の面積値を 100% として経時的な粒子面積の減少率を算出した。また、それらの値と 0 分の差を薬物粒子の溶解率としてプロットし、最小二乗法により導いたプロファイルの傾きから溶出速度 (%/min) を求めた。

【結果】測定板①による検討 Levofloxacin の結晶粒子は、TM に触れた後、経時的に比較的速やかな減少を示し、20 分後には粒子はほとんど検出されなかった。一方、acyclovir の面積の減少は遅かった (図 3、表 3)。表 3 の数値から算出した各時間における溶解率のプロットから、溶解が直線的に進行することが示唆された。また、その傾きから求めた溶解速度は、acyclovir に比べて levofloxacin では約 3 倍速いことが明らかとなった (図 4)。Antipyrine は、結晶の溶解が極めて速く、数値データを得ることができなかった。これら溶解速度の関係を過去に行った MDCK 細胞層透過実験結果 (図 5) と比較すると、溶解の速い levofloxacin では実験開始後 20 分

後に透過速度が低下した。これはラマン測定の結果と一致しており、levofloxacin の結晶粒子が粘膜上に無くなり、透過に伴い粘膜表面の levofloxacin 濃度が低下したことを示唆すると考えられる。また、acyclovir は、ラマン測定で観察されたように溶解が遅く、20 分の時点で粘膜上の acyclovir 濃度は低下しないため、膜透過の低下がみられなかったと考えられ、両薬物の溶解と膜透過の関係に矛盾はなかった。しかしながら、*in vivo* の経鼻吸収では投与された薬物粒子は、繊毛運動により粘液と共に咽頭へ排出される、いわゆる mucociliary clearance により鼻腔から消失する。Mucociliary clearance による投与液の鼻腔内からの排出の半減期は 15～30 分とされており、未溶解の粒子が粘膜上に残っていても溶解に時間が掛かる場合は、鼻粘膜からの吸収率が低下し、bioavailability の低下に繋がると考えられる。Acyclovir のように、溶解の遅い薬物を粉末投与する場合には、鼻腔内での溶解速度を上げる製剤学的な工夫が必要となる。一方、antipyrene は、ラマン分光測定開始 5 分後には粒子が検出されなかった。溶解速度が極めて速く、細胞層透過が良好な antipyrene は、透過実験開始 20 分で投与量の約 80%が透過した。このように、ラマン測定で検出できないほどの速い溶解を示す薬物は、粉末投与により高い吸収量が見込めるため、鼻腔内投与製剤化に適していると判断できる。なお、griseofulvin はラマン分光測定中の経時変化が観察されなかった。

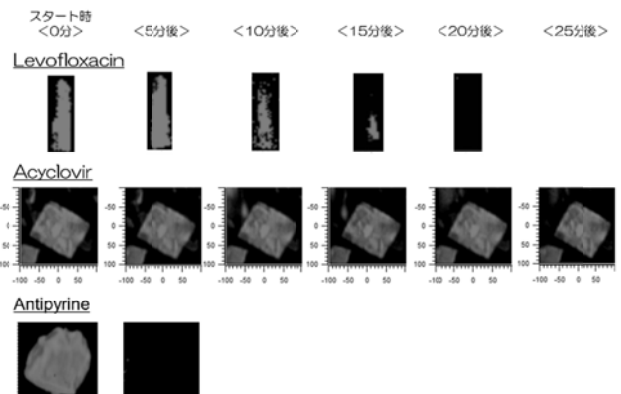


図3 ラマン分光法による結晶粒子経時変化のイメージング画像

表2 Levofloxacin及びacyclovirの結晶粒子の検出面積の変化

Drug	各時間 (min) における結晶粒子の検出面積 (% for 0 min)					
	0	5	10	15	20	25
Levofloxacin	100	62.2±9.80	42.5±13.2	11.7±3.75	2.3±9.1	-
Acyclovir	100	89.3±3.32	90.1±9.29	78.3±12.7	58.9±30.2	83.1±16.2

以上の結果より、ラマン分光法を利用することにより、鼻粘膜などの微少水分環境における薬物粒子の経時的な状態変化から、各種薬物の溶解プロファイルを明らかにすることができた。また、結晶粉末の状態変化と膜透過に一定の関係性が示されたことから、ラマン分光法による解析から薬物の鼻粘膜透過性を推測できる可能性が示唆された。

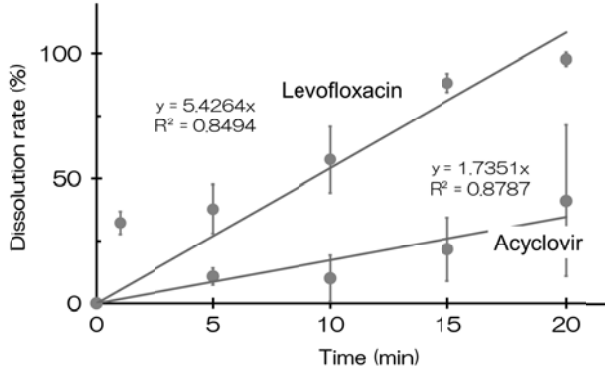


図4 結晶粒子の溶解率推移

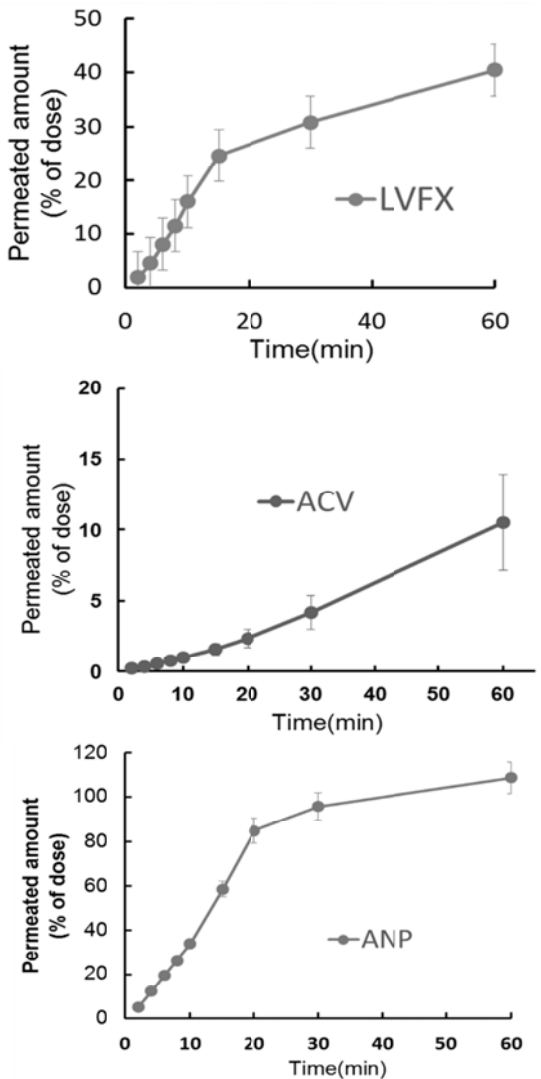


図5 MDCK細胞膜透過プロファイル

このように、簡便な *in vitro* 実験により、粉末状薬物の吸収性を予測できる可能性を明らかにすることができたが、一方で、測定板①ではろ紙表面水の移動が比較的大きく、測定中に薬物粒子が流されることが度々生じていた。より精度の高いデータを得るには、より安定した測定状態が必要となるため、改良版として、培養細胞層上でのラマン測定を試みた。

測定板②による検討 粘液を分泌する培養細胞を利用することにより、噴霧した粉末薬物が付着しやすい環境となり、測定中の薬物粒子の移動を抑えることが期待された。また、測定中の細胞層表面の乾燥を防ぐことにもつながると考えた。そこで、粘液を細胞表面に分泌する培養細胞として、気液界面培養により粘液を分泌することが報告されているヒト肺腺癌由来培養細胞株 Calu3 を用いた。

ポリカーボネート製多孔質フィルター上で Calu3 を培養し、細胞層を形成させた後、培養容器からフィルター部を切り取り、スライドガラスに貼り付けてラマン分光測定に用いた。しかしながら、比較的短時間で表面の乾燥が見られたため、TM を浸み込ませたろ紙の上に細胞層のフィルターを乗せて用いたところ (図 2)、細胞層表面の乾燥が抑えられ、さらに薬物粒子の細胞層表面での移動が大幅に改善され、ラマン分光測定の安定性が増した。

Levofloxacin の粉末を測定板②に噴霧した後のラマン測定結果から溶解速度を算出したところ、測定板①での結果よりも少し低い値を示し、粒子が完全に溶解するまでに約 30 分かかることが示された (図 6)。ムチンで再現した粘液層と細胞が分泌した粘液層に対する溶解性の差と考えられ、より生体に近い条件で測定した結果かどうかの検証を予定している。また、測定板②を用いることで溶解プロファイルのばらつきが抑えられ、精度の高い評価システムにつながる可能性が示された。

過去に実施した acyclovir 及び antipyrine の粉末をラット鼻腔内投与した実験で得られた血中濃度推移と今回得られた溶解・細胞層透過推移を比較してみると、溶解性・膜透過性がいずれも高く、BCS 分類で Class I に分類される antipyrine では吸収も速く、吸収率も高い (約 96%) ことが示され (図 7

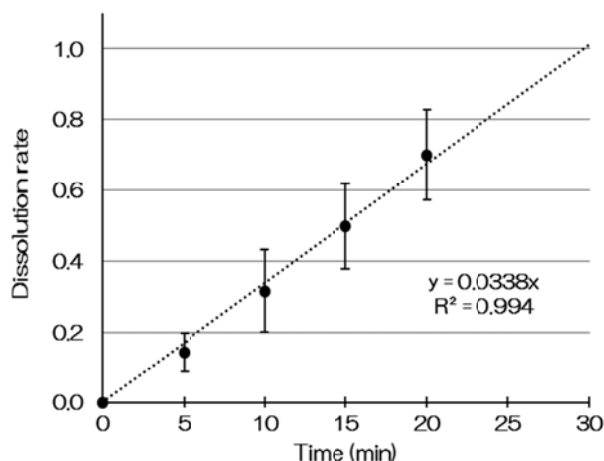


図6 Levofloxacin粒子の溶解率推移

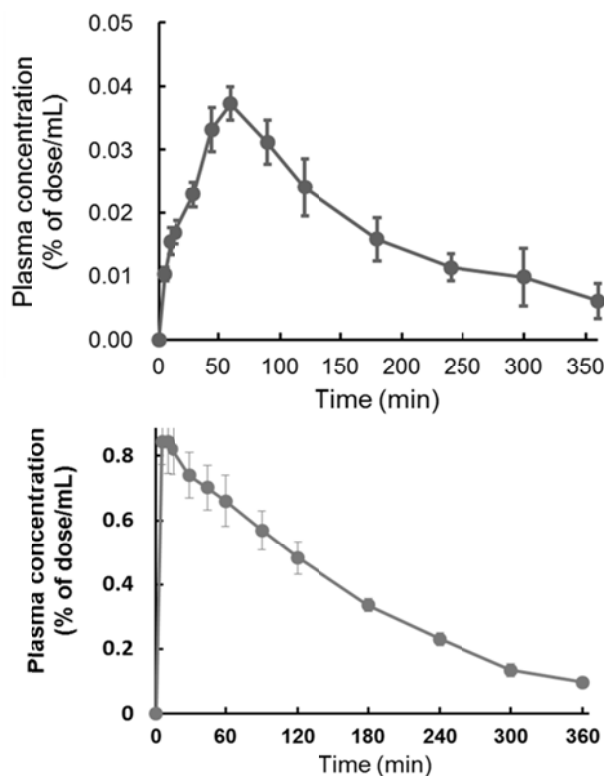


図7 粉末状製剤を鼻腔内投与した後の血中濃度推移 (上) acyclovir (下) antipyrine

上)、ラマン測定による溶解性と細胞層透過性の結果との関係性が示された。このような薬物の製剤化では、溶解や細胞層透過の妨げにならないように賦形剤を添加する程度に留めておくことが望ましいと考えられる。また、classIIIに分類される acyclovir の吸収率は約 9.1%と低く (図 7 下)、細胞層透過性の低

さに加え、溶解速度の遅さが *in vivo* での低い吸収率に現れていると考えられた。このような薬物の場合には、鼻腔内滞留性と溶解速度の改善を念頭に入れた製剤化が必要であり、高粘性を示す高分子添加剤の添加や溶解補助剤の添加が有効と考えられる。このように、ラマン分光法を利用した本評価システムの構築は鼻腔内投与型粉末状製剤開発において有用なツールになる可能性を秘めている。

現在、測定板②を用いたデータを蓄積するために種々の薬物を用いて測定を継続している。より多くのデータを解析することにより、簡便かつ精度の高い吸収性評価システムを構築できると確信している。さらに、添加剤との相互作用による溶解性の変化に関するデータを加え、将来的には、薬物の経鼻吸収性を改善できる最適製剤選択が可能なシステムへと発展させたいと考えている。

たくましいカラダと心を育む短時間運動習慣形成支援プログラムの開発 ～運動を通して子どもの可能性を伸ばす学校の取り組み～

就実大学 教育学部教育心理学科

森村 和浩

概要

本研究は、短時間の運動習慣の形成支援による身体活動や体力の向上と子どもの脳機能や学習効果との関係を明らかにするため、短時間の運動習慣形成支援と脳機能との関連の強い有酸素能力との関連について縦断的・横断的に検討した。その結果、支援を実施する対象児童の3年間の縦断データを用いた体重の相対的発育係数(傾き)が全国水準と同等の発育度であったことに対し、有酸素能力の相対的発育係数は、男女ともに全国水準を有意に上回る係数を示す結果となった(研究Ⅰ)。また、短時間の運動習慣形成を1年以上継続した児童を対象として運動習慣の有無による比較を行ったところ、対象児童の体力・運動能力は、運動習慣の有無に関わらず、男女とも多くの項目で全国平均値よりも高い体力水準であり、とりわけ、有酸素能力において顕著であることを明らかにした(研究Ⅱ)。

以上より、小学校における短時間の運動習慣形成支援の継続的实施は、発育期にあたる児童期の呼吸循環機能や代謝系機能へ影響を及ぼし、運動習慣の有無に関わらず、有酸素能力の向上に寄与するものと推察された。

はじめに

「学校等における体育・スポーツ活動の充実」を基本施策とし、「運動好きな子どもの育成と体力向上の取り組みの推進」を具体的施策として掲げられている。成長期における運動欠乏は、健全な発育発達への悪影響が懸念される一方、習慣的な運動・スポーツの実施は、心身の健康に寄与することが広く知られているところである。近年では、運動によってヒトの認知機能を改善することも明らかにされ、子どもの学習能力の向上への応用も期待されている。従って、学校における体育や課外活動・業間における身体活動の推進は、子どもの健やかな心身の発達だけでなく、学習意欲やそれらに関わる学力の向上にも寄与できると考えられる。運動習慣や体力が認知機能や学習能力に関わるメカニズムについては未だ不明な点が多いもののこれらの知見に基づけば、運動習慣の形成を促し、高い体力を維持することが認知機能や学習能力の確保に貢献できることは明らかである。ただし、その成果を学校現場にて応用するためには、実践的にプログラムの展開とその縦断的検証が必須である。加えて、これまでに子どもへの認知機能向上を意図した介入研究では、高強度でかつ1～2時間以上のいわゆるまとまった運動時間を確保された介入研究が大半を占め、短時間かつ低強度で構成

された運動プログラム介入は見当たらない

教育現場への応用を考えた際、授業以外の時間で体系的に長時間、身体を動かすような時間を創出することは難しく、現行のエビデンスを基に学校現場へ応用して、すべての児童を対象に習慣的にまとまった運動時間を創出するプログラムを実践的に取り組むことは現実的にも困難である。現場に活用しやすい実用的な短時間プログラムの効用を解明できれば、身体活動不足が加速する現代社会において極めて有用なエビデンスとなる。そこで、我々は運動そのものの身体活動量や体力向上などの運動効果とは別に学習課題行動の改善などの副次的な作用も期待できる「短時間の運動効果」に焦点を当てている。

本研究は、短時間の運動習慣の形成支援による身体活動や体力の向上と子どもの脳機能や学習効果との関係を明らかにするため、学校における短時間の取り組みと、とりわけ、脳機能との関連の強い有酸素能力との関係について検討することを目的とした。

研究Ⅰ

【目的】生涯にわたって健康的な生活を営む上で、体力を保持増進することは重要である。近年の日本における少子超高齢社会への対応として、成人の生活習慣

病の予防という問題ともに、子どもの体力向上が重要視されている。このような背景から、全国の小学校では子どもの体力向上のための取組みが盛んに取組まれるようになった。取組み効果について検討する場合は、身長等の発育が強く影響を及ぼす可能性が高いことから、特に長期的な取組みにおける効果を評価する際には、子どもの発育発達の影響を加味しなければならない。文部科学省では、年度毎に年齢別の体力・運動能力値の平均と標準偏差を示しており、これによって個人や学校毎の体力水準がどの程度の水準かを推測できる。しかし、子どもの体力測定項目は、身長に大きく影響される可能性が高く、筋力やパワーに関係する項目は身長の 2 乗または 3 乗に比例することも明らかにされている。このように体力・運動能力は、発育発達の影響が大きいにも関わらず子どもを対象とした多くの検討では、年代等との関係は検討されているものの身長差が体力へ及ぼす影響や縦断的に身長・体格等の発育度を考慮した研究報告は見当たらない。

そこで本研究 I では、継続的な有酸素性運動の実施と発育と体力・運動能力の発達との関連性から短時間の取組みが児童の有酸素能力へ及ぼす影響について検討することを目的とした。

【方法】対象は、体力向上を目的とした重点課題校である A 小学校に在籍する児童 54 名(男子 19 名, 女子 35 名)であり、対象児は、導入校は、健康的な生活習慣を身につけた子どもの育成をスローガンとして全学年児童を対象に始業前の時間を活用して短時間のジョギング活動を取り入れている。本取組みは、体調不良や雨天時、学校行事等を除く全登校日に入学時から卒業時まで習慣的に取組んでおり、その取組みの内容は、始業前(8 時 20 分)に全学年がグラウンドへクラスごとに集合し、点呼と体調確認後、準備体操(2 分間)とクラスメイト全員でゆっくりと走る「いきいきペース」と称したジョギングを 2 分間、その後、テンポの良い音楽を合図に各々のペースで頑張って走る「頑張りペース」と称したジョギングを 6 分間、計 10 分間の活動から構成された。

対象児童は全員、第 1 学年次から第 3 学年次までの 3 年間で、毎年 5 月に身長・体重ならびに体力・運動能

力テスト(20m シャトルラン:20MS)を実施した。体力・運動能力測定 20MS は、文部科学省新体力テストマニュアルに従って測定し、これを有酸素能力とした。尚、20MS の測定に際しては、全ての説明と測定は、バイアスが生じないよう担任以外の熟練した測定スタッフによって実施された。

得られた測定値は、発育の影響を加味し評価を行うため、生物学的指標であるアロメトリー式を用いて評価した。生物学的指標であるアロメトリー式 $y=bX^a$ は両辺の対数をとると、 $\log y=\log b + a\log X$ の一次関数で表される。各学年階級における身長の全国平均値と対応するシャトルラン回数、体重の平均値をそれぞれ両対数グラフにプロットし、最小二乗法により直線式 $\log y=\log b + a\log X$ を算出した。同様に、個人毎に 3 年間の縦断的測定値を用いて両対数グラフから、個別の有酸素能および体重の相対的発育発達係数(a)を算出した。また、全国のアロメトリー式(標準式)を用いて身長に対応する推定値と実測値との残差を算出し、体重および 20MS の残差を求め評価した。

【結果】対象児童の特徴は、1 年次の身長が、それぞれ男:117.3 ± 5.1, 女:114.8 ± 4.1cm, 体重が 21.9 ± 3.5, 女:20.6 ± 2.7kg, 2 年次はそれぞれ、身長が 123.5±5.5, 121.2 ± 4.5cm, 体重 24.5 ± 4.0, 23.5 ± 3.7kg, 3 年次は、身長がそれぞれ 128.9 ± 5.4, 126.9±4.9cm, 体重が 27.4 ± 5.0, 26.4 ± 4.5kg であり、いずれも年次毎に有意差を認めた($p<0.01$)。男児の 20MS の結果は、1 年次 23.3 ± 10.9 回, 2 年次が 46.5 ± 13.8 回, 3 年次が 46.5 ± 13.8 回であり、各年次に有意な差が認められた($p<0.01$)。女子児童の 20MS の記録は、22.5 ± 10.1 回, 39.0 ± 14.2 回, 49.2 ± 12.6 回であり、各年次の比較において、いずれも有意差を認めた($p<0.01$)。相対的発育発達係数(a)は、男女ともに体重には、有意差を認めなかった(全国 vs 対象:2.48 v.s 2.33, 2.37 v.s 2.40, いずれも n.s)。20MS においては、男女ともに全国値に比べ有意に高値を示した(7.50 v.s 10.01, 5.84 v.s 8.48, それぞれ $p<0.01$) (表 1)。身長に対応する体重の推定値と実測値の残差は、男子児童が 0.30±2.1kg(1 年), -0.04 ± 2.27kg(2 年), 0.11 ± 3.20kg(3 年), 女子が 0.18 ±

1.91kg(1 年), $0.07 \pm 2.83\text{kg}$ (2 年), $0.17 \pm 3.70\text{kg}$ (3 年)であった。身長に対応する 20MS の推定値と実測値の残差は、男子児童がそれぞれ、 2.5 ± 12.1 回, 15.9 ± 16.5 回, 13.1 ± 18.4 回と、1 年次に比べ 2, 3 年次が有意に高値であることを示した。女子児童は、 5.1 ± 10.5 回, 12.7 ± 15.8 回, 11.9 ± 16.6 回であり、1 年次に比べ 2, 3 年次が有意に高値を示した。尚、男女ともに 2 年次, 3 年次には有意差を認められなかった。

【考察】本研究は、短時間ジョギングを継続的に実施する児童の有酸素能(20MS)が、全国平均値に比して有意に高いことを縦断的に明らかにし、継続的な短時間活動が児童期の有酸素能の向上へ寄与する可能性を示唆した。まず、アロメトリー式(直線式)は、傾きを示す係数(a)は x と y の相対発育発達度間の比であることから、 $a > 1$ の場合は身長の発育に対して体力・運動能力の発達や改善度が大きいことを意味し、全国水準の相対的発育発達係数よりも大きな傾き(a)の場合には、標準的な発育発達度以上に高まっている可能性が示唆される。よって、本結果は、体重が全国水準と同等の発育度を示したのに対し、有酸素能の傾きについては、男女ともにこれよりも有意に大きい値を示す結果となった。このことは、短時間のジョギングの継続的実施が発育期にあたる児童期の呼吸循環機能や代謝系機能の発達へ影響を及ぼし、有酸素能力が高まったものと推察された。ただし、年次ごとに身長に対応する推定値と実測値の残差の比較においては、2 年次と 3 年次に有意差が認められていないことから、短時間のジョギング効果が飽和水準へ達している可能性もあり、発育度や体力に応じた運動量が必要と考えられた。尚、本研究は、課外クラブ活動の開始や日常の運動習慣や生活習慣については、考慮していないため短時間のジョギング活動が直接的に有酸素能へ寄与したかどうかについては、今後、より詳細な検証が必要である。

研究Ⅱ

【目的】子どもたちの体力は、緩やかな向上傾向に転じているものの(文部科学省, 2012)、スポーツ基本計画(2012 年)で目標とされる 1985 年代の体力水準を上回るには至っていない。さらに、運動習慣の二極化に伴う

体力の二極化(文部科学省, 2012)や運動実施頻度の減少(加賀ほか, 2004)が指摘されており、特に運動する子とそうでない子どもの二極化の傾向や子どもの体力低下傾向が依然深刻な問題となっている。

そこで本研究では、始業前の時間を活用して習慣的に短時間運動プログラムを導入する小学校児童の体力水準について、全国平均水準と運動習慣の有無の視点より明らかにすることを目的とした。

【方法】本研究対象校は、F 県都市近郊部に位置し、始業時間前に 10 分間のジョギング活動を年間を通じて取り組む小学校を対象とした。対象者は、対象校に通う 2 ～ 6 年生男女児童のうち在籍期間が 1 年未満の児童を除外した 271 名を分析対象者とした。測定項目は、文部科学省新体力テスト、運動習慣の有無、質問紙による身体活動水準調査であった。運動習慣の有無は、スポーツクラブ等に過去に 6 ヶ月以上所属している者を運動習慣有とした。体力の評価は、文部科学省の体力・運動能力調査の各学年の全国平均値に基づく z スコア(文科省 z スコア)を算出し、シャトルラン、50m 走、反復横とび、握力、上体起こし、立幅とび、長座体前屈の 8 項目を解析した。

【結果】文科省 z スコアは、運動習慣の有無の比較では、男女ともに運動習慣有りが多くの体力項目で有意に高値を示した。また、文科省 z スコアは、運動習慣の有無に関わらず、いずれの群も多くの項目で全国水準以上であり、特に、20m シャトルランは、特に高水準を示した(表 2)。身体活動水準では、男児において運動習慣有りが有意に高値を示し、女児においては有意な差は認められなかった。

【考察】対象校児童は、男女とも運動習慣の有無に関わらず多くの項目で全国平均値よりも高い体力水準であり、特に全身持久力で顕著であることが明らかとなった。運動習慣の無い児童において、全国平均値よりも高い水準であることは、短時間の課外活動の継続的な取組が、とりわけ運動習慣のない児童や身体活動水準の低い児童に対し、好影響を及ぼしていると考えられた。

まとめ

短時間のジョギングを用いた小学校における運動習慣形成支援は、発育期にあたる児童期の呼吸循環機能や代謝系機能の発達へ影響を及ぼし、また、運動習慣の有無に関わらず、子どもの有酸素能力の発育発達に寄与すると考えられた。今後は、これら支援プログラムが精神的側面や学力面に及ぼす影響について検証していきたい。

謝辞

本研究課題の推進に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いたします。

図表

表 1. 全国平均値(MEXT)と対象校における3年間の相対的発育係数の比較

	性別	対象校	MEXT	p value
weight	Boys (n=19)	2.33 ± 0.63	2.38	n.s.
	Girls (n=35)	2.40 ± 0.58	2.35	n.s.
20MS	Boys (n=19)	10.01 ± 3.49	7.78	p<0.01
	Girls (n=35)	8.48 ± 3.10	6.68	p<0.01

Date shows Average±SD

*MEXT; Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology

表 2. 全国平均値と対象校運動ありとなし各群との体力・運動能力の比較

男児	運動なし(n=53)				運動あり(n=88)				効果量の目安
	平均値 ± SD	p値	効果量(r)	効果量の目安	平均値 ± SD	p値	効果量(r)	効果量の目安	
握力z-score	-0.42 ± 0.87	p<0.001	.44	中	-0.07 ± 0.94	.49	.07	なし	
上体起こしz-score	0.05 ± 0.91	.67	.06	なし	0.31 ± 1.00	p<0.01	.30	中	
長座z-score	0.28 ± 0.95	.03	.29	小	0.58 ± 0.93	p<0.001	.53	大	
反復z-score	0.50 ± 0.76	p<0.001	.55	大	0.90 ± 0.74	p<0.001	.77	大	
シャトルz-score	0.66 ± 0.92	p<0.001	.58	大	1.07 ± 0.80	p<0.001	.80	大	
50mz-score	0.29 ± 1.28	.11	.22	小	0.53 ± 0.93	p<0.001	.50	大	
立幅z-score	-0.21 ± 0.91	.11	.22	小	0.26 ± 0.91	.01	.28	小	
ボールz-score	-0.57 ± 0.81	p<0.001	.58	大	-0.08 ± 0.95	.44	.08	なし	
体力テストz-score合計	0.58 ± 4.23	.33	.14	小	3.50 ± 4.35	p<0.001	.63	大	

女児	運動なし(n=83)				運動あり(n=47)				効果量の目安
	平均値 ± SD	p値	効果量(r)	効果量の目安	平均値 ± SD	p値	効果量(r)	効果量の目安	
握力z-score	-0.15 ± 0.98	.17	.15	小	0.11 ± 1.01	.47	.11	小	
上体起こしz-score	0.22 ± 1.07	.06	.20	小	0.77 ± 1.27	p<0.001	.52	大	
長座z-score	0.24 ± 0.86	.01	.27	小	0.64 ± 0.95	p<0.001	.56	大	
反復z-score	0.63 ± 0.74	p<0.001	.65	大	1.03 ± 0.72	p<0.001	.82	大	
シャトルz-score	1.21 ± 1.19	p<0.001	.72	大	2.15 ± 1.17	p<0.001	.88	大	
50mz-score	-0.08 ± 1.40	.58	.06	なし	0.33 ± 1.32	.09	.25	小	
立幅z-score	0.01 ± 0.88	.88	.02	なし	0.59 ± 1.02	p<0.001	.51	大	
ボールz-score	-0.19 ± 1.24	.17	.15	小	0.39 ± 1.42	.07	.27	小	
体力テストz-score合計	1.89 ± 5.38	p<0.001	.33	中	6.00 ± 6.31	p<0.001	.69	大	

p値: 全国平均値(0)との比較
効果量の目安: (r) 小>.10, 中>.30, 大>.50, (d) 小>.20, 中>.50, 大>.80

学会発表

1. 短時間ジョギングの長期継続が児童期の有酸素能力へ及ぼす影響 森村和浩, 熊原秀晃, 原田健太郎, 田中宏暁. 第 79 回日本体力医学会中国・四国地方会. (香川)
2. 学校における継続的な短時間運動推進が児童の体力へ及ぼす影響～全国平均値と運動習慣有無の比較から～ 森村和浩, 熊原秀晃, 安方惇, 田中宏暁. 日本発育発達学会第 16 回大会. (東京)

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、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年に比して約8割増に拡大すると試算されている。特に商業施設の多くでは、広視野角・高解像度な魚眼カメラを採用しているが、レンズが特殊で高価なため導入可能な台数に限界がある。そこで本研究では、監視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、それらから得られた画像をフロア全体の俯瞰画像として高速に合成することにより、死角のない防犯カメラシステムを提案する。本システムは、カメラモジュールを搭載した Raspberry Pi3 をクライアント、グラフィックボード(GPU)を搭載した汎用 PC をサーバとして構成し、特に演算負荷の高い画像合成処理を GPU で処理することで高速化を図っている。そして、9 台のカメラを用いて俯瞰動画画像が適切に生成されていることを確認するとともに、合成枚数とフレームレートの関係を定量的に明らかにしている。

1. まえがき

近年、社会情勢の劇的な変化に伴って個人・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年に比して約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^[2]。これに対する有効な解決策の一つとして、広視野角・高解像度なカメラの導入が挙げられるが、これに代表される魚眼カメラ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^[3]。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せざるを得ず、人物追跡アルゴリズムで死角を補間する手法^[4]や最適なカメラ配置^[5]などが検討されているものの、完全に死角を排除することは困難である。

そこで本研究では、監視フロアの天井に複数の安価なカメラを格子状に配置した上で、それらから得られた画像をフロア全体の俯瞰画像として合成することにより、死角のない防犯カメラシステムを提案する。特にこの種の画像合成は、一般的に演算負荷が高くフレームレートの劣化が危惧されるため、本研究では OpenCV とグラフィックボード(GPU)を併用することでリアルタイムな画像合成を実現する。

2. 俯瞰画像合成システム

提案する俯瞰画像合成システムは、監視フロアの撮像を担うネットワークカメラをクライアント、俯瞰画像の合成を担う汎用 PC をサーバとするクライアントサーバモデルとして実現し、その具体的な構成を図1に示す。本システムにおける構成上の特徴は、組み込みプロセッサを内蔵した Raspberry Pi3 と専用のカメラモジュール Pi Camera V2(以下、それぞれ単に Pi3 および PiCam という)を単位としてクライアントを構成する点である。Pi3 は安価なシングルボードコンピュータであるにも関わらず、無線通信機能を備えている上に、専用の MIPI CSI-2 インタフェースで PiCam を接続することで Full HD・30fps の撮像が可能であり、コストパフォーマンスに優れたネットワークカメラとして特に有望である。さらに、Pi3 は OS(Raspbian)を搭載してユーザ独自のアプリケーションを実行できるため、これに OpenCV などの画像処理ライブラリを併用することにより柔軟かつ高性能なクライアントを構成できる。以降本研究では、システム全体を通して、汎用的な画像処理には OpenCV を利用して実現する方針を採る。

以下、クライアントによる撮像からサーバでの俯瞰画像の合成に至るまでの動作手順を示す。なお、“cv::”を付した関数は OpenCV の実装関数・クラスである。

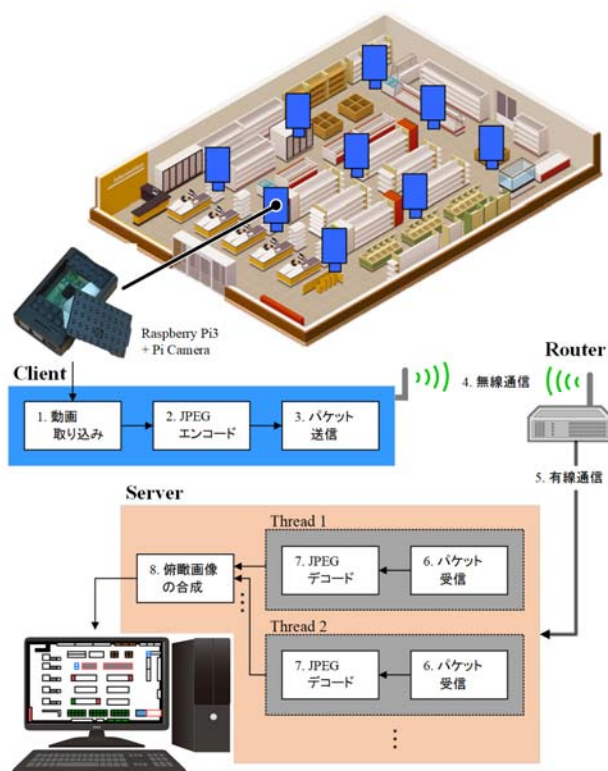


図 1 俯瞰画像合成システムの構成

手順 1. 動画取り込み `cv::VideoCapture` クラスを用いて PiCam を操作し、動画のフレーム画像(以下、単にフレームという)を取得する。

手順 2. JPEG エンコード ビットマップ(BMP)画像であるフレームは、そのままではデータ量が大きいため `cv::imencode` 関数で JPEG に圧縮する。

手順 3. パケット送信 圧縮されたフレームをパケット単位に分割して送信する。なお、本システムでは、俯瞰画像の合成に係るフレームレートの向上、すなわちクライアント-サーバ間の通信速度を優先し、その通信プロトコルには通信速度に優れた UDP を採用する。

手順 4. 無線通信 無線によりクライアント-ルータ間の通信を行う。Pi3 は無線通信機能(IEEE 802.11 b/g/n)を内蔵しているが、一般的な動画像の送受信においても十分な通信帯域を備えている IEEE 802.11 n (最大伝送速度 150Mbps)を使用する。

手順 5. 有線通信 複数のクライアントによる帯域負荷を軽減するため、ルータ-サーバ間については LAN ケーブル(最大 1Gbps)による有線通信を行う。

手順 6. パケット受信 受信したパケットを結合して圧縮されたフレームの画像データを取得する。

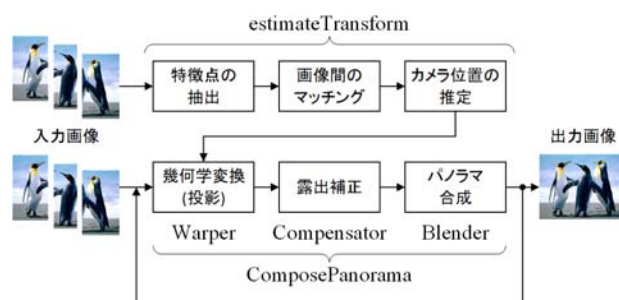


図 2 OpenCV におけるパノラマ合成関数の構成

手順 7. JPEG デコード `cv::imdecode` 関数で手順 6 の画像データをデコードしてフレームを復元する。

手順 8. 俯瞰画像の合成 各クライアントから得られたフレームを俯瞰画像に合成し、動画像としてモニタに出力・表示する。その詳細は 3 章で述べる。

ここで、上述したように本システムにおけるクライアント-サーバ間の通信は UDP を前提するため、サーバには各クライアントから画像データが随時送信されることとなる。そのため、これらの受信に係るオーバーヘッドを極力軽減するには、データが先着した順に受信処理を行う、いわゆる非同期通信としてサーバを構成する必要がある。これについて本研究では、クライアントと一対一で交わされる上述の手順 6 および手順 7 を単位としてサブスレッドを生成し、マルチスレッドシステムとしてサーバを構成する方針を採用する。

3. GPU を用いた画像合成の高速化

3.1 OpenCV を用いた画像合成

OpenCV では、複数の画像を合成してパノラマ画像を生成する `cv::Stitcher` クラスが用意されており、これを利用することで“手順 8. 俯瞰画像の合成”に係る処理を実現できる。Stitcher クラスの構成と処理手順を図 2 に示す。Stitcher クラスでは、`cv::estimateTransform` 関数でカメラ位置を推定し、`cv::ComposePanorama` 関数で画像合成を行う。ここで本研究では、各カメラの位置を固定して撮像を行うため、最初に `estimateTransform` 関数でカメラ位置を推定すれば、後はそれを基に `ComposePanorama` 関数を順次実行すればよい。したがって、画像合成の速度は `ComposePanorama` 関数のそれに依存することとなるが、OpenCV の関数群の中でもこれに係る演

算コストは高く、一般的な CPU 処理では十分なフレームレートを得ることが困難である。

この種の画像処理の高速化には、多数の演算コアを搭載した GPU による大規模並列演算が一般的になりつつある。特に OpenCV では、種々の関数を簡便に GPU で処理するための gpu オプションが用意されており、図 2 の ComposePanorama 関数を構成する関数群の中では cv::Warper 関数がこれに対応している。したがって、Warper 関数については、単に OpenCV の gpu オプションを有効にするだけで GPU による高速化を期待できる。

3.2 CUDA による画像合成の高速化

gpu オプションを有効にすることで Warper 関数は GPU による高速化を期待できるが、残る Compensator 関数と Blender 関数は依然として CPU 処理となる。これに対して文献^[6]では、汎用 GPU 演算基盤である CUDA を利用して、ComposePanorama 関数を完全に GPU で処理する手法を提案している。具体的には、ComposePanorama 関数の OpenCV ソース(.cpp)から汎用的な四則演算部を抽出し、それを GPU による並列処理として CUDA ソース(.cu)に書き下すことで実現している。しかしこの実装では、中心からカメラで 360° 撮像する球体形の投影面を前提としているため、本研究のように全てのカメラが直下を撮像する俯瞰画像の合成には対応していない。そこで本研究では、文献^[6]の投影面を平面形に拡張し、GPU を用いた俯瞰画像の高速化を実現する方針を採る。

投影面の合成を担う Warper 関数では、球体形、円筒形および平面形の 3 種が定義されている。実際はこれらの基本関数である warp 関数のオーバーライドとして実装されており、引数によって各投影面に対する処理を指定できる。例えば、カメラが中心に位置する球体形および円筒形では、estimateTransform 関数で得られたカメラの外部パラメータの中から回転行列 R のみを与えればよい。一方、カメラの位置がそれぞれ異なる平面形では、これに加えて平行移動行列 t を与える必要がある。したがって、既存の球体形の処理に係る warp 関数の引数に行列 t を適宜追加することにより、平面形の投影面による合成を実現できる。これに係る文献^[6]

の公開ソースコード(MyStitcher.cpp)の改変内容と箇所(行番号)は以下の通りである。

```
-----
//Warper 関数の呼び出しを「SphericalWarperGpu」
//から「PlaneWarperGpu」に変更。
396 : Ptr<detail::PlaneWarperGpu> w =
        new detail::PlaneWarperGpu(float(warped
        _image_scale_ * seam_work_aspect_));
//warp 関数の第 4 引数に「cameras_[i].t」を追加。
//なお、cameras_はカメラのパラメータを保持する
//CameraParams 構造体の動的配列である。
406 : corners[i] = w->warp( seam_est_imgs[i], K,
        cameras_[i].R, cameras_[i].t, INTER_LINEAR,
        BORDER_REFLECT, images_warped[i]);
409 : w->warp( masks[i], K, cameras_[i].R,
        cameras_[i].t, INTER_NEAREST,
        BORDER_CONSTANT, masks_warped[i]);
//変形画像を囲む最小矩形を求める warpRoi 関数の
//第 4 引数に「cameras_[i].t」を追加。
478 : Rect roi = w->warpRoi( sz, K, cameras_[i].R,
        cameras_[i].t);
//warp 関数の第 4 引数に「cameras_[img_idx].t」
//を追加。
508 : w->warp(img_gpu, K, cameras_[img_idx].R,
        cameras_[img_idx].t, INTER_LINEAR,
        BORDER_REFLECT, img_warped_gpu);
513 : w->warp(mask_gpu, K, cameras_[img_idx].R,
        cameras_[img_idx].t, INTER_NEAREST,
        BORDER_CONSTANT, mask_warped_gpu);
//行列 R と同様に行列 t の値を初期化。
683-689 : for(size_t i=0; i<cameras_.size(); ++i)
        { Mat t;
                cameras_[i].t.convertTo(t, CV_32F);
                cameras_[i].t = t;
        }
-----
```

4. 実装と評価

4.1 実装プラットフォーム

本研究では、防犯カメラシステムとしてのユーザビリティを考慮し、豊富な GUI を備えた Microsoft .Net Framework(以下、単に.Net という)による開発

を前提とする。ただし、OpenCV や CUDA は .Net 系の開発言語に対応していないため、本研究ではこれら双方の記述に対応した C++/CLI を開発言語に選び、それに基づいて各コード間のデータ型に係る変換ラッパーを構築することにより、CUDA⇔OpenCV⇔.Net 間のマルチプラットフォームとして開発を行う。なお、OpenCV の高速化に利用する CUDA は .Net との直接的なデータの授受を伴わないため、ここでは、.Net と OpenCV 間のデータの授受についてのみ述べる。

画像データの型変換 本研究における .Net は、GUI の設計や処理済み画像の表示にのみ利用するため、必要となる型変換は OpenCV の Mat 型から .Net の Bitmap 型へのそれに限られる。これについては、.Net の IntPtr メソッドにより Mat 型の画像が格納されているポインタを取得し、それに基づいて Bitmap 型のインスタンスを生成することで型変換を実現する。ただし、Bitmap 型は行サイズを 4 の整数倍で管理するため、これに合せて事前に Mat 型の行サイズを補正する点に注意する。

画像データの受信に係る排他制御 サーバのメインスレッドでは、各サブスレッドがクライアントから得た画像データに対するアクセス競合が生じる。そのため、デリゲート関数を用いてその引数に指定したデータへのアクセスを制限する必要があるが、.Net のデリゲート関数の引数は参照型のクラスに限定されているため、値型の変数である Mat 型を直接これに渡すことはできない。そこでまず、Mat 型の変数をメンバに持つ値型クラスを定義した上で、さらにこのクラスへのポインタをメンバに持つ参照型クラスを定義する。そしてこれをデリゲート関数の引数として与えることにより、間接的に Mat 型へのアクセスを実現する。

4.2 実装評価

以上に基づいた俯瞰画像合成システムを開発し、図 3 に示す実験環境においてその動作確認を行った結果(GUI)を図 4 に示す。図 3 の灰色領域は中央のクライアントの撮像領域であり、カメラは解像度を 640×480、フレームレートを 30 に設定している。

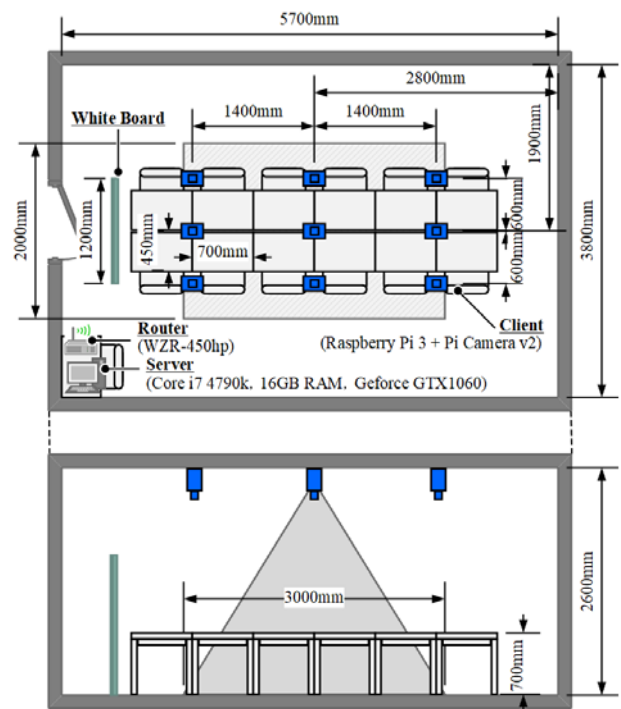


図 3 実験環境(川崎医療福祉大学 8015 演習室)

図 4 の GUI 左部には各クライアントから受信したフレームを併せて表示しており、それらを基にフロア一面の俯瞰画像として適切に合成されていることを確認できる。

続いて、受信に係る平均フレームレート(fps_R)および画像合成に係るフレームレート(fps_P)の計測結果を図 5 および図 6 に示す。横軸はクライアント数、凡例は画像合成を全て CPU 処理(CPU)、Warper 関数のみ GPU 処理(GPU)、全て GPU 処理(CUDA)した場合それぞれに対応する。図 5 より、クライアント数の増加によるネットワーク負荷の増大に伴って、 fps_R は線形的な劣化傾向を示している。また、クライアント数 1~3 における fps_R がカメラ設定の 30fps を僅かに下回っているが、クライアントの送信時点で 27fps 前後であった点を勘案すると、これはクライアントの内部処理に起因する劣化と考えられる。次に、図 6 の画像合成に着目すると、 fps_P と同様にクライアント数、すなわち合成枚数の増加に伴って fps_P が劣化しているが、いずれの枚数でも CPU < GPU < CUDA の順に改善している。特に本研究が提案した CUDA は、2~3 枚程度であればリアルタイムに合成可能であり、9 枚合成時でも CPU および GPU に比してそれぞれ 85% および 48% の高速化を実現できる。

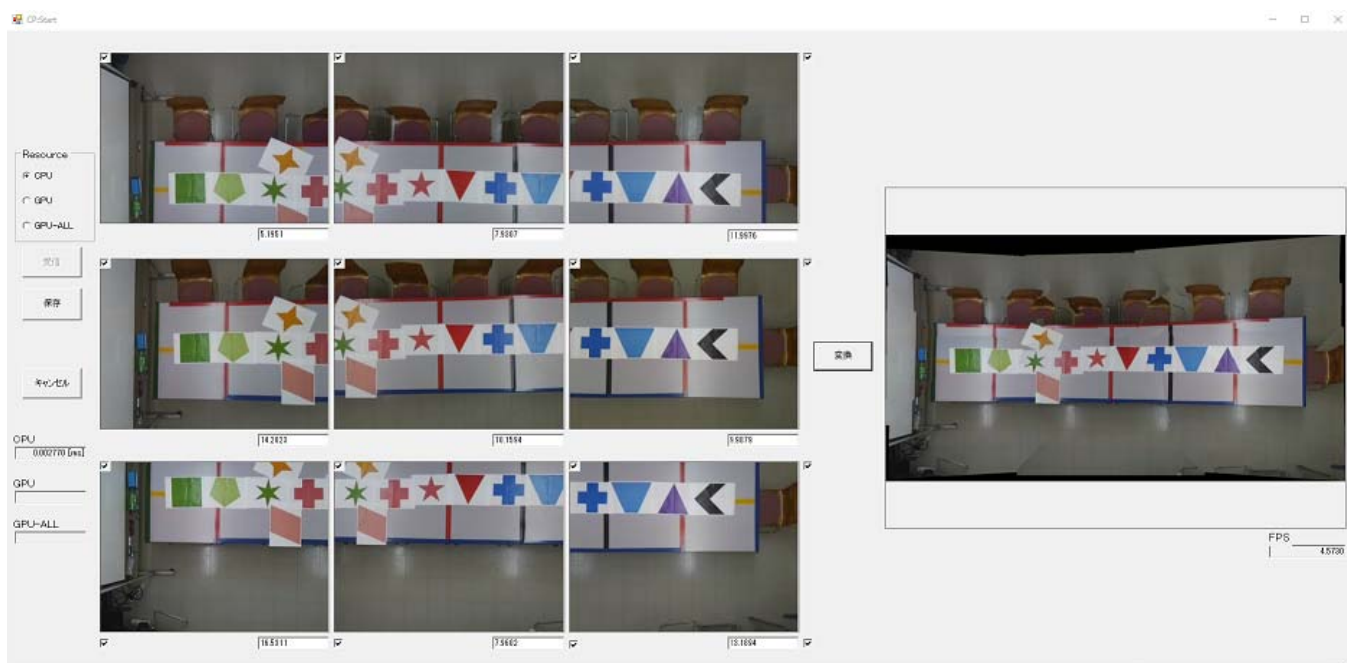


図 4 俯瞰画像合成システムとその動作例

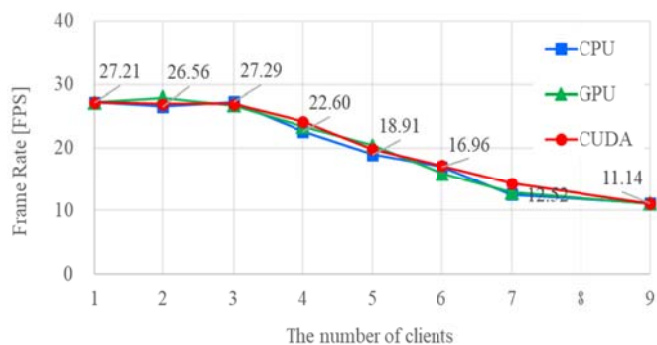


図 5 画像の受信に係る平均フレームレート

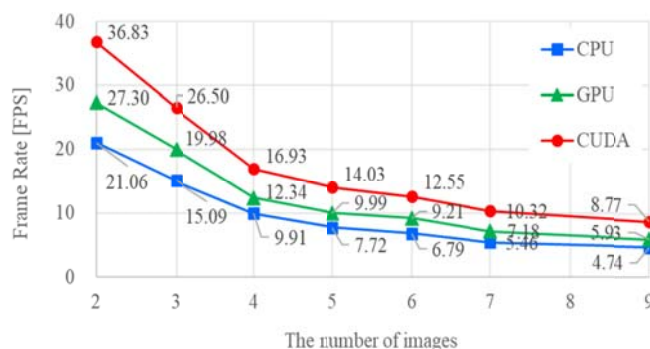


図 6 俯瞰画像の合成に係る平均フレームレート

あとがき

本研究では、複数のネットワークカメラを用いた俯瞰画像合成システムの開発を行った。特に、OpenCV と CUDA を併用した画像合成の高速化手法を実装することでリアルタイムな俯瞰画像の生成を実現している。今後の課題としては、ネットワークの負荷分散法を検討し、合成枚数の増加に伴う fps の劣化を軽減することが急務である。そして、隣接するカメラの視差を利用した超解像度化、撮像領域の重複を利用した耐故障性について検討を進め、高機能・高性能な防犯カメラシステムの開発を行う予定である。

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 (Aug. 2015)
- [2] 日本万引防止システム協会, “万引防止システムハンドブック第 3 版,” 日本万引防止システム

協会事務局, p. 3 (Sept. 2012)

- [3] 高野 照久, 他, “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)
- [4] X. Li, et al., “A Survey of Appearance Models in Visual Object Tracking,” ACM Trans. Intelligent Systems and Technology, Vol. 4, No. 4, pp. 1-48 (Sept. 2013)
- [5] K. Yabuta, et al., “Optimum Camera Placement Considering Camera Specification for Security Monitoring,” IEEE Proc. Circuits and Systems, pp. 2114-2117 (May 2008)
- [6] 松岡 洋, “GPU 並列処理による OpenCV 関数高速化のポイント,” CQ 出版 Interface, Vol. 41, No. 9, pp. 118-126 (Sept. 2015)

認知機能等を改善させる植物由来物質の探索

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床検査学科

上野 浩司

現代の日本は、超高齢化社会に突入しつつあり、様々な医療と介護の問題を抱えている。ヒトをはじめ多くの動物は高齢化するにともない脳の機能が低下していく。残念ながら、なぜ認知機能や記憶能力が低下するのかは明らかになっていない。しかし、生活の質(QOL)の維持には社会性の維持が必要であり、その中でも認知機能の維持は極めて重要である。そこで我々は手軽に入手できる柑橘類中に認知機能や運動機能を向上させる物質がないか調べた。これらの機能を向上させることが出来れば日常生活に大きな支障を来さずに高齢化することができるため、日本の医療の為、人々のために有益である。本研究では柑橘類の一種であるカボス(*Citrus sphaerocarpa*)にそのような効果がないかマウスに投与してその効果を調べた。その結果、カボス抽出物には認知機能、不安様行動、うつ様行動を改善させる効果は確認されなかった。しかし、濃度の増加や長期間の投与によって認知機能等が向上する可能性も十分推測される。

1. 序文

認知症の高齢者人口は近年増大し続けており、早急な対策が必要となっている。加齢は疾患ではなく、正常な生理学的な過程である。自然に歳をとるにつれて、多くの動物達の認知機能が低下する。この加齢による変化は脳全体で均一ではない。学習や記憶、決定などの認知機能は側頭皮質と前頭皮質に依存している。しかしながら、なぜ加齢によって認知機能が低下していくのか明確な理由は分かっていない。種による違い、脳の領域による違いがあることより加齢によって変化するメカニズムがあることが明確である。すなわち、この変化を止めたり、減弱させることも可能であることが示唆される。そこで、我々は認知機能等の脳機能を改善させるものがないか調べることにした。薬として既に販売されているものではなく、多くの人間が安心して継続的に摂取できるものとして食品中の物質に着目した。特に、古くから柑橘類の匂いや皮には何らかの効果があることが世界各地で伝えられてきている。我々はカボス(*Citrus sphaerocarpa*)の抽出物に焦点を絞って実験を行うことにした。シークワサーなどの柑橘類に含まれるフラボノイドの一種であるノビレチンには記憶障害作用があることが報告されている。さらに、温州みかんや伊予柑果汁をマウスに飲用投与し

た実験では、血管保護効果があることも報告されており、抗酸化作用が関与していることが示唆されている。

本研究では、マウスにカボス抽出物を投与した結果、身体特徴や活動量、不安様行動、うつ様行動、認知機能に影響があるのか解析を行った。

2. 材料と方法

2.1. 材料と方法

マウスは生後3ヶ月齢のC57BL/6N♂を使用した。マウス購入後、1週間を経ってから実験を開始した。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. 抽出物の投与

カボス抽出物投与群(n=10)、コントロール群(n=10)を準備した。カボス抽出物(0.5g/5mL)を蒸留水に溶解し、100μL/匹で投与した。コントロール群には蒸留水を100μL/匹で投与した。行動実験開始1週間前から1回/日で投与し、行動実験当日は開始30~60分前に経口投与した。

2.3. 行動実験

投与開始1週間後にマウスの体重、ヒゲの有無など身体的な計測と観察を行った。

2.3.1. 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(40 × 40 × 40 cm)に入れ、自由に 30 分間自由に動き回らせた。ビデオに撮影し、解析ソフトウェア(ANY-MAZE)を使用して解析した。

2.3.2. Y字迷路テスト

等間隔でY字型に配置されたアーム(走路幅 4cm, 高さ 10cm)の 1 つにマウスを入れた。10 分間自由に動き回らせて、直前に侵入したアームとは異なったアームに入ろうとするマウスの習性を利用して認知機能を計測する。真上からビデオに撮影し、解析ソフトウェア(ANY-MAZE)を使用して解析した。

2.3.3. 強制水泳テスト

直径 15cm, 高さ 30cm の透明なシリンダー内に高さ 10cm まで水を入れた。その中にマウスを入れて横から 10 分間ビデオに撮影し、解析ソフトウェア(ANY-MAZE)を使用して解析した。

2.3.4. テールサスペンションテスト

マウスの尾にテープをつけ、床から高さ 60cm のところに吊り下げた。10 分間、横からビデオに撮影し、解析ソフトウェア(ANY-MAZE)を使用して解析した。

2.4. 統計解析

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. カボス抽出物投与マウスの正常な特性

我々はカボス投与群とコントロール群を比較して身体的な特徴がないか調べた。投与開始 1 週間後に目視による観察を行った。毛並み、ヒゲの有無にカボス投与群とコントロール群に差は見られなかった。また、カボス 1 週間の投与によって体重に変化は見られなかった(図 1)。

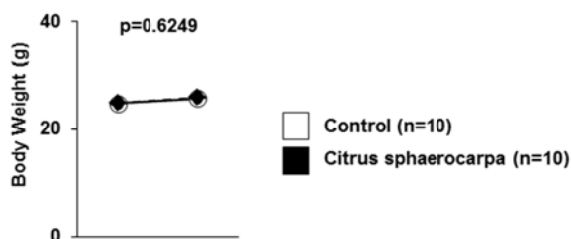


図 1. 体重の変化

3.2. カボス抽出物投与による活動量と不安様行動への影響

オープンフィールドテストにおいて、カボス投与群とコントロール群では総移動距離、中央部分に入る回数、中央部分での滞在時間に有意差はなかった(図 2)。

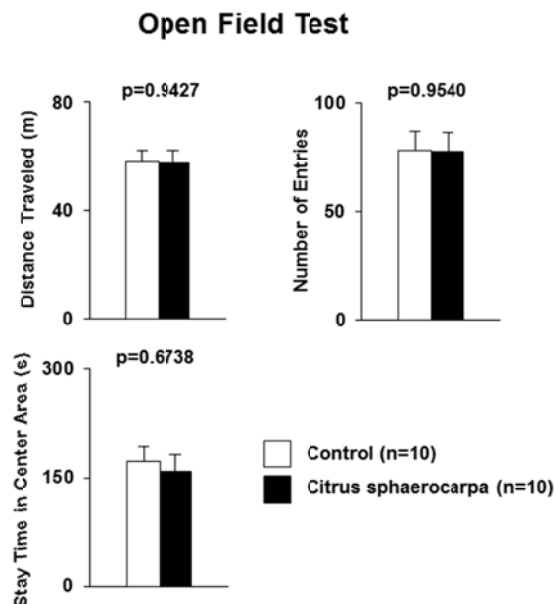


図 2. オープンフィールドテスト

3.3. カボス抽出物投与によるうつ安様行動への影響

強制水泳テスト、テールサスペンションテストにおいて、カボス投与群とコントロール群では無動時間の割合に有意差はなかった(図 3, 4)。

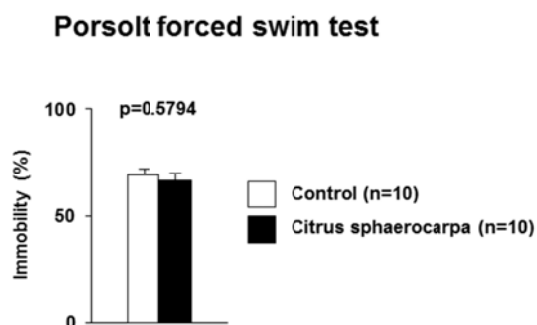


図 3. 強制水泳テスト

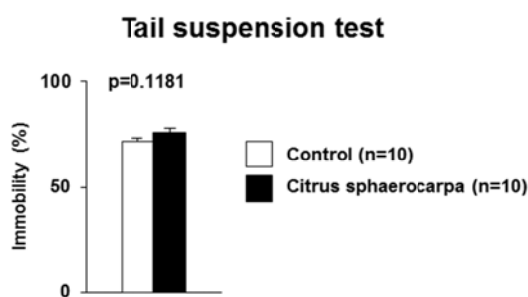


図 4. テールサスペンションテスト

3. 4. カボス抽出物投与による認知機能への影響

Y 字迷路テストにおいて、カボス投与群とコントロール群では総移動距離、総アーム進入回数、自発交替回数、自発交替の割合に有意差はなかった(図 5)。

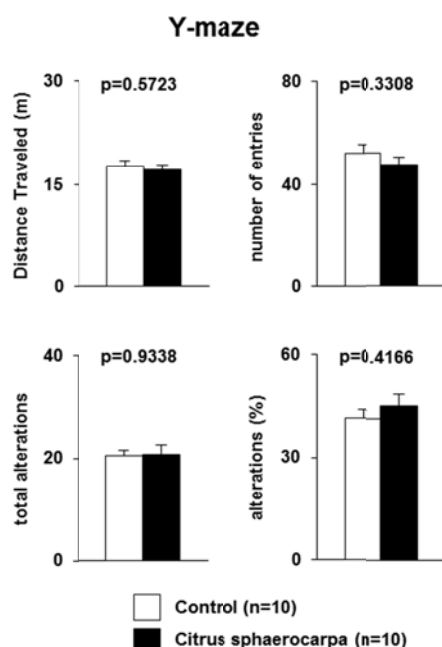


図 5. Y 字迷路テスト

4. 考察

今回の研究ではカボスを投与することで認知機能をはじめ脳機能に影響があるか解析した。しかし、今回解析に用いた項目ではカボス投与群とコントロール群では有意な差は得られなかった。

認知機能とは視覚や聴覚、触覚などから情報を受け取り正しく認識する能力を示す。そのため、これら全てを一度に実験することは難しい。本研究で調べたのは視覚情報による認知機能のみであるため、カボス投与群では他の認知機能が改善している可能

性も十分考えられる。特に柑橘類には独特の匂いがあり、哺乳類は太古の昔からこの匂いをキャッチし認識する機能を持っている。

以前よりカボスには強い血清コレステロール上昇抑制作用を持つことが示されている。中枢神経系の重量は体重の約 20%であるが、体の 20%以上のコレステロールを含んでいる。しかし、中枢神経系におけるコレステロールは外因性のものではなく、脳内で産生している。中枢神経系におけるコレステロール代謝にカボス抽出物が影響していない可能性がある。しかし、マウスにカボス抽出物を長期間投与することで何らかの影響が出る可能性もある。また、投与するカボス濃度を変化させることで影響が出る可能性もある。今後さらなる研究が必要である。

5. 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。

6. 参考文献

1. 小川博, 望月聡, 目黒忠道 (1998) カボス果汁粕がコレステロール添加飼育脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) の脂質代謝に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌. 51. 273-278
2. 望月聡, 安東史子, 岩橋妙子, 朝来壮一 (2004) ラットの脂質代謝に対するカボスオイルの影響. 大分大学教育福祉科学部研究紀要. 375-380.
3. Okuyama S, Yamamoto K, Mori H et al., (2014) Auraptene in the Peels of Citrus kawachiensis (Kawachi Bankan) Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in the Mouse Brain. Evid Based Complement Alternat Med. 2014. 408503.
4. Wolfenbüttel AN, Zamboni A, Becker G et al., (2018) Citrus essential oils inhalation by mice: Behavioral testing, GCMS plasma analysis, corticosterone, and melatonin levels evaluation. Phytother Res 32. 160-169.

Hecke 環と環のゼータ関数に関する新研究

川崎医療福祉大学

兵藤史武

(概要) 数論の諸問題において考察対象に付随する Dirichlet 級数(ゼータ関数)を研究することは非常に重要である。特に保型形式に登場する Hecke 環においては、それに付随する Dirichlet 級数が定義されており、有理性と呼ばれる等式を満たすことが知られている。これらの Dirichlet 級数の係数は互いに可換であるが、本研究ではその係数が互いに非可換なものを考察する。これまでの私の研究で、1 次と 2 次の Heisenberg の Lie 環の Hecke 環の場合に有理性に類似した等式を示した。この等式は、E. Hecke が定義した古典的な Hecke 環の Dirichlet 級数の有理性、さらには Grunewald-Segal-Smith のゼータ関数の有理性をも導いており、非常に興味深い。本研究では 2 次のハイゼンベルグの Lie 環の場合の、より簡明な証明が得られた。

1. 研究の学術的背景

本研究では Hecke 環を研究し、その成果を環のゼータ関数の研究に適用する。全く異なる背景を両者は持っている。まずは両者の紹介を行った後その関連について述べる。Hecke 環は整数論や表現論に多く現れ、これらを研究する上で非常に重要な概念である。これは古典的には Hecke[2]により保型形式への作用素の環として定義され、後 Shimura[4]がこの定義を一般化した。その後 Tamagawa[5]や Satake[6]らにより Hecke 環の研究は目覚ましい発展を遂げた。これらの研究の中で Hecke 環の環構造や Hecke 級数と呼ばれる冪級数について著しい成果を彼らは挙げている。一方で申請者は、[5]の Hecke 環や Hecke 級数の概念を拡張する形で、環に付随する Hecke 環と Hecke 級数を定義し、研究を行っている。これらはこれまで扱われてこなかった新しいタイプの Hecke 環であり、[5]や[6]が扱っている Hecke 環と比較すると、環構造が大きく異なることが申請者の研究[3]により明らかとなった。このような Hecke 環に関する先行研究は他には存在しない。これは他分野との関連が見つからず、研究する意義を見出せなかった為であると思われる。しかし申請者が以前から研究してきた群・環のゼータ関数との関連に着目することで本研究の意義を見出すことができる。群・環のゼータ関数は Grunewald・Segal・Smith[7]により群論の研究

を目的として導入された。この関数はリーマン予想で有名なリーマンゼータ関数の拡張になっているため数論的にも興味深い研究対象である。[7]の主定理として群・環のゼータ関数の有理性定理がある。それから約 20 年後、Vo11[8]により関数等式が示されることで群・環のゼータ関数は数学において重要な関数としての地位を確立したと言える。しかしこれ以後大きな進展は見られない。申請者はこの分野の研究の新たな方向性として環に付随する Hecke 級数とゼータ関数とを関連づけることを提案する。Hecke 環とゼータ関数との関連を以下で述べる。Shimura は[9], § 3.2 の中で、[5]の Hecke 級数に関する定理に *degreemap* と呼ばれる写像を適用することによって、リーマンゼータ関数による積表示が得られることを指摘した。実は Shimura の指摘は次のように表現できる。

[5]の Hecke 級数に関する定理は *degreemap* を介して特殊な環のゼータ関数の有理性定理を導く。

申請者は上記の一般化を目指している。その第一歩として、申請者は[3]で Heisenberg の Lie 環において、上記と同様の定理を得た。申請者の大目標として以下を掲げる。

一般の環に対して、その環のゼータ関数の有理性定

理を degreemap を介して導くような
Hecke 級数のよい関係式を構築する.

2. 明らかにする内容

本研究ではこの大目標に向けて, 申請者の[3]の結果を高次の Heisenberg の Lie 環へ拡張することを旨とする。

3. 研究成果

本研究では2次のハイゼンベルグの Lie 環の関係式を求める際の証明を大幅に簡略することに成功した. 定理の証明自体は前年度にすでに得られていたが, 計算が複雑すぎたため, 証明の可読性が低く, 論文にすることができなかった. 本研究によりそれが可能となり, 現在投稿準備中である。

4. 研究手法

まず, n 次ハイゼンベルグの Lie 環の自己同型群が n 次斜交群と関連付けられるとことを用いて, 両者に付随する Hecke 環を関連付ける. n 次ハイゼンベルグ Lie 環の Hecke 環を S , n 次斜交群に付随する Hecke 環を R とすれば, 以下が成り立つ。

Proposition1 三つの環準同型写像 $s: R \rightarrow S, \phi: S \rightarrow R, \theta: S \rightarrow S$ が存在し, 以下が成り立つ。

$$\deg \circ \theta = \deg, \phi \circ \theta = \phi, \phi \circ s = \text{id}.$$

R については[1]によりすでに研究されており, 彼らの手法を利用することが可能となる. 今回の証明のポイントは写像 s による R の像と, ハイゼンベルグの Lie 環の Hecke 級数との積を巧みに計算したことである. Γ を n 次斜交群, すなわち $\text{GSp}_{2n}(\mathbb{Z}_p), \Delta$ を $\text{GSp}_{2n}(\mathbb{Q}_p) \cap \text{M}_{2n}(\mathbb{Z}_p)$ とおく. 次で定義される $Y(A, C, c)$ の Γ による左側剰余類の位数を計算することが重要となる. $A, C \in \Delta, c \in \mathbb{Z}_4$ に対し, $Y(A, C, c) = \{ \alpha \in \Gamma A \Gamma \mid \alpha C \in \mu(A) \Delta, \alpha c \in \mu(A) \mathbb{Z}_{2n} \}$ と定義する. この位数が, Γ の十分大きな部分群の右作用において不変であることを用いることで, 計算の負担を大幅に軽減し, 見通しの良い証明を与えることができた。

参考文献

- [1] A. N. Andrianov, Rationality theorems for Hecke series and zeta functions of the groups GL_n and Sp_n over local fields, *Izv. Math.* 3(3) (1969) 439-476.
- [2] E. Hecke, Ueber Modulfunktionen und die Dirichletschen Reihen mit Eulerscher Produktentwicklung. I, II. *Mathematische Annalen* 114.1 (1937): 1-28, 316-351.
- [3] F. Hyodo, A formal power series of a Hecke ring associated with the Heisenberg Lie algebra over \mathbb{Z}_p , to appear in *Int. J. Number Theory*.
- [4] G. Shimura, Sur les integrates attachees aux formes automorphes. *Journal of the Mathematical Society of Japan* 11.4 (1959): 291-311.
- [5] T. Tamagawa, On the ζ -functions of a division algebra. *Ann. of Math.* 77.2 (1963): 387-405.
- [6] I. Satake, Theory of spherical functions on reductive groups over p -adic field, *Publ. Math. I.H.E.S.* 18 (1963): 5-69.
- [7] F.J. Grunewald, D. Segal, and G.C. Smith, Subgroups of finite index in nilpotent groups, *Invent. Math.* 93.1 (1988): 185-223.
- [8] C. Voll, Functional equations for zeta functions of groups and rings, *Ann. of Math.* 172.2 (2010): 1181- 1218.
- [9] G. Shimura, Introduction to the arithmetic theory of automorphic functions. Vol. 1. Princeton University Press, 1971.

未来に残す資産としての岡山方言のデータベース構築—映像アーカイブの研究活用—

ノートルダム清心女子大学

尾崎 喜光

本研究は、「方言」を未来に残す文化資産のひとつと位置づけ、方言の衰退が現在よりもまだ進んでいなかったおよそ 30 年前の状況について、地元テレビ局が制作し、現在は映像アーカイブとして残されているテレビ番組に登場する岡山県民の発話を忠実に文字化・データベース化し、それを分析することにより、実際の会話において岡山方言がどのように用いられていたか、その言語生態の一端を明らかにすることを目的とする。

調査対象となるテレビ番組は計 55 回分あるが、本助成を受けてデータベースとして追加した 13 回分を含めデータベース化が完了したものは 31 番組にとどまることから、いまだ本格的な分析をする段階に至っていない。中間的分析をした研究論文に、「帰るとゆうことです」を「帰るゆうことです」のような、岡山方言の特徴の一つである「と」を省略した表現の使用を分析した尾崎喜光（2018）がある。本報告では、出現頻度はそれほど高くないものの、ときどき出現が観察される、共通語の「～で（は）なく」に対応する「～で（は）なしに」という、一見方言形とは思われない表現がどのように出現しているかについて分析した結果を報告する。

1. 研究目的

後世に残し伝えるべき日本の文化資産の一つに「方言」がある。岡山県にも、共通語にはない方言としての表現が豊かにあった。

しかしながら、学校教育における共通語指導や、昭和 30 年代以降のテレビの普及により、従来用いられてきた伝統的な岡山方言は現在大きく衰退し、これに代わって共通語や岡山方言と共通語とのハイブリッドの新しい方言が普及しつつある。

本研究は、現在失われつつある伝統的岡山方言がかつて生活の中でどのように使われていたかという方言使用の実態について、過去に放送され現在は映像アーカイブとして保存・公開されている地元テレビ局制作のテレビ番組を方言研究のための話し言葉資料として位置付け調査・データベース化し、それを分析することでかつての方言使用の一端を明らかにすることを目的とする。加えて、研究の過程で構築するデータベースを研究終了後に学術研究等のために無料公開し、岡山方言に関心を持つ学生や若手研究者、市井の研究家が活用できる資産として残す。

なお、共通語の影響を受ける以前の岡山方言は方言辞典で確認することもできる。しかしながら辞典に示されている方言はいわば“標本”としての方言

であり、実際の生活においてどう使われていたか、すなわち“生態”としての方言の姿までは示されていない。この“生態”としての方言を明らかにする本研究は、“標本”としての方言の研究を補う研究として大いに意義がある。

2. 研究方法と研究経過

過去における話し言葉の使用実態を明らかにするためには録音・録画資料を活用する必要がある。そのためには、過去に放送されたテレビ番組・ラジオ番組を蓄積した映像アーカイブが、研究資料の有力候補となる。

そうしたテレビ番組・ラジオ番組を蓄積し、学術研究および一般利用のために無料公開している施設に公益財団法人「放送ライブラリー」（横浜市）がある。テレビ番組は現在約 18,000 本蓄積されている。この中に、「テレビせとうち」が 1985 年 10 月から翌年 10 月までの約 1 年間に計 55 回放送した地域紹介番組「くろーず UP せとうち」（日曜日放送の 30 分番組）がある。各回のテーマに関係する岡山県民が、レポーターを兼ねたアナウンサーのインタビューに答えて発話する場面が多数含まれているが、その中に岡山方言が現われることがある。本来であれ

ば、より日常的な会話場面において方言がどう使われているかを観察したいと考えるが、「テレビ番組」という制約が伴うため、そこは断念せざるをえない。そこでむしろ、方言の使用が控えられる傾向のあるテレビ番組のインタビュー場面においてもなお、それが方言形であると意識されにくいためにいろいろな人が使用する傾向のある方言形は何であるか、どのような文の中で使っているのかという観点から分析することとした。

こうした分析をするために、全 55 番組について、アナウンサーによる視聴者向けの説明やナレーションを除くインタビュー場面に現われた全ての発話を対象とし、アナウンサーによる質問も含め、言い誤り等も含めて忠実に文字化し、それに話者情報（性別・年齢層・職業等）を付加してデータベース化している。

個人研究費等によりすでに 18 番組をデータベース化していたが、昨年度は本助成を受け 13 番組を追加し、現在のところ 31 番組のデータベースを蓄積している。進捗率は 56.4%である。

3. 本稿で注目した方言形

データベースはいまだ作成の途上にあり完成を見ていないが、インタビュー場面において出現頻度が比較的高いことから中間的段階でも分析可能と判断した方言形の使用について分析した研究論文に尾崎喜光（2018）がある。たとえば「明日には帰るとゆうことです」を「明日には帰るゆうことです」のように、引用の「と」を省略することは岡山方言等の特徴の一つであるが、これを分析した。「ぼっけー」「でーれー」のような一見して方言形と分かる表現と異なり、「と」を省略することが特徴であるため方言形と意識されにくいことから、引用の「と」を含みうる文を発話した人のうちの約 3 割が「と」を省略していること等を明らかにした。

本報告では、出現頻度は引用の「と」の省略ほど高くないものの、しかしながらときどき出現が観察される、共通語の「～で（は）なく」に対応する「～で（は）なしに」という、やはり一見方言形とは意識されにくい表現がどのように出現しているかにつ

いて、中間的に分析した結果を紹介する。

4. 「～で（は）なしに」の分析

ここで問題にする「～でなしに」の中核部分は「なしに」であるが、共通語においても「あなたなしには生きていけない」のような「なしに」の用法はある。しかしながらここで問題とするのは、「なしに」の直前に「で」ないしは「では」を伴い、それ以前の部分を否定することを基本とする用法である。典型的には共通語の「A で（は）なく B」を「A で（は）なしに B」とする用法である。つまり、「で（は）なく」を「で（は）なしに」とするのである。このような用法は共通語にはなく、従って方言的な用法と言える。これがデータ中にしばしば現れる。

データの中には共通語形の「～で（は）なく」も現れることから、以下では、その出現と対比しつつ、方言形の「～で（は）なしに」の出現を見てゆく。なお、共通語の「～で（は）なく」をそのまま岡山方言に置き換えると「～で（は）のうて」であり、従って三項対立の可能性はあるが、「～で（は）のうて」は実際には現れないことから二項対立として比較する。また、「は」を介する「では」は「じゃ」と縮約されて「～じゃなくて」「～じゃなしに」と現れることもあるが、これも分析対象とする。

31 番組のデータを分析したところ、「～で（は）なく」は 5 件、「～で（は）なしに」は 13 件出現した。前者 5 件のうち 2 件は、共通語の使用を意識することの強い取材アナウンサーによるものである。これを除くと 3 件対 13 件ということになる。全体として件数はそれほど多くないものの、内部構成比を見ると、共通語形よりも方言形の方がはるかに優勢であることがわかる。これは、「～で（は）なしに」の「で」も「は」も「なしに」も共通語にあり、形の上ではこれが方言形と意識されにくいことによるものと考えられる。

実際の用例を両グループに分けて以下に示す。なお、文字化部分の「*」は聞き取りが困難な箇所である。用例末尾の【 】内は発話者情報と番組情報である。発話者情報うち年齢層は筆者の推定によるものがほとんどである。

【共通語的表現：「～で(は)なくて」】…5件

- ①「と同時にですねえ、まああのー、観光業者の方だけでなくてですねえ、この地域の方がですねえ」
【取材アナウンサー (50代?・男性)、第1回「売り出せ!ふるさと 燃えた農林漁業祭」1985年10月6日放送】
- ②「まあ、湯原に訪れていただいたお客様をですねえ、あのー湯原だけでなくて、その周辺の観光地とタイアップできた観光を、していただけると。」
【湯原観光協会事務局長 (50代・男性)、第4回「いで湯の町 岡山県真庭郡湯原町」1985年10月27日放送】
- ③「おもには、東京と岡山をまず結ぶと、ゆうことで、えー、その東京ー、岡山空港だけでなくてですねえ、東京での空港の受け入れ、の問題も当然、からんでくると思うんです*ね。」【取材アナウンサー (40代・男性)、第15回「新春特別企画 建設すすむ新空港」1986年1月12日放送】
- ④「当然、あの、新規路線の開設とゆうことになりますと私どもの方からだけの希望ではなくて向こうの方(ほう)からもですねえ、乗り入れの希望とゆうものもあるわけですので、」【岡山県新空港開設準備室長 (30~40代・男性)、第15回「新春特別企画 建設すすむ新空港」1986年1月12日放送】
- ⑤「たとえば行政が言うからだとか、市町村が、あー、こうだとかってゆうんではなくて、えー、自分たち自身がね、やっぱりそれに取り組むことが、自らの、おー、その、おー、プラスにもなるし」
【岡山県企画部理事 (50~60代・男性)、第19回「川柳の里 岡山県久米郡久米南町」1986年2月9日放送】

【方言的表現：「～で(は)なしに」】…13件

- ⑥「それでー、また一新品種の方も、今一植栽してえ、もう3年先には、あー、ベリーA、でなしに、リースリングとかメルローとゆう欧州系の、おー、ワインも、おー、やってみたいと、こうゆうように思うております。」【醸造場代表取締役 (50代?・男性)、第2回「ワインの里 赤磐郡

吉井町」1985年10月13日放送】

- ⑦「日頃はまあうちで飼うこととお、それとーその前まあ宇内の方(かた)が、あのーホテルーを完全に、こう飼われる前は、あたくしがこう一日一、でなしに週一、で決めてたね。」【矢掛町役場ホテル班のプロジェクトチームの一員 (40~50代・女性)、第5回「大名行列の町 岡山県小田郡矢掛町」1985年11月3日放送】
- ⑧「それもこのー、押しつけられてやるんでなしにい、自発的にこう、進んでやろうとゆう、そうゆう、まあ運動なんですわ。」【早島町長 (60代・男性)、第7回「イ草の町 岡山県都窪郡早島町」1985年11月17日放送】
- ⑨「それでまあ、それで味噌、豆腐とかいうような手作りの野菜を、えー、野菜でなしにあの加工品を作るとゆうことで、」【早島町農協組合長 (50~60代・男性)、第7回「イ草の町 岡山県都窪郡早島町」1985年11月17日放送】
- ⑩「これあの組合員だけでなしにい、まあこう地域一般の人にも利用していただいて、」【早島町農協組合長 (50~60代・男性)、第7回「イ草の町 岡山県都窪郡早島町」1985年11月17日放送】
- ⑪「なお、その、おー、点につきましては、瀬戸(しえと)の大橋だけでなしに、い、倉敷市が、あー、水島の臨界工業地帯も、北へ行きますと吉備高原都市もある。」【灘崎町長 (70代男性)、第9回「干拓の町 岡山県児島郡灘崎町」1985年12月1日放送】
- ⑫「*はりそれには、あのー、と、搾るだけ、売るだけが仕事でなしに、やはりあの搾るときから売ることを考えた牛乳の、えー、無脂固形(やや聞き取りにくい)の問題、」【酪農家 (33歳・男性)、第10回「ジャージー牛の里 岡山県山形郡＝蒜山高原＝」1985年12月8日放送】
- ⑬「よそからよそのものを真似したようなもんでなしにねえ、津山らしいものをやはり作っていつてえ、魅力のあるものを作っていつ*。」【津山民芸協会副会長 (60代・男性)、第17回「歴史と伝統のまち 津山市」1986年1月26日放送】
- ⑭「この「いいとこ総社」ゆうのは、あの、ほんと

に総社がよいところだけであるんじゃなしに、いい総社に育て上げましょと、いい総社を皆さんにこう見ていただきましょとゆういろんなこう、願いや希望が、うー、含まれてるんですね。」【総社市助役（70代・男性）、第20回「〈古代と21世紀結ぶ〉 岡山県総社市」1986年2月16日放送】

⑮「ま、ここにありますようなあの一、フリッターでなしにあれは何ですかなあ、あの一、ボール揚げがありますでしょ。」【核酸食友の会飯岡支部長（60代・女性）、第23回「「ヤマの町」は、いま岡山県久米郡柵原町」1986年3月9日放送】

⑯「これは単年度でなしにですねえ、こつ、今後、真備町の、まあシンボルとして、真備公と竹と、こうゆうふうにああ考えてやっております。」【真備町長（60～70代・男性）、第24回「〈タケノコの里〉岡山県吉備郡真備町」1986年3月16日放送】

⑰「そーしてまたゆくゆくは煎餅（しせんべー）だけでなしに、あの一草餅なんか作ってふるさと祭とか、青空市場とか、まあああゆうふうなところへも、参加したいと思っております。」【「野草を食べる会」会長（50～60代・女性）、第27回「「星の郷」づくり 岡山県小田郡美星町」1986年4月6日放送】

⑱「それでまあ岡山がまあただ一過性で、えー、「通（とお）って、あー良かったな」とだけでなしに、しみじみした、まあ触れ合いを深めていく*、まあその手立てを一つでも増やしいこう*、」【岡山県観光連盟専務理事（50～60代・男性）、第30回「観光おかやま」1986年4月27日放送】

こうした「～で（は）なしに」という表現については、本研究と別の調査目的で「放送ライブラリー」において別のテレビ番組を視聴していたところ、関西出身者も使っているケースをたまたま耳にした。その用例を以下に示す。

・「（昔の芸人は）皆なんかねえ、そうゆう変わったことを考えて、ただしゃべるだけやなしに。」【桂

米朝（3代目）、出演当時62歳・男性、読売テレビ放送『特選!! 思い出の漫才コンビ ベストテン』、1988年3月26日放送】

・「で、えー、じつはその一、「目玉とメガネ」（西川きよしと桂文珍のこと）とゆう番組をいつもご覧いただいてるお客様を、は、あの一、お集りいただいて、それで、芸をするとゆうんではなしに、えー、なんばグランド花月に（下略）」【桂文珍、出演当時46歳・男性、読売テレビ放送『目玉とメガネスペシャル きよし・文珍の爆笑漫才』、1995年2月19日放送】

桂米朝は兵庫県姫路市出身、桂文珍は兵庫県篠山市出身である。こうしたことを考えると、「～で（は）なく」を「～で（は）なしに」とする表現は、岡山県のみならず広く西日本に行われている可能性が考えられる。

5. おわりに

現時点でのデータベース構築の進捗率は56.4%である。まだ24番組の処理を残しているが、今後も調査を継続して全55番組をデータベース化し、その後本格的な分析を進める。分析の観点には本報告の「～で（は）なしに」も含め、前後の文脈や話し手の年齢層等からの分析も進めたい。

また、ひととおり分析を行なった後は、学術研究等のために本データベースを無料公開し、岡山方言に関心を持つ学生や若手研究者、市井の研究家が活用できる資産として残すことで、研究助成を受けて行なった本研究が他者の研究のために資するというよい循環を生み出したい。

参考文献

尾崎喜光（2018）「第13章 テレビインタビューの応答場面に見られる方言使用—30年前の岡山県における引用の助詞「と」の省略—」（小林隆編『コミュニケーションの方言学』ひつじ書房、pp.293-317）

「保育士の早期離職を予防する養成校及び施設管理職者向けマニュアル」の作成

ーリアリティショックに着目してー

山陽学園大学 総合人間学部

松浦美晴・上地玲子

（概要）待機児童問題の解消には保育士の早期離職を防ぐ必要がある。新人保育士の離職の理由となるものに、「リアリティショック」（Kramer, 1974）がある。これは、「新卒の専門職者が就職後数か月以内に予期しなかった苦痛や不快さを伴う現実に出くわし、身体的、心理的、社会的なショック症状を表わす状態」と定義される。新人保育士にとって、保育現場への就職というライフイベントにおけるリアリティショックを回避することは難しく、周囲からのサポートが必要となる。本研究では、新人保育士を対象とするインタビューを実施し、リアリティショックのmatter（問題）となる、就職前に抱いていた予想と就職後の現実とのギャップを抽出した。ギャップの内容を表す 10 カテゴリーとカテゴリー間の量的関係を説明する 2 次元が抽出された。本研究の結果にもとづき、新人保育士の離職予防マニュアルを作成することが望まれる。

目的

現在、日本では待機児童問題が深刻である。その背景に保育士の不足がある。原因の 1 つは保育士の早期離職である。新人保育士の離職の理由となるものに、「リアリティショック」があると考えられる。これは、Kramer（1974）が保育士と同じ専門職である看護師について、「新卒の専門職者が就職後数か月以内に予期しなかった苦痛や不快さを伴う現実に出くわし、身体的、心理的、社会的なショック症状を表わす状態」と定義した概念である。保育士は、子どもと接する仕事というイメージを持たれがちであるが、実際の業務には保護者対応や事務が多く、新人保育士は就職前に予期しなかった現実に出くわしやすい。厚生労働省の「待機児童解消加速化プラン」（2013）でも、保育士のリアリティショックへの対応の必要性が述べられている。

近年のリアリティショック研究では、リアリティショックの流れをストレス理論（Lazarus & Folkman, 1984）の枠組みで捉え、尺度を作成するようになっている（松田・設楽・濱田, 2016）30）。岡本・岩永（2015）は、新人看護師のリアリティショックを「自己に対して抱いている能力や自己評価と、就職した職場の環境や仕事内容など現実とのギャップが認知的不整合を引き起こし、それがストレスとなりストレスが喚起された状態」とした。

本研究も同様の枠組みを採用し、新人保育士が就

職前に抱いていた予想と就職後の現実とのギャップがストレスとなり、ストレスが喚起された状態を新人保育士のリアリティショックと考えることにする。本研究は、新人保育士のリアリティショックのmatter（問題）として、ストレスとなりうるギャップをとらえることを目的とする。新人保育士を対象にインタビューを実施し、就職前の予想と就職後に経験した現実との間のギャップを抽出する。

方法

研究実施にあたり、研究代表者の所属機関の研究倫理審査委員会より承認を受けた。

1. インタビュー

A 県内の保育施設に就職して 1 年目の保育士 8 名、2 年目の保育士 3 名の合わせて 11 名（女性 10 名、男性 1 名、私立保育園勤務 10 名、認定こども園勤務 1 名）をインタビューの対象とした。年齢は全員が 20 歳台であった。1 年目の保育士のインタビューは、就職後 1～3 か月に相当する 5 月～7 月に実施した。保育施設では季節ごとに行事が行われるため、新任の保育士は最初の 1 年を通して「初めての業務」を経験し続けることがある。業務についてのギャップの内容をとりこぼさず収集する必要があったため、2 年目の保育士には 1 年目の経験について尋ねた。対象者への協力依頼の際は、文書と口頭で説明を行い、対象者からの同意を文書により受けた。

インタビューは大学内の鍵のかかる個室で、対象者 1 名または 2 名に対し、実施者 2 名が行った。所要時間は約 1 時間であった。あらかじめ作成したインタビューガイドに沿った半構造化面接を通して、「就職前のイメージと就職後の現実とのギャップ」を中心に対象者の話を聴き取った。面接中の対象者と実施者の発言を IC レコーダーに録音した。

2. ギャップの抽出と分類

心理学の研究者 3 名で話し合いながら発話内容をまとめ整理し、98 の内容を表す切片を作成した。さらに心理学の研究者と心理学の博士課程に在籍する大学院生数名で話し合い、「ギャップの認知」を表す 84 の切片に絞り分類対象とした。

続く分類では、恣意的にならないよう、KJ 法 (川喜田, 1967) を参考に次の手続きをとった。本研究に直接関わっていない社会人と学生合わせて 33 名 (男性 3 名, 女性 30 名, 年齢 20 歳台から 60 歳台) に分類を依頼した。分類者は互いに独立して、何らの規定された基準も用いず、内容が類似すると判断した切片を同じカテゴリーに分類した。切片 A と切片 B の両方を同じカテゴリーに分類した分類者の数を全分類者数 33 で除したのち反転したものを, AB 間の距離とした。距離行列をもとに, 平均連結法を用いたクラスター分析によって, ギャップの内容のカテゴリーを抽出した。同じく距離行列をもとに, 多次元尺度法 (MDS, ALSCAL 解) によって, 切片の分類軸となる次元を抽出した。クラスター分析と多次元尺度法には, SPSS for Windows ver.23 を用いた。

結果

1. クラスタ分析

クラスター分析から得られたデンドログラムを, 内容のまとまりを考慮し切断し 10 カテゴリーとした。同一カテゴリー内の切片に共通する内容を表すよう, カテゴリーに命名を行った。表 1 にカテゴリー名と代表的な切片内容を示す。

第 1 のカテゴリーは, 子どもと関わる楽しさを表す内容であり, カテゴリー名を「a 子どもと関わる楽しさ」とした。「仕事楽しい」という切片がこ

のカテゴリーに含まれた。第 2 のカテゴリーは, 就職後の自らの成長への気づきを表す内容であり, 「b 自分の成長の実感」とした。第 3 のカテゴリーは, 仕事をする上でサポートになっている事柄を表す内容であり, 「c 仕事のためのサポートの実感」とした。以上のカテゴリーは, 予想より現実のほうがポジティブな方向にあるギャップを表している。第 4 のカテゴリーは, 子どもと関わる上での困難を表す内容であり, カテゴリー名を「d 子どもと関わる難しさ」とした。第 5 のカテゴリーは, 仕事での要求に対し自らの能力が追いついていないことを表す内容であり, 「e 自分の能力不足の実感」とした。第 6 のカテゴリーは, 保護者と関わる上での困難を表す内容であり, 「f 保護者と関わる難しさ」とした。第 7 のカテゴリーは, 職員間の人間関係や先輩保育士との関係の難しさを表す内容であり, 「g 職場の人間関係の難しさ」とした。第 8 のカテゴリーは, 職場の待遇や方針・慣習に対する不満を表す内容であり, 「h 職場への不満」とした。第 9 のカテゴリーは, 人手が足らず業務の量・範囲が大きく, 時間に追われ, 残業や持ち帰り仕事を要求されるという労働負担の大きさを表す内容であり, 「i 労働負担の大きさ」とした。第 10 のカテゴリーは, 余暇の少なさや業務に耐えるための体力保持の必要性から十分なストレス対処ができずサポートも得られないことを表す内容であり, 「j ストレス対処やサポート獲得の難しさ」とした。以上のカテゴリーは, 予想より現実のほうがネガティブな方向にあるギャップを表している。

2. 多次元尺度法

カテゴリー間の関係を解釈するため, MDS では解釈の容易な 2 次元解を採用した。適合度指標は, Stress 値が.373, RSQ 値が.441 であった。適合度が高くない理由は, クラスタ分析のデンドログラムが多層の構造を示していることから, 分類軸が実際には 2 軸を越えて存在すると考えられることである。84 の切片の 2 次元空間布置図を図 1 に示す。クラスター分析から得られたカテゴリーごとに, カテゴリーのアルファベット記号をプロットした。

カテゴリー間で明確に分離しないプロットが見られた。特に「e 自分の能力不足の実感」は 1 つにま

表1 クラスタ分析より得られたカテゴリーと主な内容

a 子どもと関わる楽しさ
子どもの成長が嬉しい
子どもがなついてくれるのがうれしい
仕事を楽しんでいる
b 自分の成長の実感
自分が成長している実感がある
体調管理に気をつけるようになった
仕事をするようになって、自分の姿を客観的に見ることが出来るようになった
c 仕事のためのサポートの実感
他の園の友人と情報交換をするようになった
新人を育てるための、さまざまな配慮がある
先輩保育士が優しい
d 子どもと関わる難しさ
手のかかる子どもがいる
年度初めに新入の子どもが泣くので大変
子どもを怒ることがストレスになる
e 自分の能力不足の実感
自分の力不足を感じる
初めてで仕事がよく出来ない
新人なのに責任の重い仕事を任される
f 保護者と関わる難しさ
保護者とのコミュニケーションが難しい
保護者同士のトラブルがある
保護者から一人前の保育士と見てもらえない
g 職場の人間関係の難しさ
職員間の連携が取れていない
職員間の人間関係が難しい
先輩保育士の言い方に傷つく
h 職場への不満
園の方針に疑問がある
結婚や出産後も働ける職場ではない
仕事に必要な設備が十分でない
i 労働負荷の大きさ
書類が多い
持ち帰り仕事が多い
忙しすぎて必要な仕事ができない
j ストレス対処やサポート獲得
家族や友達には仕事の悩みを相談できない
プライベートの時間が少なくなった
仕事のための体力を残しておきたいので、思い切り遊べない

とまらなかった。2次元布置の次元1上では、正極に「i 労働負荷の大きさ」が布置し、続いて正方向に「j ストレス対処やサポート獲得の難しさ」、 「h 職場への不満」が布置した。労働の負担が大きく、そ

れに対応するためのサポートを周囲から得られず、負担から来るストレスにも対処ができず、職場への不満が募っていることを表すと考えられる。負極には「c 仕事のためのサポートの実感」が布置し、続いて負方向に「b 自分の成長の実感」が布置した。周囲からサポートを得ることができ、自らが成長することによって、仕事による負担があっても対応できていることを表すと考えられる。以上から次元1を＜仕事への非対応→対応＞と解釈した。次元2上では、正極に「g 職場の人間関係の難しさ」が布置し、続いて正方向に「f 保護者と関わる難しさ」が布置した。職場の先輩・同僚や保護者などの大人を相手にする関わりに苦労していることを示すと考えられる。負極には「d 子どもと関わる難しさ」が布置し、続いて負方向に「a 子どもと関わる楽しさ」が布置した。いずれも子どもを相手とする関わりを表している。以上から次元2を＜関わる対象が大人→子ども＞と解釈した。

2つの次元により空間布置は4つの象限に分かれる。第1象限は、仕事に対応できておらず、関わる対象が大人であるギャップといえる。＜仕事への非対応＞の極に「i 労働負荷の大きさ」がある。象限内に広く「h 職場への不満」に属する内容が布置している。第2象限は、仕事へ対応できており、関わる対象が大人であるギャップといえる。＜関わる対象が大人＞の極に「g 職場の人間関係の難しさ」「f 保護者と関わる難しさ」がある。隣接して「h 職場への不満」に属する内容が布置している。象限内に広く「e 自分の能力不足の実感」がある。＜仕事への対応＞の極に「c 仕事のためのサポートの実感」がある。第3象限は、仕事へ対応できており、関わる対象が子どもであるギャップといえる。＜仕事への対応＞の極に「e 仕事のためのサポートの実感」がある。象限内に「b 自分の成長の実感」「a 子どもと関わる楽しさ」が布置し、＜関わる対象が子ども＞の極に「d 子どもと関わる難しさ」がある。第4象限は、仕事へ対応できておらず、関わる対象が子どもであるギャップといえる。＜関わる対象が子ども＞の極に「d 子どもと関わる難しさ」がある。象限内に「e 自分の能力不足の実感」「j ストレス対処

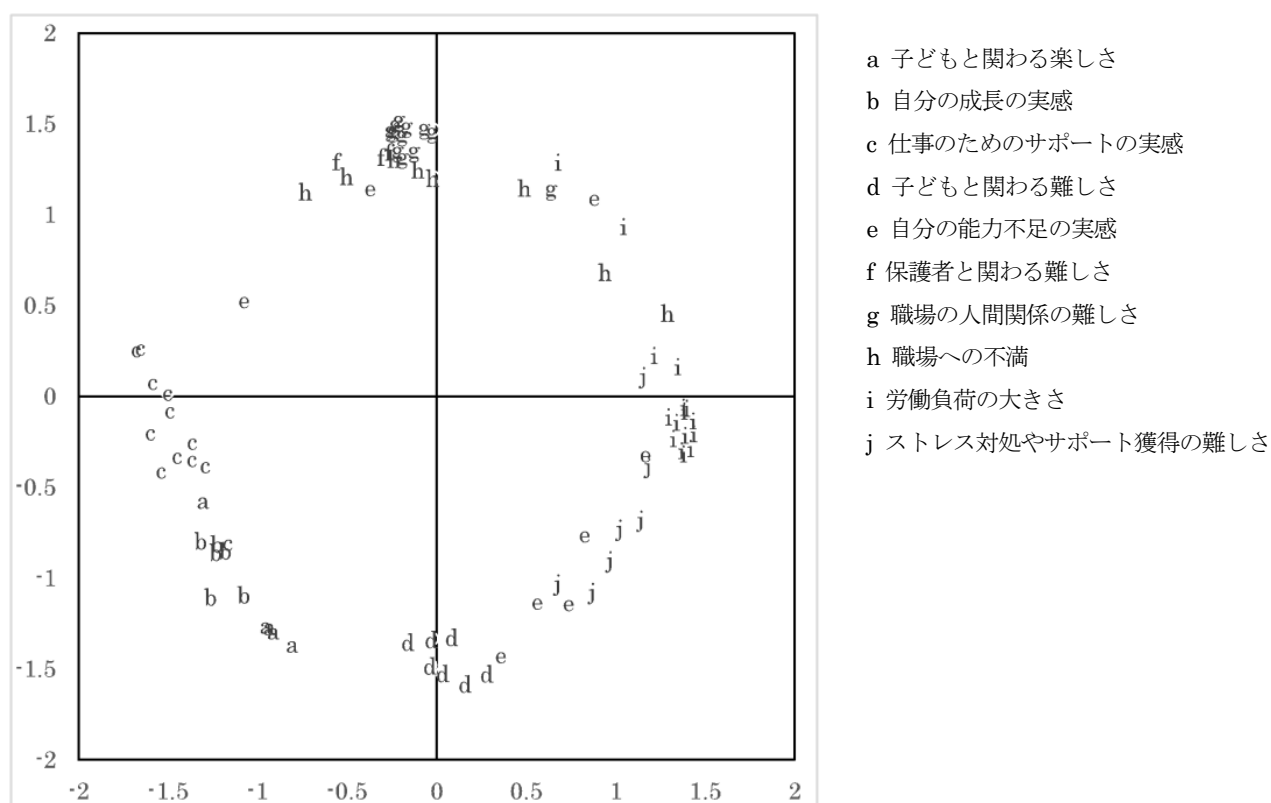


図1 新人保育士のギャップの内容を表す切片の2次元空間布置図

やサポート獲得の難しさ」が布置する。＜仕事への非対応＞の極に「i 労働負荷の大きさ」がある。

考察

本研究は、保育士のリアリティショックの「要因」となる、仕事についての予想と現実とのギャップとして認知された内容の抽出と分類を行った。保育士を対象とした半構造化インタビューから得られた内容を分類した33名の結果から距離行列を作成し、クラスター分析を用いて10のカテゴリーを抽出した。さらに多次元尺度法を用いて、カテゴリー間の量的関係を説明する分類軸となる2次元を見出した。見出された次元は、本研究に直接かわからない分類者33名分の分類軸の要約であり、カテゴリー間の相違を量的に表す一般的な基準に近いといえる。2次元布置は、カテゴリー間の次元上の量的関係を表している。以下、各カテゴリーの次元上の布置とカテゴリー同士の空間内における位置関係をもとに、カテゴリーの特長について考察する。

1. ポジティブなギャップの認知

抽出されたカテゴリーのうち、「a 子どもと関わる

楽しさ」と「b 自分の成長の実感」と「c 仕事のためのサポートの実感」の3つはポジティブな内容である。子どもとの関わりは就職前の保育士志望者が期待する職務内容であるが、実際の子どもとの関わりが期待を越えてさらに楽しいというギャップである。看護師の先行研究（岡本・岩永，2015）では、ポジティブなギャップとして「患者・家族との関係に関するギャップ」が見られたが、それは、看護師志望者の期待する職務内容が、家族や患者の笑顔に触れたり患者の回復に立ち会うことであることによる。保育士において「a 子どもと関わる楽しさ」が抽出されたのはそれと同様といえる。また、「c 仕事のためのサポートの実感」からは、保育士として、サポートを得て専門的な能力を発揮できることが、ポジティブなギャップにつながる考えられる。

養成校で形成される保育者としての基礎的力量は、保育の技能と保育への態度である（金子，2013）。ポジティブなギャップは養成校で培った力量を予想以上に発揮できていることへの認知といえる。ネガティブなギャップがストレスとなりストレスが喚起されるとき、ポジティブなギャップがストレス

の緩衝要因として働くと考えられる（岡本・岩永，2015）。また、「予想以上に楽しい」ことは職務への動機づけにつながる。したがって、これらのギャップは早期離職につながるとはいえない。

2. リアリティショックをもたらす認知

他のネガティブなギャップがリアリティショックをもたらすと考えられる。本研究で得られたネガティブなギャップとして、「i 労働負荷の大きさ」「j ストレス対処やサポート獲得の難しさ」「d 子どもと関わる難しさ」「保護者と関わる難しさ」「e 自分の能力不足の実感」がある。「i 労働負荷の大きさ」に含まれる切片の内容は、書類や残業の多さ、忙しさなどであるが、これらは新人保育士から子どもと関わる時間を奪うものである。「d 子どもと関わる難しさ」「保護者と関わる難しさ」「e 自分の能力不足の実感」は、専門職としての職務に関するギャップである。「g 職場の人間関係の難しさ」は、人間関係、特に先輩との関係構築の困難さを表している。これらネガティブなギャップについては岡本・岩永（2015）が看護師において同様の内容を見出しており、保育士と看護師に共通のことが多いといえる。松田ら（2016）は保育実習で実感する予期せぬ現実として「子どもとの関わりの難しさ」を示しており、就職後の新人保育士においても同様にギャップが生じていることになる。保育の専門性の力量は現職においても継続的に形成されるべき（金子，2013）とされ、保育実習で感じたギャップが就職時までには埋まることは容易ではないといえる。

3. 2次元布置におけるカテゴリーの特徴

2次元布置の第3象限の部分は、保育士にとって適応的で職業アイデンティティに合致する状態といえる。そしてこの象限から離れるほどストレスに結びつきやすいネガティブなギャップとなると考えられる。具体的には、仕事に対応できないこと、関わる対象が大人であることが、ネガティブなギャップとなる。

＜関わる対象が大人＞の極に「g 職場の人間関係の難しさ」とともに布置するのが、「f 保護者と関わる難しさ」である。保護者との関わりは、新任保育士にとって未知の業務といえる。養成校の実習等で

保護者対応を経験することはほとんどなく、新任の保育士にとってほとんどの保護者が年上であり苦手意識がある（中平・馬場・竹内・高橋，2016）。しかし、「f 保護者と関わる難しさ」カテゴリーは象限2に布置し、＜仕事への非対応＞の座標は大きくない。その理由として、保護者対応は難易度が高い業務である（宮崎，2016）ために、経験の少ない新人保育士ではなく他の保育士が対応していることが現実として多い（入江，2013）ことが考えられる。「保護者から一人前の保育士として見てもらえない」という切片が含まれることもそれを裏付ける。新人保育士が保護者対応の業務に対応できているのではなく、対応できないことがただちには問題となっていないと解釈すべきであろう。一方で、仕事への対応に感じる困難が小さくとも大人との関係性があると、それは新人保育士にとってネガティブなギャップとなるといえる。＜関わる対象が大人＞であるほど新人保育士にとってネガティブなギャップとなることは、子どもとの関わりを期待して現場に入る新人保育士に特有の問題といえる。

同じく＜仕事への非対応＞の状態である象限1と象限4を比較すると、＜関わる対象が子ども＞であれば「e 自分の能力不足の実感」のギャップとなり、＜関わる対象が大人＞であれば「h 職場への不満」のギャップとなるといえる。どちらのギャップも早期離職につながる可能性がある。ただし、「h 職場への不満」は他の施設への転職となる可能性があるのに対し、「e 自分の能力不足の実感」は保育士としての職業アイデンティティそのものを揺るがすことになる。同じように仕事への対応が困難であっても、関わる対象が子どもである場合、自らの保育職への適性を疑い保育職そのものを辞めてしまう可能性がある。

4. 新人保育士に必要なサポート

第3象限に「c 仕事のためのサポートの実感」、第4象限に「j ストレス対処やサポート獲得の難しさ」が布置することから、子どもとの関わりは、周囲からのサポートを実感しやすい状況と考えられる。養成校で子どもと関わる力を習得したという自負を持って現場に入った新人保育士が、周囲からのサポー

トを得て力を発揮することで第3象限に位置する「b 自分の成長を実感」できる状況と、力を予想通りには発揮できずサポートも得られず第4象限に布置する「e 自分の能力不足の実感」となる状況に分かれるといえる。職場サポートは新人保育士としての自己肯定感を高める（宮崎，2016）とされる。職業アイデンティティを揺るがす状況を防ぐため、新人の段階で子どもとの関わりにおける周囲からのサポートを得ることが重要と考えられる。例えば、能力不足への気づきを成長につなげるためのサポートが必要であろう。

今後の展開として、本研究の結果にもとづき、新人保育士のサポートマニュアルを作成してゆくことが望まれる。保育施設における組織的なサポートのために、施設管理職向けのマニュアルが必要である。ただ、規模の小さな施設では現場の職員の負担を考慮すると難しい面もある。子どもとの関わりに困難を感じる時期に、自治体単位で新人保育士を対象とする研修会を開催するなどの方策も必要であろう。また、就職前の保育士養成校における教育・支援のマニュアルも必要といえる。養成校学生に就職後の困難をイメージさせ、対処の方法を考えさせておく、養成校に卒業生向けの窓口を開設するなどの方策が考えられる。

引用文献

- 入江慶太（2013）. 新人保育士が感じる保育の難しさとは何か― 3 歳未満児クラスにおける検討― 川崎医療短期大学紀要, 33, 61-67.
- 金子智栄子（2013）. 保育者の力量形成に関する実践的研究 風間書房.16-17.
- 厚生労働省（2013）. 保育を支える保育士の確保に向けた総合的取組.
<http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11907000-Koyoukintoujidoukateikyoku-Hoikuka/000026218.pdf> 2013 年 10 月 16 日（情報取得 2018 年 4 月 5 日）
- Kramer, M.(1974). Reality Shock : Why Nurses Leave Nursing? The C.V. Mosby Co.,St. Louis, MO.
- 川喜田二郎（1967）. 発想法 中央公論社
- Lazarus, R. S. & Folkman, S. (1984). Stress,

appraisal and coping. New York: Springer

- 松田侑子・設楽紗英子・濱田祥子（2016）保育系実習用予期せぬ現実尺度の作成. 心理学研究, 87, 284-394.
- 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.
- 中平絢子・馬場訓子・竹内敬子・高橋敏之（2016）.事例から見る望ましい保護者支援の在り方と保育士間の連携 岡山大学教師教育開発センター紀要, 6, 21-30.
- 岡本響子・岩永誠（2015）. 新人看護師のリアリティシヨック尺度の開発 インターナショナル nursing care research, 14, 1-10.

付記

本研究は、平成29年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団研究活動費助成事業および科学研究費助成事業 挑戦的萌芽研究（課題番号 15K13152）の助成を受け行われた。

職員の精神的健康度と関連する経営行動・マネジメント行動の同定

山陽学園大学大学院看護学研究科公衆衛生学

高木 二郎

本研究の目的は、職場における以下の5つの経営行動・マネジメント行動（職場への忠誠心を要求する；職場で特定の態度や意見を要求する；成果に関係のない、仕事の作法や礼儀を要求する；職場で、縄張り争いがある；上司が、部下の強みよりも、弱みに目を向ける）と精神的健康度との関連を調べることである。国内の15の事業所の全従業員(n=1760)を対象とし、2017年6月から2018年3月まで自記式質問紙による横断調査を行った(有効回答率79.7%)。精神的健康度の測定には日本語版 Kessler Six-question Psychological Distress Scale (K6) を用い、気分障害・不安障害を検出した。潜在的交絡因子として、job strain index と社会的支援（日本語版 Job Content Questionnaire にて測定）、及び努力報酬比（日本語版 Effort-Reward Imbalance Questionnaire にて測定）、職場のいじめ・ハラスメント（日本語版 Negative Acts Questionnaire にて測定）を用いた。以上の日本語版尺度はいずれも日本において信頼性と妥当性が確認されている。ロジスティック回帰分析の結果、5つの経営行動・マネジメント行動はいずれも気分障害・不安障害との間で有意な正の関連を示した。その関連は、人口統計学的因子にて調整した後も有意であり、さらに上記の潜在的交絡因子にて調整した後も、関連の大きさは減ったが、依然として有意であった。5つの経営行動・マネジメント行動と気分障害・不安障害との正の関連は人口統計学的因子及び既知の心理社会的因子で調整後も依然として認められ、それらとは独立の関連が存在することが示唆された。

はじめに

近年、職域におけるメンタルヘルスの重要性が取り沙汰されている。経営学、あるいはマネジメントの研究分野では、様々なマネジメント行動が分類・提唱され、それらと事業所の業績との関連が研究されている。また、成功した著名な経営者の方々が自身の経験に基づいて経営論を様々述べている。しかし、それらの経営行動・マネジメント行動と、職員の精神的健康度との直接の関連をみた研究は国内外でほとんどない。今回、経営学やマネジメント研究分野、一般の経営論の文献、書籍を広く調べ、記載された経営行動、マネジメント行動と、医学的に確立された方法で測定された精神的健康度との関連を解析した。

今回取り上げる経営行動・マネジメント行動としては、ありふれているが、職員の精神的健康度に悪い影響を与える可能性がある以下の5つとした。aとbは一見職場では普通に行われることのように見えるが、職場における思想の自由の制限といえる。

a. 職場への忠誠心を要求する

b. 職場で特定の態度や意見を要求する

c. 成果に関係のない、仕事の作法や礼儀を要求する

d. 職場で、縄張り争いがある

e. 上司が、部下の強みよりも、弱みに目を向ける

方法

対象者

国内の15の事業所の全従業員(n=1760)を対象とし、2017年6月から2018年3月まで自記式質問紙による横断調査を行った(有効回答者数1402人、有効回答率79.7%)。調査を行うにあたり、調査の目的・内容について説明した上で、署名による同意を得た。本研究は岡山大学大学院保健学研究科倫理審査委員会および岡山県立大学倫理審査委員会の承認を得て実施した。

質問項目

人口統計学的因子（年齢、性別、婚姻状況、就業状況、生活習慣）、心理社会的因子（精神的健康度、職業性ストレス、社会的支援、職場のいじめ・ハラ

スメント) について質問した。また、経営行動・マネジメント行動については、職員の経験を知るため、受身形にし、以下のように質問を行った。

- a. 職場への忠誠心を要求される
- b. 職場で特定の態度や意見を要求される
- c. 成果に関係のない、仕事の作法や礼儀を要求される
- d. 職場で、縄張り争いがある
- e. 私の上司は、部下の強みよりも、弱みに目を向ける

各々について、「全くあてはまらない=1、あまり当てはまらない=2、どちらともいえない=3、やや当てはまる=4、よく当てはまる=5」を回答頂いた。

精神的健康度の測定には日本語版 Kessler Six-question Psychological Distress Scale (K6) を用いた[1]。K6 は世界保健機関 (WHO) による World Mental Health Survey や米国の全国調査である United States National Health Interview Survey (NHIS) で用いられている。K6 は6項目の質問からなり、結果は0~24点の点数で表される。K6 は適切な逆翻訳法にて日本語版が作成されており、日本における World Mental Health Survey で使用されている。日本において、米国精神医学会の診断基準である Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition (DSM-IV) に基づいて診断された気分障害あるいは不安障害を、日本語版 K6 を用いてスクリーニングした際の受診者動作特性曲線 (ROC 曲線) の下部の面積 (AUC) は 0.94 であり、8.5 をカットオフポイントとした時、感度は 77.8%、特異度は 86.4% と良好な妥当性が示されている[2, 3]。また、良好な内的整合性も示されている[2]。今回上記カットオフポイントを用いて気分障害・不安障害を検出した。

職業性ストレスの一つは Karasek による仕事の要求度-コントロールモデルに基づいて測定した[4]。仕事の要求度が高い割に、仕事のコントロール (仕事の裁量度、自分のペースでできる度合い) が低いとストレスがあるとされるモデルである。日本語版 Job Content Questionnaire (JCQ) で仕事の要求度と仕事のコントロールを測定し、仕事の要求度の値を

仕事のコントロールの値で割った job strain index を職業性ストレスの値とした[5]。また、職場の社会的支援も日本語版 JCQ にて測定した。日本語版 JCQ は逆翻訳にて適切に作成され、日本において信頼性と妥当性が確立されている[5]。

職業性ストレスのもう一つは Siegrist による努力-報酬不均衡モデルにて測定した[6]。努力が多い割に、報酬が少ないとストレスがあるとされるモデルである。日本語版 Effort-Reward Imbalance Questionnaire (ERI) で努力と報酬の値を測定し、努力値を報酬値で割り、6/11 を掛けた値を努力報酬比として、職業性ストレスの値とした[7]。日本語版 ERI は逆翻訳にて適切に作成され、日本において信頼性と妥当性が確立されている[7]。

職場のいじめ、ハラスメントは日本語版 Negative Acts Questionnaire (NAQ) にて測定した[8]。NAQ は Einarsen と Raknes によって開発され、具体的な仕事のいじめ、ハラスメント行為を受けた頻度を本人がそれらを仕事のいじめ、ハラスメントだと自覚しているかどうかと無関係に問う。日本語版 NAQ は逆翻訳にて適切に作成され、日本において信頼性と妥当性が確立されている[9]。

統計解析

SPSS statistics を用い、有意水準は 5% 未満とし、両側検定を行った。2 群間のカテゴリー変数の差の検定には Fisher の正確確率検定を用い、2 群間の連続変数の差の検定には *t* 検定を用いた。経営行動・マネジメント行動と気分障害・不安障害との関連はロジスティック回帰分析にて検討した。経営行動・マネジメント行動の測定にはリッカート尺度を用いたが、リッカート尺度は線形の性質を持ち、間隔変数とみなすことができるため[10]、経営行動・マネジメント行動得点が 1 増加すると気分障害・不安障害のリスクが何倍になるかを示すオッズ比を求めた。この値が 1 を超えれば、経営行動・マネジメント行動と気分障害・不安障害との間には正の関連があるといえる。また、有意水準を 5% 未満としているため、オッズ比の 95% 信頼区間が 1 を含まなければ、統計

表1. 研究参加者の属性(n=1402)

	n	%		
男性	782	55.8		
結婚	774	55.2		
夜勤あり	317	22.6		
現喫煙者	446	31.8		
月に2回以上飲酒	752	53.6		
週に1回以上運動	509	36.3		
気分障害・不安障害(K6>8)	326	23.3		
	平均値	標準偏差	最小値	最大値
年齢	46.3	14.2	18	77
精神的健康度(K6粗点)	5.1	5.5	0	24
Job strain index	0.52	0.15	0.14	1.50
社会的支援	21.7	4.5	8	32
努力報酬比	0.66	0.50	0.20	3.93
職場のいじめ・ハラスメント	27.9	8.7	22	94
忠誠心の要求	2.8	1.1	1	5
特定の態度や意見の要求	2.4	1.0	1	5
作法礼儀の要求	2.2	1.1	1	5
縄張り争いあり	2.2	1.1	1	5
上司が弱みに目を向ける	2.3	1.1	1	5

表2. 気分障害・不安障害に該当する場合としない場合の属性の差

	気分障害・不安障害に該当		非該当		p値
	n	%	n	%	
男性	165	50.6	617	57.3	0.036
結婚	140	42.9	634	58.9	0.001>
夜勤あり	80	24.5	237	22.0	0.365
現喫煙者	102	31.3	344	32.0	0.839
月に2回以上飲酒	166	50.9	586	54.5	0.281
週に1回以上運動	108	33.1	401	37.3	0.189
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
年齢	41.5	13.3	47.8	14.2	0.001>
Job strain index	0.58	0.17	0.50	0.14	0.001>
社会的支援	19.6	5.2	22.3	4.0	0.001>
努力報酬比	1.07	0.70	0.54	0.34	0.001>
職場のいじめ・ハラスメント	35.0	12.9	25.7	5.4	0.001>
忠誠心の要求	3.1	1.1	2.7	1.1	0.001>
特定の態度や意見の要求	2.8	1.0	2.3	1.0	0.001>
作法礼儀の要求	2.6	1.1	2.1	1.1	0.001>
縄張り争いあり	2.7	1.3	2.0	1.1	0.001>
上司が弱みに目を向ける	2.9	1.2	2.2	1.0	0.001>

表3. ロジスティック回帰分析の結果：経営行動・マネジメント行動得点が1増加すると気分障害・不安障害のリスクが何倍になるかを示すオッズ比

	調整なし	人口統計学的属性 ^a で調整	さらに心理社会的因子 ^b で調整
	オッズ比 (95%信頼区間)	オッズ比 (95%信頼区間)	オッズ比 (95%信頼区間)
忠誠心の要求	1.39 (1.24-1.57)	1.37 (1.22-1.55)	1.17 (1.02-1.34)
特定の態度や意見の要求	1.62 (1.43-1.83)	1.57 (1.37-1.78)	1.21 (1.04-1.42)
作法礼儀の要求	1.58 (1.41-1.77)	1.56 (1.39-1.75)	1.17 (1.02-1.35)
縄張り争いあり	1.67 (1.50-1.87)	1.67 (1.49-1.86)	1.16 (1.01-1.33)
上司が弱みに目を向ける	1.81 (1.62-2.03)	1.80 (1.60-2.03)	1.17 (1.01-1.35)

a: 年齢、性別、婚姻状況、就業状況、生活習慣.

b: Job strain index、社会的支援、努力報酬比、職場のいじめ・ハラスメント.

学的に有意である。

結果

研究参加者の属性を表1に示す。研究参加者の平均年齢は46.3歳、男性は55.8%、女性は44.2%であった。

気分障害・不安障害に該当する場合としない場合の属性の差を表2に示す。気分障害・不安障害に該当する方々のほうは有意に女性が多く、結婚率、年齢、社会的支援は有意に低く、job strain index、努力報酬比、職場のいじめ・ハラスメントは有意に高かった。経営行動・マネジメント行動の得点は5つ全てが、気分障害・不安障害に該当する方々のほうで有意に高かった。

表3に経営行動・マネジメント行動と気分障害・不安障害との関連を示すロジスティック回帰分析の結果を示す。5つの経営行動・マネジメント行動はいずれも気分障害・不安障害との間で有意な正の関連を示した。その関連は、人口統計学的因子にて調整した後も有意であり、さらに心理社会的因子にて調整した後も、関連の大きさは減ったが、依然として有意であった。

考察

5つの経営行動・マネジメント行動はいずれも気

分障害・不安障害と正の関連を示した。心理社会的因子にて調整した際には関連の大きさが減ったが、これは経営行動・マネジメント行動と気分障害・不安障害との関連の一部で、既知の心理社会的因子がメカニズムとして機能していた可能性と、関連の一部が既知の心理社会的因子による交絡であった可能性が考えられる。しかしながら、経営行動・マネジメント行動と気分障害・不安障害との関連は人口統計学的因子及び既知の心理社会的因子で調整後も依然として認められ、それらとは独立の関連が存在するといえる。

職場の構成員の精神的健康度を上げる方法として従来から、仕事の要求度を減らし、コントロールや社会的支援を高めること、努力・報酬不均衡を是正すること、職場のいじめ・ハラスメントを予防することが提唱されている[8, 11]。今回の研究で、それ以外に、以下の経営行動・マネジメント行動が提唱される。

1. 職場への忠誠心を要求しない
2. 職場で特定の態度や意見を要求しない
3. 成果に関係のない、仕事の作法や礼儀を要求しない
4. 職場で、縄張り争いを行わない
5. 上司は、部下の弱みよりも、強みに目を向ける

1 については忠誠心は自然に醸成されるのを待つのが賢明で、要求すべきではないという意味と考える。2 については、「雇用関係は特定の成果要求する契約に過ぎない。それ以外のいかなる試みも人権の侵害である。」というドラッカーの言葉[12]を引用して説明としたい。3 については、仕事の作法や礼儀が成果につながるのであれば、そのことを議論し、職員に納得して頂くのが賢明だが、成果につながらないのであれば、簡略化・合理化を進めてよいように考える。4 については、職場での競争を煽るより、役割分担を明確にするほうがよいという意味と考える。5 については、上司の部下への接し方として、研修を行うことが有効と考える。

本研究の限界を述べる。まず、今回の研究は全て参加者の主観を自記式質問紙によって測定したものによる。今後はストレスや健康アウトカムについて、より客観的な測定が必要になろう。次に今回 convenience sampling を用いており、結果は全ての労働者全体には当てはまらない可能性がある。しかしながら、今回我々は 15 の異なる事業所から、79.7%の有効回答率で結果を得ており、ある程度の一般化可能性は期待できると考える。次に今回の研究は横断研究のため、因果関係を特定できない。将来の介入研究にて、因果関係が明らかになるであろう。

謝辞

本研究のデータ収集にご協力を頂きました岡山大学大学院保健学研究科の林由佳先生、山陽学園大学助産学専攻科の山中絵美先生、及び岡山県立大学保健福祉学部の谷口敏代教授(平成 30 年度からは島根県立大学看護栄養学部)に感謝申し上げます。また、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助成を頂きまして、深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Kessler RC, Andrews G, Colpe LJ, et al. Short screening scales to monitor population prevalences and trends in non-specific

psychological distress. Psychol Med 2002;32:959-76.

2. Furukawa TA, Kawakami N, Saitoh M, et al. The performance of the Japanese version of the K6 and K10 in the World Mental Health Survey Japan. Int J Methods Psychiatr Res 2008;17:152-8.

3. Miyaki K, Song Y, Htun NC, et al. Folate intake and depressive symptoms in Japanese workers considering SES and job stress factors: J-HOPE study. BMC Psychiatry 2012;12:33.

4. Karasek RA. Job demands, job decision latitude, and mental strain: implications for job redesign. Adm Sci Q 1979;24:285-308.

5. Kawakami N, Kobayashi F, Araki S, Haratani T, Furui H. Assessment of job stress dimensions based on the job demands-control model of employees of telecommunication and electric power companies in Japan: reliability and validity of the Japanese version of Job Content Questionnaire. Int J Behav Med 1995;2:358-75.

6. Siegrist J. Adverse health effects of high effort-low reward conditions at work. J Occup Health Psychol 1996;1:27-43.

7. Tsutsumi A, Ishitake T, Peter R, Siegrist J, Matoba T. The Japanese version of the Effort-Reward Imbalance Questionnaire: a study in dental technicians. Work Stress 2001;15:86-96.

8. Takaki J, Tsutsumi A, Fujii Y, et al. Assessment of workplace bullying and harassment: Reliability and validity of a Japanese version of the Negative Acts Questionnaire. J Occup Health 2010;52:74-81.

9. Einarsen S, Raknes BI. Harassment in the workplace and the victimization of men. Violence Vict 1997;12:247-63.

10. Vickers AJ. Comparison of an ordinal and a continuous outcome measure of muscle soreness. Int J Technol Assess Health Care 1999;15:709-16.

11. Takaki J, Taniguchi T, Fukuoka E, et al.

Workplace bullying could play important roles in the relationships between job strain and symptoms of depression and sleep disturbance. J Occup Health. 2010;52:367-74.

12. P.F. ドラッカー著, 上田惇生訳. エssenシャル版 マネジメント 基本と原則. ダイヤモンド社.

ゲノム編集技術を用いたノックアウトマウスの作製と腎臓線維化の制御機構の解明

重井医学研究所 分子遺伝部門

古家野 孝行

CRISPR-Cas9に代表されるゲノム編集技術の発展により、これまで困難であった遺伝子改変動物の作製が容易に行われるようになった。本研究では、新規ゲノム編集マウス作製法、*i*-GONAD法 (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acid Delivery system) を利用し、細胞周期や細胞老化の制御に関わる遺伝子p21ノックアウトマウスの作製を行った。加えて、片側尿管結紮 (UUO; Unilateral Ureteral Obstruction) によって腎臓の線維化を誘導し、制御における細胞周期の意義について検討した。UUOにより線維化を誘導した腎臓において、CDK1の15番目のチロシンのリン酸化が亢進し、G2期遅延が示唆された。また、DNA損傷の指標である γ H2A.Xの発現が上昇し、活性型Chk1のレベルも増加しており、DNA損傷チェックポイント機構が活性化され細胞周期遅延が誘導されていることが示唆された。さらに、作製したp21ノックアウトマウスの比較を行ったが、細胞周期チェックポイントの活性化には顕著な差はみられず、p21は腎臓の線維化進展においてはチェックポイント機構の下流で機能することが示唆された。

【はじめに】

末期腎不全になると人工透析や腎移植に頼らなければならない。透析患者数は年々増加傾向にあり、医療費の増加など社会問題となっている。新たな腎臓病の治療法確立は社会全体が抱える、緊急かつ重要な課題の一つである。

腎臓の線維化は腎機能低下と密接に関連しており、線維化の制御機構解明は、腎臓病の治療薬開発や治療法確立など臨床における基盤になることが予想される。近年の報告から、急性腎障害時において、近位尿細管上皮細胞の細胞周期G2/M期停止や筋線維芽細胞への形質転換 (Epithelial to Mesenchymal transition) などが線維化の進展に寄与していることが示された (Lovisa et al., 2015)。しかしながら、その詳細、特に分子レベルでの制御機構については十分に明らかとなっていない。

細胞は異常な細胞増殖を制御するため、細胞周期チェックポイントを有している。DNA損傷や染色体分配エラーなど細胞にとって致命的な異常が生じた場合、細胞周期を停止し異常を修復する。しかし、細胞が異常を修復できないと判断すると、不可逆的に細胞増殖を停止させる。このことを細胞

老化 (Cellular senescence) と呼ぶ。細胞老化が誘導された細胞は、アポトーシスのように細胞死しているわけではなく、増殖が止まった状態で存在しており、SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) 因子と呼ばれる細胞老化に関連したタンパク質を分泌することが明らかになってきている (Hoare and Narita, 2013)。しかし、p16およびp21の生体内、とりわけ、腎臓における機能について十分に理解されていない。

近年、CRISPR-Cas9に代表されるゲノム編集技術の発展により、遺伝子改変動物の作製が容易に行われるようになった (Gurumurthy et al., 2016; Wang et al., 2013)。しかし、*ex vivo*での受精卵やES細胞の扱いが困難であるなど、いまだにハードルの高い実験である。

本研究では、最近開発されたGONAD法 (Takahashi et al., 2015) を利用してp21ノックアウトマウスを作製し、腎臓線維化と細胞周期および、細胞老化の関係について解析した。

【材料と方法】

1. 動物実験

C57BL/6 マウスを用いた。ノックアウトマウス

スの作製は *i*-GONAD 法(Ohtsuka et al., 2018) に従った。ここでは簡潔に述べる。妊娠 0。7 日目の雌のマウスの卵管に、CRISPR/Cas9 システム (IDT、Coralville、IA) の溶液を一本鎖 DNA と共に注入した。その後、産まれてきた子の遺伝子の確認を行った。さらに、ヘテロマウスの交配を行い、ホモノックアウトマウスの作製を行った。

生後 8-12 週のマウスを使用し、片側尿管結紮 (Unilateral Ureteral Obstruction; 以下 UUO) を行った。マウスの左側の尿管を外科的に結紮後、切断した。その後、右側 (Control) と左側 (UUO) の腎臓をそれぞれ摘出し、解析を行った。

2. 免疫染色

採取した腎臓は 5 μ m の厚さで凍結切片を作製した。サンプルを 10%中性緩衝ホルマリン、アセトンまたはメタノールで室温、10 分の条件において固定した。5%血清/TBST で 30 分間室温でブロッキングし、一次抗体と反応させた。その後、Alexa Fluor 標識された二次抗体と反応させ、共焦点顕微鏡 (オリンパス、FV1200) を用いて観察した。

3. ウェスタンブロッティング

サンプルを Sample buffer に懸濁後、100 $^{\circ}$ C で熱処理を行った。SDS-PAGE 電気泳動後、PVDF メンブレンに転写、ブロッキングを行い一次抗体と反応させた。その後適切な二次抗体と反応させ、発光試薬によりシグナルの検出を行った。

【結果】

1. p21 ノックアウトマウスの作製

p21 の腎臓障害時の線維化進展における機能を調べるため、遺伝子機能欠損マウス (ノックアウトマウス) の作製を GONAD 法(Takahashi et al., 2015)により行った (図 1)。GONAD 法は ex vivo での受精卵の取り扱いを必要とせず、簡便に遺伝子改変が行える方法である。p21 の遺伝子座 (exon2) に含まれる開始コドンの 96base 下流に STOP コドンが組み込まれるように一本鎖 DNA (ssDNA) をデザインし、挿入した。目的の遺伝子改変の確認は PCR および、DNA シーケンスにより行った (結果は示さない)。なお、p21 ノックアウト作製に過程において、CRISPR/Cas9 の試薬の最適化やエレクトロポレーションの条件などを変更し、新たなゲノム編集マウス作製法、*i*-GONAD (improved-GONAD) として発表した (Ohtsuka et al., 2018)。

2. UUO の腎臓では、G2/M 期遅延が誘導される

腎臓線維化の進行過程における細胞周期制御については不明な点が多い。UUO によって線維化を誘導し、細胞周期進行の変化を調べた。UUO を施した腎臓では顕著に線維化の指標である α -SMA が著しく上昇しており、線維化が誘導されていた (図 2)。まず、M 期移行の主要制御因子である Cdk1 (サイクリン依存性キナーゼ) の 15 番目チロシンのリン酸化を指標に細胞周期停止

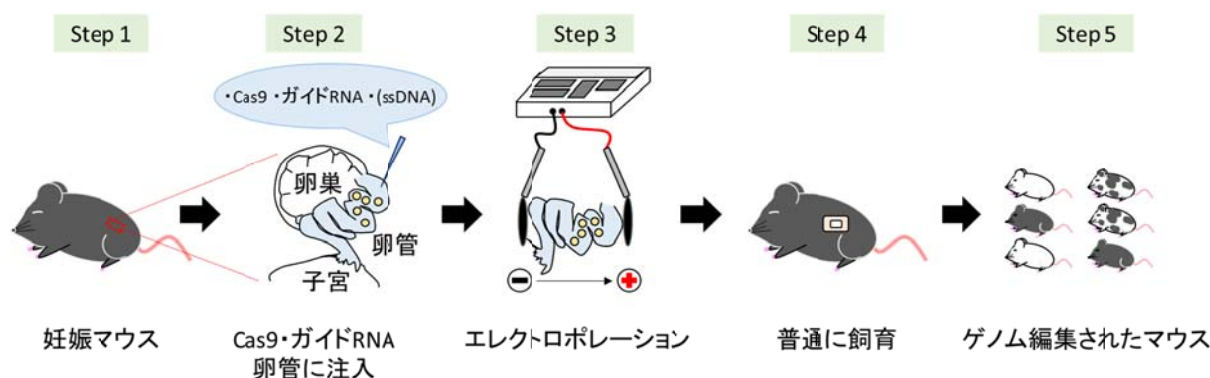


図 1 *i*-GONAD法による遺伝子改変マウスの作製概略

について調べた。その結果、UUO によってリン酸化が顕著に亢進していた。Cdk1 の 15 番目チロシンは、G2 期にリン酸化され、M 期への移行に対して阻害的に働くことが報告されている。この結果より、UUO によって線維化が生じた腎臓においては細胞周期のG2期からM期への移行が遅延していることが示唆された。

3. UUO によりチェックポイントキナーゼ Chk1 が活性化される

UUO によって引き起こされる細胞周期 G2 期遅延の原因の解明を試みた。注目したのが DNA 損傷応答チェックポイントである。チェックポイントが関与しているかどうかを調べるため、Chk1 (チェックポイントキナーゼ) の活性化状態について調べた。活性型の Chk1 は 345 番目のセリンがリン酸化されていることが知られている。そこで、抗リン酸化 Chk1 抗体を用い、ウェスタンブロットによって活性化を調べた。UUO 施術後、7 および 14 日目において、Chk1 の分子量付近 (56kDa) に特異的なバンドが検出された (図 2)。

一般的に Chk1 は紫外線刺激などによる DNA 損傷によって活性化される。DNA 損傷が誘導されているかどうかを γ H2A.X を指標に調べた。その結果、Chk1 が活性化される同時期において、 γ H2A.X の増加が見られた (図 2)。また、DNA 損傷が腎臓のどの部位に引き起こされているかを調べるため、免疫染色を行った。上皮細胞のマーカーである、E-カドヘリンで染色された領域において、 γ H2A.X 陽性の細胞を観察された (図 3)。また、近位尿細管上皮細胞のマーカーである AQP1 によって染色される領域において γ H2A.X 陽性の細胞が確認された (結果は示さない)。以上の結果より、UUO によって近位尿細管上皮細胞に DNA 損傷が生じていると考えられた。

4. p21 ノックアウトマウスでは DNA 損傷チェッ

クポイントの活性化の変化は見られない

p21 ノックアウトマウス ($p21^{-/-}$) に UUO を施し、チェックポイント活性化の差について調べた。

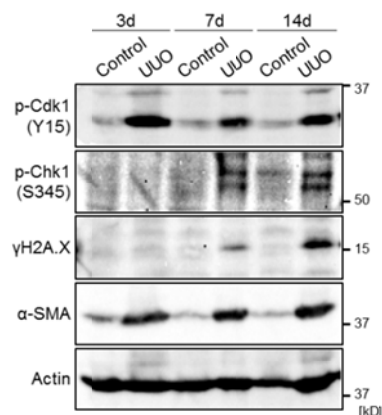


図2 UUOによりChk1が活性化される

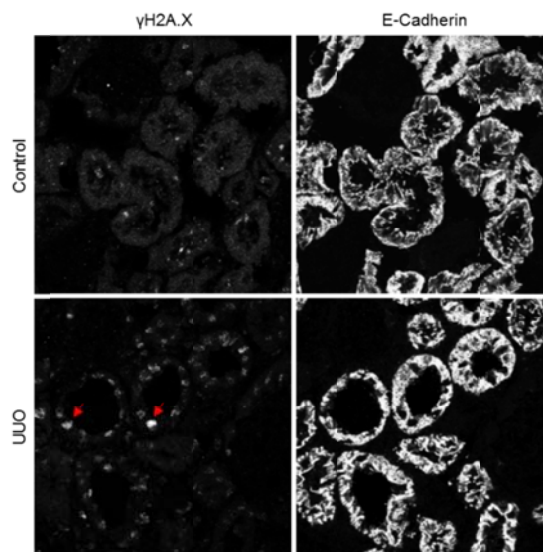


図3 尿細管においてDNA損傷が生じる矢印は陽性細胞を示す。

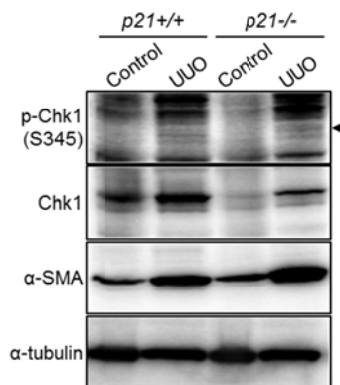


図4 p21機能欠損によるChk1活性化の変化

UUO 後 7 日後の腎臓を用いて、比較を行ったが、Chk1 の活性化に関しては顕著な差は認められなかった (図 4)。UUO による線維化誘導後、7 日目においては p21 はチェックポイント機構の活性化には関与しない、もしくは機能的関係において、チェックポイント機構の下流において機能することが示唆された。

【考察】

本研究では、新規遺伝子改変マウス作製法、*i*-GONAD 法を確立し、この方法を利用して、p21 ノックアウトマウスの作製を行った (Ohtsuka et al., 2018)。近年のゲノム編集技術の進展は目覚ましい。しかし、簡便に、かつ効率的に遺伝子改変動物を作製する方法はあまり存在せず、長く待ち望まれていた。本研究において確立した *i*-GONAD 法は、非常にシンプルで使いやすい方法である。また、他の動物にも応用可能で、今後、他の動物も含めた、遺伝子改変動物作製のスタンダードな方法に発展すると考えられる。

さらに、腎臓の線維化制御機構を明らかにするため、p21 ノックアウトマウスを用いて、腎臓の線維化を誘導し、細胞周期の関与について検討した。UUO により線維化を誘導すると、DNA 損傷チェックポイントが活性化され、G2 期遅延が誘導されることがわかった。p21^{+/+}と p21^{-/-}では、DNA 損傷チェックポイントの活性化については顕著な差は認められなかった。以上の結果は、p21 が DNA 損傷チェックポイント機構の遺伝的下流において機能していることを示唆している。Chk1 が直接 p21 をリン酸化し、制御しているという報告もある (Buscemi et al., 2014)。今後、腎臓の線維化においても同様の反応が見られるのか、検証していきたい。線維化における細胞周期遅延が関わることが示されているが (Lovisa et al., 2015)、その本質的な意義は不明である。今後の更なる研究に期待したい。

【謝辞】

本研究遂行にあたり、公益財団法人ウエスコ学術振興財団に研究助成を賜り、深く感謝いたします。

【参考文献】

- Buscemi, G., Ricci, C., Zannini, L., Fontanella, E., Plevani, P., and Delia, D. (2014). Bimodal regulation of p21(waf1) protein as function of DNA damage levels. *Cell cycle* 13, 2901-2912.
- Gurumurthy, C.B., Takahashi, G., Wada, K., Miura, H., Sato, M., and Ohtsuka, M. (2016). GONAD: A Novel CRISPR/Cas9 Genome Editing Method that Does Not Require Ex Vivo Handling of Embryos. *Curr Protoc Hum Genet* 88, Unit 15 18.
- Hoare, M., and Narita, M. (2013). Transmitting senescence to the cell neighbourhood. *Nat Cell Biol* 15, 887-889.
- Lovisa, S., LeBleu, V.S., Tampe, B., Sugimoto, H., Vadrnagara, K., Carstens, J.L., Wu, C.C., Hagos, Y., Burckhardt, B.C., Pentcheva-Hoang, T., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 21, 998-1009.
- Ohtsuka, M., Sato, M., Miura, H., Takabayashi, S., Matsuyama, M., Koyano, T., Arifin, N., Nakamura, S., Wada, K., and Gurumurthy, C.B. (2018). *i*-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol* 19, 25.
- Takahashi, G., Gurumurthy, C.B., Wada, K., Miura, H., Sato, M., and Ohtsuka, M. (2015). GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci Rep* 5, 11406.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910-918.

平成29年度 海外渡航報告書

岡山大学大学院自然科学研究科（工学系）

今井 純

（概要）平成29年7月8日～16日という日程で国際自動制御連盟（IFAC; The International Federation of Automatic Control）第20回世界会議（WC; World Congress）に出席するため、公益財団法人ウエスコ学術振興財団のご支援によりフランス・トゥールーズへ渡航したので、以下に報告する。

【会議概要】 IFAC が世界各国の自動制御関係の学術機関をメンバーとする国際組織として1957年に設立されて今年で60周年となるが、WCは3年に一度開催され、自動制御関係の世界最高峰の研究集会として今回で第20回目となる。今回は世界69か国から2800件の発表があったが、採択率は全投稿論文数のうちの69%ということである。

トゥールーズはフランス南西部の人口40万人規模（フランスおよそ第5位）の街であるが、そのうち学生が10万人という学園都市として有名で、また世界的航空機メーカー「エアバス」の本社があるところとしても知られている。観光客が世界一多いとされるフランスにおいて、トゥールーズはそれほど観光地として有名というわけではないが、それでも市街地中心部には歴史的建造物が多く残されており、大会会場周辺を少し散策するだけでも十分楽しめるほどであった。

ここ1年間は欧州でもテロが多発しているせいで空港には銃火器を携帯する兵士の姿も目にしたり、また今回の大会会場でも、政府の指導により会場入口ゲートで空港並みの厳重なセキュリティチェックが導入され、朝や昼食後のラッシュ時には入場待ちの列で10分以上並ばねばならなかったが、それ以外の市民生活においては特に普段と変わらない様子であった。

今回の世界会議は本会議の日程が7月10日（月）から14日（金）まで連日5日間に渡り、しかもセッションは常時28トラック以上という私の知る限り制御関係ではこれまでで最大規模の国際会議であった。小生の投稿論文1本にも査読者が少なくとも5名割り当てられ、かつ返されたコメントの質も高かった。セッションは通常のLecture形式の発表が主体ではあるものの、4トラックはInteractive sessionであり、ポスターではなく幅1メートル強のディスプレイにパソコン画面を映し出して発表するものであった。サイズや解像度に関して当初心配していたが、実際に発表してみるとこれが意外になかなか効果的な方式であり、原則1枚に集約したポスターと同様のフォーマットの画面表示を採用しても意思疎通にはほとんど問題がなく、他の会議ではなかなか得られない大変有意義な議論を経験できたことは今後のために大きな収穫であった。

【発表内容】 発表タイトルは「境界制御系の制御器設計のための混合ガラーキンモデリングについて」（原題 On Mixed Galerkin Modeling for Controller Design of Boundary Control Systems）であり、その概要は以下の通りである： 物理的な空間分布を考慮する分布定数系は一般に無限次元であり、有限次元の制御器をモデルベースで設計するにはどこかに有限次元近似が必要になる。ガラーキン法は幅広い分布定数系に対して有効な近似法として知られている。制御系設計には低次元モデルが必要となるがそれを得るためには試行関数の適切な選択が非常に重要である。しかしほとんどの物理系が制御入力を境界に持ち、非同次境界条件を有しているため、特にディリクレ型境界条件に対して試行関数をガラーキン近似で用いるためにはいわゆる同次化の処理が必要という定説がある。しかし、その解析処理はしばしば込み入ったものになり、得られた近似モデルの状態空間表現はかなり複雑なものになるという問題点が知られていた。

本研究ではこの同次化の手続きを関数空間上の射影のアイデアにより再構成し、境界入力をもつ分布定数系の有限次元近のモデリングを拘束条件付きのデスクリプタシステムとして定式化する方法を新たに

提案するものである．これによると偏微分方程式は常微分方程式に，境界条件は制約条件に変換されて，それらをあわせた比較的明らかな構造を持つデスクリプタシステムが得られる．試行関数の1次独立性の条件のもとでそのシステムは常に状態空間表現に変換できることが明らかにされている．Fig. 1 に基礎的な分布定数系の例題について，提案手法により得られた近似モデルの特性をボード線図として示しており，また Fig. 2 にその誤差の大きさの周波数特性の評価を示している．従来，重み付き残差法やガラーキン近似法においては同次境界条件を満足する試行関数と非同次境界条件を満足する試行関数を独立に分離して準備する必要があったが，提案法においては試行関数の候補に対して境界条件による面倒な調整を特段行わなくても，デスクリプタシステムにおける拘束条件の消去として数値計算的に処理されるため，そのまま適用可能であるというメリットがあり，分布定数系の境界条件の処理法の一つとして今後発展および応用が期待される．

【発表時の質疑とコメント】本手法は線形問題が対象であるが，非線形へはどのように拡張できるのかという質問があった．これは対象とするシステムのクラスに大きく依存する議論となり，今後の課題であろう．また発表中に示した例題は最も基礎的な1次元定係数放物型分布定数系であったが，参加者からのコメントとして，実用的な応用例への適用をさらに意識した取り組みに期待するというものがあり，今後はまず弦の振動を記述する双曲型問題への適用に向けた検討が必要である．さらにはTimoshenko 柔軟ビームやさらに複雑な回転型ビームについて提案する方法論を適用していく取り組みを今後の課題としていきたい．

【謝辞】本海外渡航には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の支援を頂いており，厚く感謝の意を表したい．

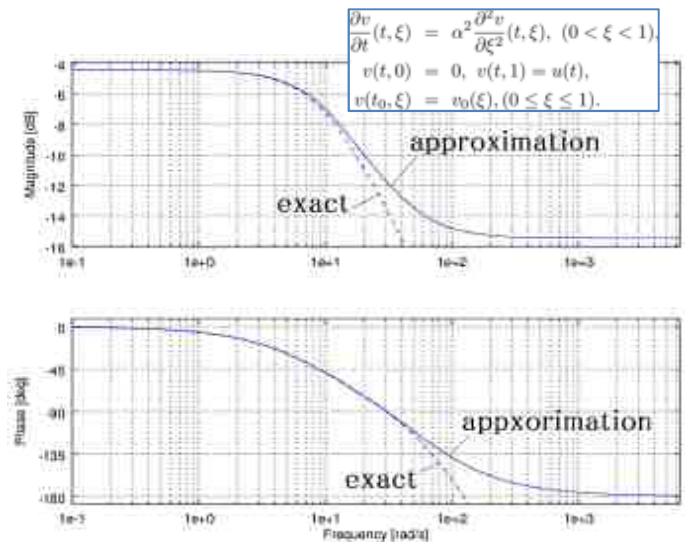


Fig. 1 最も基本的な 1 次元定係数放物型分布定数系と提案手法による 4 次近似モデルのボード線図（上段；ゲイン線図、下段；位相線図）ただしオリジナルの伝達関数と近似モデルのそれはともに入力 u から出力 $y(\cdot, x = 3/5)$ までの入出力特性を表す．

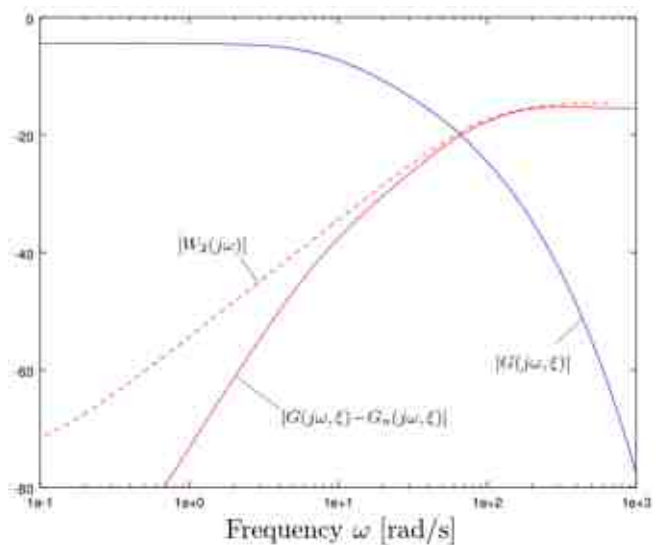


Fig.2 Fig.1 にて示した近似における誤差評価． G はオリジナルの分布定数系で G_n は近似系を表す．角周波数 $\omega = 8 \times 10 \text{ rad/s}$ 程度までの周波数域で誤差がオリジナルのゲイン特性を下回り，その範囲までの制御帯域の達成が期待できる． W_2 は制御系設計に用いるための加法的誤差重みで誤差の大きさを 2 次の最小位相有理関数の絶対値でカバーしている．

平成29年度 海外渡航報告書

岡山大学大学院自然科学研究科

萬代 大樹

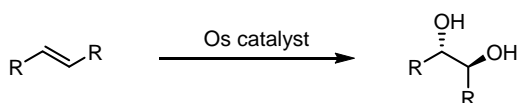
(概要) 今回、公益財団法人 ウェスコ学術振興団の海外渡航費助成事業の支援を受け 2017 年 6 月 8–10 日の日程でホーチミン市 (ベトナム) の Hotel Continental Saigon で開催された ISPAC2017 に参加し、情報収集や口頭発表を行った。渡航日程は以下のようになっている。

年 月 日	日 程	訪問先	内 容
2017 ・ 6 ・ 7	移動 (岡山発)		岡山発→仁川国際空港経由 (韓国) →タンソンニャット国際空港 (ベトナム) 着
2017 ・ 6 ・ 8		ISPAC2017 会議出席	情報収集および共同研究に関する意見交換
2017 ・ 6 ・ 9		ISPAC2017 会議出席	情報収集および共同研究に関する意見交換
2017 ・ 6 ・ 10		ISPAC2017 会議出席	口頭発表, 情報収集および共同研究に関する意見交換
2017 ・ 6 ・ 11	移動 (ベトナム発)		タンソンニャット国際空港 (ベトナム) →仁川国際空港経由 (韓国) →岡山着

今回、以下の研究成果についての発表を行った。

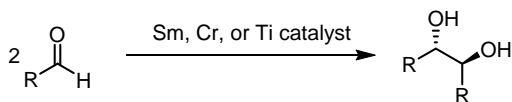
光学活性 1,2-ジオールの合成は, Sharpless ジヒドロキシル化をはじめとして, 様々な方法が報告されている (Figure 1a–d)。しかし, 反応基質に制限がある場合が多く, 反応によっては用いた重金属の残存やジアステレオマー混合物 (*d,l/meso*) の分離精製が問題となる場合もあり, 実用的かつ一般性の高い方法論の開発は未だ重要な課題である。

a Sharpless dihydroxylation



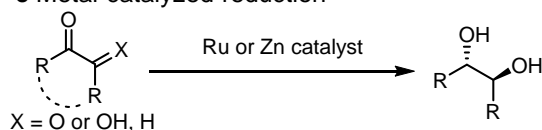
- Cannot be applied to a *cis*- or cyclic alkene
- Poisonous catalyst

b Pinacol coupling reaction



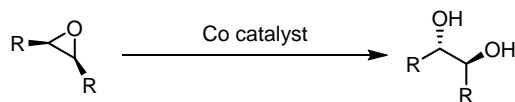
- Cyclic and dialkyl-substituted 1,2-diols have not been fully studied.

c Metal-catalyzed reduction



- Generally contaminated by large quantities of *meso*-1,2-diols

d Jacobsen hydrolytic desymmetrization



- Shows low reactivity for internal epoxides

Figure 1. Various enantioselective syntheses for 1,2-diols

一方, ラセミ体の 1,2-ジオールを用いるアシル化による速度論的光学分割反応やメソ体の 1,2-ジオールを用いるエナンチオ選択的なアシル化による非対称化反応は, 光学活性 1,2-ジオールやそのモノアシル化

体の有力な供給手段として汎用されている。これまでいくつかの報告例があるものの、反応に適用できるジオールに制限があり、過剰反応が進行したジアシル化体が副生するため改善の余地が残されていた。

近年、我々はビナフチル骨格の 3,3'位に極性官能基(FG)を導入した不斉求核触媒を開発した¹。この触媒は第二級アルコールの速度論的光学分割反応²、*d,l*-1,2-ジオールの速度論的光学分割反応 (Figure 2a)³、さらに *meso*-1,2-ジオールの非対称化反応 (Figure 2b)⁴などを円滑に進行させる優れた触媒である。特にジオール類の反応では、わずか 0.1–0.5 mol %の触媒量を用いるのみで高エナンチオ選択的なモノアシル化反応が進行する。今回の口頭発表では、主に 2 つの反応の基質適用範囲と各種検証実験を中心に詳細を発表を行った。またこの発表に関して共同研究の話し合いをする機会を得ることができ、大変有意義な学会参加であった。

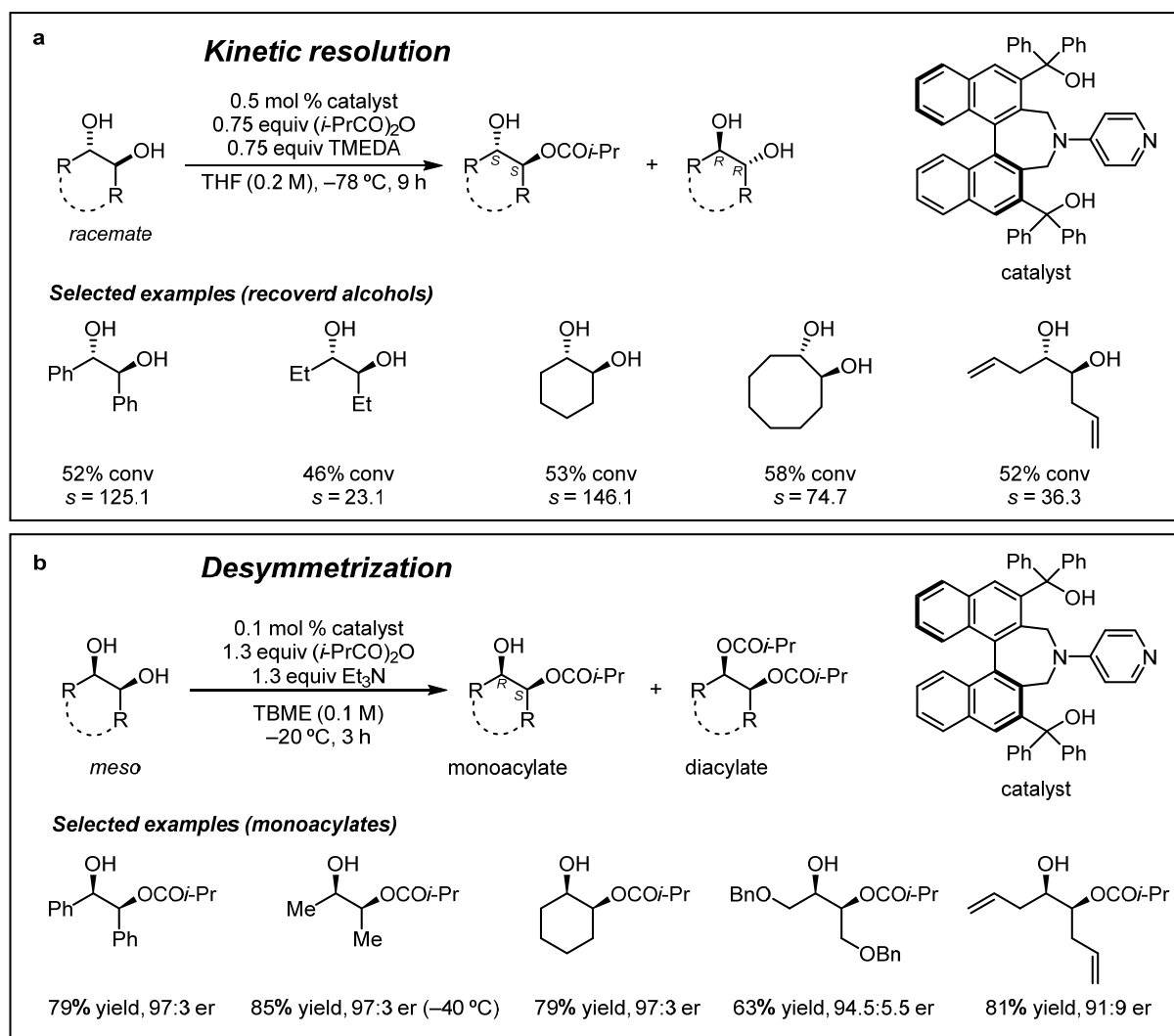


Figure 2. (a) Kinetic resolution of *d,l*-1,2-diols. (b) Desymmetrization of *meso*-1,2-diols.

参考文献

- 1) Mandai, H.; Fujii, K.; Yasuhara, H.; Abe, K.; Mitsudo, K.; Korenaga, T.; Suga, S. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 11297.
- 2) Fujii, K.; Mitsudo, K.; Mandai, H.; Suga, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2016**, 89, 1081.
- 3) Fujii, K.; Mitsudo, K.; Mandai, H.; Suga, S. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, in press (DOI: 10.1002/adsc.201700057).
- 4) Mandai, H.; Yasuhara, H.; Fujii, K.; Shimomura, Y.; Mitsudo, K.; Suga, S. *J. Org. Chem.* **2017** in press (DOI: 10.1021/acs.joc.7b00992).

平成 29 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

三木直子

2016 年 5 月 22 日から 27 日の日程でアメリカの California State University Fullerton で開催された 10th International Workshop On Sap Flow 2017 に参加してきました。この会議は 2~3 年に一度開催される植物の水輸送に関わる国際的な専門家会議です。今回も植物の水輸送に関わる各分野（主に灌漑、森林水文、植物の水分生理）の専門家が参加し最新の研究についての発表ならびに活発な議論が行われました。なかでも今回は、植物水分生理学者である Dr. H. Jochen Schenk が organizing committee の chair を務めていたこともあり、申請者の専門でもある本分野の発表が非常に充実しているように感じました。樹木は水分などの環境条件の変動下において、水輸送機能を失ったり、またそれを回復したりしますが、この回復機構については未解明の部分が多く、まさに研究が日進月歩で進められており非常に注目されている課題ともいえます。本会議ではこの分野の第一人者の一人である Dr. Andrew McElrone の keynote speech をはじめ多くの最先端の発表を聴講することができ非常に有意義で刺激的な時間を持つことができました。

申請者は本会議で Water movement via adventitious root of *Juniperus sabina* with prostrate life form in semiarid areas of China というタイトルで、中国の半乾燥地に分布する匍匐性の樹木 *Juniperus sabina*（別名：*Sabina vulgaris*）の、降雨後の乾燥の進行に伴う土壌深層から土壌表層への根を介した水の移動の存在を、ポット苗木を用いた樹液流速の測定ならびに重水トレーサー実験などから確認した結果について報告しました。本種は常緑性かつ匍匐性といった極めて特異的な形態的特徴から流砂固定の効果が非常に高いといわれています。それに加えて、今回確認された乾燥下におけるこの水分の再分配は土壌表層の乾燥の緩和効果につながるということが予想されることから、このような乾燥環境下の緑化や生態系修復において非常に重要な種である可能性が高いことが確認できました。この水の再分配については、これまでいくつかの種で確認されていますが、匍匐性樹木での確認は申請者らの研究が初めてになります。加えて沙漠化が進行する乾燥地生態系の修復を行う上で非常に有意義な知見が提供できる可能性を示すことができました。ポスター発表の時間が 1 時間 30 分設けてありましたが、ほぼ途切れることなく多くの方に聴講いただき、結果についても大変好意的なコメントを多数いただきました。

本会議は参加者 79 人とあまり大きな規模ではありませんが、より専門性が優先されているということ、またゆったりと落ち着いた中で非常にフレンドリーな環境が確保されているということから、研究成果を関連する研究者に確実に発信できるとともに、人脈の形成やモチベーションのより一層の向上において非常に貴重で有意義な機会となりました。



申請者の lightning presentation の様子

平成29年度 海外渡航報告書

岡山大学大学院自然科学研究科（理学部）

野坂俊夫

渡航先 イタリア共和国（パヴィア市，トリノ市，およびジェノバ市周辺）

渡航日程 平成29年10月11日出発，同10月21日帰着。日程は以下の通り。

10月11日 岡山発，関西空港・ミラノ空港経由，パヴィア着

10月12日 パヴィア大学にて研究成果発表，研究打ち合わせ

10月13日 パヴィア大学にて化学分析準備

10月14日 トリノ大学にて研究成果発表，研究打ち合わせ

10月15～19日 トリノ近郊およびジェノバ近郊にて野外調査と岩石試料採取

10月20～21日 パヴィア発，ミラノ空港・関西空港経由，岡山着

渡航の目的と経緯

報告者は、国際深海科学掘削計画（IODP）の第360次航海に乗船研究員として参加した。この航海の目的は、南西インド洋海嶺に露出する隆起岩体 Atlantis Bank を掘削し、海洋下部地殻におけるマグマ活動と熱水変質作用の実態を解明することにあった（写真1）。掘削は米国の掘削船を用いて平成27年12月～翌2月に実施され、日米欧亜各国から30名の研究者が参加した。報告者は熱水変質研究グループのリーダーとして、船上での観察・分析・報告書作成を行った。掘削試料は乗船研究者に優先的に配分され、現在、各国の大学等で研究が続けられている。

この掘削試料について昨年我々が岡山大学で行った研究によって、多くの黒雲母が広範囲にわたって見つかった。さらにカリウムに富む通常の黒雲母だけでなくナトリウム黒雲母も見つかった。海洋地殻においてこれほど多量の黒雲母が産出する例はこれまでに報告がなく、また海洋斑れい岩中のナトリウム黒雲母の産出は世界初の発見である。これらの黒雲母にはアルカリ元素の不足が認められる一方、共存する緑泥石には過剰のアルカリが含有されていることから、黒雲母と緑泥石の間の固溶体形成または両者の機械的混合が生じているものと考えられる。これらの層状珪酸塩の産状と化学組成は学術上重要な新知見であり、その予察的成果を平成29年9月開催の日本鉱物科学会年会にて発表した。

広範囲にわたる黒雲母の産出は、海洋地殻の熱水変質に伴って大規模なアルカリ交代作用が起きていることを示唆するものであり、その生成条件を明らかにすることは地球科学への重要な貢献となる。特に微量元素組成と結晶構造の分析は黒雲母の生成条件の解明に対して重要な制約条件を与えるものと期待されるが、それらの分析には学外の高分解能分析装置を用いる必要がある。一方 IODP には下船後の共同研究は乗船研究者間のものを優先するという内規がある。そこで黒雲母の微量元素分析と結晶構造分析を、船上での共同研究者であったトリブジオ教授の協力を得てイタリアで実施することにした。鉱物の微小領域分析に当たり、照射線（電子線または粒子線）の照射位置について、実際の分析試料を見ながら、装置操作者と入念な打ち合わせを行う必要がある。そこで、分析試料を携行してイタリアに渡航することにした。

また、北部イタリアには、Atlantis Bank に類似した中生代の海洋下部地殻起源の斑れい岩体とそれに付随する上部マントル岩体が露出していることが知られている。異なる時代の岩石を比較することは、地質作用の普遍性あるいは特異性を理解するうえで重要なことである。そこで代表的な岩体について野外での産状を観察し、分析用の岩石試料を採取することも、渡航の目的のひとつであった。

用務概要

パヴィア大学では、まず岡山大学での研究の途中経過を発表し、海洋地殻からの黒雲母の発見の重要性をあらためて説明した。質疑応答の後、トリブジオ教授と微量元素分析の第一人者であるザネッティ博士を交えて今後の研究計画について打ち合わせを行った。当初計画では微量元素測定にイオンプローブアナライザーを用いる予定であったが、装置の故障のため、やや空間分解能の劣るレーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析計（LA-ICPMS）を用いることにした。必要な前処理を施した分析試料をあらかじめ岡山大学で作製し、これを渡航時に持参したため、現地での打ち合わせと分析準備は全く問題なく進めることができた。使用する LA-ICPMS の空間分解能は数十ミクロン程度であり、また黒雲母の結晶粒径は相当細かいため、分析点の決定には細心の注意が必要である。現地ではトリブジオ教授とザネッティ博士とともに持参した試料を光学顕微鏡で観察し、結晶粒径や不純物の有無を確認しながら慎重に分析点を決定した。当初は現地滞在中に分析を実施する予定であったが、先方の都合により、平成 30 年 1 月以降に実施されることになった。

トリノ大学では、岡山大学で得られた鉱物の化学組成分析結果について発表し、透過電子顕微鏡分析（TEM）の専門家であるペルーソ教授に結晶構造分析の必要性と重要性をあらためて説明した。ここでも分析試料の光学顕微鏡観察を行い、分析対象について詳細な検討を行った。分析試料は TEM 用の前処理を施す必要があるため、帰国後に岡山大学で処理をしたものをあらためてトリノ大学に送付することで合意した。分析は平成 30 年の春までに実施される予定である。

海洋下部地殻の変質作用の研究の一環として、中生代の海洋リソスフェア起源の斑れい岩とかんらん岩が露出しているトリノ近郊とジェノバ近郊に赴き、野外における岩石の産状観察と岩石試料の採取を行った（写真 2）。異なる時代の岩石を比較することは地質学的研究において重要なことであるが、陸上に露出した岩石はたいてい強く風化しており、良好な試料を効率よく採取することは難しい。今回は現地の地質に精通したトリブジオ教授の案内により、風化していない非常に新鮮な岩石試料を採取することができた。現在進行中の南西インド洋の斑れい岩の研究に加えて、今回採取したイタリア北部の岩石についても、今後パヴィア大学との共同研究を進めていくことを計画している。

以上のように、今回の渡航は今後の研究の発展に大いに役立つものであり、大変有意義なものであった。この場を借りて、ご支援を賜ったウエスコ学術振興財団にあらためて感謝の意を表したい。



写真 1. 南西インド洋海嶺 Atlantis Bank から掘削された斑れい岩のコア試料（掘削船 JOIDES Resolution 船上、平成 28 年 1 月）



写真 2. イタリア北部に露出する斑れい岩と、岩石の構造について説明するトリブジオ教授（ジェノバ近郊、平成 29 年 10 月）

平成 29 年度 海外渡航報告書

岡山大学 異分野基礎科学研究所

岩崎 真之

平成 29 年 6 月 24 日 (土) から 30 日 (金) までの 7 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 19 回有機合成指向有機金属化学国際会議 (19th International Conference on Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis (OMCOS-19)) に出席し、研究成果を発表・討論するため、大韓民国済州島に渡航した。本国際会議では、韓国科学技術院 (KAIST) の Sukbok Chang 教授と Chulbom Lee 教授が組織委員長を務めた。講演会場は解放感にあふれる海に隣接する済州国際会議場 (ICC Jeju) であった。巨大なホールであり、座席も座り心地が良く、ゆったりと講演を楽しむことができた。

渡航スケジュールの関係で、本会議が開催される前日の 6 月 24 日 (土) 午前 10 時 (定刻) に岡山空港を離陸し、仁川国際空港に正午前に到着した。ソウル市内にて 1 泊したのち、翌 25 日 (日) の正午過ぎに金浦空港より済州空港を経て会場である済州国際会議場に移動した。空港から会場までの移動はシャトルバスを利用したが、会場に到着したのは、基調講演の始まる 1 時間前であった。参加登録を済ませて、講演要旨集を受け取り、2005 年ノーベル化学賞受賞者である Robert Grubbs 教授 (カリフォルニア工科大学) の基調講演を聴講した。その後、Welcome Reception に参加し、世界の第一線で活躍する研究者とお互いの研究について意見交換をおこなった。

翌 26 日 (月) から 28 日 (水) のあいだは、本会議は午前 9 時から始まり、午後 7 時過ぎまで続いた。本国際会議は、基調講演 8 件 (50 分)、招待講演 14 件 (30 分)、選抜された口頭発表 19 件 (15 分) で構成されており、いずれの講演もハイレベルであり、組織委員の慧眼がうかがえる。また、396 件のポスター発表が 26 日 (月) と 28 日 (水) の 2 部に分かれておこなわれた。活気に満ち溢れた会場は身動きのとれないほどのすし詰め状態となったが、老いも若きも熱心に議論を交わした。

26 日 (月) 午後 5 時から、われわれの最新の研究成果である「パラジウムまたはニッケル触媒によるジセレニドおよび単体セレンを用いたベンズアミドの直截セレノ化反応 (Direct Selenation of Benzamides with Diselenides and Elemental Selenium Catalyzed by Palladium or Nickel)」に関して発表をおこなった。本発表において、多くの研究者から異なった視点から様々な質問を受け、今後の研究に非常に有意義であった。

40 歳以下の有機金属化学分野の若手研究者に贈られる OMCOS 賞はカタロニア化学研究所 (ICIQ) の Ruben Martin 教授が受賞した。27 日 (火) の受賞講演では、彼の代名詞ともいえる二酸化炭素を利用したカルボキシ化反応について述べられた後に、未発表の成果についても発表された。まさに OMCOS 賞にふさわしく、講演終了後は本会議一番の拍手に包まれた。

28 日 (水) の夜には、国際会議の Banquet が開催され、そこで多くの世界的に著名な研究者と進行を深めることができた。

最終日である 29 日 (木) は、Douglas Stephan 教授 (トロント大学) や Shengming Ma 教授 (上海有機合成科学研究所) による基調講演を拝聴し、Closing Ceremony にも出席した。次回は、2019 年 7 月の予定で、Stephen Hashmi 教授を組織委員長としてハイデルベルクで開催される。国際会議は昼過ぎに全プログラムが終了したが、飛行機のスケジュールのために当日の夕方に済州島からソウル市内に移動した。ソウル市内に 1 泊し、翌日の 30 日 (金) 午後 7 時前に仁川国際空港から帰途につき、同日中に岡山空港に帰着した。

本報告書の最後に、今回の実り多い韓国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29年度 海外渡航報告書

岡山県立大学 情報工学部

瀬島 吉裕

2017年7月9日(日)から14日(金)までの5日間、カナダ・バンクーバーでThe 19th International Conference on Human-Computer Interaction (HCII2017)が開催された。上述の国際会議に、申請者は公益財団法人ウエスコ学術振興財団からの助成金を得て研究成果を発表した。ここに、関係者の皆様に感謝の意を示すとともに、渡航報告を行う。なお、申請者の渡航日程は、2017年7月9日(日)に出国して、5日間バンクーバーに滞在し、7月15日(日)に帰国した。

申請者が研究成果発表を行ったのは、International Conference on Human-Computer Interaction (略称 HCII) という人間を中心としたインタフェースやそれらのインタラクションを対象とした国際会議で、この分野における国際学会では発表数が最大の学会である。開催地であるバンクーバーは、北緯49°に位置しているため、7月であっても平均気温18度と、夏場でも快適に過ごせる気候であった。また、会場である Vancouver Convention Centre (バンクーバー コンベンションセンター) は、バンクーバー中心部にあり、非常にアクセスの良い場所であった。

HCII2017では、初日から3日間、ワークショップ・チュートリアルが全22件開催され、人間中心設計手法や視線計測手法だけでなく、教育やセラピー等、様々な分野に関する議題が取り上げられていた。翌日から3日間に渡って研究発表がなされた(図1)。本年は参加者が70カ国から1800人(主催者発表)で、一般講演1,800件、ポスター発表180件であった。申請者は2日目に口頭発表を行った(図2)。発表内容は後述するが、数人に興味を持っていただき、有意義な議論を行うことができた。また、ポスター発表の会場は、件数が多いため、広い会場での展示であった。参加者の多くが来場し、活発な議論が行われていた。HCII2017では、2種類の賞(Best Paper Award: 15件(各発表領域より1件)、Best Poster Award: 1件)が設けられており、受賞研究はアイデア発想が豊かで、ユニークな研究が多い印象であった。



図1 講演会場の様子



図2 発表時の様子

申請者は、HCII2017において、「A Speech-Driven Embodied Communication System Based on an Eye Gaze Model in Interaction-Activated Communication」という題目で研究成果発表を行った。この研究は、遠隔地で人間同士が情報機械を介して行うコミュニケーションを支援することを目的として、コミュニケーションにおける場の盛り上がりと人間の視線行動に着目し、対面コミュニケーションにおける視線行動を解析した。その結果、場が落ち着くにつれて視線を大きく外すことを定性的に示した(図3)。さらに、解析結果に基づいて、場の盛り上がりに関連する視線モデルを開発し、それを適用したコミュニケーションシステムを開発した(図4)。このシステムは、CGキャラクターが発話音声のみから身体動作と視線情報を自動生成する。このシステムを用いて、コミュニケーション実験を行い、場の盛り上がりに応じた視線行動を行うことで、コミュニケーション効果が高まることを示した。この内容を口頭発表し、来場した参加者と議論した。また「人の眼球を計測することなく自然な視線を生成できるのは良い」、「実空間の知見は、仮想空間に適用しても同様の特性を得るのか」等のコメントをいただく等、有意義な議論の場となった。さらに、人の視線行動から興味特性を推定し、商品を推薦する研究等、一般発表およびポスター発表において、本研究を発展・応用させる可能性がある研究が数多く紹介され、今後の研究を展開するために重要な情報が収集できた。なお、第20回会議となる次回のHCII2018は、米国のラスベガスで7月15日から7月20日の期間に開催される予定である。(参考 URL <http://2018.hci.international>)

末筆になるが、このような貴重な機会を与え、ご支援していただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団の関係者各位に感謝したい。

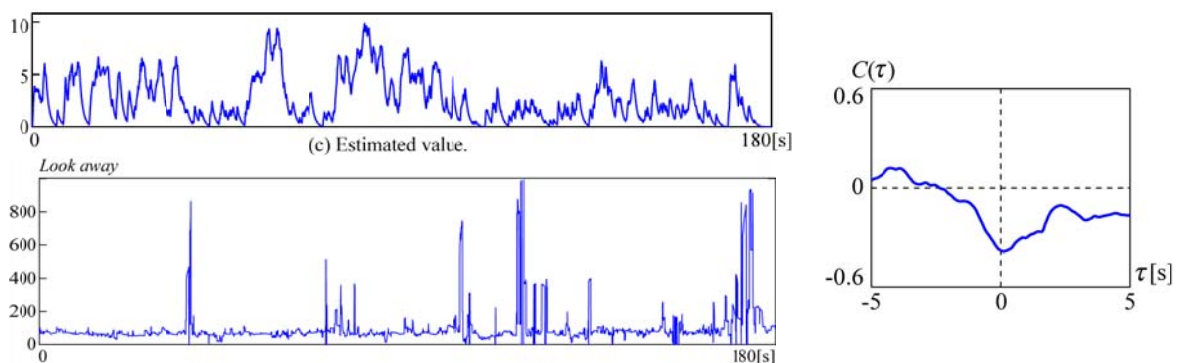


図3 場の盛り上がりと視線行動との相互相関解析の一例

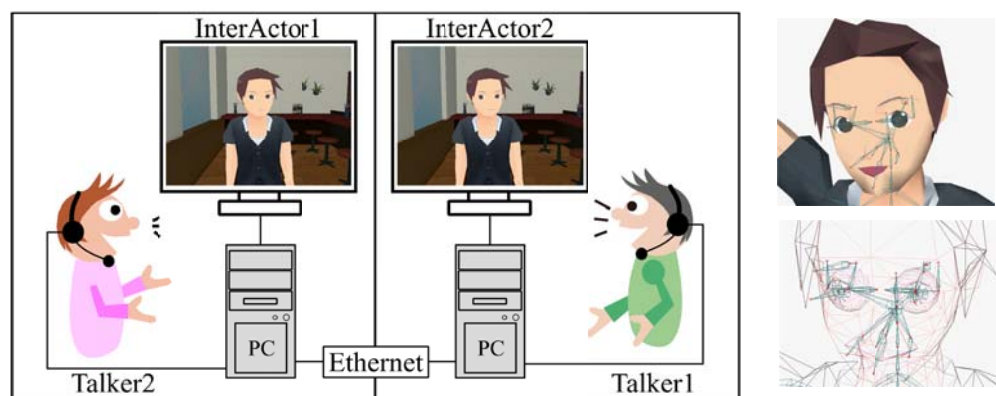


図4 解析結果を適用したコミュニケーションシステムの概要

平成 29 年度 海外渡航報告書

川崎医科大学 微生物学教室

内藤 忠相

2017 年 7 月 17 日から 21 日の日程で、シンガポールの SANDS EXPO & CONVENTION CENTER において開催された IUMS (International Union of Microbiological Societies : 国際微生物学連合) 2017 年大会の一部である 17th International Congress of Virology (ICV : 国際ウイルス学会) に参加しましたので報告いたします。17th ICV では、様々なウイルス研究の成果発表が行われ、66 題の口頭発表および約 300 題のポスター発表がプログラムされていました。また、IUMS2017 においては 17th ICV の他に、15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (国際細菌学・応用微生物学会) と 15th International Congress of Mycology and Eukaryotic Microbiology (国際真菌学・真核微生物学会) が同日の日程で共催され、微生物学に携わる様々な国と地域から参加した研究者が一堂に会する場となりました。

報告者は、インフルエンザウイルスが持つ遺伝子複製酵素 (ウイルスポリメラーゼ) を人為的に改変することで、遺伝子変異の発生頻度を半減させた新しいワクチン製造用ウイルスの開発に成功しました (参考文献、平成 27 年度ウエスコ学術振興財団学術研究助成課題)。本技術を用いれば、従来法と比較してワクチン製造中に生じるウイルス抗原変異が起きにくくなり、効率良く有効なワクチンの製造が可能になると期待できます。今回の渡航では、これら成果を 17th ICV において発表し、多くの参加者からコメントをいただきました。特に、ウイルスポリメラーゼの構造学的な視点からのコメントは、今後の研究の発展に非常に有意義であり、さらなる高性能なワクチン製造株へ改変するための技術情報を得ることができました。

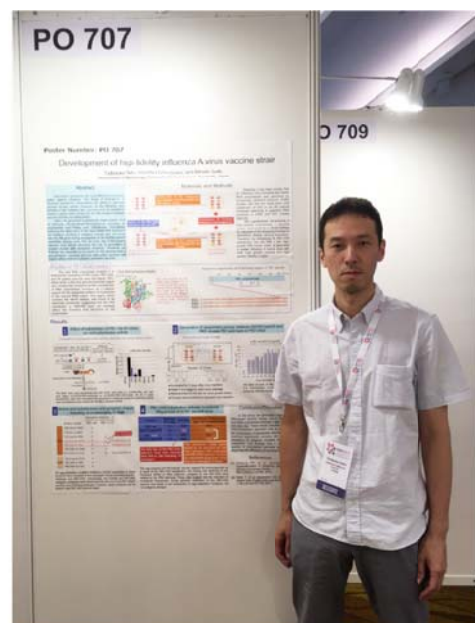
最後になりましたが、この度の渡航費助成を賜った公益財団法人ウエスコ学術振興財団に深く感謝を申し上げます。

参考文献

Naito T. *et al.*, Generation of a Genetically Stable High-Fidelity Influenza Vaccine Strain. *Journal of Virology*, Vol.91, e01073-16, 2017.



学会会場入り口の様子



掲示ポスターと報告者

平成 29 年度 海外渡航報告書

川崎医療福祉大学 医療技術学部 リハビリテーション学科
鈴木 啓太

(概要)

10月25日から10月28日にかけて、アメリカ合衆国ジョージア州アトランタにて開催された第94回 American Congress of Rehabilitation Medicine に参加した。

私は学会2日目にポスター発表にて「A pilot study of the preventive effects of repetitive peripheral magnetic stimulation on muscle atrophy」の演題を発表した。脳卒中患者の筋萎縮予防に関する演題は涉猟する限りでは、他に見当たらなかった。数名の参加者から質問を受けたが、その多くは反復末梢性磁気刺激をご存じなく、機械に関する質問が多かった。反復末梢性磁気刺激の利点や現状の限界点などを説明した。アメリカのリハビリテーション医療の現場において、脳卒中の急性期の筋萎縮予防に特別な取り組みをしているという話は聞かれなかった。

今回の学会における講演の内容としては、Traumatic Brain Injury による高次脳障害に関するものや慢性痛に関するものが多かったように思われた。その中でトピックスとなっている内容は日本と比較して大きな差はないと感じた。唯一、「テレリハビリテーション」が日本と比較して先進的であり、アメリカにおいて近年注目を集めているようであった。「テレリハビリテーション」とは、退院後の患者の運動習慣を定着させるために、テレビ電話等でセラピストが運動を指導するものである。学会全体の流れとしても、退院後にいかに運動習慣や身体機能を維持するかに焦点が向いているような印象を受けた。超高齢社会を迎え、地域包括ケアを推進している日本においても、このテレリハビリテーションは非常に有用な方法となってくることが予想された。

本学会を通して最も印象に残っていることはディスカッションの活発さである。講演の途中であっても、演者と聴衆の間で頻繁にディスカッションが展開されていた。参加者それぞれが自分の意見を持ち、それを出することが文化として根付いていることが感じられた。また、新たな視点やアイディアを得るという学会の目的を達成するためには不可欠な姿勢であると感じた。学会の本来あるべき姿を見ることができた点が今回の最も大きな収穫であった。



図1 口述発表会場の様子

視触覚クロスモーダルな質感形成の脳機能解明と質感評価システムの提案

岡山大学 大学院ヘルスシステム統合科学研究科

楊 家家

概要 21 世紀の産業界では、高品質のもの作りが求められ量から質への転換が要請されている。しかし、「品質の良さ」はヒトの主観に頼っているのが現状で、客観的指標の作成と品質計測システムの開発が喫緊の課題である。筆者は、このような要請に応えるため、品質の良さを客観的に評価法の構築を目指し、脳イメージング手法を用いてヒトの品質の良さを判断する脳内メカニズムの究明に関する研究を取り込んでいる。機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) は、現在の非侵襲的脳イメージングの中で最も発達した手法の一つであり、脳科学分野や生体計測工学分野では幅広く応用されている。アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health, NIH) の Section on Functional Imaging Methods (sFIM) では、世界最先端の脳イメージング技術の開発とヒトの脳機能解明の研究を進めている。筆者は、sFIM に滞在期間 (2016 年 11 月～2017 年 10 月) において、fMRI 研究の実施や最新技術の取得などの成果を報告する。

はじめに

ヒトはある物体を見ただけで、その素材を認知できる。また、その物体を触ることにより、物体表面の滑らかさなどの複雑な状態を正確に判断できる。このようにヒトは事物が生み出す質感情報から、物を選んだり身体運動を制御して、生活の豊かさを実感している。1990 年代からコンピュータグラフィックス (CG) 技術が高度に発達し、世界がリアルな映像で表現できるようになった。また、材料工学分野の発展と高度な加工技術の進歩によりさまざまな物体の形状などの再現が可能になった。しかし、工学分野において、加工された製品のどのような情報が質感の良さ (高品質) に関与するのかは未だ不明で、客観的な質感評価は困難な課題である。

ヒトの視覚と触覚はそれぞれが独立に機能し、それぞれが特有の感覚情報を与えてくれるが、感覚種をまたがるクロスモーダルな性質も持っている。質感を生み出す情報は、物体表面の滑らかさ、物体の反射特性や照明環境などが相互作用して作る複雑なものであり、人間はその視覚と触覚情報を読み解くことができるものの、それがどのような脳内情報処理によって実現されているかはまだ解明されていない。このように、クロスモーダルな質感認知メカニズムに関して、脳科学分野の研究でも始まったばかりである。

りである。

機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) は、1990 年代初頭開発された手法であり、ヒトおよび動物の脳神経活動に関連した血流動態反応を視覚化する方法である。これまでヒトの脳機能解明に欠かせない役割を果たしている。筆者は、工学博士学位を取得しており、これまで高磁場環境対応の実験装置開発に成功させ、ヒトの視触覚クロスモーダルな質感認知の脳内処理メカニズムに関する研究を進めてきた。しかし、MRI の高磁場環境における撮像ノイズ対策、実験に適した撮像パラメータや解析方法などは研究テーマに応じてカスタマイズする必要性があり、最適な条件の選択は課題としてあげられる。

滞在先 (National Institutes of Health, NIH) の研究指導者 Peter Bandettini 博士は、fMRI の撮像技術と脳イメージング解析手法の開発分野の先駆者であり、脳イメージングの分野で最も権威のある学術論文誌 NeuroImage の編集長も務めている。筆者が、1 年間に渡り、Bandettini 博士の Section on Functional Imaging Methods (sFIM) で研究を進め、最新の脳イメージング技術と解析手法を修得することができた。そのノウハウを所属機関の研究教育へ応用でき、科学技術の発展だけでなく、人材育成にも貢献できる。

滞在先研究セクションの構成

アメリカ国立衛生研究所 (NIH) は、20 の研究所と 7 つのセンターで構成されている世界最大の衛生研究組織である。筆者は滞在している Section on Functional Imaging Methods (sFIM) は、アメリカ国立精神衛生研究所に属している。図 1 に示すよう、Bandettini 博士を中心として 12 名のコアメンバと毎年約 10 名前後のポスドクや交流研究者などで構成されており、脳イメージング撮像・解析手法の開発に関する研究を進められている。

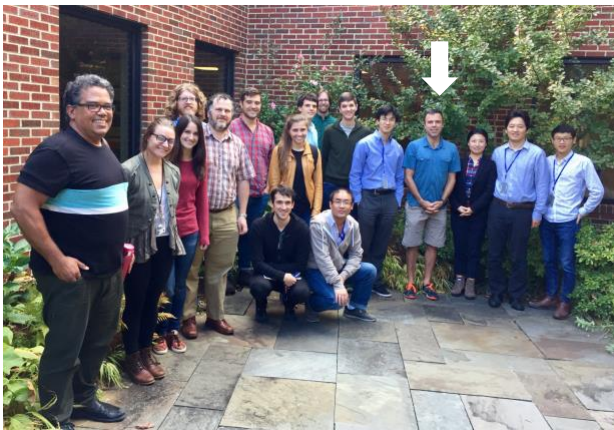


図 1 sFIM メンバ構成 (白矢印は Bandettini 博士, 左手側に于英花 (JSPS-RPD 研究員), 筆者)

国際協同研究の企画・実施

筆者は、2016 年 1 月から NIH の研究指導者 Bandettini 博士とウェブミーティングを通じて、協同研究の課題の企画・検討を始めている。2016 年 5 月に研究実施計画案を完成し、筆者所属機関 (岡山大学) で fMRI 予備実験を実施した。2016 年 11 月から 2017 年 10 月までの 1 年間に於いて、Bandettini 博士の指導を受け、Dr. Peter Molfese (研究員) と Dr. Laurentius Huber (研究員) の協力を得て協同研究を実施し、以下の 4 つの目標を達成した。ここで 2) から 4) の内容を要約して、報告する。

- 1) 最適 fMRI 撮像パラメータの設定方法の習得
- 2) 3T-fMRI 実験の実施
- 3) 超高磁場 7T-fMRI 実験の実施
- 4) 脳領域間解剖学的・機能的結合解析, 脳情報デコーディング解析方法の習得

3T-fMRI 実験の実施

今回、筆者は Dr. Peter Molfese (sFIM), Ms. Natasha Topolski (NIH) と JSPS-RPD 研究員の于英花氏 (岡大) の協力を得て、国際協同研究のテーマである「ヒトの品質の良さの判断脳内メカニズムに関する研究」の第一ステップの素材質感形成に注目し、fMRI 実験を設計・実施した。図 2 の写真は、GE 社製 3T-MRI を用いた fMRI 実施する際の様子を示す。素材質感はもともと触覚によって形成され、その後で視覚が形成され記憶されると考えられる。したがって、素材質感の形成過程を理解するには、触覚がどのように対象の質感を処理・形成し、それを視覚と結びつけるかを明らかにすることが不可欠である。筆者らは、この実験結果に基づいて、視触覚クロスモーダルな素材質感形成の脳内処理モデルを検討でき、その成果を脳機能イメージング分野の学術論文誌への投稿を進めている。

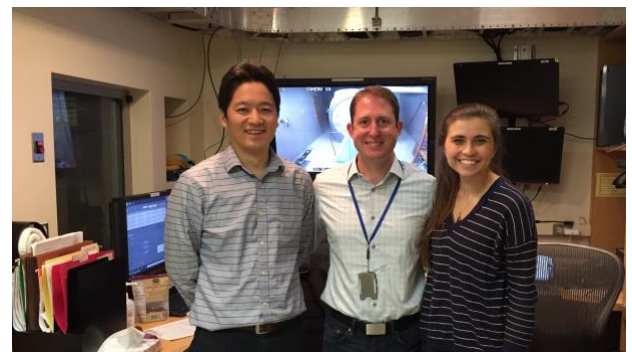


図 2 fMRI 実施する際の様子 (左側から筆者, Molfese 研究員, Topolski ポスバック研究員)

超高磁場 7T-fMRI 実験の実施

前述のように、fMRI は、現在の非侵襲的脳イメージングの中で最も発達した手法の一つであり、脳科学と生体計測工学を含む多分野へ広く応用されている。7T-MRI の誕生により、従来は困難であったミクロン単位での脳微細構造や神経線維の複雑な走行を 3 次元再構築することが可能になるなど、ヒト脳高次機能の解明に大きな希望を与えた。しかし、日本国内で 5 台、世界で 69 台程度しか稼働していないのが現状 (2017 年 12 月現在の調査により) であり、7T-MRI 画像の信号対雑音比 (SNR) の向上、研究

目的に応じた撮像シーケンスの開発やデータ解析手法の選択といった様々な課題に直面している。筆者の滞在先のセクションは、世界の脳イメージング分野の研究をリードしており、7T-MRI の計測法からデータ解析法に至るまで最先端の技術とノウハウを持っている。特に、sFIM に所属している Huber 研究員は、7T-MRI を用いた高解像度（サブミリ）の Vascular Space Occupancy の撮像技術を確立した人物である。筆者は、Huber 研究員と JSPS-RPD 于研究員の協力を得て、高解像度のそれぞれの指先に対応する体性感覚皮質の脳内マッピングにチャレンジし、顕著な成果が得られている。図3の写真は、筆者がテスト被験者となり、指先を刺激する装置をテストしている様子である。（操作者は Huber 研究員）



図3 指先を刺激する装置をテストしている様子

図4に示すように、従来の3T-MRIで観察できなかった個々の指に対応する脳表マップの撮像に成功している。

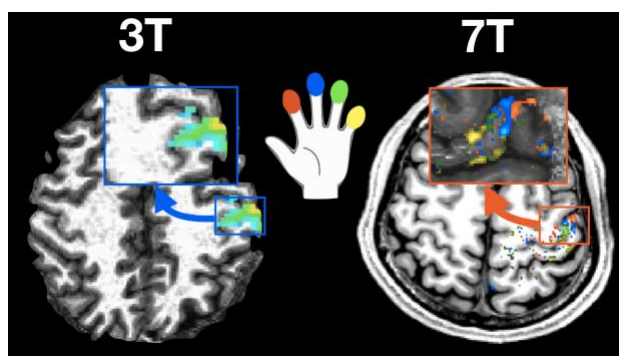


図4 3T と 7T の体性感覚皮質の脳内マッピング結果

脳領域間解剖学的・機能的結合解析、脳情報デコーディング解析方法の習得

ヒトの脳は、千数百億個の神経細胞からなるネットワークにより構成されており、脳を理解するために神経活動がネットワーク上どのように伝達されるのかを明らかにすることが必要不可欠である。近年、脳領域間の解剖学的結合や脳機能ネットワーク解析の進歩によりマクロスケール脳機能ネットワーク（脳領域間）は解明されつつある。さらに、機械学習技術を基礎とした脳情報デコーディング（Decoding）解析の応用も広がっている。この解析は、外界情報の脳活動パターンを解読する手法であり、2000年代後半から3T-MRI装置を用いた研究へ普及されている。図5に示すように、筆者は、前述の協同研究を通じて、高精度のヒト脳領域間の解剖学的結合と脳機能ネットワーク解析法及び最適撮像法も習得している。

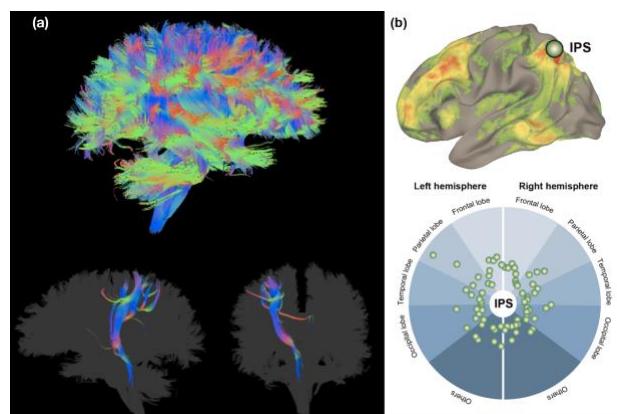


図5 脳領域間の（a）解剖学的結合と（b）脳機能ネットワーク解析の一例

その他の学術交流

筆者は、米国滞在期間中において、Bandettini 博士の共同研究先であるハーバード大学の脳科学研究所とマサチューセッツ工科大学の McGovern 脳研究所を訪問し、fMRI を用いた脳イメージング技術の最前線を調査した。また、NIH と同じ市内にあるジョンズ・ホプキンス大学の体性感覚研究室とジョンズ・ホプキンス大学病院の放射線科を訪問し、霊長類（サル）の触覚研究及びイメージング研究の現状と課題を調査した。

結言と今後の展開

図6に示すように、筆者らの独自調査により、2017年現在、7T-MRI装置は世界中に69台が稼働している。また、その追い風として、2017年10月に7T-MRIの臨床応用は正式に認可されたため、2030年ごろに普及されるだろうと期待できる。一方、磁場強度が高い装置を開発されることにより、撮像解像度の向上、科学問題の解決に繋がると共に、人体に対する安全性、研究倫理や高磁場によるノイズ増加なども課題にも直面しているため、筆者らもこれらの問題解決に積極的に取り組む必要性を感じている。

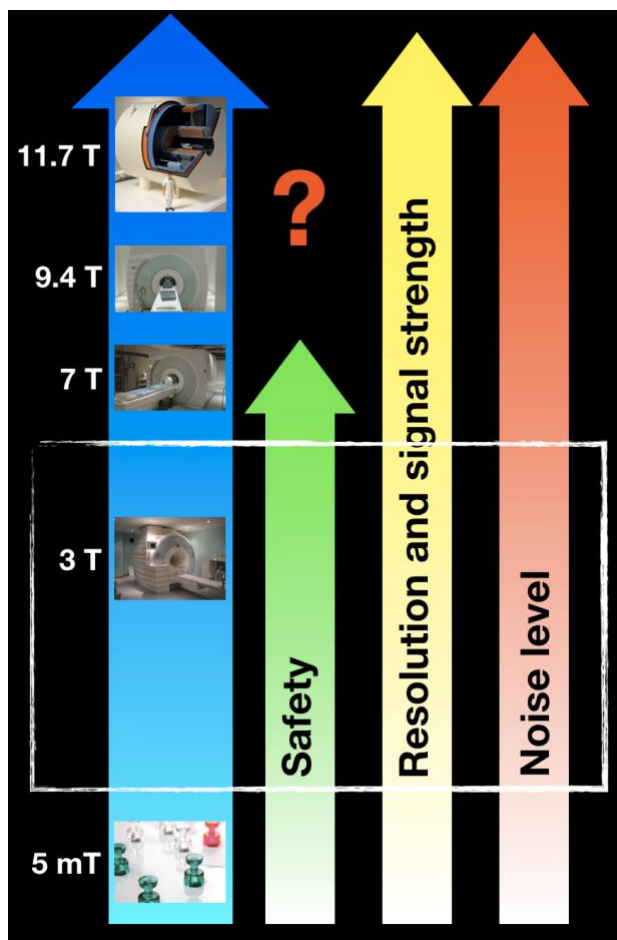


図6 超高磁場 7T-fMRI の現状と今後の課題

近年、日本を含む多くの国々で人口の高齢化が進むことにつれて、認知症患者の増加は社会問題となっている。現在、日本の認知症患者数は10年前に推定した180万人より大きく上回り300万人にもいると言われている。さらに、2025年に、日本では470万人、世界では8000万人以上になると予想される。しかし、認知症の診断は非常に難しく、頭部CT画像には異常が現れないため発見が困難であり、「見えない障害」と言われている。一方、認知症患者は顕著な早期段階の症状として、空間認知・短期記憶・判断などの高次機能が低下することが知られている。筆者らは、認知実験とfMRI脳画像などの認知脳科学の基礎研究を積み重ねて、認知症早期診断に関する研究も積極的に取り込んでいる。今後、今回の研修で得られた知識と経験を生かして、基礎研究のみならず、社会還元にも努力していきたいと考えている。

ラマン分光技術の習得と 共溶媒が誘起するタンパク質の構造変化における疎水効果の理解

岡山大学異分野基礎科学研究所

望月建爾

私はこれまでコンピュータシミュレーションや理論化学的手法を用いて、水や氷の相転移に関する物理化学的研究を行ってきた。今回、長期間海外派遣滞在費助成事業からの支援を受け、アメリカのパデュー大学に 1 年間（2016 年 1 月から 2017 年 1 月）滞在し、ラマン分光法を主体とした水和水の構造を調べる実験的手法を習得し、実験と理論の両方を使った多角的な研究手法を発展させた。実験手法の習得と同時に、共同研究「単純分子における共貧溶媒効果」を遂行し、国際的に評価が高い化学系雑誌 *J. Am. Chem. Soc.* に研究成果を発表した。

【背景】

刺激応答性分子 Poly(N-isopropylacrylamide), PNIPAM, は常温常圧で水によく溶け、外部からの様々な刺激で Coil-Globule 転移を起こす事が知られている。PNIPAM 水溶液の最も興味深い現象の一つは、PNIPAM が水、メタノールのそれぞれの純溶媒には可溶だが、ある濃度の混合溶媒には溶けない性質である(図 1)。

このような振る舞いは一般的に共貧溶媒効果, co-non-solvency, と呼ばれる。純溶媒中に比べ、混合溶媒中で PNIPAM の実効的な分子間力が強くなり、目に見えるサイズまで凝集が進む。これまでの研究では、PNIPAM が溶けなくなる濃度範囲で水-メタノールが特殊なクラスターを作る、メタノールが PNIPAM に選択的に溶媒和する、など様々な解釈が提案されてきた。

本研究では、共貧溶媒効果の根本的な原因の究明のためには、共貧溶媒効果を引き起こす最低限の要素を特定する事が重要だと考えた。高分子以外の単純な分子 (TBA) を対象とし、実験と計算を組み合わせ、共貧溶媒効果の有無を明らかにし、さらにその原因を TBA 周りの溶媒の分布から説明した。



図 1. メタノール水溶液に溶けた PNIPAM が示す共貧溶媒効果。メタノールモル分率 0.2-0.4 で PNIPAM 溶液が白濁している。

【実験方法】

TBA ($C_4H_{10}O$) は、高分子とは違い非常に単純な構造をしている。いかなる濃度のメタノール水溶液でも無限に溶け、白濁や相分離が起こらないため、目で見て凝集を調べることはできない。本研究は、ラマン分光法と多変量スペクトル分解法を組み合わせ、溶液のスペクトルから溶媒のスペクトルを引いた差スペクトルを評価した。TBA の CH とメタノールの CH のスペクトルが重なる事を防ぐために、重水素化したメタノールを用いた。

【実験結果】

メタノール濃度と TBA 濃度を変化させながら、TBA 濃度で規格化した差スペクトルを調べた。差スペクトルの面積は、TBA に水和する分子数に比例する。

TBA が凝集すると、TBA 分子あたりの水和分子数が減少し、差スペクトルの面積の減少として見える。

純水中で TBA 濃度を増加させると差スペクトルが少し減少する (図 2A)。つまり、TBA がわずかに凝集することがわかる。一方、メタノールを少しだけ加えた溶媒を用いると、TBA の濃度増加と共に、差スペクトルが大きく減少していることが分かる (図 2B, C)。つまり、メタノールの混合により、TBA の分子間の実行的な引力が増加する。同様の解析を、水からメタノールまでの全濃度に対して行った。TBA の凝集はメタノールモル分率 0.4-0.6 付近で最も強まり、さらにメタノール濃度が増加すると弱まることがわかった。つまり、単純な分子である TBA でも、ポリマーと同様に、メタノールと水の混合溶液中で分子間引力が強まる事を明らかにした。

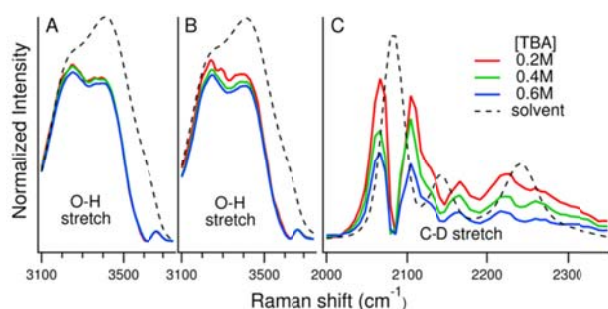


図 2. 純溶媒のスペクトル(破線)と(A, B)OH と(C)CD 領域の差スペクトル(実線)。それぞれの溶媒は (A) 水、(B, C) モル分率 0.02 (=1.0M) のメタノール水溶液。TBA 濃度は 0.2 から 0.6M まで変化。

【計算方法】

計算ソフト GROMACS 5.1.2. を用いて分子動力学計算を実行した。圧力(1atm)、温度(298K)は、それぞれ Parrinello-Rahman 法と Nose-Hoover 法を用いて制御した。水分子は TIP4P/2005、TBA は TraPPE-UA で再現した。過剰化学ポテンシャルは、ソフトコアポテンシャルを用いて、Bennett Acceptance Ratio 法で計算した。溶質間の平均力ポテンシャルは、アンブレラサンプリングと weighted histogram analysis 法を用いて、重心間距離に対して求めた。

【計算結果】

まず、TBA-TBA の平均力ポテンシャルがメタノール水溶液中で強まっている事を確かめた。そして、Wyman-Tanford 理論を用いて、平均力ポテンシャルの変化と溶媒和分布との関係を明らかにした。独立して存在する TBA と二量化した TBA のそれぞれの周りの溶媒分布から、preferential binding coefficient (Γ) を求めた。Wyman-Tanford 理論では、二つの Γ の差を、二つの溶質構造の間の平衡定数のメタノール濃度に対する変化と結びつける。メタノール濃度が低い時は、TBA2 量体の Γ が孤立した TBA の Γ より大きく、メタノール濃度が高い時はその逆になる事を明らかにした (図 3)。つまり、メタノール濃度により、メタノールが選択的に溶媒和する TBA 構造が変化する事を示した。さらに、メタノール水溶液中の TBA 2 量体の構造解析から、TBA の疎水基同士が向き合うように凝集する事が分かった。これは、メタンの凝集に関する解析[K. Mochizuki and K. Koga, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, 16188-16195 (2016)]と合わせて、共貧溶媒性効果における疎水性相互作用 (疎水基) の重要性を示唆する。

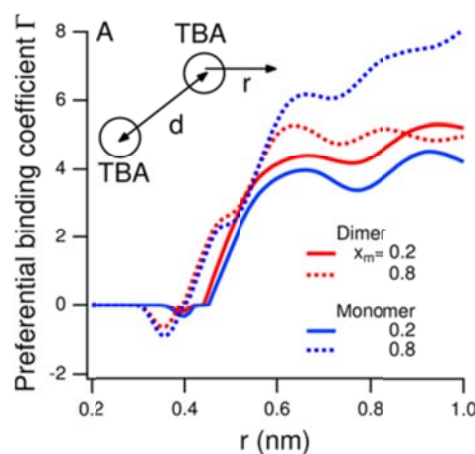


図 3. メタノールモル分率 $x_m=0.2$ (実線) と 0.8 (点線) における、孤立した TBA (青) と TBA 2 量体 (赤) の Γ の値。 $\Gamma = \langle n_m - n_w \rangle (N_m - N_w) / (N_w - N_m) >$; n は TBA から距離 r 内にある分子数、 N は系全体の分子数、 m, w はそれぞれメタノールと水を表す。 $x_m=0.2$ では、赤線が青線より高く、 $x_m=0.8$ では逆になっている事が分かる。

【まとめ】

本研究成果は、一見複雑に見える共貧溶媒効果の本質は、高分子の複雑な構造にあるのではなく、極端に小さな分子でも観察でき、メタノール濃度により変化する疎水基の引力相互作用にある事を見つけました。外部刺激により構造変化する高分子は、体内での薬物輸送、ナノスケールの流れの制御など、医学から材料化学までさまざまな分野に応用・発展できます。本研究による共貧溶媒効果の基礎的な理解が進んだことで、そのような分野における分子設計などに貢献することが期待されます。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ウエスコ学術振興財団長期間海外派遣滞在費助成事業から支援を賜りましたことを深く感謝いたします。

【研究成果】

[1] K. Mochizuki, S. R. Pattenaude, D. Ben-Amotz, Influence of Cononsolvency on the Aggregation of Tertiary Butyl Alcohol in Methanol-Water Mixtures, *J. Am. Chem. Soc.*, 138, 9045-9048 (2016)

上記論文に対して、ITIJC (Indy Tomorrow Indiana Japan Chamber) Outstanding Research Paper Award 2016 を受賞

[2] K. Mochizuki, D. Ben-Amotz, Hydration Shell Transformation of Thermosensitive Aqueous Polymers, *J. Phys. Chem. Lett.*, 8, 1360-1364 (2017)

[3] S. R. Pattenaude, B. M. Rankin, K. Mochizuki, D. Ben-Amotz, Water-Mediated Aggregation of 2-Butoxyethanol, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, 24937-24943 (2016)

炎症性腸疾患由来発癌における免疫担当細胞の役割

(所 属) 岡山大学大学院 自然科学研究科

(氏 名) 増田 潤子

がん移植マウスはがん局所だけでなく全身の免疫能も変化する。しかしこれまでに得られているがん研究のほとんどは、大腸癌細胞をマウスに移植した人工的なモデルにすぎないため、前癌状態で早期診断および治療を求められる臨床において有意義な知見を得ることはできない。本研究では、炎症性腸疾患由来発癌モデルマウスに抗酸化物質を摂食させた時の大腸の肉眼的所見および免疫担当細胞の変化を解析した。大腸がん誘発剤アゾキシメタン(AOM)およびデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)飲水によって誘発させた BALB/c 系統野生型マウスの大腸の発癌数は、抗酸化物質摂取群で有意に減少した。また、脾細胞の抗腫瘍免疫は抗酸化物質摂取群で有意に高かった。これらの結果は、抗酸化物質の摂取によって大腸癌を抑制できる可能性を示唆した。

緒 言

がんの周辺には、腫瘍関連線維芽細胞、間葉系間質細胞やMDSC、さらにリンパ球が浸潤し、その微小環境によって結果として産生されたサイトカインが全身の免疫状態にも影響を及ぼす。Th2 優位な遺伝的特徴を持つ BALB/c 系統マウス由来の大腸がん細胞 (Colon 26/CT26) 株を同系統マウスの腰部皮下腹腔外、または尾静脈血管中に移植し、遺伝的系統や飼育環境など背景も統一された環境で、原発巣、血行性肺転移の各実験的モデルマウスを作成し、両モデルマウスの骨髄由来抑制性細胞 (MDSC)、Th1 サイトカインおよび Th2 サイトカインの動態を明らかにすることで全身免疫能を検討したところ、原発巣モデルマウスは MDSC の増加に伴いすべての免疫細胞の機能が抑制されているのに対し、血行性肺転移モデルマウスは MDSC の増加を誘導せず、一部の免疫細胞の活性化していた。これは、原発巣と肺転移は全身の免疫へ異なる影響を及ぼすことが示唆された。

活性酸素(ROS)は本来の酸素分子に電子が 1 つ還元して発生し、強い酸化力を示す。その電子はほかの化合物から奪取するため酸化能を持つ物質は連鎖的に産生される。生体には多数の細胞内に発生した活性酸素を分解する酵素や物質が存在し活性酸素を消去するため活性酸素の発生そのものは身体に悪影響を示さない。しかし、激しい運動やストレス、紫外線などにより過剰に増加した活性酸素は脂質や

タンパク質、核酸を酸化し、発がんを誘導する。そこで近年、活性酸素の発生を抑制することでがんを抑制するような機能性食品の開発が進んでいる。ところが抗酸化物質摂食が免疫細胞にどのように働きかけるのか、生体を用いたメカニズムは未だ詳細に明らかになっていない。また、これまでに得られたがん研究の成果はがん細胞株を移植したがんモデルマウスを用いた実験のため、発がん抑制に関与する抗酸化物質の影響を知ることはできない。

そこで本研究では潰瘍性大腸炎に起因する炎症性発癌(炎症性腸疾患由来)モデルマウスを用い、本研究では、炎症性腸疾患由来発癌モデルマウスに抗酸化物質を摂食させた時の大腸の肉眼的所見および免疫担当細胞の変化を解析した。

材料と方法

1. マウス

5 週齢 BALB/c 系統雌マウスを、チャールズリバー社より購入し、岡山大学動物資源部門津島北施設で飼育した。

2. 細胞培養

マウス脾細胞を、10%ウシ胎児血清および 50 μ M 2-メルカプトエタノール (ナカライテスク社) 含有 RPMI-1640 培地で培養した。ウォータージャケットインキュベーター (APC-30D; アステック社) を用

い、摂氏 37 度、5% CO₂、湿度 100%条件下で細胞を培養した。

3. 抗体および測定セット

抗マウス CD3 ϵ (145-2C11)、CD8 (53-6.7) および CD11b (M1/70) 抗体を BD バイオサイエンス社より購入した。抗マウス CD25 (PC61.5)、CD16/CD32 (93)、および Gr-1 (RB6-8C5) 抗体を e バイオサイエンス社より購入した。抗マウス CD4 (RM4-5)、CD11c (N418) および Foxp3 (3G3) 抗体を、トンボバイオサイエンス社より購入した。IFN- γ 、IL-4 および IL-10 測定セットを BD バイオサイエンス社より購入した。

4. 実験動物の摂食

5 週齢から実験終了まで、国立研究開発法人水産研究・教育機構およびニュートリション・アクト社より供給された抗酸化物質含有餌と非含有餌(対照群; AIN-93M, オリエンタル酵母工業社)を自然摂食させた。1 匹あたり約 12 グラム (g) を供餌し、2-3 日おきに零下 20 度に保存した新鮮餌と交換した。

5. 担がん原発巣モデル動物の作製

1 週間馴化後 (6 週齢) にマウス 1 匹当たり 200 μ L の PBS に懸濁した CT26 株または CT26-luc 株を皮下に移植した。期間中、2-3 日おきに体重の測定を行った。

6. 炎症性発がんモデル動物の作製

5 週齢の野生型 BALB/c 系統の雌マウスにアゾキシメタン (AOM; シグマアルドリッチ社) を 10 mg/kg 腹腔投与し 1 週間後 (6 週齢)、2% (w/v) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS; MP バイオメディカル社) 水溶液を 5 日間飲用させた後、2 週間通常の水道を飲用させた。計 3 サイクル行うことで発癌させた。期間中、2 または 3 日おきに体重の測定を行い腸の炎症を推察した。

7. 全身免疫能の評価

マウスを安楽死させ、無菌的に脾臓を摘出した。脾臓から脾単核球 (脾細胞) を単離した。脾細胞中の骨髓由来抑制細胞 (MDSCs)、ヘルパー (CD4 陽性) T 細胞 (Th)、細胞傷害性 (CD8 陽性) T 細胞 (CTL)、CD4 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞 (Tregs) の各サブセットを、蛍光染色細胞解析装置 (AccuriC6, BD バイオサイエンス社) と FlowJo ソフトウェア (ツリースター社) を用いたフローサイトメーター法 (FCM 法) により測定した。

また、5 μ g/ml で抗 CD3 ϵ 抗体が固相化された 96 穴プレート上で、脾細胞 (穴当たり 40 万細胞) を 48 時間培養し、培養上清中に放出された IFN- γ 、IL-4 および IL-10 の濃度を、酵素結合免疫吸着法 (ELISA 法) にてセットの説明書に従って測定した。

8. 統計解析

生存曲線はカプランマイヤー法を用い、ログランク検定で解析を行った。また 2 群間の統計解析はスチューデントの t 検定で解析を行った。グラフ値は平均値 \pm 標準偏差で示した。これらの解析はグラフパッドプリズム (バージョン 6; グラフパッドソフトウェア社) を用いた。P 値が 0.05 以下の時に有意差があると判断した。

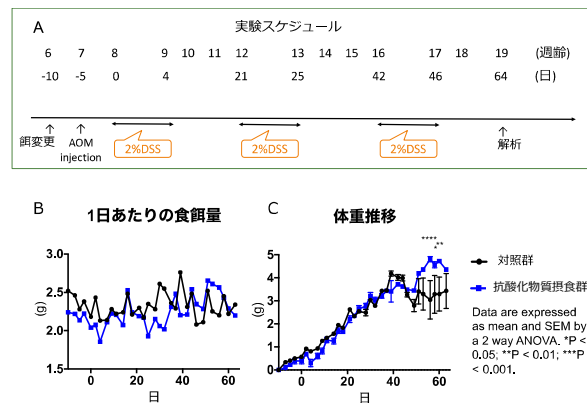
結 果

1. 発がんモデルマウス

潰瘍性大腸炎由来発がんは、潰瘍性大腸炎患者が活動期 (腸炎) と寛解期を繰り返すことで上皮細胞の任意の遺伝子に変異が生じることで生じる。そこで、発がん物質である AOM と腸炎誘発剤である DSS を用いて潰瘍性大腸炎由来発がんマウスを作製した (図 1A)。

2. 発がんモデルマウスでの 1 日あたりの食餌量

搬入直後の5週齢から、実験終了の19週齢まで2-3日おきに設置餌の残量を測定することにより、各群のマウス1匹1日あたりの摂食量を経時的に算出した。各群とも1匹、1日あたり、1.85-2.76gの間で推移した(図1B)。各群での顕著な摂食量の差は認められず、餌の違いによる摂食障害は生じなかつ



た。
図1 大腸の発がんモデルで抗酸化物質摂食群は有意に体重を維持する(A) SeH 摂食群と対照群に発がん物質(アゾキシメタン)投与およびデキストラン硫酸ナトリウム水溶液自然飲水させ、潰瘍性大腸炎由来発がんを誘発した。(B)1日あたり1匹の食餌量および(C)餌変更時の体重を0とした時の体重推移。対照群のN数=10, SeH 摂食群のN数=10。

3. 発がんモデルマウスでのマウス体重

搬入直後の5週齢から、実験終了の19週齢まで2-3日おきにマウス体重を測定した。各群での顕著な体重差は見られず、餌の違いによる摂食障害は生じていなかった(図1C)。両群とも1度目および2回目のDSS誘発腸炎では微弱な体重減少が認められたもののすぐに回復した。ところが3回目のDSS誘発腸炎以降、対照群の体重は抗酸化物質含有餌摂食群よりも有意に減少が認められた。これは、対照群における腸炎の悪化と発がんを示唆した(図1C)。

4. 発がんモデルマウスの腸内発がん数

1度目のDSS誘発腸炎から64日後にマウスを解体した。腸炎に伴い直腸から結腸までの長さは健常時より縮小するが、抗酸化物質含有餌摂食群と対照群に結腸から直腸までの長さに違いは認められなかった(図2A)。しかし、大腸内の発がん数は抗酸化物質含有餌摂食群において有意に低下した(図2B)。また、対照群の1匹あたりの発がん数は、4割が8個

以上であったのに対し、抗酸化物質含有餌摂食群において8個以上の発がんしたマウスは存在せず(図2B)、肉眼的所見でも抗酸化物質摂食群の発がん数の減少は明らかであった(図2C)。これらの結果は、抗酸化物質含有餌摂食に大腸がんを抑制する効果がある可能性を強く示唆した。

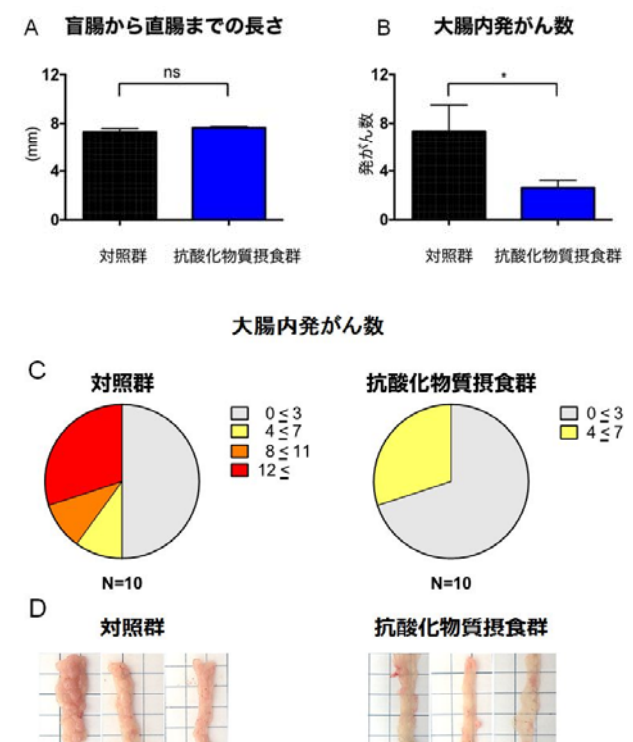


図2 抗酸化物質摂食群と対照群を発がん物質(アゾキシメタン)投与およびデキストラン硫酸ナトリウム水溶液自然飲水させ、潰瘍性大腸炎由来発がんを誘発した後、(A)盲腸から直腸までの長さ、(B, C)大腸内発がん数を測定した。(D)直腸部位の肉眼的所見。対照群のN数=10, 抗酸化物質摂食群のN数=10。

5. 発がんモデルマウスのMDSCs数の検討

MDSCs はがん患者の腫瘍内および末梢血中に増加し、抗腫瘍免疫を減弱させる。そこで、このモデルマウスにおける脾細胞中のMDSCs数を調べたところ、対照群のみで増加が認められた(図3)。この結果は、抗酸化物質含有餌摂食にMDSCs数の増加が抑制する効果および抗腫瘍免疫能を維持する効果がある可能性を強く示唆した。

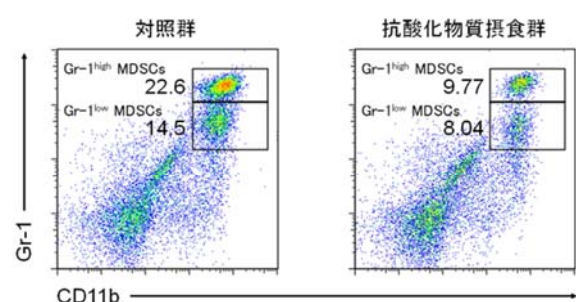


図 3 抗酸化物質摂食群と対照群を発がん物質（アゾキシメタン）投与およびデキストラン硫酸ナトリウム水溶液自然飲水させ、潰瘍性大腸炎由来発がんを誘発した後、脾細胞中の MDSCs を抗 Gr-1 抗体および抗 CD11b 抗体を用いフローサイトメトリーで検出した。プロット中の数字はゲート内細胞の%を示す。図は、それぞれ代表的な解析を示す。

6. 発がんモデルマウスの T 細胞数の検討

脾細胞中のヘルパー（CD4 陽性）T 細胞および細胞傷害性（CD8 陽性）T 細胞数に両群の差は認められなかった（図 4）。しかし、脾細胞中の制御性 T (Treg) 細胞は対照群のみで低下が認められた（図 5）。これらの結果は、抗酸化物質摂食が腸内環境を維持することで発がんを抑制している可能性を示唆した。

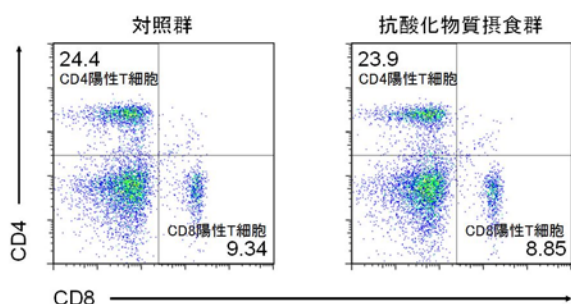


図 4 抗酸化物質摂食群と対照群を発がん物質（アゾキシメタン）投与およびデキストラン硫酸ナトリウム水溶液自然飲水させ、潰瘍性大腸炎由来発がんを誘発した後、脾細胞中の制御性 T 細胞を抗 CD4 抗体 および 抗 CD8 抗体を用いフローサイトメトリーで検出した。プロット中の数字はゲート内細胞の%を示す。図は、それぞれ代表的な解析を示す。

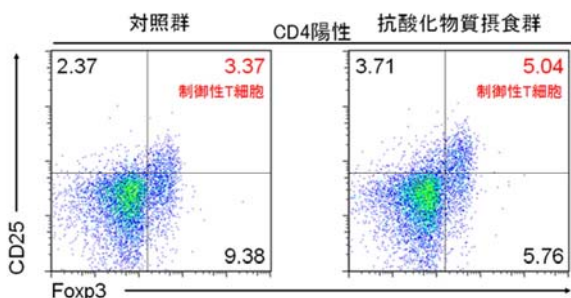


図 5 抗酸化物質摂食群と対照群を発がん物質（アゾキシメタン）投与およびデキストラン硫酸ナトリウム水溶液自然飲水させ、潰瘍性大腸炎由来発がんを誘発した後、脾細胞中の制御性 T 細胞を抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体 および 抗 Foxp3 抗体を用いフローサイトメトリーで検出した。プロット中の数字はゲート内細胞の%を示す。図は、それぞれ代表的な解析を示す。

7. 発がんモデルマウスのサイトカイン分泌量の検討

抗酸化物質含有餌摂食群の IFN- γ 産生量は、対照群

に比べて有意に増加した（図 6A）。一方、抗酸化物質含有餌摂食群の IL-4 産生量は、対照群に比べて有意に低下した（図 6B）。さらに抗酸化物質含有餌摂食群の IL-10 産生量は、両群において有意な差は認められなかった（図 6C）。これらの結果は、抗酸化物質摂食が抗腫瘍免疫は増強させることで発がんを抑制している可能性を示唆した。

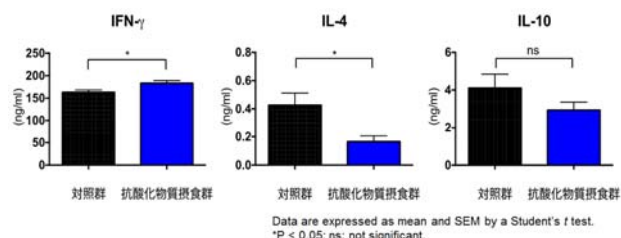


図 10 3つの代表的なサイトカインの分泌量。抗酸化物質摂食群と対照群を発がん物質（アゾキシメタン）投与およびデキストラン硫酸ナトリウム水溶液自然飲水させ、潰瘍性大腸炎由来発がんを誘発した後、脾細胞を抽出し、抗 CD3 ϵ 抗体を固相化した 96 ウェルプレートに播種し、得られた培養上清中に存在する各種サイトカイン量を測定した。対照群の N 数=3、抗酸化物質摂食群の N 数=4。

考 察

潰瘍性大腸炎由来発がんモデルを用いた実験で、大腸の発がん数は抗酸化物質含有餌摂食群で有意に減少した。この時、がん患者の抗腫瘍免疫を減弱させる MDSCs 数は抗酸化物質含有餌摂食群で増加せず、抗腫瘍性で Th1 型免疫能を担うサイトカインである IFN- γ の産生量は抗酸化物質含有餌摂食群で有意に増加した。さらに、体液性で Th2 型免疫能を担うサイトカインである IL-4 の産生量は抗酸化物質含有餌摂食群で有意に減少した。これらの結果は、抗酸化物質含有餌摂食で抗腫瘍免疫が増強し、発がんが抑制する可能性を示唆した。

細胞内で生じる ROS 発生の主要因は、ミトコンドリア内で行われる酸化的リン酸化によるものである。また、細胞外による ROS 発生の要因は、紫外線、ガンマ照射、化学物質である。これらに起因する ROS 発生が、DNA 損傷などの障害を生み発がんが生じる。そのため正常細胞には ROS による障害を回避するためにスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) およびカタラーゼなどの抗酸化酵素、あるいはビタミン E やビタミン C などの抗酸化物質によって ROS を消去

している(1)。一方、がん細胞の ROS 活性は適度に亢進しており、がん細胞自身の細胞周期の亢進、細胞増殖能の獲得、がん遺伝子の活性化および上皮間葉転換 (EMT) の亢進を担う (2, 3)。このため、がん細胞に直接抗酸化物質が供給できれば ROS 活性によるこれらの亢進は抑制できる可能性がある。本研究では、抗酸化物質含有餌摂食による腫瘍増大の抑制効果が示唆された。これはがん細胞内の ROS 活性が抗酸化物質により直接抑制されたことを示唆しているのかもしれない。しかし、がん細胞はワールブルク効果によりほとんど解糖系と酸化的リン酸化による代謝を行わないにも関わらず、ROS 発生を適度に亢進させる機序は詳しく解っていない。生体内で抗酸化物質が腫瘍内に直接届き、癌細胞の ROS 活性を抑制しているかを証明することは、困難であるが、抗酸化物質含有餌摂食群と対照群から得た腫瘍の酸化ストレス状態の差を検出することで有用な知見を得られるかもしれない。

ROS は生体に障害を惹起する分子であるだけでなく、一種のシグナル伝達分子としての機能が明らかになりつつある。とりわけ大腸は、酸素分子から ROS を生成する NADPH オキシダーゼ (NOX) 1 の発現が顕著である(4)。また、ROS の発生で転写因子である NFκB 経路が亢進し、炎症を引き起こす(5)。実際に腸の炎症と寛解を繰り返す炎症性腸疾患であるクローン病や潰瘍性大腸炎は、大腸上皮における NFκB 発現が亢進している。そのため炎症性腸疾患治療薬として、NFκB 発現を抑制する抗 TNF-α抗体 (レミケード®, ヒュミラ®) が適用されている(6)。本研究で用いた AOM と DSS による発がんは、NFκB 経路による慢性炎症により誘発されるため、抗酸化物質摂食による大腸内 ROS 活性を生体内で見ることのできる実験系である。本研究では抗酸化物質含有餌摂食と対照群の発がん数を計測するため、DSS の飲水を通常の 5 日から 4 日に変更したことにより両群の差が顕著に得られた。この結果は、抗酸化物質の常食が、炎症由来発がん抑制に効果があることを強く示している。この点は予防医学に大いに貢献できる可能性がある。

ROS は、炎症細胞やがん細胞だけでなく、免疫細

胞にも働きかける。例えば、がん患者の MDSCs は、NOX2 発現が亢進しており、ROS 活性が高い状態にあり、さらに MDSCs を増加させる状態に導く(7)。また腫瘍浸潤マクロファージや Treg も ROS を産生する。ROS は T 細胞レセプターと MHC ペプチドの結合を妨げるばかりか、T 細胞の抗腫瘍免疫を減弱させる(3, 8)。本研究において、抗酸化物質含有餌摂食で慢性炎症による発がん誘導時の MDSCs や IL-4 などの抗腫瘍活性減弱に働きかける細胞やサイトカインの抑制と、抗腫瘍免疫の増強が見られた結果は、抗酸化物質が免疫細胞の ROS 発生を除去することによる可能性も考えられる。抗酸化物質含有餌摂食群の脾細胞および腫瘍浸潤このマクロファージが抗腫瘍活性を示す M1 型なのか、抗腫瘍免疫を減弱させる M2 型であるのか今後詳細な検討を行う必要がある。

腫瘍局所は低酸素かつ低グルコース状態にあり、この状況で CTL が抗腫瘍免疫を発揮するのは困難である。腫瘍局所で活性化 CTL が十分なグルコースを供給できる能力を獲得できれば、腫瘍を根絶するほど抗腫瘍免疫が活性化されると考えられている。抗酸化物質が腫瘍浸潤 CTL を活性化させる可能性も考えられ、さらなる詳細な検討が期待される。

参考文献

1. Lambeth, J. D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 181–189.
2. Liou, G.-Y., and P. Storz. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 44: 479–96.
3. Chen, X., M. Song, B. Zhang, and Y. Zhang. 2016. Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016: 1580967.
4. Block, K., and Y. Gorin. 2012. Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* 12: 627–637.
5. Wang, M., and R. J. Kaufman. 2014. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 14: 581–597.

6. Popivanova, B. K., K. Kitamura, Y. Wu, T. Kondo, T. Kagaya, S. Kaneko, M. Oshima, C. Fujii, and N. Mukaida. 2008. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J. Clin. Invest.* 118: 560–70.
7. Corzo, C. A., M. J. Cotter, P. Cheng, F. Cheng, S. Kusmartsev, E. Sotomayor, T. Padhya, T. V McCaffrey, J. C. McCaffrey, and D. I. Gabrilovich. 2009. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.* 182: 5693–701.
8. Belikov, A. V., B. Schraven, and L. Simeoni. 2015. T cells and reactive oxygen species. *J. Biomed. Sci.* 22: 85.