平成 30 年度研究費助成　研究成果報告書集

研究成果報告書　目次

■ ヒト下肢リンパ系の 3 次元構築の解明～解剖研究からリンパ浮腫診断・治療への応用～
　岡山大学　大学院　医歯薬学総合研究科　助教　品岡　玲 …… 1

■ 骨微小環境を介した制御性Ｂ細胞の維持機構の解明
　岡山大学　大学院　医歯薬学総合研究科　助教　山田　大祐 …… 3

■ ニコチンによる口腔癌リンパ節転移の促進機構の解明とその阻害効果の検討
　岡山大学　大学院　医歯薬学総合研究科　助教　伊原木　聰一郎 …… 6

■ 抗癌免疫破綻における新規チェックポイント阻害薬の作用機序の解明
　岡山大学　大学病院　泌尿器科　医員　定平　卓也 …… 10

■ SGLT2 阻害薬はメタボリック症候群において直接的に腎保護に寄与する
　岡山大学　大学病院　腎臓･糖尿病･内分泌内科　講師　喜多村　真治 …… 13

■ 含ホウ素機能性色素を基盤とした円偏光発光材料の開発
　岡山大学　大学院　自然科学研究科　助教　前田　千尋 …… 16

■ 腸炎の治療および大腸がん予防に効果のある化合物の免疫学的検討
　岡山大学　大学院　ヘルスシステム統合科学研究科　助教　増田　潤子 …… 19

■ 空間ネットワーク環境における二色逆最近傍探索に関する研究
　岡山大学　大学院　自然科学研究科　准教授　後藤　佑介 …… 23

■ エキシプレックス/エキシマー有機円偏光発光色素の開発
　岡山大学　大学院　自然科学研究科　講師　高石　和人 …… 29

■ 破骨細胞のアポトーシスを誘導する SB-203207 の全合成と高活性アナログの創製
　岡山大学　大学院　自然科学研究科　准教授　早川　一郎 …… 32

■ 高解像度の面的な地形データを用いた、旭川の河床変動解析の精度向上に関する検討
　岡山大学　大学院　環境生命科学研究科　准教授　吉田　圭介 …… 36

■ 歴史的砂防施設「別所砂留」の持続可能な保存整備に向けた調査研究
　岡山大学　大学院　環境生命科学研究科　准教授　樋口　輝久 …… 42

■ 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　秉洙 …… 48

■ 高精度氾濫解析と避難経路解析を組み合わせた防災シミュレーターの開発
　岡山大学　大学院　環境生命科学研究科　准教授　赤穂　良輔 …… 57

■ 日本で高度に多様化した植物群テンナンショウの多様性維持機構の解明
　岡山大学　大学院　環境生命科学研究科　教授　廣部　宗 …… 63

■ 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 …… 66

■ 母体-初期胚間の情報伝達を担う卵管エクソソーム中マイクロ RNA の網羅的解析
　岡山大学　大学院　環境生命科学研究科　助教　山本　ゆき …… 70

■ 岡山県特産セイヨウナシ「パスクラサン」果実の成熟機構解析とその応用による貯蔵･流通技術の確立
　岡山大学　大学院　環境生命科学研究科　教授　久保　康隆 …… 74

■ 光化学系Ⅱ修復過程におけるタンパク質酸化損傷の役割の解明
岡山大学　資源植物科学研究所　助教　加藤　裕介 …… 80

■ 水素吸蔵法とμＳＲ法を用いた新規イリジウム酸化物超伝導体の開発
岡山大学　異分野基礎科学研究所　特任准教授　堀金　和正 …… 83

■ 岡山県内の障害者就労支援に関する実態調査
岡山大学　全学教育・学生支援機構　講師　池谷　航介 …… 86

■ 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　准教授　池田　理恵 …… 92

■ 身体性アバタを介したリフレクションによる看護コミュニケーション教育支援システム
岡山県立大学　保健福祉学部　助教　高林　範子 …… 98

■ 性同一性障害に関する看護師の知識･理解が影響を及ぼす看護ケアの態度
岡山県立大学　保健福祉学部　准教授　井上　幸子 ……102

■ 筋電･筋音ウェアラブルモニタを応用した骨格筋機能の可視化システムの開発
岡山県立大学　情報工学部　准教授　綾部　誠也 ……107

■ 接触により親近感を増大させる瞳孔反応ロボットの開発
岡山県立大学　情報工学部　助教　瀬島　吉裕 ……113

■ アバタ影コミュニケーションシステムを用いたインタラクション支援
岡山県立大学　情報工学部　准教授　石井　裕 ……117

■ 自然言語処理を用いたソフトウェア要件管理技術に関する研究
岡山県立大学　情報工学部　助教　天嵜　聡介 ……123

■ 無線ボディ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 ……129

■ 使用者の状態推定に基づき動作と音声で反応する身体的引き込みキャラクタシステムの開発
岡山県立大学　デザイン学部　准教授　西田　麻希子 ……135

■ 展示空間の文脈を伝えるテキスタイルデザインの開発と提案①
岡山県立大学　デザイン学部　助教　岡本　汐加 ……140

■ 教育効果のある木育玩具のデザイン指標づくりと研究開発
岡山県立大学　デザイン学部　助教　林　秀紀 ……146

■ 含ヘテロパイ電子系ユニットを有するプリンタブル太陽電池材料の開発
岡山理科大学　理学部　准教授　岩永　哲夫 ……152

■ 布賀鉱山産ホウ酸塩鉱物のホウ素同位体に関する基礎的研究
岡山理科大学　理学部　教授　小林　祥一 ……156

■ 高分子基複合材料の衝撃層間せん断特性評価法の確立
岡山理科大学　工学部　准教授　中井　賢治 ……162

■ 防災気象情報基準を備えた雨量計システムの開発
岡山理科大学　生物地球学部　准教授　佐藤　丈晴 ……167

■ 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～遺伝的な地理的境界線の成立要因の解明～
岡山理科大学　生物地球学部　講師　矢野　興一 ……173

■ 運動は炎症性腸疾患を予防するポジティブ・アクションとなりうるか？
倉敷芸術科学大学　生命科学部　専任講師　椎葉　大輔 ……176

■ 筋音図・筋電図を用いた筋コンディションの定量評価法の開発
倉敷芸術科学大学　生命科学部　准教授　枝松　千尋 ……180

■ 内向き整流性 K^+チャネル遮断ペプチドの探索と作用の解明
倉敷芸術科学大学　生命科学部　教授　岡田　誠剛 ……185

■ 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 ……188

■ 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 ……191

■ 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 ……196

■ 漏れ性向上効果を有する銅温間酸化被膜の構造と伝熱性評価
津山工業高等専門学校　総合理工学科　講師　竹村　明洋 ……200

■ 環境負荷の小さい硫化ズズ薄膜太陽電池の禁制帯不連続の制御による高効率化に関する研究
津山工業高等専門学校　総合理工学科　教授　中村　重之 ……206

■ *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　ｸﾞﾙｰﾌﾟﾘｰﾀﾞｰ　畑中　唯史 ……211

■ 病害抵抗性植物の効率的選抜を可能にする免疫応答可視化ツールの開発
岡山県農林水産総合センター　生物科学研究所　特別研究員　中野　真人 ……215

■ 栽培化により失われたトマトの短日性を支配する鍵遺伝子の解明
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　後藤　弘爾 ……218

■ 新たに見出されたモモ不稔現象の詳細解析
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 ……221

■ 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 ……225

■ 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 ……231

■ 鳥類アデノ随伴ウイルス（AAAV）受容体の機能解析
就実大学　薬学部　准教授　工藤　季之 ……235

■ 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　渡邉　政博 ……241

■ 脳内液体循環システムを利用した経鼻薬物送達法による新規な認知症治療法の開発
就実大学　薬学部　助教　井上　大輔 ……245

■ ドイツ健康靴の日本市場への導入・定着に関する歴史的研究
就実大学　経営学部　講師　三浦　紗綾子 ……250

■ 新しい細胞動態評価法でスクリーニングした抗腫瘍薬の応用
川崎医科大学　教授　山内　明 ……256

■ 糖尿病性腎症における糸球体内皮･上皮細胞連関における Inflammasome を介した炎症遷延化（慢性炎症）機序解明
川崎医科大学　講師　長洲　一 ……260

■ カルバペネム耐性大腸菌の駆除を目指したファージ療法の開発
川崎医科大学　講師　川野　光興 ・・・・・・・262

■ 腸内環境維持とコンディションに関する研究 －外環境変化と腸内細菌叢の関連－
川崎医療福祉大学　医療技術学部　准教授　松生　香里 ・・・・・・・265

■ 食餌誘導性肥満マウスの不安様行動におよぼす運動の効果
川崎医療福祉大学　医療技術学部　助教　小柳　えり ・・・・・・・267

■ 保育士の早期離職対策としての「リアリティショック予防プログラム」の開発
山陽学園大学　総合人間学部　准教授　松浦　美晴 ・・・・・・・272

■ 日常活動レベルの異なる対象者における筋音筋電センサの有効性に関する研究
環太平洋大学　体育学部　准教授　早田　剛 ・・・・・・・278

■ 新規ゲノム編集ラット作成法 rGONAD 法を用いた腎臓病モデルラットの開発
重井医学研究所　分子遺伝部門　室長　松山　誠 ・・・・・・・283

■ 音声・言語障害における新規代用音声法の開発
岡山済生会総合病院　耳鼻咽喉科　医長　平井　美沙都 ・・・・・・・289

海外渡航報告書　目次

■ 岡山大学　大学院　環境生命科学研究科　准教授　頼藤　貴志 ・・・・・・・293

■ 岡山大学　大学院　環境生命科学研究科　准教授　門田　有希 ・・・・・・・295

■ 岡山大学　異分野基礎科学研究所　講師　寺嶋　健成 ・・・・・・・297

■ 岡山県立大学　情報工学部　准教授　大田　慎一郎 ・・・・・・・299

■ 岡山県立大学　情報工学部　助教　瀬島　吉裕 ・・・・・・・301

■ 岡山大学　理学部　准教授　武安　伸幸 ・・・・・・・303

■ 岡山県立大学　情報工学部　助教　高林　健人 ・・・・・・・304

■ 岡山理科大学　教育学部　講師　笹山　健作 ・・・・・・・305

■ 川崎医療福祉大学　医学技術学部　助手　氏川　拓也 ・・・・・・・306

長期間海外派遣滞在 研究成果報告書　目次

【平成 29 年度長期間海外派遣滞在費助成】

■ 口腔常在菌による骨代謝ネットワーク機構の解明
岡山大学　大学病院　予防歯科　講師　入江　浩一郎 ・・・・・・・307

ヒト下肢リンパ系の 3 次元構築の解明
～解剖研究からリンパ浮腫診断・治療への応用～

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

品岡　玲

リンパ系は心血管系と同様に体の隅々まで張り巡らされている。老廃物を回収する機能、免疫機能が主な機能であるが、消化管では脂肪成分を選択的に吸収・運搬する機能も持っている。また、癌手術後などで引き起こされるリンパ系の機能低下は四肢に異常なリンパの貯留を引き起こし、手足が腫れるリンパ浮腫が臨床現場で問題になっている。しかしリンパ系の基礎医学的な情報は未開な部分も多く、特に最も基本となりうる、マクロ解剖学的情報ですら定まっていない。その大きな原因は、リンパ系の解剖学的研究は難しく、それは、リンパ系は血管と違い透明で細いため、解剖体や実際の手術中には認識することすら適わないからである。そこで我々は、近赤外蛍光色素インドシアニングリーンを用いて新たな解剖学的研究方法を開発し、下肢リンパ管の分類をおこなった。次に CT リンパ管造影を用いて、3 次元的なリンパ管の走行解析、さらにはリンパ節の解剖学的分類を検証する。

リンパ系は心血管系と同様に体の隅々まで張り巡らされており、２大循環系の一つである。細胞からの老廃物を回収する機能、さらには細菌や癌細胞などに対する免疫機能も担っている。また消化管では脂肪成分を選択的に吸収する栄養学的にも重要な器官である。臨床では、癌細胞の転移経路としてリンパ節の切除をする際に重要となる。またリンパ系の機能低下は四肢に異常なリンパの貯留を引き起こし、象のように手足が腫れるリンパ浮腫が問題になっている。

しかしリンパ系は解剖学の最後のフロンティアと呼ばれるように、未解明な部分が多く存在する。それは、リンパ系は血管と違い透明で細い（太くても 1㎜程度）ため、解剖体や実際の手術中には認識することすら適わないからである。それも画期的な可視化法がなく 200 年以上前に開発された色素注入法を用いて解剖研究しているのが現状である。そのため、他臓器に比べ解明が進んでいない。特に無数に存在する、リンパ管の分類や 3 次元構築の情報はまったく存在しない。

そこで、我々は臨床現場でリンパ管造影に用いられる近赤外線色素ジアグノグリン（ICG）が死体でも同様にリンパ系を可視化することが可能であることを発見し(図 1)、それが全身のリンパ系のマッピングに用いることができることを報告した(Shinaoka et al, PRS 2018)。

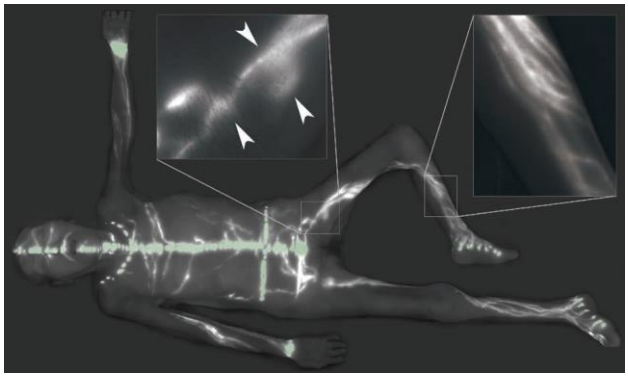


図 1 遺体における ICG lymphography
緑 : 注射部位　arrowhead : リンパ節
(Shinaoka *et al, PRS* 2018)

この方法の大きな特徴は近赤外色素であるため解剖をすることなくリンパ管の走行を皮膚表面から観察することができるということである。これにより、多数のご遺体を用いた研究が短時間で可能となった(Shinaoka et al, PRS in press)。下肢のリンパ系は解剖学的特徴に基づいて 4 グループに分類することができ、リンパ管の走行と起始部の情報より解剖学的リンパ系支配地図(図 2 lymphosome)を作成することができた。しかし、この地図情報の大きな問題点は皮膚表面から得た情報であるため、深さ情報がなく 2 次元情報で

しかないことである。さらにはリンパ管が最終的につながるリンパ節は深部に存在するため観察が難しく、3 次元的な情報が不十分であった。

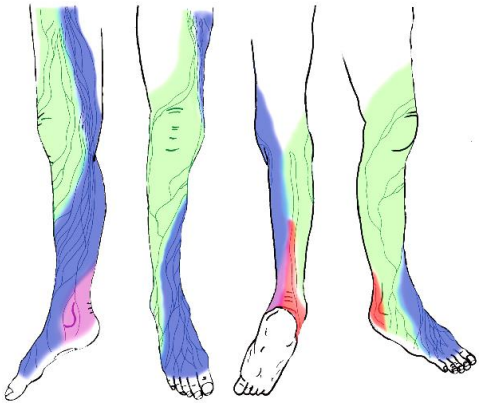


図 2 下肢リンパ系支配地図
紫：Posteromedial 青：Anteromedial
緑：Anterolateral 赤：Posterolateral
(Shinaoka *et al, PRS* in press)

そこで、本研究で CT リンパ管造影による、3 次元リンパ系ネットワークの解析を行った。死体における血管造影では、硫酸バリウム-ゼラチン法が一般的だが、リンパ管は細く粒子状の造影剤は詰まってしまって不適だったため、油性造影剤リピオドール(ヨード化ケシ油脂肪酸エチルエステル)を用いることとした。また室温でのリピオドールは粘度が高く、34 ゲージ注射針では注入が難しかったため、ジエチルエーテルを溶媒としたリピオドール溶液を作成し、造影剤とした。このリピオドール法では末梢リンパ管から 1 次リンパ節のみならず 2 次リンパ節まで造影することが可能であり、本研究で目的とするリンパ管の 3 次元構造解析とそれとリンパ節の関係を明らかにすることができた(図 3)。

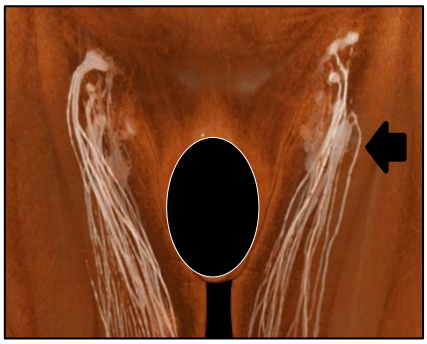


図 3 遺体における CT lymphography
arrow：リンパ節

下肢末梢から、4 つのリンパ系グループすべてにリピオドール溶液を注入したところ、ネットワーク構造が複雑すぎて、解析が困難であった。そのため、特定のリンパ系のみ造影剤を注入し、そのリンパ系グループのリンパ管の走行と、到着するリンパ節の情報を解析することとした。1 グループあたり 30 肢、4 グループに対し計 120 肢を用いて研究を行った。

この結果、4 グループ(前内側:AM, 前外側:AL, 後内側:PM, 後外側:PL)のうち AM と PM グループは浅鼠径リンパ節の大伏在静脈外側に接する最大のリンパ節に高率に到着し、AL グループは外側副大伏在静脈外側に接するリンパ節に高率に到着することがわかった。また PL グループは膝下リンパ節に高率に到着することがわかった(図 4)。つまり図 2 で示したリンパ系の支配領域は中枢側のリンパ節においても支配が異なっており、これらのグループ間の機能的な独立性が示唆されている。

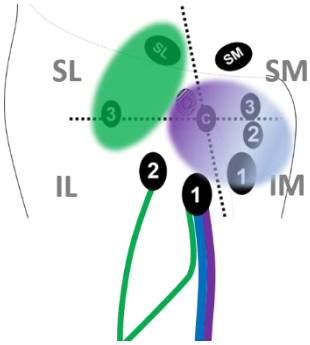


図 4 リンパ管グループと浅鼠径リンパ節の関係
AM と PM は IL1 リンパ節に、AL は IL2 リンパ節に吻合する。
紫：Posteromedial 青：Anteromedial
緑：Anterolateral 赤：Posterolateral

これらの結果は、リンパ浮腫患者に対するリンパ管造影検査時における造影剤注射部位プロトコールの標準化に寄与し、さらにはリンパシンチグラフィなどリンパ節可視化画像診断時の関心領域の設定に応用されている。

最後になりましたが、本研究にご支援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。

骨微小環境を介した制御性 B 細胞の維持機構の解明

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

山田　大祐

骨組織に存在する骨芽細胞は B 細胞の分化・成熟過程に関与することが明らかにされているが、その詳細な制御機構に関しては不明である。本研究では、薬剤誘導的な Runx2 の欠損マウスを利用することで、骨微小環境で発現している Runx2 が B 細胞の分化制御に関与しているかを解析した。生後のマウスで Runx2 を全身欠損させた場合、骨髄中の B 細胞の割合が減少した。次に、骨髄移植モデルを使用して、レシピエントあるいはドナーのみで Runx2 の欠損を誘導した場合、レシピエントで Runx2 を欠損させた時のみ骨髄中の B 細胞の割合が減少した。さらに、若齢マウスと比較した際、老齢マウスではストローマ細胞での Runx2 の発現量の低下と骨髄中の B 細胞の減少が観察された。以上の結果から、骨髄微小環境で発現している Runx2 は、B 細胞の分化を正に制御していることが示唆される。

[背景]

加齢に伴う身体の老化作用によって、感染症の罹患率の上昇などの弊害が誘導されるが、それらがどのような機序で生じるかに関しては不明な点が多いのが現状である。B 細胞は抗体産生を介して生体の免疫反応を制御している細胞であるが、その分化・成熟過程には骨髄微小環境に存在している骨芽細胞が重要であるとの報告がなされている[1]。B 細胞数は老化に伴って減少するが、その減少に骨芽細胞の機能変化が関係しているかについては未だ十分な解析がなされていない。

Runt related homeobox 2 (Runx2)は転写制御因子の一つであり、発生過程における骨形成に必須の遺伝子である。生後においては、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化・成熟に伴ってその発現量が上昇することも明らかにされている[2]。Runx2 は様々な転写制御分子と複合体を形成することが報告されている[3]が、その一つである Cbfb は老齢化によって発現量が減少し、その影響で骨芽細胞における Runx2 の転写活性が低下することが示されている[4]。しかし、老化に伴う骨髄微小環境の Runx2 活性の低下が、免疫機能に影響を及ぼすかに関しては不明である。

そこで本研究では、生後における骨髄微小環境の Runx2 と免疫系との関係を詳細に解明するために、薬剤誘導的な Runx2 の欠損マウスを使用して以下の解析を行った。

[結果]

薬剤誘導的な Runx2 欠損マウスの作成

初めに、タモキシフェン誘導的な Runx2 の欠損モデルを作成するために、Runx2 の flox アリルを持つマウスと ROSA26-CreER^{T2} マウスを交配して ROSA26-CreERT2, Runx2$^{f1/f1}$マウスを作成した(図 1A)。次に、骨髄並びに骨組織における Runx2 の欠損を誘導するために、生後 4 週齢のマウスに 1mg のタモキシフェンを５日間連続投与し、投与終了から 6 週間後に Runx2 の発現量をウエスタンブロットにて解析した。その結果、タモキシフェン投与によって Runx2 の欠損が誘導されたことが確認された(図 1B)。

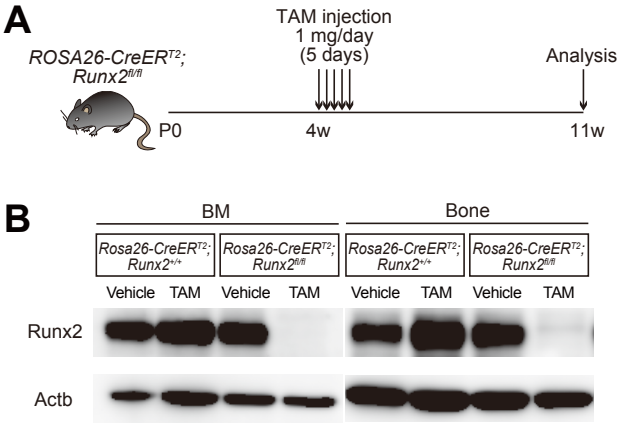


図 1. タモキシフェン投与による Runx2 の欠損

(A) タモキシフェンの投与スケジュール。

(B) タモキシフェン投与後の骨髄(BM)と骨組織(Bone)における Runx2 の発現。対照群:Runx2 が野生型の ROSA26-CreERT2, Runx2$^{+/+}$マウスを対照群とし、

vehicle にはコーンオイルを使用している。

Runx2 全身欠損時の B 細胞への影響

B 細胞への影響を比較するために、Runx2 欠損マウスから骨髄細胞を回収後、フローサイトメトリーにて解析を行った。その結果、対照群と比較して、骨髄中の B220 陽性な B 細胞の割合が有意に減少していた(図 2)。

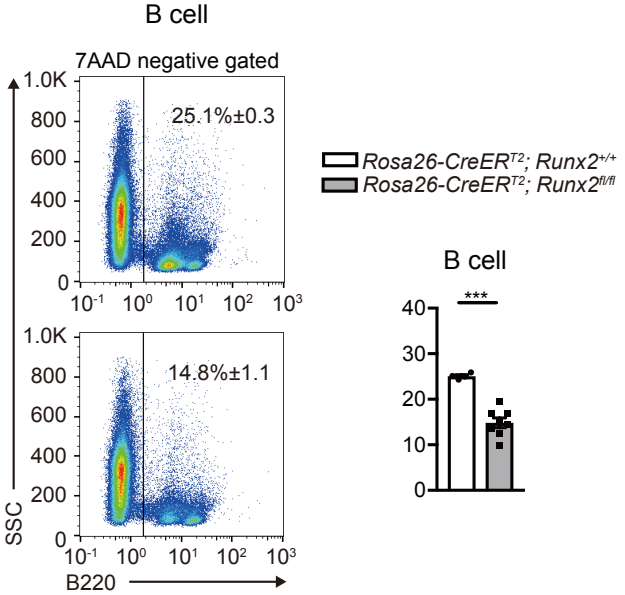


図 2. Runx2 の全身欠損による B 細胞の減少
タモキシフェン投与後の対照群あるいは Runx2 欠損マウスから骨髄細胞を回収し、7AAD 陰性の生細胞中の B220 陽性 B 細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。Runx2 が野生型の ROSA26-CreERT2, Runx2$^{+/+}$マウスを対照群としている。

骨微小環境あるいは骨髄細胞特異的な Runx2 の欠損

次に、骨微小環境あるいは骨髄細胞のどちらで発現している Runx2 が重要かを確認するために、骨髄移植モデルを使用して、レシピエント(骨微小環境)あるいはドナー(骨髄細胞)のみで Runx2 の欠損を誘導できる系樹立した(図 3A)。タモキシフェン投与後 6 週間後に、B220 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにて比較した結果、レシピエントで Runx2 を欠損させた時のみ、B 細胞の割合が減少していた(図 3B)。

図 3. 骨髄移植モデルを使用した Runx2 の欠損モデル
(A) 骨髄移植の手法とタモキシフェンの投与スケジュール。6 週齢のレシピエントマウスに致死量の X 線を照射(9.5Gy)した後、ドナー由来の骨髄細胞を尾静脈から 1x10^6 個移植した。移植してから 4 週間後にタモキシフェンを 5 日間連続投与し、投与終了後 6 週間目に解析を行った。
(B) レシピエントあるいはドナーで Runx2 を欠損させた際の B 細胞数への影響。レシピエントとドナー由来の骨髄細胞を区別するために、CD45.1(Ly5.1 マウス)と CD45.2(ROSA26-CreERT2, Runx2$^{fl/fl}$ マウス)の染色も行っており、レシピエント欠損時は CD45.1、ドナー欠損時は CD45.2 陽性細胞中の B220 陽性細胞の割合を算出している。

加齢による Runx2 の発現量と B 細胞への影響

最後に、若齢マウスと老齢マウスにおける Runx2 の発現量と B 細胞数の比較を行った。若齢マウスと老齢マウスから骨髄細胞を回収し、フローサイトメトリーにて Runx2 の発現量を比較した結果、血球/血管内皮細胞を含む画分では差は認められなかったが、老齢マウスのストローマ細胞画分では Runx2 の発現量が減少していた(図 4A, B)。また、これまでの研究報告の通り、老齢マウスでは骨髄における B 細胞の割合が減少していた(図 4C)

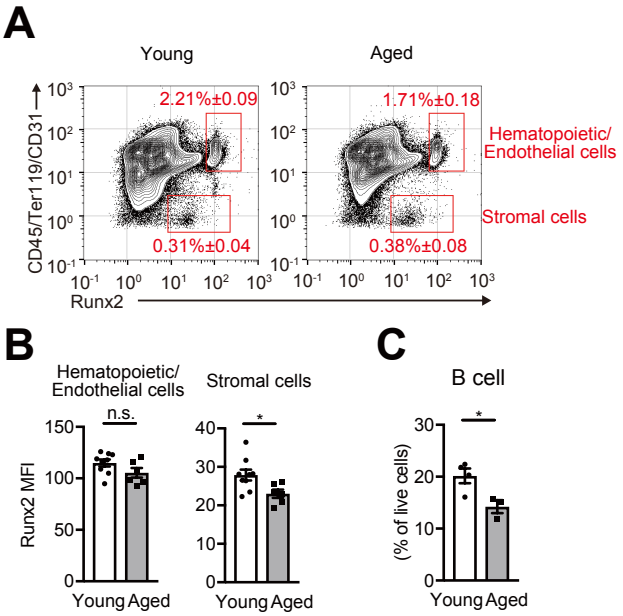


図 4. 若齢マウスと老齢マウスの比較解析

(A, B) 若齢マウスと老齢マウスの骨髄における Runx2 の発現量の比較。骨髄中の血球/血管内皮細胞画分とストローマ細胞画分における Runx2 の発現量をフローサイトメトリーで比較した。

(C) 若齢マウスと老齢マウスの骨髄中に存在する B 細胞数の比較。マウスから骨髄細胞を回収し、7AAD 陰性の生細胞中の B220 陽性 B 細胞の割合をフローサイトメトリーで比較した。

[考察]

以上の結果から、老化によって骨微小環境の Runx2 活性が低下することで、B 細胞の減少が引き起こされることが推察された。しかし、骨微小環境には骨芽細胞以外の細胞も存在していることから、SP7-Cre などの細胞種特異的な欠損モデルを使用した解析を実施することで、どの Runx2 陽性細胞が重要かを解明する必要があると考えられる。また、我々の研究結果は、Runx2 の転写活性を上昇させることで生体の免疫機能を向上できる可能性を強く示唆するものである。このことから、将来的には、本研究が免疫機能賦活化薬としての Runx2 活性化剤の研究開発に応用できることも期待される。

[謝辞]

本研究をご支援して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. Wu JY, *et al.* Osteoblastic regulation of B lymphopoiesis is mediated by Gs{alpha}-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16976-16981 (2008).

2. Takarada T, *et al.* Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. *Development* **143**, 211-218 (2016).

3. Ito Y, Bae SC, Chuang LS. The RUNX family: developmental regulators in cancer. *Nat Rev Cancer* **15**, 81-95 (2015).

4. Wu M, Wang Y, Shao JZ, Wang J, Chen W, Li YP. Cbfbeta governs osteoblast-adipocyte lineage commitment through enhancing beta-catenin signaling and suppressing adipogenesis gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 10119-10124 (2017).

ニコチンによる口腔癌リンパ節転移の促進機構の解明とその阻害効果の検討

岡山大学大学院　医歯薬学総合研究科　腫瘍制御学講座　口腔顎顔面外科学分野

伊原木　聰一郎

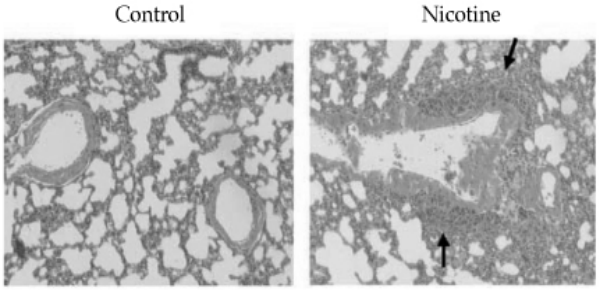
上皮成長因子（EGF）はその受容体（EGFR）に結合すると，EGFR のリン酸化と核内移行を起こし，細胞増殖を促進する．タバコの主要成分ニコチンは，喫煙により肺胞や口腔粘膜から吸収され中枢神経系のニコチン性アセチルコリン受容体（ニコチン受容体）に作用し，タバコ依存性に関与する．最近，主に神経系に局在すると考えられていたニコチン受容体が癌細胞に存在すること，またニコチンが EGFR を介して転移に関与していることが報告された．口腔はタバコ煙に最も曝露される臓器であるが，ニコチンが口腔癌の転移に与える影響は不明である．そこで，ニコチンが口腔癌細胞の EGFR リン酸化とリンパ節転移に与える影響を検討した．ニコチンはニコチン受容体を介して EGFR のリン酸化と核内移行を惹起し，口腔癌細胞のリンパ節転移を促進していた．さらにニコチン受容体阻害剤は口腔癌細胞のリンパ節転移を抑制することが明らかになった．

研究の背景

上皮成長因子（EGF）はその受容体（EGFR）に結合すると，EGFR のリン酸化と核内移行を起こし，細胞増殖を促進する．

ニコチンは，喫煙により肺胞や口腔粘膜から吸収され中枢神経系のニコチン性アセチルコリン受容体（ニコチン受容体）に作用し，タバコ依存性に関与する．

最近，主に神経系に局在すると考えられていたニコチン受容体が癌細胞に存在すること，またニコチンが乳癌細胞において EGFR を介して転移に関与していることが報告された．



ニコチンは乳癌細胞の肺転移を促進した．

乳癌細胞MCF-7をヌードマウス尾静脈に注射後，ニコチンを隔日で腹腔内注射した．4週間後マウスを屠殺し肺の組織切片を作製した．転移巣を矢印で示す．

Guo J, **Ibaragi S**, Zhu T, Luo LY, Hu GF, HuppiPS, Chen CY. Nicotine Promotes Mammary Tumor Migration *via* A Signaling Cascade Involving PKC and cdc42.***Cancer Research*** 68(20), 8473-81, 2008

口腔はタバコ煙に最も曝露される臓器であるが，ニコチンが口腔癌の転移に与える影響は不明であるため，本研究で検討した．

研究方法

口腔癌細胞（HSC-2，HSC-3，OSC-19，OSC-20）を，ニコチン存在下と非存在下で培養し解析を行った．増殖能は TC10TM automated cell counter を用いて評価した．遊走能は Boyden chamber 法を用いて測定した．浸潤能は Boyden chamber と Matrigel を用いて測定した．

ニコチン受容体非選択的阻害剤（メカミラミン塩酸塩），α7 ニコチン受容体選択的阻害剤（α-ブンガロトキシン），抗ヒト EGFR キメラ化モノクローナル抗体（Cetuximab），EGFR 阻害剤，MAPK 阻害剤，Akt 阻害剤を用いてニコチン-ニコチン受容体系のシグナル伝達因子を阻害した．

EGFR 発現，リン酸化 EGFR，リン酸化 ERK，リン酸化 AKT などシグナル伝達因子およびニコチン受容体の発現は Western blot 法を用いて調べた．

ヌードマウス可移植性ヒト口腔扁平上皮癌のリンパ節転移モデル（口腔癌リンパ節転移動物モデル）の作製を行った．5 週齢雄 BALB/C 系 nu/nu ヌードマウスの足蹠皮下に口腔癌細胞 OSC-19 を移植し，膝窩

リンパ節への転移の有無を評価した.移植後は連日,ニコチンを腹腔内注射し，移植部の大きさを計測した．マウスを屠殺し，移植部と膝窩リンパ節を摘出して，4%パラホルムアルデヒドで固定後，パラフィン包埋組織切片を作製した．移植部と所属リンパ節の病理組織学的検討を行った．移植部においてはニコチン受容体および EGFR，リン酸化 EGFR を免疫組織化学的に評価した．膝窩リンパ節においてはリンパ節転移陽性率を評価した．移植部のリンパ管新生は抗 LYVE-1 抗体を用いて，血管新生は抗 CD31 抗体を用いて，それぞれ免疫組織化学的に評価した.

口腔癌リンパ節転移動物モデルにおいて,ニコチン-ニコチン受容体系を阻害し,リンパ節転移の抑制効果を調べた.ニコチン-ニコチン受容体系の阻害には,ニコチン受容体阻害剤（メカミラミン塩酸塩）を用いた.

研究成果

(1)ニコチンが口腔癌細胞の増殖能に与える影響

HSC-2 細胞，HSC-3 細胞，OSC-19 細胞，OSC-20 細胞を用いて細胞増殖能を検討した．いずれの細胞においてもニコチン添加群が対照群と比較して増殖能が有意に上昇していた.

(2)口腔癌細胞のニコチン受容体発現

HSC-2 細胞，HSC-3 細胞，OSC-19 細胞，OSC-20 細胞のニコチン受容体発現を検討した．いずれの細胞においてもニコチン受容体発現を認めた.

(3)ニコチンおよびニコチン受容体阻害剤が口腔癌細胞の増殖能，遊走能，浸潤能に与える影響

HSC-3 細胞，OSC-19 細胞を用いて増殖能，遊走能，浸潤能を検討した．ニコチン添加群は対照群と比較して，増殖能，遊走能，浸潤能が有意に促進されていた．ニコチン受容体阻害剤であるメカミラミン，α-ブンガロトキシンはニコチンの効果を有意に抑制した.

(4)ニコチンが口腔癌細胞の細胞内シグナル伝達経路に与える影響

HSC-3 細胞， OSC-19 細胞を用いて，Western blot 法で細胞内シグナル伝達経路について検討した．HSC-3 細胞，OSC-19 細胞ともに，ニコチン添加により EGFR，Akt のリン酸化が亢進した.

(5)ニコチンが口腔癌細胞におけるリン酸化 EGFR の細胞内局在に与える影響

リン酸化 EGFR の細胞内局在を，蛍光免疫染色を用いて検討した． HSC-3 細胞，OSC-19 細胞をそれぞれカバーガラス上で培養し，ニコチンを作用させた後メタノールで固定し,抗リン酸化 EGFR 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った．ニコチンを作用させると経時的に核内にリン酸化 EGFR が移行していく様子が観察された.

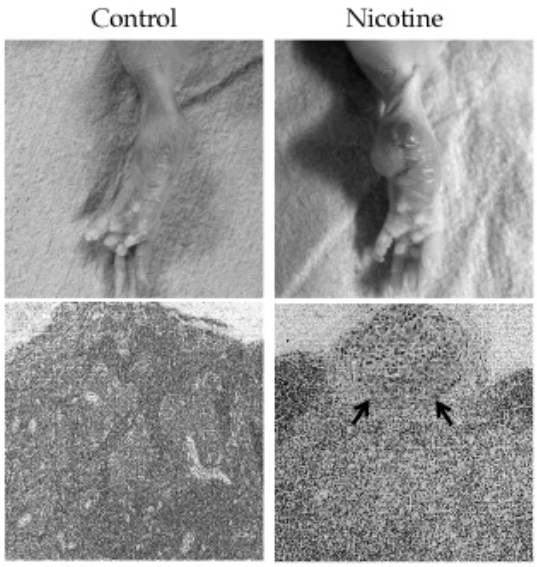
リン酸化 EGFR の細胞内局在について Western blot 法を用いて検討した．HSC-3 細胞と OSC-19 細胞から抽出した蛋白を，細胞質と核に分画し，EGFR とリン酸化 EGFR を Western blot 法にて検討した．EGFR の発現は，対照群およびニコチン添加群ともに細胞質で認めるが，核内ではほとんど認めなかった．EGFR のリン酸化は，ニコチン添加群において，核内で増加していた.ニコチンによって EGFR がリン酸化し核内移行したと考えられた.

(6)ニコチン受容体阻害剤,Cetuximab,AKT 阻害剤,mTOR 阻害剤が口腔癌細胞の細胞内シグナル伝達経路に与える影響

ニコチンとメカミラミン塩酸塩もしくはα-ブンガロトキシンの共存下では，EGFR，Akt のリン酸化は抑制された．ニコチンと AKT 阻害剤の共存下では,ニコチン添加群と比較して，Akt，mTOR のリン酸化は抑制されたが,EGFR のリン酸化に変化はなかった.また,ニコチンと mTOR 阻害剤の共存下では,ニコチン添加群と比較して,mTOR のリン酸化は抑制されたが，EGFR，Akt のリン酸化に変化はなかった．また Cetuximab は EGFR のリン酸化を抑制したが,ニコチンはその効果を減弱させた.

(7)ニコチンが Cetuximab で抑制された口腔癌細胞の増殖能，遊走能，浸潤能に与える影響

Cetuximab は口腔癌細胞の増殖能，遊走能，浸潤能を抑制したが，ニコチンはその効果を減弱させた．



リンパ節転移動物モデル

口腔癌細胞OSC-19をヌードマウスの足底皮下に移植後，ニコチンを腹腔内注射した．移植6週間後にマウスを屠殺し，膝窩リンパ節を摘出しH.E.染色を行った．転移巣を矢印で示す．

(8) ニコチン，ニコチン受容体阻害剤，Cetuximab が口腔癌細胞のリンパ節転移に与える影響

OSC-19 細胞を用いた口腔癌リンパ節転移動物モデルで，移植腫瘍の増殖およびリンパ節転移の頻度を検討した．ニコチン投与群では対照群と比較し腫瘍増殖が促進され，メカミラミンはその効果を抑制した．また Cetuximab 投与により腫瘍増殖が抑制されたが，ニコチンはその効果を減弱させた．

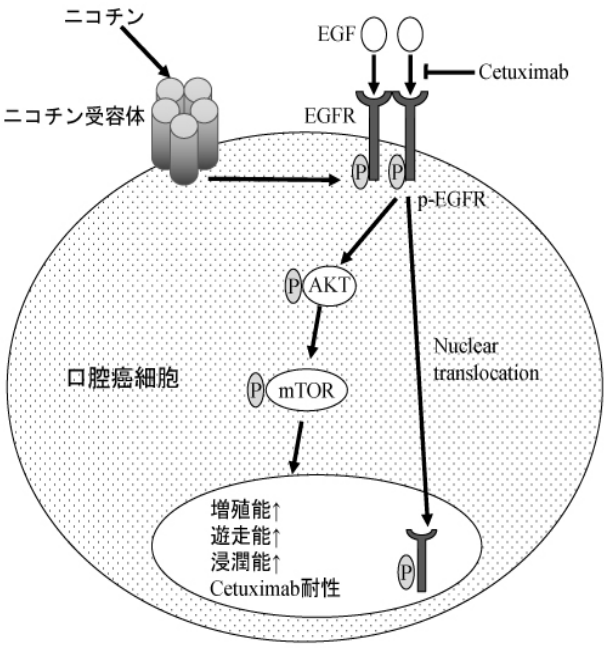
移植腫瘍のリン酸化 EGFR の核内陽性率を病理組織学的に検討した．ニコチン投与群では対照群と比較しリン酸化 EGFR の核内陽性率が上昇し，メカミラミンはその効果を抑制した．

リンパ節転移に関しては，ニコチン投与群では対照群と比較し転移陽性率が上昇し，メカミラミンはその効果を抑制した．

まとめ

ニコチンはタバコ依存性に関与するが発癌性物質ではない．そのため禁煙治療には，ニコチンをガムやパッチなどの形態で補給するニコチン置換療法が行われている．しかし近年，肺癌，乳癌においてニコチンが腫瘍増殖の促進に関与することが報告された．口腔はタバコ煙中のニコチンに最も曝される臓器であるにも関わらず，口腔癌についての報告は今までなかった．

本研究において，ニコチンはニコチン受容体を活性化することで，EGFR リン酸化を促進していた．またリン酸化EGFRは細胞表面から核内へ移行しAKTおよびその下流の mTOR を活性化し，口腔癌細胞の増殖能，遊走能，浸潤能を促進し，リンパ節転移を惹起していた．さらに同機構は Cetuximab の耐性にも一部関与していると考えられた．



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．（なお本研究は JSPS 科研費 JP 26463004，17K11836 の助成も受けております．）

本研究助成による研究成果に関する発表

Shimizu R, Ibaragi S, Eguchi T, Kuwajima D, Kodama S, Nishioka T, Okui T, Obata K, Takabatake K, Kawai H, Ono K, Okamoto K, Nagatsuka H, Sasaki

A.
Nicotine promotes lymph node metastasis and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma.
International Journal of Oncology 54(1):283-294. 2019
https://www.spandidos-publications.com/ijo/54/%201/283

参考文献

兒玉真一，ニコチンが口腔癌の増殖およびリンパ節転移に与える影響に関する研究，*岡山歯学会雑誌*，学位論文，2013

桑島大介，ニコチンが口腔癌の上皮成長因子受容体発現に与える影響の検討，*岡山歯学会雑誌*，学位論文，2016

抗癌免疫破綻における新規チェックポイント阻害薬の作用機序の解明

岡山大学病院　泌尿器科

定平　卓也

がん治療において癌抗原特異的細胞障害性 CD8（+）T 細胞（CTL）の機能調節は非常に重要である。近年、癌免疫療法において T 細胞疲弊（T-cell exhaustion）という抗原特異的な細胞障害性 T 細胞の機能喪失及び細胞死という現象が注目されている。T 細胞疲弊の分子メカニズムには、抑制性サイトカイン（TGF-β，IL-10 など）の関与や負の制御因子（CTLA-4，PD-1，TIM-3，LAG-3 など）発現が関与しており、臨床的にはメラノーマ、腎癌、肺小細胞癌を中心に、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体による抗体療法により劇的な腫瘍縮小効果があることが報告された（N Engl Med 369(2):122-133，2013）。一方で、我々岡山大学のグループは、embryonic development に関与する新規不死化関連遺伝子である Reduced Expression in Immortalized Cells / Dickkopf 3（REIC/Dkk-3）タンパク質が腫瘍微小環境において CD8（+）T 細胞の機能調節に関与することで抗腫瘍効果を発揮することを実証してきている。そこで本研究では、新規の免疫チェックポイント阻害薬である REIC/Dkk-3 タンパク質による CD8（+）T 細胞の免疫疲弊解除およびその分子メカニズムを詳細に検証する。また、既存の免疫チェックポイント阻害薬（抗 PD-1 抗体，抗 PD-L1 抗体，抗 CTLA-4 抗体，抗 Tim-3 抗体）と併用することで、複合免疫療法への展開を目指した。

はじめに

本研究は新規の免疫チェックポイント阻害薬である REIC/Dkk-3 タンパク質を用いたがん免疫治療において、従来の免疫チェックポイント阻害薬と同等もしくはそれ以上の治療効果を確認し、腫瘍内免疫疲弊解除機構を解明することを目的とする。すなわち、腎癌、膀胱癌、前立腺癌を中心とした尿路性器癌において、この REIC/Dkk-3 タンパク質を用いたがん免疫治療の有用性ならびに抗腫瘍効果を検証し、当該免疫治療の基盤を確立することである。具体的には、①免疫学的解析に必要な独自のマウス腫瘍細胞株をそれぞれの尿路性器癌で樹立する。そのモデルを用いて、②REIC/Dkk-3 タンパク質による腫瘍浸潤 CD8（+）T 細胞の免疫疲弊解除機構を介した抗腫瘍効果と、③REIC/Dkk-3 タンパク質による腫瘍浸潤 CD8（+）T 細胞の代謝制御を介した抗腫瘍効果の両方の観点から抗腫瘍効果を解析する。さらに、臨床応用を目指すため、④免疫チェックポイント阻害薬（抗 PD-1 抗体，抗 PD-L1 抗体，抗 CTLA-4 抗体，抗 Tim-3 抗体）と新規の免疫チェックポイント阻害薬である REIC/Dkk-3 タンパク質を併用した場合の抗腫瘍効果ならびに腫瘍浸潤 CD8（+）T 細胞への作用メカニズムを検証した。*in vitro* において CD8（+）T 細胞の刺激培養系（anti-CD3 および CD28）を立ち上げ、CD8（+）T 細胞における REIC/Dkk-3 タンパク質の作用評価が可能な系を作成した。また、in vivo においてもヒト膵癌細胞株（AsPC-1，MIA Paca-2）の腫瘍モデルにおいて REIC/Dkk-3 タンパク質の著名な抗腫瘍効果をすでに確認した。本申請研究の実施により、尿路の各種癌における REIC/Dkk-3 タンパク質による新規治療法の基盤が確立される可能性が高いことが確認された、

研究の特色

REIC/Dkk-3 の癌治療遺伝子としての臨床応用は近年脚光を浴びており、現在、岡山大学を中心としたグループにより、複数の難治性固形癌（前立腺癌、悪性胸膜中皮腫、肺癌、膵臓癌、悪性グリオーマ、肝細胞癌等）への癌遺伝子治療への応用が進められている。国際的にみて REIC/Dkk-3 に関連する一連の研究は岡山大学での独創的研究であり、遺伝子の機能に関する基本特許は 2000 年に出願、2006 年に日本、2010 年に欧州で特許を取得している。また、関連特許「前立腺癌細胞のアポトーシス誘発剤」、「部分断片及び該断片を

含むがん治療薬」等も出願済みである。これまでにREIC/Dkk-3の癌抑制遺伝子としての重要性を指摘する論文が相次いで報告されてはいるものの、正常細胞における細胞の分化、増殖に関する報告は少なく、今回の新知見である「REIC/Dkk-3タンパク質による腫瘍内免疫疲弊解除機構の解明」についての報告は存在せず、本申請研究の成果は国際的に大きな注目を浴びる可能性が高い。このようにREIC/Dkk-3遺伝子研究の分野で、岡山大学は確実に世界をリードしている。近年、急激な高齢社会に直面している我が国では、高齢者のQOLを低下させる悪性腫瘍への対応は喫緊の課題であるが、残念ながら、劇的な治療効果をもたらす、副作用の少ない新規薬剤に関する研究は少ないのが現実である。岡山大学ではトランスレーショナル・リサーチの一環として、遺伝子・細胞治療研究を全国に先駆け積極的に実施しており、これまでに尿路性器癌に対する樹状細胞ワクチン療法や、本邦初の肺癌ならびに前立腺癌遺伝子治療臨床研究を実施している。さらに関連した基礎研究も精力的に実施しており、学内にはトランスレーショナル・リサーチの効率的な推進のためのシステムが確立しており、当該研究の成果は直ちに臨床応用される体制が整備されている。

臨床研究の成果

新規の癌免疫療法「癌治療遺伝子 REIC/Dkk-3 を用いた前立腺癌に対するin-situ 遺伝子治療」臨床研究を実施している。本臨床研究では CRPC 患者 A 群と、ハイリスク前立腺癌に対する術前投与療法としての B 群 の二群に設定して施行している。両群とも Ad-REIC 製剤を2 回投与し、A群では画像評価を B 群では画像評価に加えて、2 回目投与から42日後に前立腺全摘術を行い、摘出した前立腺での REIC 注入部の組織学的評価を行っている。現在までに施行した症例で治療後の PSA 低下を認め、画像上治療部位のアポトーシス、腫瘍縮小効果が確認された症例を経験している。さらに申請者は、これまでも世界をリードする形で、前立腺癌に対する先端的遺伝子治療関する多数の基礎研究、トランスレーショナル研究、臨床研究の推進に携わっており、実務的役割を担っている。最近では、これまでの遺伝子治療の基礎・臨床研究に加え、新規開発した超高効率遺伝子発現システムを用いた次世代分子標的生物製剤（イメージング医薬を含む）の創製に携わり、革新的治療薬により標的医療イノベーションを実現させるため、当該分野における最先端研究を行った。

基礎研究の成果

癌抗原特異的細胞障害性 CD8（+）T 細胞の解析に必要な腫瘍細胞株の樹立をした：癌抗原特異的細胞障害性CD8（+）T細胞（CTL）を解析するために、モデル抗原を有するマウス癌細胞株を樹立する。モデル抗原としては卵白アルブミン(ovalbumin, OVA)を使用する。腎癌細胞株 (Renca)、膀胱癌細胞株 (MBT-2)、前立腺癌細胞株（PC-3, DU-145, LNCaP）にOVAを遺伝子導入しOVA発現癌細胞株を樹立した。これらのOVA発現癌細胞株を用いることで免疫能正常マウスにおいて種々のモデルが構築可能であった。

Tetramerを用いた癌抗原特異的反応とそれに関するマーカーの検出を行った：抗原特異的反応の検出にはtetramer 試薬によるフローサイトメトリー法（FACS）を用いて抗原特異的CTLの誘導を確認した。腫瘍局所へ浸潤したリンパ球（Tumor-infiltrating Lymphocyte：TIL）の解析に加え、必要に応じて脾臓やリンパ節におけるリンパ球も追加した。さらに、それぞれの組織のリンパ球について、疲弊マーカーであるPD-1, PD-L1, CTLA-4, Tim-3の発現と多機能性マーカーである IFN-γ, TNF-α, IL-2 をフローサイトメトリー法で検証した。

癌抗原特異的細胞障害性 CD8（+）T 細胞の機能評価を行った：tetramer で同定された抗原特異的 CTL はMHC・抗原ペプチド複合体との親和性を有しているが、実際に癌細胞に対する細胞障害活性の有無に関しての評価は不十分であっら。精製されたCTLと元の細胞株を反応させてMTT assayにより細胞死の程度を評価し、CTL の細胞障害活性を評価した。また CTL のサイトカイン産生能として、ペプチド抗原を提示した抗原提示細胞と反応させた際の IFN-γ 産生能を評価して治療により誘導された抗原特異的 CTL の機能評価を行った。脾臓から CD11c 陽性の樹状細胞を抗体ビーズで精製し、ペプチドを貪食、抗原提示させた状態で固定し、分離・精製したCTLと反応させてIFN-γ産生をELISPOTによるIFN-γ産生細胞の有無とELISAによる産生濃度に分けて評価を行った。

REIC/Dkk-3 タンパク質と免疫チェックポイント阻害薬の併用:REIC/Dkk-3 タンパク質と免疫チェックポイント阻害薬（抗 PD-1 抗体, 抗 PD-L1 抗体, 抗 CTLA-4 抗体, 抗 Tim-3 抗体）を併用し、in vivo での抗腫瘍効果を検証する予定である。さらに、併用した場合の CD8（+）T 細胞に対する免疫疲弊解除および代謝制御の分子メカニズムも同時に解析する。また、同所性/異所性発癌マウスモデルを使用し、投与法（全身投与、局所注入）の最適化を検証する予定している。

謝辞

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。

SGLT2 阻害薬はメタボリック症候群において直接的に腎保護に寄与する

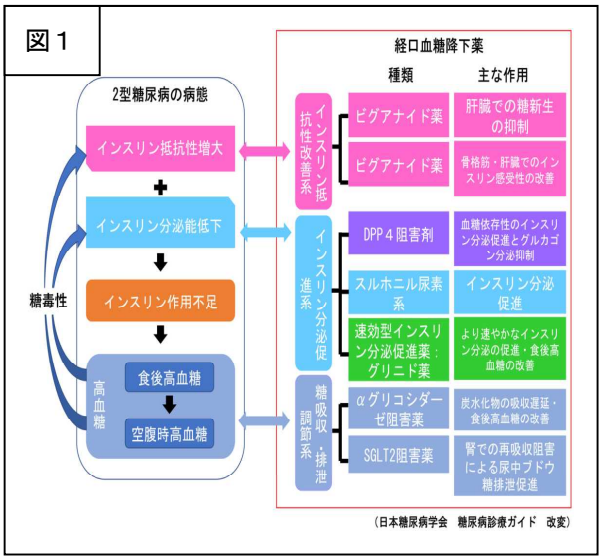
岡山大学病院　腎臓・糖尿病・内分泌内科
喜多村　真治

【概要】
メタボリック症候群は腎障害を来し、その診断治療は重要である。一方、SGLT2 阻害薬は血糖降下のみならず慢性腎臓病治療薬としても期待されている。今回我々はメタボリック症候群における SGLT2 阻害剤の腎保護効果について検討した。【方法】5 週齢 C57BL/6J マウスを通常食（ND）群、高脂肪食（HFD）群で 10 週間飼育、SGLT2 阻害剤である Empagliflozin（EMPA）群 10 mg/kg、溶媒の 0.5 %HPMC（C）群にて 7 日間経口投与し、腎障害を比較検討した。【結果】HFD 群は ND 群と比較し尿蛋白，尿中 NAG の有意な上昇を認めたが EMPA 群では有意に低下していた。近位尿細管でオートファジーのマーカーである p62 陽性細胞は、C 群の近位尿細管の割合は HFD 群が ND 群に比して上昇を認めた（ND 群：HFD 群、15.25±5.79 vs. 28.92±2.93（%）、$p<0.01$）が、EMPA を投与した HFD 群では有意な減少を認めた（C－HFD 群：EMPA－HFD 群、28.92±2.93 vs. 16.18±8.10（%）、$p<0.05$）。【結論】メタボリック症候群における近位尿細管障害のオートファジー不全に対する SGLT2 阻害薬保護効果が示唆された。

【本文】
【背景】肥満症は、日本人の食生活の変化から、日本においても増加しており、メタボリック症候群として、国民病の一つになっている。そのメタボリック症候群は、高血圧症、脂質異常症、肥満、糖尿病などを含んだ症候群である。その中の糖尿病は生活習慣病の最たるものであり、その合併症は、心血管病に影響し、生命予後に深く関与する。

そのような糖尿病治療薬には、インスリンが有名だが、経口血糖降下剤には以下の 7 種類がある（図１）。インスリン抵抗性改善系でビグアナイド薬・チアゾリジン薬、インスリン分泌促進系で DPP4 阻害剤・スルホニル尿素薬・速効型インスリン分泌促進薬、糖吸収・排泄調節系でαグルコシダーゼ阻害薬・SGLT2 阻害薬である。

SGLT2 阻害剤は、腎臓の近位尿細管ある SGLT（sodium glucose cotransporter の略、以下 SGLT）2 に作用し、原尿内にある糖の再吸収を抑制することにより血糖排泄を促し、糖尿病患者における血糖降下作用を発現する。そのような SGLT2 阻害剤には、利尿効果があると推測されており、各種臨床研究において、心不全抑制効果などが示されており、現在腎機能改善効果の治験などもなされている。



しかし、そのような SGLT2 阻害剤であるが、腎臓に作用する薬剤であるにも関わらず、腎機能改善効果が報告されているが、その詳細な機序は不明であり、現在のところ、改善効果は TGF フォードバックシステムによる糸球体濾過量改善によるものと推測されている。今回我々は、その改善効果につき、検討を行った。

【material & method】

In Vivo study

Material: C57BL/6 マウス

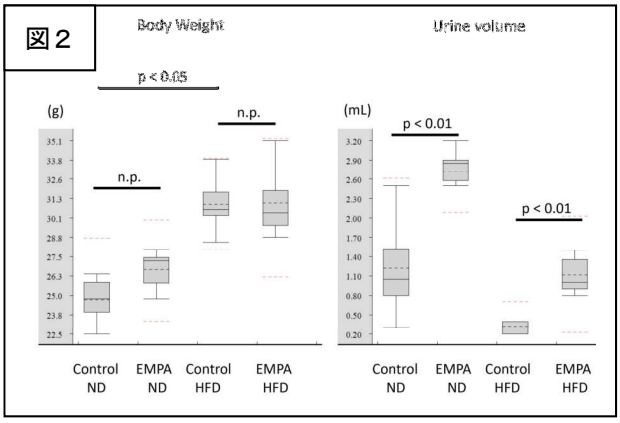
方法：SGLT2 阻害剤： Empagliflozin では 10mg/kg 濃度で投与する。C57BL/6J マウスに関しては、統計学的に有意差がでる数を使用した。コントロールの sham-ope 群を 10 週飼育する群、高脂肪食を与え、10 週飼育し、耐糖能異常を惹起させた群、また、SGLT2 阻害剤：Empagliflozin 10mg/kg を７日間経口にて一日一回投与する群、SGLT2 阻害剤＋高脂肪食を与えた群の 4 群を作製した。SGLT２阻害剤投与７日後に合わせ、全群のマウスに炭酸ガスによる安楽死を行い、腎臓を摘出。その腎臓の組織、遺伝子、蛋白を回収し、解析を行った。

評価方法：マウスの安楽死前に 24 時間の蓄尿を行い、腎機能、尿量、尿中電解質を測定した。また、安楽死時に血圧測定、採血も行い、血液中の生化学検査にて腎機能、電解質も測定する。腎臓組織では切片で、遺伝子、蛋白、染色レベルにて検討した。

【結果】

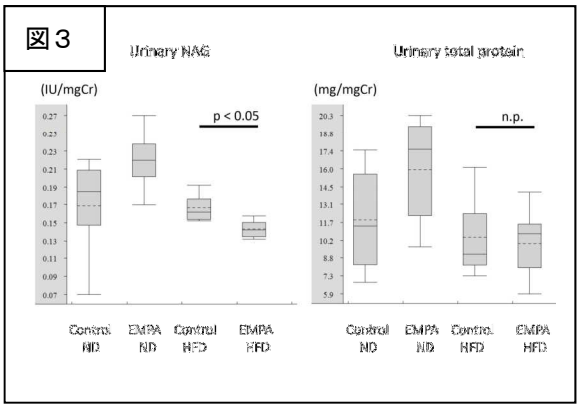
体重において高脂肪食群は全て有意に増加していた（図２）。また同様に、SGLT2 阻害剤投与群は有意に尿量が増加していた（図２）。しかし、血圧に

図２



関しては、有意な変化は認められなかった（data not shown）。同様に、血糖に関しても有意な変化は認められなかった（data not shown）。しかし、尿中 NAG は近位尿細管障害では通常上昇するが、高脂肪食群はコントロール群と比較し尿蛋白，尿中 NAG の有意な上昇を認めたが SGLT2 阻害剤 EMPA 群では有意に低下していた。（図３）。

図３



その機序として、細胞障害の一因であるオートファジーについて検討した。ｐ62 は最も良く知られたオートファジーの基質の一つであり、その発現を検討した。p62 の染色では、高脂肪食にすると近位尿細管において、p62 陽性部位は有意に増加していたが、SGLT2 阻害剤の EMPA 群では高脂肪食群において有意に減少していた（図 4,5）。このことは、近

図４

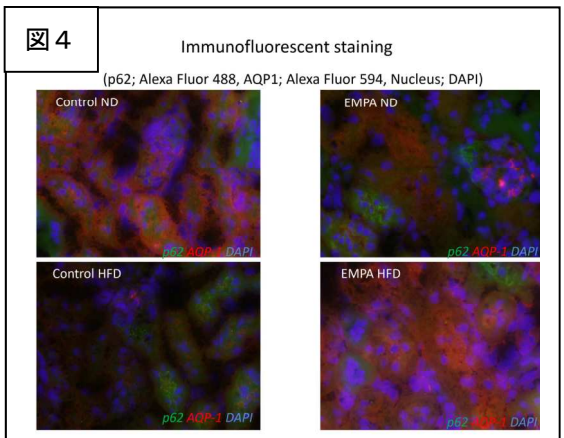
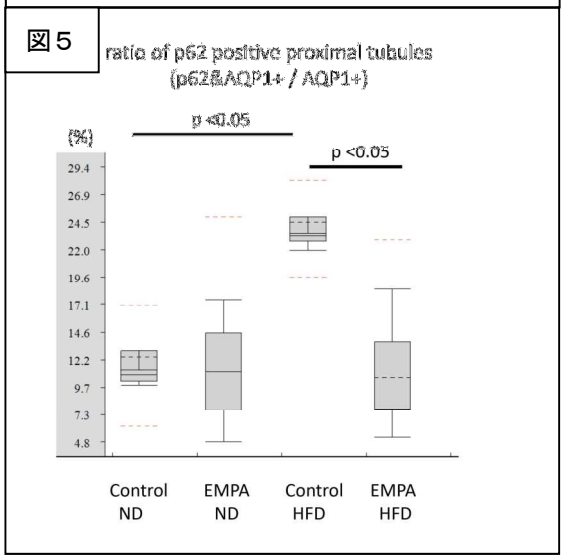


図５



位尿細管障害のオートファジー不全により p62 陽性部位が増加するのに対し SGLT2 阻害薬により、オートファジー不全が改善することが示唆された。

【考察】

SGLT2 阻害剤については、最近 Perkovic らはカナグリフロジンを使用した糖尿病性腎臓病の改善を報告した（CREDENCE 試験）。これまで、SGLT2 阻害薬の心血管イベントに対する有効性は EMPA-REG OUTCOME、CANVAS Program、DECLAIR の 3 つの大規模試験で示されてきたが、CREDENCE 試験は SGLT2 阻害薬による腎アウトカムを主要評価項目とした初めての大規模臨床試験であった。しかし、その中では改善機序の解明はなされておらず、TGF フィードバックなど既存の改善機序と推測されている。

今回我々の検討では、TGF フィードバックといった糸球体濾過量改善機序ではなく、SGLT2 阻害剤による近位尿細管への直接的な結合による薬理作用が、近位尿細管細胞へどのような影響を与えるかを検討した。その中で、メタボリック症候群ではオートファジー不全を起こすが、それを SGLT2 阻害剤が抑制することを見出した。この知見は、既存の糸球体濾過量の海前のみならず、直接的な尿細管改善作用があることを示唆している。

しかし、SGLT2 阻害剤がどの経路でオートファジーを改善するかは現在検討中であり、その更なる解明が期待される。

含ホウ素機能性色素を基盤とした円偏光発光材料の開発

岡山大学大学院自然科学研究科

前田 千尋

近年円偏光発光（CPL）を示す有機キラル化合物の開発が盛んに行われている。CPL は直線偏光とは異なり、円を描きながら振動する光学特性である。左円偏光と右円偏光の二種類があり、キラル色素に励起光を照射することで発現する。CPL の強度を評価する異方性因子 g_{lum} は左円偏光と右円偏光の差を発光強度で割った値であり、CPL 特性を評価する上で重要な指標となる。最近、有機蛍光色素 BODIPY にキラリティーを付与することで、低分子においても溶液中で比較的高い蛍光量子収率、CPL を示すことが報告されている。しかし固体 CPL を示すキラル BODIPY の報告例はない。そこで本研究では我々が開発した固体発光特性を有する含カルバゾール BODIPY に軸不斉ビナフチルユニットを導入することで、固体発光特性を維持しつつ CPL を示す新規キラル BODIPY を開発することとした。Et_2AlCl を用いた新規反応条件により高収率で目的物を得ることに成功した。これらは CPL を示し g_{lum} 値は溶液中で-5.2×10^{-4}、固体状態で最大$+7.0 \times 10^{-3}$を示した。BODIPY 誘導体における固体 CPL の初の例であり、これまでに報告されている有機色素の中で最高水準の値を記録した。

１．研究目的

含ホウ素π共役系化合物は発光材料として有用な色素である。溶液中で強く発光する色素が多数報告されている一方、固体状態では消光しがちである。これは分子間での自己光吸収が原因となる。一般的に剛直な π 共役系化合物は溶液中で強い発光を示す一方で、固体状態では π−π スタッキングにより分子内での相互作用が強くなるため自己光吸収による消光が起きやすい。蛍光性色素の応用を考えると有機溶媒中だけでなく固体状態でも発光することが求められる。

申請者は様々なヘテロ環を導入したカルバゾール誘導体を配位子として用いた BODIPY 類縁体の開発に成功してきた。[1-4] 一般的な BODIPY は溶液中で高い量子収率を示す反面、固体状態では消光してしまう。一方申請者らが開発したホウ素錯体は固体状態でも比較的強い蛍光を示した（図１）。

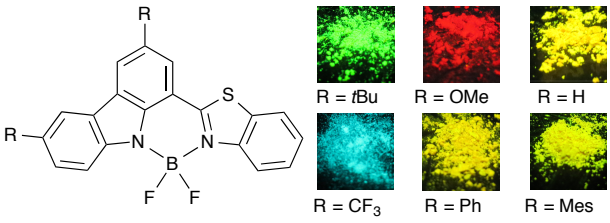
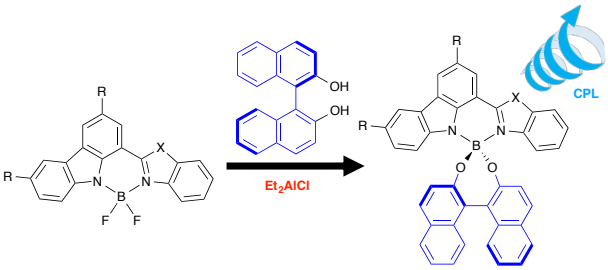


図１ 固体発光を示す含カルバゾール BODIPY

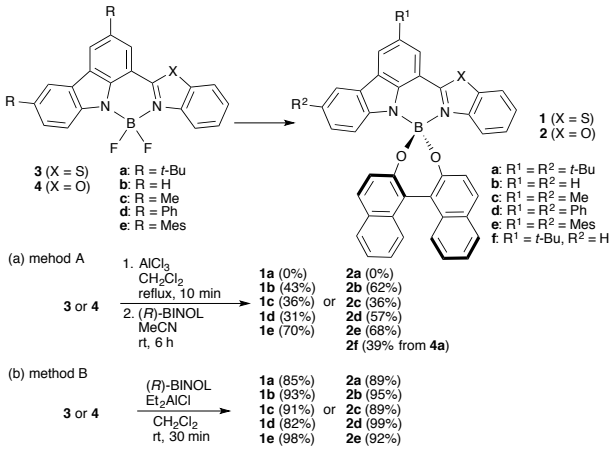
また近年 3D ディスプレイや植物の成長制御を指向して円偏光発光(CPL)材料が注目されている。ヘリセンやビナフチル骨格を有するものを中心に研究されているが、CPL の効率上昇の方法はほとんど確立されていない。また固体 CPL の研究例は少ない。そこで我々が開発した色素にキラルユニットを導入することで固体 CPL 材料の開発を行うこととした。配位子、またはホウ素上の置換基にキラリティーを導入する。配位子部分を螺旋型カルバゾールとすることでヘリセンに、またホウ素上にキラルユニットを導入することで目的物を合成する。本年度は Et_2AlCl を用いた新規反応により、ホウ素上に軸不斉ビナフチルユニットを高収率で導入することに成功した（スキーム１）。これらは CPL を示し g_{lum} 値は、溶液中で-5.2×10^{-4}、固体状態で最大$+7.0 \times 10^{-3}$を示した。



スキーム１

２．結果と考察

まずBODIPY誘導体**3**及び**4**に対して$AlCl_3$存在下(R)-BINOL との反応を行った（スキーム２a）。[5] カルバゾール 3, 6 位に H, Me, Ph, Mes 基を持つ **1b-e** 及び **2b-e** が中程度の収率で得られたが t-Bu 基を持つ **1a** や **2a** は得られなかった。これらの場合脱ホウ素化体を含む複雑な混合物となったが、t-Bu 基が１つ外れた **2f** を単離することができた。このことは$AlCl_3$により逆フリーデルクラフツ反応が起きたと考えられる。そこで用いるルイス酸を $AlCl_3$ よりマイルドな Et_2AlCl に変更したところ、**1a-e** 及び **2b-e** がいずれも高収率で得られた（スキーム２b）。



スキーム２

1b と **2b** に関しては単結晶Ｘ線構造解析に成功しその構造を確認した。どちらもπ−πスタックにより一次元鎖を形成していた（図１）。

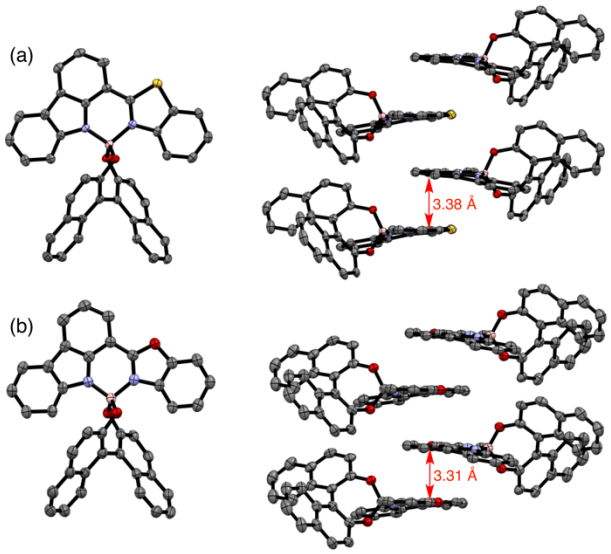


図１　**1b** と **2b** の結晶構造

合成した **1** と **2** の光学特性を図２と表１に示す。吸収スペクトルでは 200 nm 付近及び 400−500 nm にそれぞれビナフチル、BODIPY 由来の吸収帯が確認された。CD スペクトルにおいて 230 nm 及び 400−500 nm にコットン効果が確認された。BODIPY 由来の吸収領域である 400−500 nm でのコットン効果の発現は軸不斉ビナフチルからの誘起効果と考えられる。

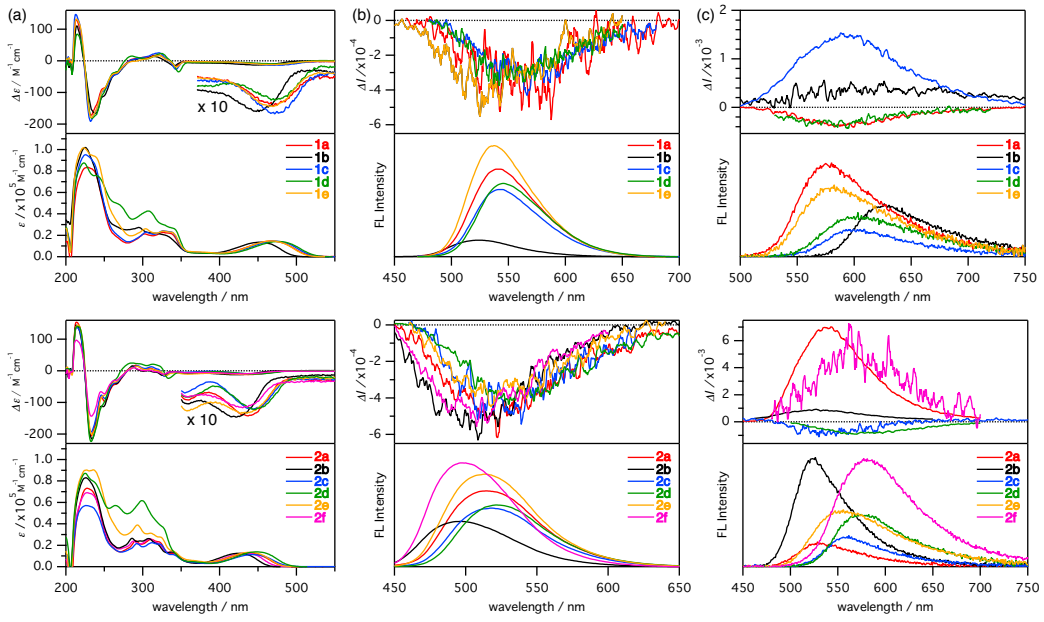


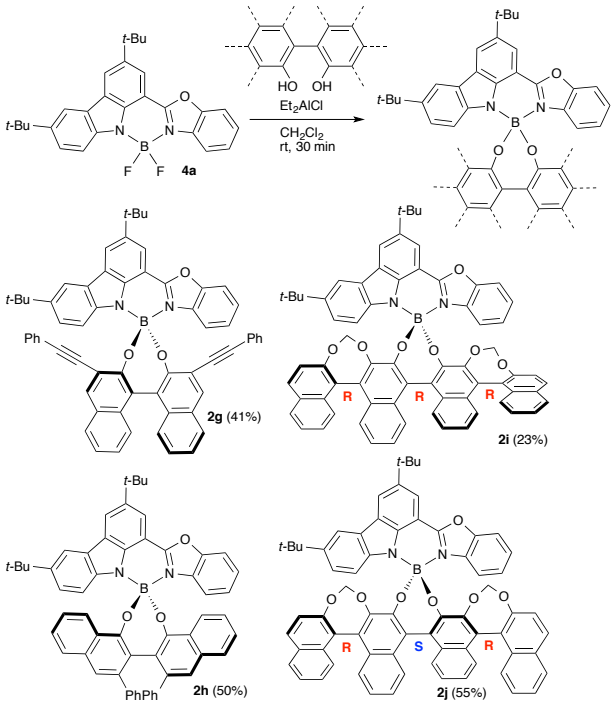
図２（a) ジオキサン中の CD 及び UV スペクトル（b）ジオキサン中の CPL 及び FL スペクトル（c）固体状態での CPL 及び FL スペクトル

表１ 化合物 1 と 2 の光物性

	1,4-dioxane						powder		
compd	λ_A (nm)	λ_F (nm)[a]	$\Delta\nu_{St}$ (cm^{-1})[b]	Φ_F	g_{abs}[c]	g_{lum}[d,e]	λ_F (nm)[a]	Φ_F	g_{lum}[e,f]
1a	467	540[g]	2890	0.259	-6.9×10^{-4}	-3.0×10^{-4}	576[g]	0.157	-3.4×10^{-4}
1b	452	526[h]	3110	0.108	-9.4×10^{-4}	-4.2×10^{-4}	578[h]	0.136	$+2.2\times10^{-4}$
1c	472	541[g]	2700	0.229	-9.4×10^{-4}	-4.0×10^{-4}	597[g]	0.104	$+1.5\times10^{-3}$
1d	476	546[g]	2690	0.231	-6.4×10^{-4}	-3.0×10^{-4}	603[g]	0.123	-3.0×10^{-4}
1e	468	538[g]	2780	0.315	-7.8×10^{-4}	-3.1×10^{-4}	581[g]	0.150	–[i]
2a	438	515	3410	0.374	-9.2×10^{-4}	-5.0×10^{-4}	528	0.040	$+7.0\times10^{-3}$
2b	425	497	3410	0.245	-9.5×10^{-4}	-5.2×10^{-4}	524	0.232	$+7.2\times10^{-4}$
2c	443	518	3270	0.290	-8.4×10^{-4}	-4.4×10^{-4}	555	0.087	-8.7×10^{-4}
2d	448	522	3160	0.300	-6.8×10^{-4}	-4.0×10^{-4}	573	0.132	-8.4×10^{-4}
2e	439	514	3320	0.431	-7.9×10^{-4}	-3.9×10^{-4}	554	0.152	–[i]
2f	432	496	2990	0.487	-7.0×10^{-4}	-4.7×10^{-4}	580	0.279	$+4.8\times10^{-3}$
2g	438	514	3380	0.432	-6.5×10^{-4}	-4.4×10^{-4}	544	0.179	$+1.7\times10^{-4}$
2h	438	514	3380	0.418	-8.7×10^{-4}	-3.5×10^{-4}	543	0.308	$+1.8\times10^{-4}$
2i	438	510	3220	0.443	-6.7×10^{-4}	-2.5×10^{-4}	540	0.164	$+4.1\times10^{-4}$
2j	439	517	3440	0.358	$+1.4\times10^{-3}$	$+8.9\times10^{-4}$	550	0.157	$+2.2\times10^{-4}$

[a]Excited at 420 nm. [b]Stokes shift. [c]$g_{abs}=\Delta\varepsilon/\varepsilon$ at λ_A. [d]$g_{lum}=2(I_L-I_R)/(I_L+I_R)$. Average value in the range of $\lambda_F\pm10$ nm. [e]Excited at 320 nm. [f]Excited at 360 nm. [g]Excited at 460 nm. [h]Excited at 440 nm. [i]The CPL signals were too weak to detect.

これらは可視領域での発光と CPL を示した。溶液中での蛍光量子収率Φ_Fは 0.11-0.49 であり CPL の強度 g_{lum} は−3.0〜5.2 × 10^{-4} であった。さらに固体発光も示し、Φ_Fは 0.04〜0.28 であった。Mes 基を持つ **1e** と **2e** 以外固体 CPL を示し、いくつかの色素は溶液中の値よりも向上した。特に **2a** と **2f** の g_{lum} 値 +7.0 × 10^{-3}、+4.8 × 10^{-3} はこれまでに報告されている有機色素の中でも最高水準の値である。



スキーム３

本研究で開発した反応を用いて基質 **4a** と種々の BINOL 誘導体との反応を試みたところ、キラル色素 **2g–j** を与えた（スキーム３）。いずれも溶液中、固体状態で CPL を示した。

３．まとめ

本研究では Et_2AlCl を用いた新規反応条件により新規キラル BODIPY の開発に成功した。[6] これらは固体状態でも CPL を示し g_{lum} 値は最大+7.0 × 10^{-3} を示した。BODIPY 誘導体における固体 CPL の初の例であり、最高水準の値を記録した。現在キロプティカル特性に及ぼす置換基効果の調査及び螺旋型キラル BODIPY の開発を行っている。

４．参考文献

(1) C. Maeda, T. Todaka, T. Ema, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3090.

(2) C. Maeda, T. Todaka, T. Ueda, T. Ema, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 7508.

(3) C. Maeda, K. Nagahata, T. Ema, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 7783.

(4) C. Maeda, T. Todaka, T. Ueda, T. Ema, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 9283.

(5) C. Tahtaoui, C. Thomas, F. Rohmer, P. Klotz, G. Duportail, Y. Mély, D. Bonnet, M. Hibert, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 269.

(6) C. Maeda, K. Nagahata, K. Takaishi, T. Ema, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 3136.

腸炎の治療および大腸がん予防に効果のある化合物の免疫学的検討

岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科

増田潤子

がんによる免疫機能の抑制はがんの特徴の一つとして考えられている。さらに、がん細胞は腫瘍微小環境のみならず、脾臓における免疫機能に影響することが示唆されている。しかしながら、がん細胞が腸内の免疫系に与える影響については未だ解明されていない。本研究では腸炎の治療および大腸がん予防に効果のある化合物の免疫学的検討をするための初期段階として、多くのヒト乳がんと同様に、骨、肺、肝臓および脳などの遠隔臓器に転移する性質を持つBALB/c系統由来乳がん細胞株4T1細胞を同種移植したがんモデルマウスを用いて、脾臓および腸間膜リンパ節における免疫細胞の質的変化および機能変化を対照群と比較し、がんによる全身性免疫抑制の機構を明らかにすることを目的とした。

緒　言

がんの原因になる遺伝子の変異により制御を失った細胞は、過剰な細胞分裂と増殖能と遺伝子の複製エラーの修復機能欠損を伴い、近隣の細胞との接着に関わる遺伝子変異による細胞社会性の崩壊、環境不適切なサイトカインや増殖因子の分泌など様々な遺伝子の異常発現を引き起こし、最終的に遊走能の獲得を経て周辺組織への転移能、すなわち悪性化を獲得する。腫瘍組織は、多様な遺伝子変異を伴う多数のサブクローン化したがん細胞集団により構成されており（腫瘍内不均一性)、この不均一性に富んだがん細胞が、がん関連筋線維芽細胞、血管内皮細胞、周皮細胞および免疫細胞等の多数の間質細胞と共に微小環境の構築し（がん微小環境)、がんの進展に関与している［1,2]。

腫瘍組織に含まれる免疫細胞には、樹状細胞(Dendritic cells: DC) やマクロファージ(Macrophages :Mφ) 等の抗原提示細胞 (antigen presenting cells: APC)、ヘルパーT細胞 (CD4陽性(+) T細胞)、細胞傷害性T細胞 (CD8+ T細胞: CTL) 等が含まれるが［3]、免疫活性を抑制する骨髄由来免疫細胞 (myeloid derived suppressor cells: MDSC) や CD4+制御性 T 細胞 (regulatory T cells: Treg) の増加［4-7] およびがん細胞を直接殺傷する CTL の機能低下により［8]、抗腫瘍免疫は減弱している 。また、がん局部だけでなく全身免疫においても、MDSC の増加による CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の細胞数低下およびサイトカイン分泌の減少が生じている［9]。これらは、がん細胞の増殖が腫瘍局所のみならず全身の免疫にも大きな影響を与えることを示唆している。

一方、腸管の表層を覆う粘膜組織にも多くの免疫細胞が存在するが、腸管免疫細胞が粘膜と他組織間において何らかの作用があることは古くから示唆されてきた［10,11]。そして近年になり行われた詳細な研究によって、炎症反応に伴って腸管に遊走される免疫細胞の解明が進みつつある。例えば、腸管での外来抗原侵入時のみならず、肺に侵入したインフルエンザウイルスの侵入によっても活性化された CD4+ T 細胞は腸管へ遊走し、腸内細菌の恒常性の破綻を伴う T ヘルパー (Th) -17 細胞性の粘膜障害を引き起こすことや［12,13]、腸内細菌によって引き起こされるトル様受容体 (Toll-like receptor: TLR)-5 依存的なシグナリングにより皮下移植したがん細胞の悪性化が引き起こされることが明らかになっている［14]。これらの報告は、がん細胞が腸管に直接触れることがなくても活性化した T 細胞が腸管の恒常性に影響を与える可能性を示唆する。そこで本研究では、骨、肺、肝臓および脳などの遠隔臓器に転移する性質を持つ BALB/c 系統由来乳がん細胞株 4T1 細胞［15] を同種移植したがんモデルマウスを用いて、腸間膜リンパ節と脾臓における免疫細胞の質的変化および機能変化を対照群と比較することで、腸管免疫細胞に特異ながん細胞増殖との関連を探るための基礎的実験を行った。

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 μM 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% CO_2、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 CD3ε（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. 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 μL の PBS(sham)、あるいは PBS に懸濁した 4T1-luc 株(4T1)を皮下に移植した。

5. 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。脾細胞中の骨髄由来抑制細胞（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 μg/ml で抗 CsD3ε 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）にて各セット(BD OptEIA™ ELISA Sets, BD バイオサイエンス社)の説明書に従って測定した。

6. 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±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

1.4T1 担がんマウスに見られる脾臓 MDSC の増加

脾臓は血液循環に侵入した抗原を捉え、ナイーブ T 細胞と自然免疫および適応免疫を開始させる二次リンパ組織であり、多くの免疫細胞が集簇している。ヒト患者では全身免疫を知るために採血による末梢血単核球の抽出が容易であるが、マウスに存在する全血液は 1.8 ml ほどであり、このうち血漿は 6 割程度であるため、末梢血から実験に用いるほど多くの免疫細胞を抽出するのは不可能である。そこで本研究ではマウスから脾臓を摘出し、免疫細胞の解析を行うことで全身の免疫状態を知るための実験を行った。

BALB/c 系統雌マウス由来大腸癌細胞株 CT26 を同種皮下移植したマウスの脾臓では、MDSC 数の増加が認められる [9]。一方、4T1 を同種皮下移植したマウスの脾臓では、MDSC 数の増加が報告されている [7]。そこで本実験で作製した 4T1 担がんマウスが CT26 担がんマウスや既報と同様に MDSC の増加が認められるかを確認するために、4T1 担がんマウス脾臓に存在する MDSC 割合を測定し、対照群と比較した。マウス MDSC は、$Gr\text{-}1^{hi}$ $CD11b^{+}$を示す顆粒系（G-MDSC）と $Gr\text{-}1^{intermediate}$ を示す $CD11b^{+}$単球系（M-MDSC）のサブセットからなる亜集団でどちらのサブセットも

T 細胞抑制能を持つが、M-MDSC の方が抑制能が高い[6,9]。

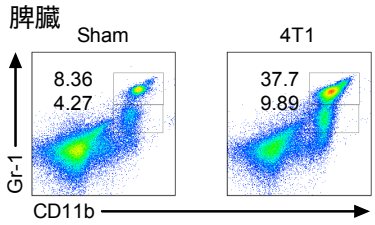


図 1. 4T1 担がんマウスに見られる脾臓 MDSC の増加. 5×10^5 個の 4T1 細胞をマウスの右脇腹に皮下移植し 14 日後に脾細胞を抽出し、MDSC をフローサイトメトリーにて解析し、対照群 (Sham) と比較した. $Gr\text{-}1^{hi}$ $CD11b^+$は顆粒系 MDSC (G-MDSC)を示し、$Gr\text{-}1^{intermediate}$ $CD11b^+$は単球系 MDSC (M-MDSC)を示す.

図 1 に示すように本研究においても 4T1 担がんマウスは既報と同様に MDSC 細胞の顕著な増加が見られた。これらの結果は、本研究で用いた 4T1 担がんマウスががん患者や既報のがんモデル動物と同様の全身免疫状態であることを示唆したため、4T1 担がんマウスの全身免疫状態を知るためのさらなる解析を行った。

2. 4T1 担がんマウス腸間膜リンパ節に MDSC は存在しない

腸間膜リンパ節(mLN)は腸管に侵入した抗原を捉え遊走した DC が、ナイーブ T 細胞と自然免疫および適応免疫を開始させる二次リンパ組織である。腸管上皮は比較的硬い組織で、腸管上皮および粘膜固有層から免疫細胞を抽出するには多くの時間を要し、得られる細胞数も極めて少ない。一方、腸間膜リンパ節は容易に摘出することができ、簡単に多くの免疫細胞を抽出することができる。そこで本研究では、4T1 担がんマウスの mLN に存在する免疫細胞について解析を行った。

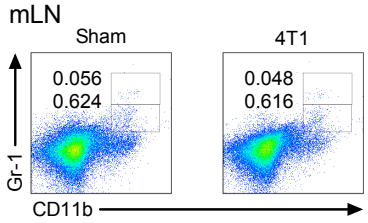


図 2. 4T1 担がんマウス腸間膜リンパ節(mLN)に MDSC は存在しない. 5×10^5 個の 4T1 細胞をマウスの右脇腹に皮下移植し 14 日後に腸間膜リンパ節からリンパ球を抽出し、MDSC をフローサイトメトリーにて解析し、対照群 (Sham) と比較した. $Gr\text{-}1^{hi}$ $CD11b^+$は顆粒系 MDSC (G-MDSC)を示し、$Gr\text{-}1^{intermediate}$ $CD11b^+$は単球系 MDSC (M-MDSC)を示す.

膵臓がん細胞株 mPAC を C57BL/6 系統マウスに同種皮下移植したマウスの脾臓および腸間膜リンパ節では、有意な MDSC 数の増加が報告されている。そこで本実験で作製した 4T1 担がんマウスは、mPAC 担がんマウスと同様に腸間膜リンパ節の MDSC が増加するか確認するために、4T1 担がんマウスの腸間膜リンパ節に存在する MDSC 割合を測定し、対照群と比較した。ところが既報と異なり、BALB/c 系統マウスの腸間膜リンパ節に MDSC はほぼ存在せず、4T1 担がんマウスにおいても存在しなかった (図 2)。この結果は、BALB/c 系統マウスにおいて、腫瘍に伴って増加する MDSC が腸管免疫を制御するメカニズムがほぼ存在しないことを示唆した。

3. 4T1 担がんマウス腸間膜リンパ節に見られる T 細胞依存的炎症

最後に、4T1 担がんマウスの腸管免疫状態を総合的に判断するため、腸間膜リンパ節に存在する T 細胞を、抗 CD3ε mAb によって刺激した時のサイトカイン量を測定した。

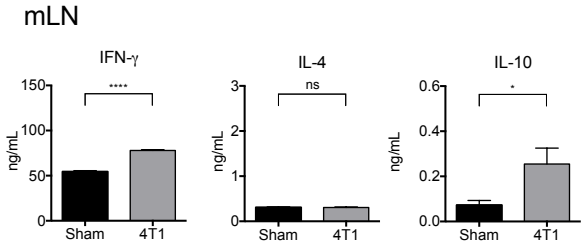


図 3. 4T1 担がんマウスに見られる抗腫瘍活性の減弱. 5×10^5 個の 4T1 細胞をマウスの右脇腹に皮下移植し 14 日後に脾細胞を抽出し、抗 CD3ε mAb 固相化プレートにて 48 時間培養した後、培養上清を回収した.

腸炎時に、炎症性サイトカインである IFN-γは有意な増加を認めるが、4T1 担がんマウスの腸間膜リンパ節由来リンパ球刺激後の培養上清中に含まれる IFN-γ量は、対照群と比べて有意に増加した (図 3)。抗炎症性サイトカインである IL-4 は、IL-10 と共に腸炎抑制を担うが、4T1 担がんマウスの腸間膜リンパ節由来リンパ球刺激後の培養上清中に含まれる IL-4 量は、対照群と変わらなかった (図 3)。
抗炎症性サイトカインである IL-10 は、常に食物や腸内細菌に曝露されている腸管において免疫寛容を担うために大事な役割を担っている。4T1 担がんマウスの腸間膜リンパ節由来リンパ球刺激後の培養上

清中に含まれる IL-10 量は、対照群と比べて有意に増加した（図 3)。

考　察

本研究において、転移能をもつ乳がん細胞株 4T1 を皮下注射することで作製した担がんマウスの全身と腸管の免疫細胞の質的および量的変化を調べた。全身免疫能を示す脾臓では、T 細胞の機能抑制と抗腫瘍免疫の抑制が生じていたが、腸間膜リンパ節では T 細胞の IFN-γ 産生能は有意に増加し、炎症状態が亢進していた。がんは局所だけでなく全身の免疫系に影響を与えるが、非常に初期の段階から腸管の免疫系においても、がん局所や全身とは異なる何らかの免疫的機能が存在する可能性が示唆された。

参考文献

[1] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med 2013;19:1423-37.

[2] Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. Cell 2005;121:335-48.

[3] Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. Nature 2013;501:346-54.

[4] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. J Immunol 2009;182:4499-506.

[5] Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. Adv Cancer Res 2010;107:57-117.

[6] Fichtner-Feigl S, Terabe M, Kitani A, Young C a, Fuss I, Geissler EK, et al. Restoration of tumor immunosurveillance via targeting of interleukin-13 receptor-alpha 2. Cancer Res 2008;68:3467-75.

[7] Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. Cell Rep 2015;10:562-73.

[8] Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udono H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112:1809-14.

[9] Masuda J, Takayama E, Strober W, Satoh A, Morimoto Y, Honjo Y, et al. Tumor growth limited to subcutaneous site vs tumor growth in pulmonary site exhibit differential effects on systemic immunities. Oncol Rep 2017;38:449-55.

[10] McDermott MR, Clark DA, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. II. Influence of the estrous cycle on B immunoblast migration into genital and intestinal tissues. J Immunol 1980;124:2536-9.

[11] McDermott MR, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. J Immunol 1979;122:1892-8.

[12] Hart AL, Ng SC, Mann E, Al-Hassi HO, Bernardo D, Knight SC. Homing of immune cells: Role in homeostasis and intestinal inflammation. Inflamm Bowel Dis 2010;16:1969-77.

[13] Wang J, Li F, Wei H, Lian Z-X, Sun R, Tian Z. Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation. J Exp Med 2014;211:2397-410.

[14] Rutkowski MR, Stephen TL, Svoronos N, Allegrezza MJ, Tesone AJ, Perales-Puchalt A, et al. Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. Cancer Cell 2015;27:27-40.

[15] Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG, Hong JE, Lee J-Y, et al. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. BMC Cancer 2008;8:228.

空間ネットワーク環境における二色逆最近傍探索に関する研究

岡山大学大学院自然科学研究科

後藤　佑介

GPS を用いて目的地検索やカーナビゲーションを行う位置情報サービスでは，探索方式に応じて膨大なオブジェクトの中から探索候補を算出する必要がある．計算量が増加すると処理時間は長大化し，ユーザは探索を中止して別のサービスに移るため，問題である．そこで，申請者らの研究グループでは，探索の処理時間を短縮する二次元問合せ手法を提案してきた．本研究では，高次元の空間ネットワーク環境において，ネットワーク距離を用いた二色逆最近傍探索技術の提案および評価を行った．はじめに，数式モデルを用いて探索手法のアルゴリズムを構築し，シミュレーションプログラムを実装して低次元評価用計算機を用いた評価を行った．次に，高次元評価用計算機を用いて提案手法のシミュレーション評価を行い，提案手法の有用性を検証した．

1. はじめに

ネットワーク上で移動端末による空間軸上の変化を表現できる空間ネットワーク環境では，地理情報を扱うシステムとして Geographic Information System (GIS) が広く用いられている．また，GIS の入力デバイスの一つである Global Positioning System (GPS) を用いた位置情報サービスが注目されており，様々な分野への応用が期待されている[1]．

空間ネットワークにおいて，オブジェクト間の距離を測定する方法は二種類に分けられる．一つ目はユークリッド距離，二つ目はネットワーク距離である．本研究では，地理情報を考慮したオブジェクト間の距離を用いるため，ネットワーク距離について考える．空間ネットワーク環境では，位置情報の問合せ元となるクエリオブジェクト(以下,クエリ) が探索条件に応じて候補となる複数のターゲットオブジェクト(以下,ターゲット) を選択する．このとき，クエリの位置情報をもとに，クエリからの距離が近いターゲットを探索する最近傍探索を用いることが有効である．

また，最近傍探索の考え方を用いて，クエリまでの距離が近いターゲットを探索する逆最近傍探索に対する注目が高まっている．逆最近傍探索は，同じグループに所属するクエリと複数のターゲットとの関係をもとに探索する単色逆最近傍 (Monochromatic-RkNN) 探索と，二種類のオブジェクトグループに分けて，あるグループのクエリと他方のグループに所属する複数のターゲットとの関係をもとに探索する二色逆最近傍(Bichromatic-RkNN) 探索に分類される．本研究では，二色逆最近傍探索について考える．

既存の二色逆最近傍探索では，ネットワーク距離を用いた手法は，オブジェクトの探索数が 1 の場合に限定されていた．本研究では，ネットワーク距離において探索数が 2 以上の場合に対応した二色逆最近傍探索手法を提案する．

2. 二色逆最近傍探索

二色逆最近傍(Bichromatic-RkNN,以下,BRkNN) 探索は，二つのグループで構成されたオブジェクト間で逆最近傍を探索する．例えば，二つのコンビニエンスストアのグループ A, B がある営業エリア内でそれぞれ複数の店舗を営業している場合，グループ A に所属するオブジェクトがグループ B に所属するオブジェクトを対象にした RkNN の関係を図 1 に示す．また，逆に，グループ B に所属するオブジェクトがグループ A に所属するオブジェクトを対象にした RkNN の関係を図 2 に示す．このような関係は，あるコンビニエンスストアのグループが次にオープンする新規店舗の場所を決める場合に利用できる．しかし，二色逆最近傍探索に関する研究は，グループ間でオブジェクトの探索方法が複雑であるため，

進んでいない．本研究では，グループ間でオブジェクト逆最近傍探索を行うため，二色逆最近傍探索を検討する．

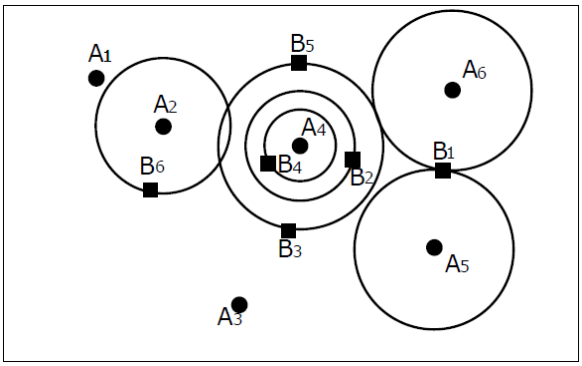


図 1：グループ A がクエリとなる場合

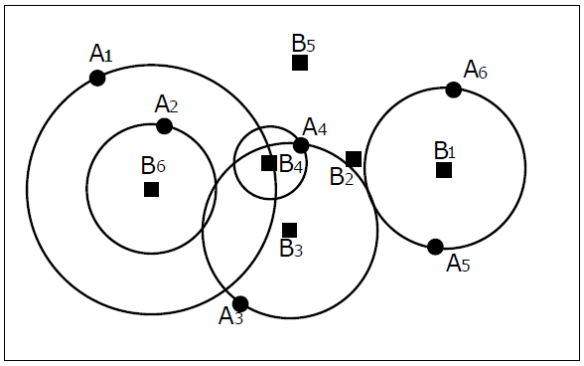


図 2：グループ B がクエリとなる場合

3. ネットワークボロノイ図

Voronoi Diagram（以下，ボロノイ図）は，空間ネットワーク上で任意の位置に複数個の点(以下，母点）を配置した状況で，同じ空間上に存在する点がどの母点に近いかに応じて領域分けした図である．図 3 は，二次元の空間ネットワーク上でユークリッド空間を用いたボロノイ図の例である．黒点は母点，白点は母点以外のオブジェクトである．白点のオブジェクトは，自身が存在する領域内にある母点を自身の最近傍とする．空間ネットワークにおけるユークリッド距離を用いたボロノイ図について，領域の境界線は，二つの母点間で構成される垂直二等分線の一部となる．

Network Voronoi Diagram（以下，ネットワークボロノイ図）は，空間ネットワーク上でネットワーク距離を用いたボロノイ図である．図 4 に，二次元の空間ネットワーク上でネットワーク距離を用いたネットワークボロノイ図の例を示す．*p1*, *p2* および *p3* は母点となるオブジェクトであり，*s1*, …,

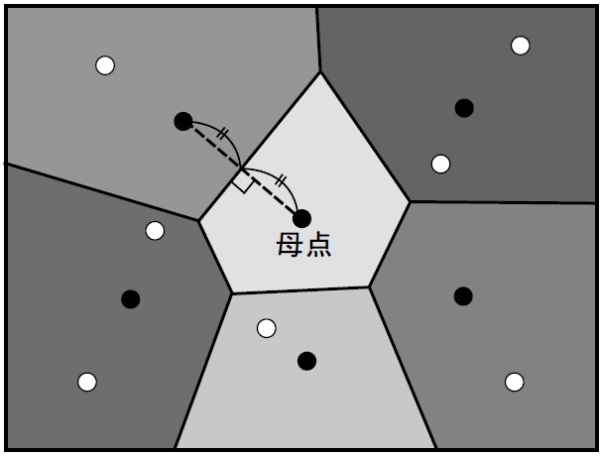


図 3：ボロノイ図

s15 は母点以外のオブジェクトである．空間ネットワーク上におけるオブジェクト間の経路上に存在する四角形は，母点が構成する領域の境界を表す．

図 4 の場合，オブジェクト *s1*, *s2*, *s3* は，母点 *p1* を自身の最近傍とするオブジェクトとなる．同様に，オブジェクト *s7*, *s8*, *s9*, *s12*, *s13* は母点 p2，オブジェクト *s4*, *s5*, *s6*, *s10*, *s11*, *s14*, *s15* は母点 *p3* を自身の最近傍とするオブジェクトとなる．

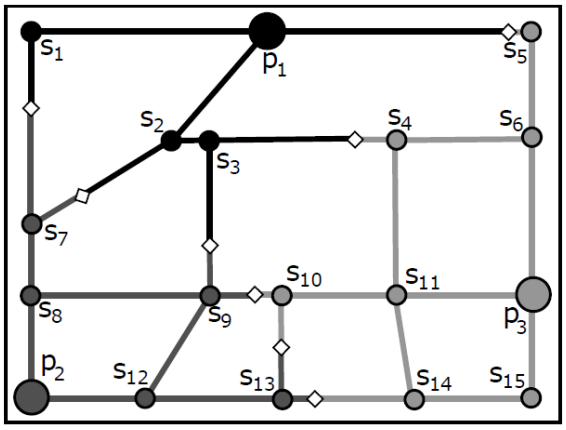


図 4：ネットワークボロノイ図

4. 提案手法

空間ネットワークにおいて，探索数 k が 2 以上の場合に対応した BRkNN 手法を提案する．提案手法では，ターゲットを母点としたネットワークボロノイ図を作成した後，各ターゲットの kNN を三つのステップに分けて探索し，条件を満たさないターゲット候補の除外(以下，刈取り）を行う．ターゲットからの距離がクエリよりも短いオブジェクトを k 個

検出した場合，このターゲットはクエリの BRkNN ではないため，除外する．すべてのターゲットに対する探索が終了した段階で除外されなかったターゲットは，クエリの BRkNN となる．

4.1 探索手順

$k \geq 2$ の場合に対応した提案手法におけるターゲットの探索手順を説明する．提案手法のアルゴリズムは，$k = 1$の場合のみに対応した既存手法[2]のアルゴリズムを拡張して作成した．

初めに，ターゲットを母点としたネットワークボロノイ図を作成する．次に，すべてのターゲットに対して三つのステップで刈取りを行いながら探索して，クエリの BRkNN となるターゲットを求める．

4.2 ネットワークボロノイ図の作成

初めに，n 個のターゲット p_1, p_2, …, p_n を母点として，ネットワークボロノイ図を作成する．ネットワークボロノイ図の作成は，論文[3] で用いられているアルゴリズムを使用する．

4.2.1 ステップ 1 ： ネットワーク距離を用いた刈取り

クエリとターゲット pk とのネットワーク距離を測定した上で，pk を母点とするボロノイ領域 $VP(pk)$ 内に存在するクエリと同じグループに所属するオブジェクトとのネットワーク距離を比較する．pk とのネットワーク距離がクエリよりも短いオブジェクトが k 個以上存在する場合，pk は，クエリの BRkNN とはならないため，候補から除外し，次のターゲットの処理に移行する．pk とのネットワーク距離がクエリよりも短いオブジェクトが k 個未満となる場合，ステップ 2 に移行する．

5.2.2 ステップ 2 ： ユークリッド距離を半径とする円を用いた刈取り

ステップ 2 では，クエリと pk とのユークリッド距離を半径，pk を中心とする円を作成し，円内の領域と重なるすべてのボロノイ領域に対して，ステップ 1 と同じ処理を行う．ステップ 2 で探索するオブジェクトと pk とのユークリッド距離は，クエリと pk とのユークリッド距離よりも短くなる可能性が高い．これは，二つのオブジェクト間のユークリッド距離が短い場合は，ネットワーク距離も短くなる可能性が高いためである．ステップ 2 を実行することで，ステップ 3 で候補となるオブジェクトをすべて探索する場合に比べて探索時間を短縮できる．

4.2.3 ステップ 3 ： ネットワーク距離を半径とする円を用いた刈取り

クエリと pk とのネットワーク距離を半径，pk を中心とする円を作成し，円内の領域と重なるボロノイ領域のうち，ステップ 2 で探索した領域以外の領域に対して，ステップ 1 と同じ処理を行う．このとき，円の外側の領域にあるオブジェクトと pk とのユークリッド距離は，クエリと pk とのネットワーク距離より長くなる．一般的に，二つのオブジェクト間の距離について，ネットワーク距離はユークリッド距離より長くなるため，円の外側の領域にあるオブジェクトと pk とのネットワーク距離は，クエリと pk とのネットワーク距離より長くなる．したがって，ステップ 3 が終了した時点で，クエリより pk に近いオブジェクトが k 個未満である場合，pk はクエリの BRkNN となる．

4.3 導入例

図 4 のネットワークボロノイ図を例にして，提案手法を実行する．$s3$ をクエリ Q, $k = 2$ とし，$p1$ に対してステップ 1 から 3 を適用した．以下で，処理手順を順番に説明する．

1. ステップ 1 で，ボロノイ領域 $VP(p1)$ 内において，クエリと同じグループでクエリを除くオブジェクトをすべて探索する．$VP(p1)$ 内において，対象となるオブジェクトは $s1$, $s2$ であるため，この二つのオブジェクトと $p1$ とのユークリッド距離をそれぞれ求め，SQ に格納し，DE の長さをもとに SQ の各要素を昇順でソートする．

2. $p1$ と Q とのネットワーク距離 $DN(p1, Q)$ を求め，$DE(p1, s2)$ と比較する．ステップ 1 の 3. より，$DE(p1, s2) < DN(p1, Q)$ であるため，$DN(p1, s2)$ を

求め，*DN(p1, Q)* と比較する．このとき，*DN(p1, s2)* < DN(p1;Q) であるため，*k* の値を 1 減らし，*k* = 1 とする．次に，*DE(p1, s1)* と *DN(p1, Q)* を比較する．*DE(p1, s1)* > *DN(p1, Q)* であるため，ステップ 1 の 3. より *SQ* を空にし，ステップ 2 へ．

3. *e* = *DE(p1, Q)* を求め，中心 *p1*，半径 *e* の円 *C1* を作成する．図 5 に，*DE(p1, Q)* を半径とする円 *C1* を作成した様子を示す．円 *C1* 内の領域と重なるボロノイ領域を求め，キュー*PQ'* に格納する．このとき，円 *C1* 内の領域と重なるボロノイ領域は存在しないため，*PQ'* は空となり，同時にキューPQ も空となる．ステップ 2 の 5. より，ステップ 3 へ．

4. *e'* = *DN(p1, Q)* を求め，中心 *p1*，半径 *e'* の円 *C2* を作成する．図 6 に，*DN(p1, Q)* を半径とする円 *C2* を作成した様子を示す．円 *C2* 内の領域と重なるボロノイ領域となる *VP(p3)* に存在する各母点と *p1* とのユークリッド距離を求め，*PQ''* に格納する．次に，*PQ''* にあり *PQ'* にはない *VP(p)* の要素を *PQ* に格納する．

5. *PQ* に格納されている先頭の要素 *VP(p3)* を取り出し，*VP(p3)* 内に存在するターゲット以外のオブジェクトである *s4*, *s5*, *s6*, *s10*, *s11*, *s14*, *s15* と *p1* とのユークリッド距離をそれぞれ求め，*SQ* に格納し，*DE* の長さをもとに *SQ* の各要素を昇順でソートする．

6. *DE(p1, s4)* < *DN(p1, Q)* であるため，DN(p1, s4) を求め，DN(p1, Q) と比較する．*DN(p1, s4)* > *DN(p1, Q)* であるため，ステップ 1 の 2. へ．

7. *DE(p1, s5)* > *DN(p1, Q)* であるため，ステップ 1 の 3. より，ステップ 2 へ．また，ステップ 2 の 5. より， *PQ* が空であるため，ステップ 3 へ．ステップ 3 の 4. より，探索処理を終了し，*p1* は *Q* の BRkNN となる．

5. 評価

提案手法の有用性を検証するため，計算機上でシミュレーション評価を行った．比較する手法として，あるターゲットに対して，クエリとの距離と，クエリと同じグループに所属するクエリ以外のオブジェクトとの距離の二つを順番に比較し，ターゲットとクエリとの距離より短いオブジェクトが k 個見つかった時点で次のターゲットの探索に移行する線形探索を用いる．提案手法および線形探索のプログラムは，C 言語で作成した．

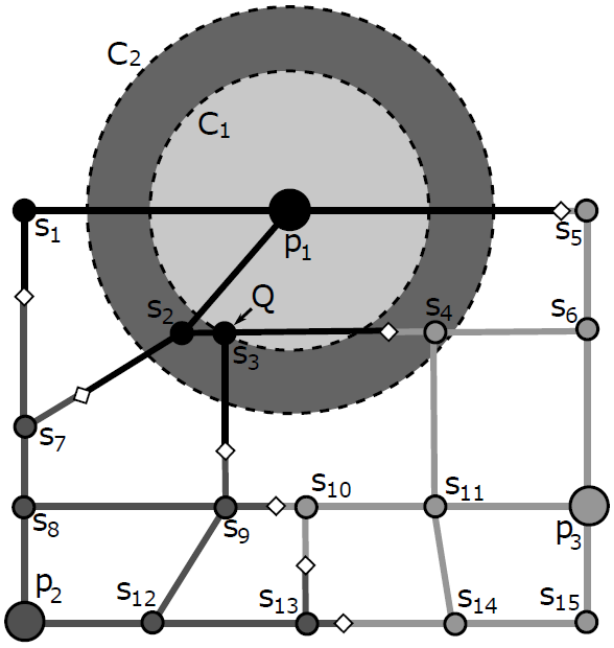


図 5：*DE(p1,Q)* を半径とする円 *C1* の作成

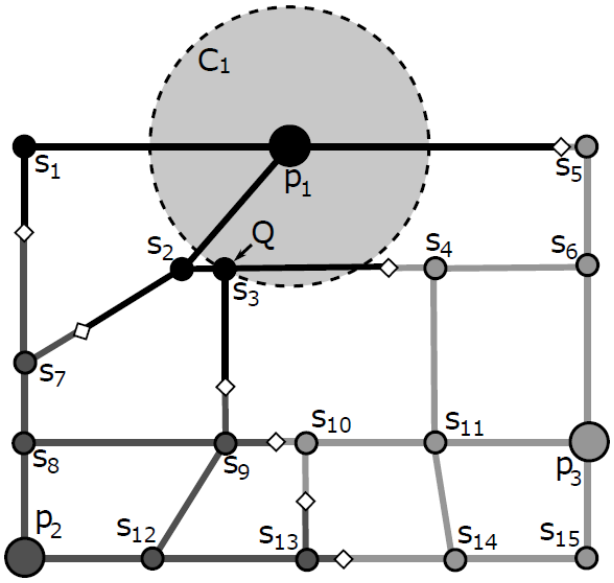


図 6：*DN(p1,Q)* を半径とする円 *C2* の作成

5.1 評価環境

計算機シミュレーションによる評価環境について，以下に示す．

・空間内のオブジェクト数は，100 とする．

・空間の大きさは，縦 1000，横 1000 の二次元領域とする．

・探索の実行時間を 110 回計測し，実行時間の上位 5 回と下位 5 回を除く計 100 回の平均を用いて評価する．

5.2 探索数の影響

探索数 k の値を変化させた場合の探索時間の変化を図 6.1 に示す．横軸は探索数，縦軸は二色逆最近傍探索の実行時間である．比較評価として，提案手法と線形探索の二つを用いる．探索数は，1 から 10 とし，ターゲットの数は 10 個と 50 個の二つの場合で，提案手法と線形探索それぞれについて，BRkNN の実行時間を算出した．

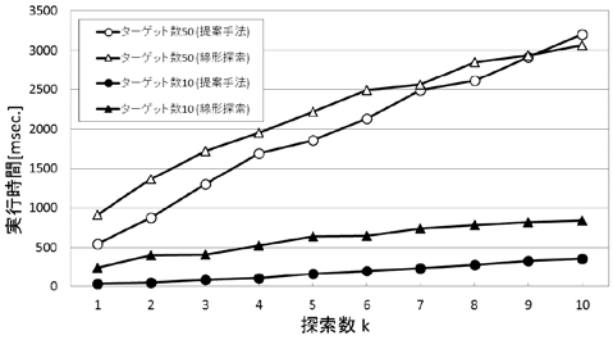


図 7：探索数と実行時間

図 7 より，探索数が増加すると，距離の比較対象となるオブジェクト数が増加するため，提案手法と線形探索のどちらでも実行時間は長大化する．特に，ターゲット数が同数の場合，ほぼすべての場合において，提案手法による探索の実行時間は線形探索に比べて短いことが分かる．また，ターゲット数が 50，探索数 k が 9 または 10 の場合，線形探索の実行時間は提案手法に比べて短い．探索数とターゲット数がどちらも多い場合，距離の比較対象となるオブジェクト数が多くなり，かつクエリと同じグループのオブジェクト数が少なくなるため，提案手法と線形探索で探索するオブジェクト数はほぼ同じになる．提案手法では，距離を比較すべきオブジェクトか否かの判別処理を行うため，この処理時間の影響で，線形探索に比べて実行時間が長くなると考えられる．

5.3 ターゲット数の影響

ターゲット数を変化させた場合の探索時間の変化を図 6.2 に示す．横軸はターゲット数，縦軸は二色逆最近傍探索の実行時間である．ターゲット数は，10 から 90 まで 10 刻みとし，探索数は 1 個と 5 個の場合で，提案手法と線形探索それぞれについて BRkNN の実行時間を算出した．

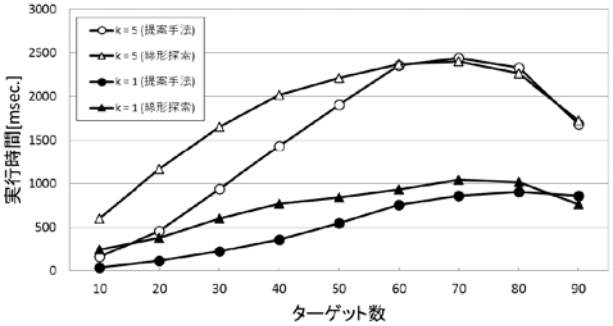


図 8：ターゲット数と実行時間

図 8 より，探索数 k が同じ場合，提案手法の実行時間は線形探索に比べて短いことが分かる．また，探索数が 5，ターゲット数が 60 以上の場合，提案手法と線形探索の実行時間の差はほとんど無い．一方で，探索数が 5 でターゲット数が 70 以上の場合，ターゲット数の増加にともない，実行時間は短くなる．これは，ターゲット数がクエリと同じグループのオブジェクト数より多くなることで，提案手法と線形探索のそれぞれで距離を比較するオブジェクト数がほぼ同じになるとともに，距離を比較するオブジェクト数が少なくなるためであると考えられる．

6. おわりに

本研究では，ネットワーク距離を用いた空間ネットワーク上のオブジェクト探索において，オブジェクトの探索数が 2 以上の場合に対応した二色逆最近傍探索手法を提案した．提案手法は，ネットワークボロノイ図を作成した後，各ターゲットの kNN を三つのステップに分けて探索し，条件を満たさないターゲット候補の除外を行うことで，実行時間を短縮する．評価の結果，空間の大きさが縦 1000，横 1000 の二次元空間でオブジェクト数が 100 の場合，提案手法における実行時間は線形探索に比べて短縮できることが分かった．

今後の予定として，オブジェクトが空間ネットワーク上を動的に移動する場合において，二色逆最近傍探索の実行時間を短縮する手法を提案する．

【参考文献】

[1] D. Taniar. and W. Rehayu, A Taxonomy for Nearest Neighbour Queries in Spatial Databases, Journal of Computer and System Sciences (JCSS), Vol.79, Issue 7, pp.1017-1039 (2013).

[2] Q.T. Tran, D. Taniar, and M. Safar, Bichromatic reverse nearest-neighbor search in mobile system, IEEE Systems Journal, Vol.4, No.2, pp.230-242 (2010).

[3] 木部宏昭, 蒲原智也, 大西真晶, 上島紳一, ネットワークボロノイ図を用いた指定範囲を結ぶ経路の生成および評価", 電子情報通信学会第 18 回データ工学ワークショップ (DEWS2007), C8-5 (2007).

エキシプレックス/エキシマー有機円偏光発光色素の開発

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) を示す有機色素の開発研究が活発である。しかし既存の発光色素を CPL 色素に変える手法は限られていた。本研究では任意の多環芳香族炭化水素色素 (発光団) をエキシマー CPL 色素へ変える手法を見出すことを目指した。キラルナフタレン四量体に 1-, 2-, 4-ピレニル、2-, 3-ペリレニル、2-アンスリルをエステル結合を介して 6 つ導入したところ、導入した発光団由来の強いエキシマー CPL が観測された。理論計算により、基底状態と励起状態共に発光団はねじれて配置されていることが明らかになった。また、導入する発光団によって CPL の正負が異なり、右周りにねじれたエキシマーは正の CPL を、左回りにねじれたエキシマーは負の CPL を示すという経験則が導かれた。

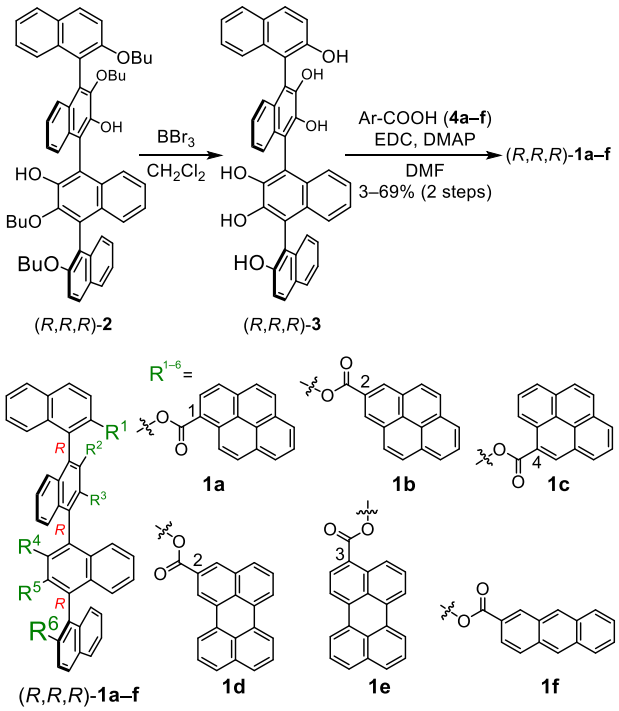
【1. はじめに】

近年、円偏光発光性 (CPL) が注目されており、ヘリセン、ビナフチル、シクロファンなどの骨格を利用した有機 CPL 色素の開発研究が展開されている。一方で多環芳香族炭化水素色素はエキシマー形成に伴う大きな蛍光量子収率とストークスシフトを併せ持つため、理想的な CPL 色素候補である。しかしながら一部のピレンを除くと、これらを CPL を色素に変えられる手法はほとんど知られていない。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。本研究ではナフタレン四量体をキラルな足場として捉え、汎用性の高い 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、エキシマー発光性を示すピレン、ペリレン、アントラセンを選択し、以下の研究を行った。

【2. 発光団連結ナフタレン四量体の合成】

(*R*,*R*,*R*)-ナフタレン四量体に 1-ピレニル (**1a**)、2-ピレニル (**1b**)、4-ピレニル (**1c**)、2-ペリレニル (**1d**)、3-ペリレニル (**1e**)、2-アンスリル (**1f**) がエステル結合を介して 6 つ連結された化合物を設計し、合成した (Scheme 1)。(*R*,*R*,*R*)-**2** は (*R*)-BINOL から 3 工程で合成した。次に、(*R*,*R*,*R*)-**2** へ三臭化ホウ素を作用させて脱ブチル化し、(*R*,*R*,*R*)-**3** を得た。最後に各種カルボン酸 **4a–f** (Ar-COOH) と縮合させ目的物を得た (2 段階で 3–69% 収率)。

Scheme 1. Synthesis of (*R*,*R*,*R*)-**1a–f**.



【3. ナフタレン四量体 1a–f の光学特性】

(*R*,*R*,*R*)-**1a–f** の溶液は無色または薄い黄色であったが、ここへ紫外光を照射するといずれも可視光領域で発光し、様々な色調を示した (Figure 1)。

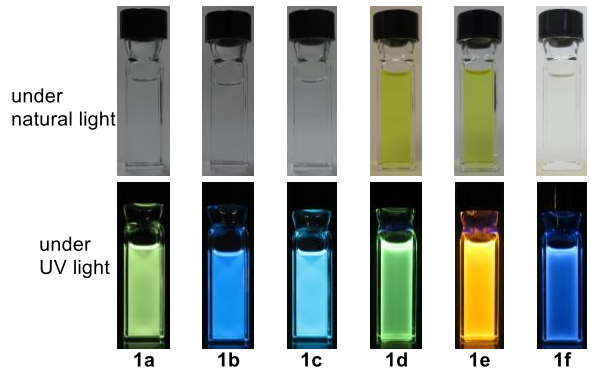


Figure 1. Photographs of solutions of **1a–f**. Conditions: 6.6×10^{-6} M, rt, CH_2Cl_2 solutions for **1a–c** and **1f** and THF solutions for **1d** and **1e**.

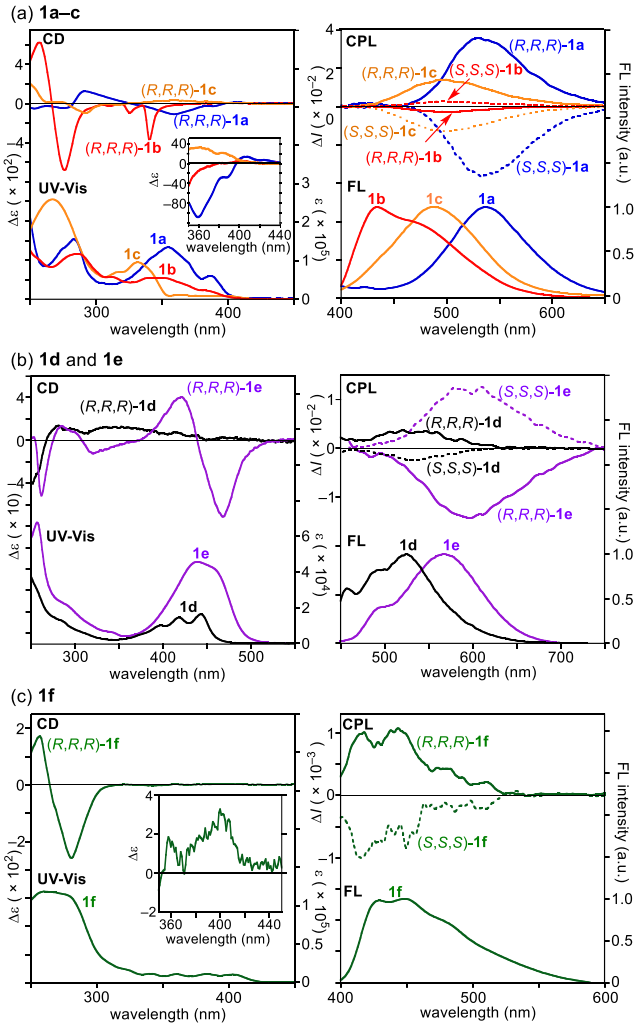


Figure 2. CD, UV-Vis, CPL, and FL spectra of (a) **1a–c** in CH_2Cl_2, (b) **1d** and **1e** in THF, and (c) **1f** in CH_2Cl_2. Conditions: λ_{ex} = 355 nm for **1a** and **1c**, 338 nm for **1b**, 380 nm for **1d** and **1e**, 340 nm for **1f**, 20 °C, light path length = 10 mm, [**1a–e**] = 1.0×10^{-6} M, [**1f**] = 1.3×10^{-6} M.

Figure 2 に CD, UV-Vis, CPL, FL スペクトルを示す。ナフタレン四量体骨格の吸収波長は 320 nm 以下であることが分かっているため、それ以上の波長領域は導入した発光団のみに由来する。いずれも発光団のみに由来する吸収領域で CD が観測された。これは発光団がキラルな環境にあることを示している。特に (*R*,*R*,*R*)-**1e** では明確な負の分裂型のシグナルが観測され、隣接するペリレン環が反時計回りに位置していることが予想された。

FL スペクトルでは **1a–f** はいずれもエキシマー発光と思われるシグナルを示した。蛍光量子収率 (Φ_{FL}) は典型的なエキシマー発光の値を維持しており、**1a**: 0.24, **1b**: 0.35, **1c**: 0.67, **1d**: 0.24, **1e**: 0.38, **1f**: 0.03 であった。また、**1a–f** はいずれも CPL を示した。私たちが知る限り、**1b**, **1c**, **1d**, **1f** はそれぞれ CPL を示す初めての 2-ピレニル、4-ピレニル、2-ペリレニル、2-アンスリルの例である。CPL の効率の指標となる異方性因子 $|g_{lum}|$ は有機色素としては高い値を示し、**1a**: 0.037、**1b**: 2.8×10^{-3}, **1c**: 0.014, **1d**: 3.3×10^{-3}, **1e**: 0.013, **1f**: 1.0×10^{-3} であった。中央の立体配置が異なるジアステレオマー (*R*,*S*,*R*)-**1a** の $|g_{lum}|$ は 1.8×10^{-3} であり、(*R*,*R*,*R*)-**1a** の約 20 分の 1 であった。このことは、大きな $|g_{lum}|$ を得るためにはナフタレン四量体の軸の立体配置を統一させる必要であることを示している。興味深いことに CPL の正負は化合物によって異なり、(*R*,*R*,*R*)-**1a**, **1c**, **1d**, **1f** は正の CPL を示し、(*R*,*R*,*R*)-**1b**, **1e** は負の CPL を示した。CPL の正負は最も長波長の CD の正負と一致しており、基底状態と励起状態で立体配置がある程度近いことが示唆された。

【4. 理論計算による立体構造の推測】

CPL 特性と立体構造の相関を明らかにするため、DFT 計算によって (*R*,*R*,*R*)-**1a–f** の最安定構造を求めた (Figure 3)。計算は Coulomb-attenuating method (CAM)-B3LYP/6-31G(d,p) level で行った。**1a–f** は以下の構造的な特徴 (1)–(4) を有していた。

(1) **1a–f** のナフタレン四量体の隣り合うナフタレン環はおよそ直行し、左回りらせん状に配列する。

(2) R^1 と R^2, R^3 と R^4, R^5 と R^6 は互いの立体障

害によって離れて位置する。

(3) 隣り合うカルボニル基は双極子–双極子反発によって互いに反対を向く。

(4) エキシマーを形成すると考えられる発光団のペア (R^2 と R^3, R^4 と R^5) は一方向にねじれて位置する。

また、準安定構造の計算結果から R^1 と R^6 はエキシマーを形成しないが、この立体配座の固定に大きく関与していることが伺えた。R^1 と R^6 に由来するモノマー発光が観測されなかったことから、発光団間で早いエネルギー移動が起こっていることが示唆された。

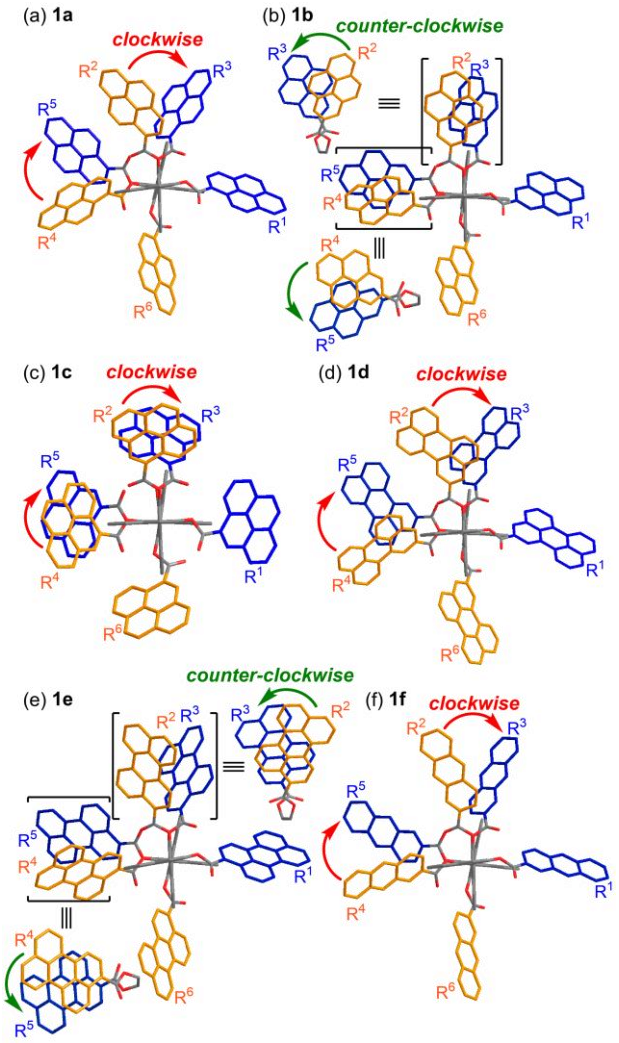


Figure 3. Top views of the DFT-optimized structures of (*R*,*R*,*R*)-**1a**–**f** (PAHs are shown alternately in blue and orange) at the CAM-B3LYP/6-31G(d,p) level.

発光団のねじれの方向は **1a**, **1c**, **1d**, **1f** は時計回り、**1b**, **1e** は反時計回りであった。強調すべきは発光団が時計周りの化合物は正の CPL を示し、反時計周りの化合物は負の CPL を示すという経験則が導かれたことである。さらに、理論計算によって基底状態と励起状態のねじれ方向は同一であることも確認できた。

【5. まとめ】

任意の発光団を CPL 色素に変えられる手法の確立を目指し、ナフタレン四量体に 1-, 2-, 4-ピレニル、2-, 3-ペリレニル、2-アンスリルをエステル結合を介して 6 つ導入した化合物 **1a**–**f** を設計し、キラル BINOL から 5 工程で合成した。いずれも導入した発光団に由来する優れたエキシマー CPL を示した。蛍光量子収率も比較的高く、顕著な消光は観測されなかった。CPL の正負は化合物によって異なっており、発光団が時計周りの化合物は正の CPL を示し、反時計周りの化合物は負の CPL を示した。このように発光団がねじれの方向と相関があることが明らかになった。本研究で見出した手法は任意の蛍光団に適用できる可能性が高い。また、CPL シグナルの符号から立体配置を予測するという使い方もできるのではないかと考えている。

【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】

“Evolving Fluorophores into Circularly Polarized Luminophores with a Chiral Naphthalene Tetramer: Proposal of Excimer Chirality Rule for CPL”
Takaishi, K.; Iwachido, K.; Takehana, R.; Uchiyama, M.; Ema, T.
J. Am. Chem. Soc. **2019**, *141*, in press. (DOI: 10.1021/jacs.9b02582)

破骨細胞のアポトーシスを誘導する SB-203207 の全合成と高活性アナログの創製

岡山大学大学院自然科学研究科

早川一郎

アルテミシジンは，1989 年に放線菌から単離されたモノテルペンアルカロイドであり，抗腫瘍活性を示すことが知られている．また，類縁体の SB-203207 はイソロイシル tRNA 合成酵素阻害活性を示し，骨粗鬆症薬のリード化合物として期待されている．我々は，分子の立体化学に着目した構造活性相関研究，即ち『立体構造活性相関』への展開を指向した戦略により，SB-203207 の合成研究を行うことにした．その結果，SB-203207 のシクロペンタン部分に対応する含窒素四置換炭素を含む四連続立体中心を，立体選択的に構築することができた．

アルテミシジン(**1**)は, 竹内らによって 1989 年に宮城県蒲生の海泥から発見された放線菌である *Streptomyces sioyaensis* SA-1758 から単離されたモノテルペンアルカロイドであり，抗腫瘍活性を示すことが知られている [1]．また，類縁体の SB-203207 (**2**)は GlaxoSmithKline のグループによって放線菌 *Streptomyces* sp. NCIMB 40513 から単離され，イソロイシル tRNA 合成酵素阻害活性を示す [2]．これら天然物の構造上の特徴として，5 員環上に含窒素四置換炭素を含む四連続立体中心を持つ点と側鎖上に天然物には珍しいスルホンアミド基を有する点が挙げられる．

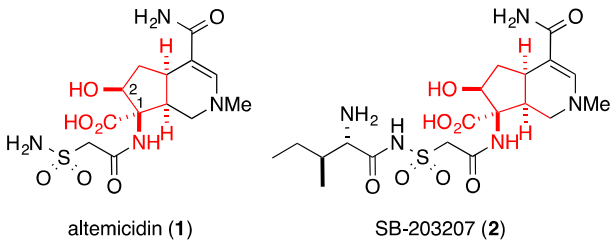


Figure 1. Structures of altemicidin-type alkaloids

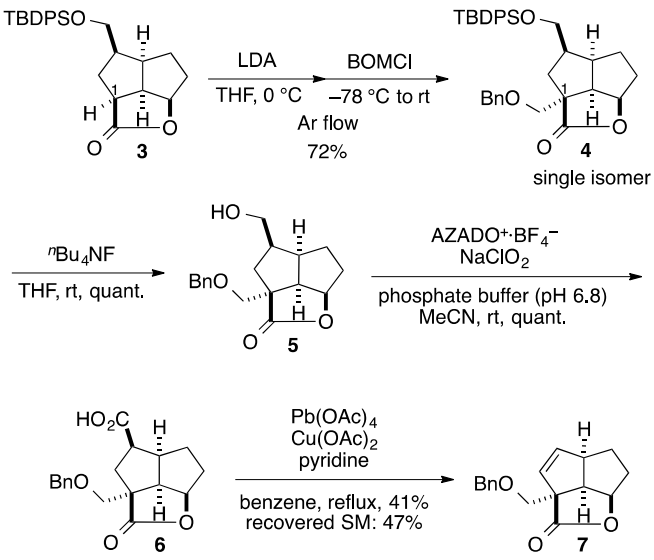
イソロイシル tRNA 合成酵素阻害活性を示す天然物としてリベロマイシン A[3]が知られており，この天然物は，成熟破骨細胞をアポトーシスへ誘導することから，骨粗鬆症薬のリード化合物として期待されている．すなわち，同じイソロイシル tRNA 合成酵素阻害活性を示す SB-203207 (**2**)も成熟破骨細胞をアポトーシスへ誘導する可能性があるが，それらについて検討された報告はこれまでにない．リベロマイシン A と SB-203207 (**2**)は，構造が大きく異なることから，活性発現メカニズムは異なる可能性が高い．すなわち, SB-203207 (**2**)は新しいタイプの骨粗鬆症薬のリード化合物として期待出来る．

一方，GlaxoSmithKline のグループによる SB-203207 (**2**)の tRNA 合成酵素阻害活性についての構造活性相関研究より，側鎖上のアミノ酸の違い，1 位の第四級炭素部分のカルボン酸の存在，および 2 位の第 2 級ヒドロキシ基の置換基の有無などが生物活性に重要であると報告されている [4]．しかし，これらの構造活性相関研究の結果に基づいた分子設計においては，活性に重要な四連続立体中心，特に 1 位の第四級炭素部分を簡略化された誘導体しか検討されていない [5]．そこで我々は，分子の立体化学に着目した構造活性相関研究，即ち『立体構造活性相関』への展開を指向した合成戦略により，SB-203207 (**2**)の全合成を行い，骨粗鬆症治療薬としてのポテンシャルを評価することを計画した．酵素は三次構造を有する巨大な分子であり，その表面に基質との結合に適する凹凸型の活性部位が存在している．この活性部位と基質である低分子が水素結合，静電相互作用，および共有結合することにより生物活性が発現する．そこで，基質の立体化学の改変により基質全体の三次元構造が変わることで，基質と酵素が，より多点で相互作用をすることが可能となり，酵素特

異性の向上や新たな生物活性の発見が期待できると考えた.

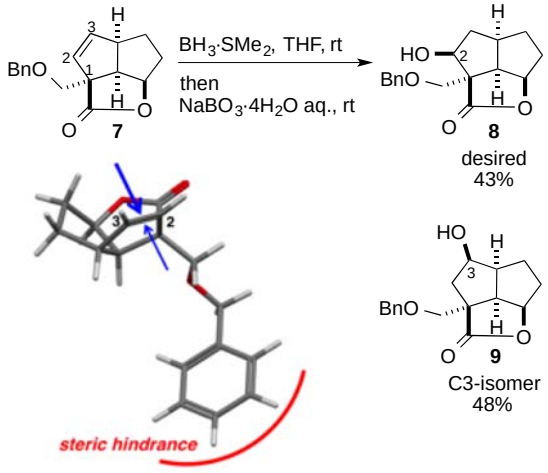
四連続立体中心の構築

SB-203207 (**2**)のシクロペンタン部分に対応する, 四連続立体中心の立体選択的構築を検討した(Scheme 1). ラクトン **3** に対して LDA を作用させ, 生じたカルボアニオンを求電子剤であるベンジルクロロメチルエーテルと反応させたところ, 1 位に目的の立体化学の不斉第四級炭素が導入された **4** を単一の立体異性体として得ることができた. この立体選択性は, ラクトン **3** がお椀型構造をしていることから, 生じたカルボアニオンの convex 面から立体選択的に求電子剤へ攻撃したことにより, 立体化学が完璧にコントロールされたと考えている. 得られた **4** の TBDPS 基を除去し, 生じた第 1 級ヒドロキシ基を $AZADO^{+}\cdot BF_4^{-}$で酸化することでカルボン酸 **6** へ変換した. **6** に対して四酢酸鉛と酢酸銅を用いて酸化的に脱炭酸を行い, アルケン **7** を得た.



Scheme 1. Synthesis of alkene **7**

アルケン **7** に対するヒドロホウ素化ー酸化反応による 2 位のヒドロキシ基の立体選択的導入を試みた (Scheme 2). ホウ素反応剤として $BH_3\cdot SMe_2$ を用いて反応を行ったところ, 位置選択性は発現しなかったが, 2 位に目的の立体化学のヒドロキシ基を有するラクトン **8** を得ることができた. お椀型分子の場合, ヒドロホウ素化は convex 面から反応が進行すると考えられるが, アルケン **7** の 1 位のベンジルメチルエーテル基が立体障害となり, より空いている concave 面から反応が進行したため, 2 位に目的の立体化学を有するヒドロキシ基が導入できたと考えられる. 以上の検討により, SB-203207 (**2**)のシクロペンタン上に全て目的の立体化学を有する官能基を導入することができた.



Scheme 2. Stereoselective introduction of the hydroxyl group at C2

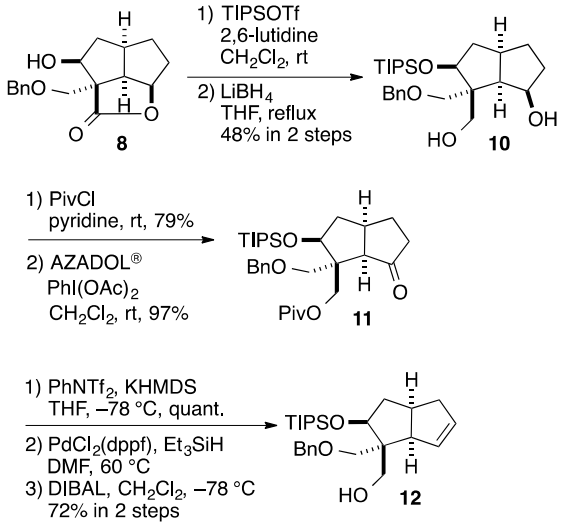
含窒素四置換炭素の構築

続いて, 1 位の含窒素四置換炭素を Curtius 転位によって導入するための前駆体である, カルボン酸 **14** の合成を行った (Scheme 3). ラクトン **8** の第 2 級ヒドロキシ基を TIPS 基で保護し, ラクトン部分を水素化ホウ素化リチウムによって開環し, ジオール **10** を得た. **10** の第 1 級ヒドロキシ基を選択的に Piv 基で保護し, 第 2 級ヒドロキシ基を AZADOL®で酸化することでケトン **11** へと変換した. **11** に対するエノールトリフラート化, 続く Pd 触媒を用いた還元反応により 5 員環上にアルケンを導入し, Piv 基を除去することによってアルコール **12** を得た.

続いて, アルコール **12** の第 1 級ヒドロキシ基を AZADOL®によりアルデヒド **13** へ変換し, **13** に対して Pinnick 酸化を行う, 2 段階の酸化反応によるカルボン酸 **14** の合成を検討した (Table 1). Entry 1 では一般的な Pinnick 酸化の条件下で反応を行ったところ, 目的のカルボン酸 **14** を得ることはできたが, クロロラクトン **15** が大量に副生した. クロロラクトン

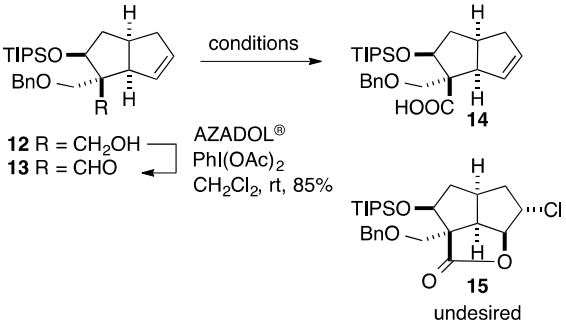
15 が生成した原因として，系中で発生した亜塩素酸ナトリウム由来のクロロニウムカチオンが，目的物である **14** のアルケン部分と反応し，クロロラクトン化を引き起こしたと考えられる．

そこで，entry 2 では resorcinol をクロロニウムカチオンのスカベンジャーとして用いたところ，クロロラクトン化を大幅に抑制することができ，目的の **14** が収率 93%で得られた．



Scheme 3. Synthesis of the precursor for the Curtius rearrangement

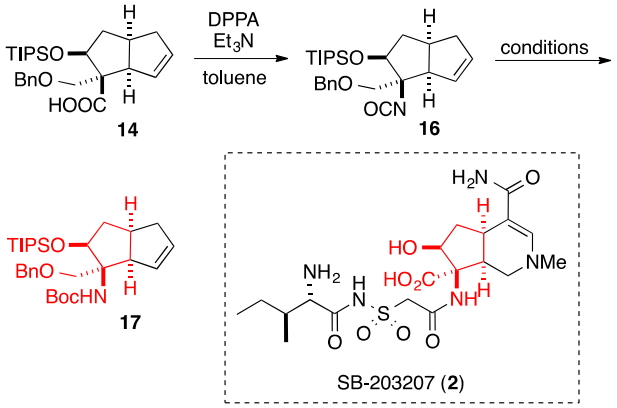
Table 1. Oxidation of the primary hydroxy group of **12**



entry	conditions	**14** (%)	**15** (%)
1	$NaClO_2$, $NaH_2PO_4{\cdot}4H_2O$ 2-methyl-2-butene ^{t}BuOH/H_2O, rt	18	79
2	$NaClO_2$, $NaH_2PO_4{\cdot}4H_2O$ resorcinol 1,4-dioxane/H_2O, rt	93	trace

得られたカルボン酸**5**に対する Curtius 転位を検討した (Table 2). Entry 1 では **14** に対して DPPA と Et_3N を用いてイソシアネート **16** へと変換し，TMSCl 存在下，^{t}BuOH を用いて Boc カルバメート **17** への変換を検討した．しかし，目的の Boc カルバメート **17** は得られず，イソシアネート **16** が収率 92%で回収された．すなわち，Curtius 転位は問題なく進行しているものの，イソシアネート基がネオペンチル位であるため，^{t}BuOH の付加反応が進行しにくいことが考えられた．そこで，求核性の高い ^{t}BuOLi を用いて反応を行ったところ，目的の反応は進行し，Boc カルバメート **17** を 2 工程収率 52%で得ることができた（entry 2）．以上の検討により，含窒素四置換炭素を導入し，SB-203207 (**2**)のシクロペンタン部分に対応する四連続立体中心を立体選択的に構築することができた．

Table 2. Optimization of the Curtius rearrangent of **14**

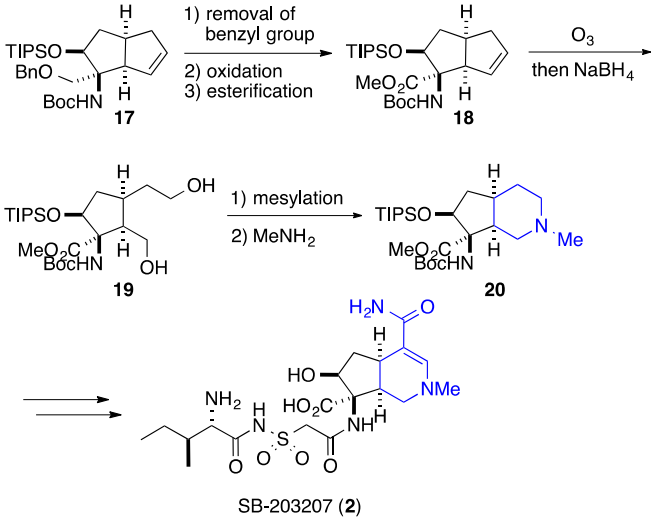


entry	conditions	results
1	^{t}BuOH, TMSCl CH_2Cl_2, rt	isocyanate **16** 95%
2	^{t}BuOLi THF, rt	**17** 52% in 2 steps

まとめ

SB-203207 (**2**)の立体構造活性相関研究を可能とする合成経路の開発を行った．三環性ラクトン **3** から分子の形状を利用した立体選択的アルキル化とヒドロホウ素化ー酸化反応により，1 位不斉第四級炭素と 2 位ヒドロキシ基を導入した．さらに，Curtius 転位によるアミノ基の導入を行い，SB-203207 (**2**)のシクロペンタン部分に対応する含窒素四置換炭素を含む四連続立体中心の立体選択的構築を達成した．今後，**17** のベンジル基の除去，生じたヒドロキシ基の酸化，エステル化により **18** を合成し，オレフィン部分をオゾン分解によりジオール **19** を調製する

(Scheme 4). 2 つのヒドロキシ基をメシル化後，$MeNH_2$ と反応させることにより，SB-203207 (**2**)の *N*-メチルピペリジン環を構築する．その後，官能基変換を経て，SB-203207 (**2**)の全合成を目指す．



Scheme 4. Future plan

謝辞

本研究は岡山大学大学院自然科学研究科　永易杏菜　修士によって遂行されたものです．日々の献身的な努力に厚く御礼申し上げます．また，本研究を財政的に支えて頂いた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に感謝いたします．

参考文献

1. a) Takahashi, A.; Kurasawa, S.; Ikeda, D.; Okami, Y.; Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1556–1561; b) Takahashi, A.; Ikeda, D.; Nakamura, H.; Nakagawa, H.; Kurosawa, S.; Okami, Y.; Takeuchi, T., Iitaka Y. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1562–1566; c) Takahashi, A.; Nakagawa, H.; Ikeda, D.; Okami, Y. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3621–3632.
2. a) Stefanska, A. L.; Cassels R.; Ready, S. J.; Warr, S. R. *J. Antibiot*. **2000**, *53*, 357–363; b) Houge–Frydrych, C. S. V.; Gilpin, M. L.; Skett, P. W.; Tyler, J. W. *J. Antibiot*. **2000**, *53*, 364–372.
3. Woo, J.-T.; Kawatani, M.; Kato, M.; Shinki, T.; Yonezawa, T.; Kanoh, N.; Nakagawa, H.; Takami, M.; Lee, K. H.; Stern, P. H.; Nagi, K.; Osada, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4729–4734.
4. Banwell, M. G.; Crasto, C. F.; Easton, C. J.; Forrest, A. K.; Karoli, T.; March, D. R.; Mensha, L.; Nairn, M. R.; O'Hanlon, P. J.; Oldham, M. D.; Yue, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2263–2266.
5. a) Banwell, M. G.; Crasto, C. F.; Easton, C. J.; Karoli, T.; March, D. R.; Nairn, M. R.; O'Hanlon, P. J.; Oldham, M. D.; Willis, A. C.; Yue, W. *Chem. Commum*. **2001**, 2210–2211; b) Crasto, C. F.; Forrest, A. K.; Karoli, T.; March, D. R.; Mensha, L.; O'Hanlon, P. J.; Nairn, M. R.; Oldham, M. D.; Yue, W.; Banwell, M. G.; Easton, C. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *11*, 2687–2694.

高解像度の面的な地形データを用いた，旭川の河床変動解析の精度向上に関する検討

岡山大学　大学院環境生命科学研究科　准教授

吉田　圭介

近年，航空レーザ測深（ALB：Airborne Laser Bathymetry）技術の向上により，水域・陸域を問わず，面的な地形データの取得が可能となった．詳細な河道地形は，河川の流れと河床変動の数値解析の精度を向上させることが期待できる．しかし，ALB データによる地形の再現性が河床変動解析結果に及ぼす影響についてはこれまで具体的に検討されていない．そこで本研究では，まず，ALB 計測により得られたデータについて測量精度を検証した．次に，ALB データと定期横断測量データを用いて旭川洪水時の河床変動解析を行い，これらの結果と洪水前後の ALB 計測の河床高の差分を比較し，解析結果に与える地形データの影響について検討した．研究の結果，ALB 計測で得られた地形データは，定期横断測量結果と同様の地形形状を描くことができた．また，河床変動解析結果と ALB 計測の差分の比較より，ALB データを用いた解析結果の方が差分と近い傾向を示した．

１．はじめに

河川の維持管理や河道改修等の河川整備計画の策定のためには，河道形状を適切に把握することが必要不可欠である．広域的に河道内の地形情報を取得する方法として，従来，定期縦横断測量が行われてきた．この測量は縦断方向 200m を標準とし，河川の規模により適切な間隔で測線を設け，測線上の地形を計測する方法であり，測線上での地形の起伏や河積の縦断的な変化を把握することができる．しかし，この方法では測線間の地形情報は得られないため，澪筋の蛇行や深掘れ等の局所的な地形の変化を捉えられない可能性がある．また，河岸からの目視点検と同様に，河床変動や水衝たりに伴って生じる水面下の水理構造物の局所的な変状は調べられないため，定期縦横断測量は河川の維持管理において必ずしも十分とは言えない．

近年，水域も含めた面的な河道の地形情報を取得する方法として，航空レーザ測深（Airborne Laser Bathymetry，以下ALBとする）の技術が向上している．ALBは従来の航空レーザ（Laser Profiler，以下LPとする）計測で使用していた近赤外線レーザに加え，水中を透過する緑レーザを用いることで，LP計測では困難だった水域の地形データも取得でき，陸域・水域の連続的かつ面的な河道形状を把握することが可能である．現在，国内のいくつかの河川では計測が実施されており，精度検証を含め，河川測量への適用や河川管理への応用を検討した研究が行われている．

今後，ALBによる詳細な地形データは実河川の流況解析や河床変動解析で必要な河床高の空間解像度の検討，さらには解析モデルの性能把握の手段として活用できるものと思われる．一方で，実河川の河床変動解析においてALBデータを活用し，その影響並びに精度向上等を検討した研究例は殆ど無いのが現状である．

以上の背景を踏まえて，本研究では岡山県を流れる旭川の祇園地区を対象に，ALBデータと定期横断測量データを用いて，地形データの違いが洪水時の河床変動解析の結果に及ぼす影響について検討する．具体的には, 2017年に発生した洪水を対象に2つの地形データで解析を行い，それぞれの解析結果と，洪水を挟む2時期のALB計測の河床高の差分を比較することで，用いる地形データの影響について検討した．また，本研究では特に，著者らの既往研究を踏まえ，平面2次元モデルによる祇園地区(KP15.2)周辺の河床変動の再現性に及ぼす，400m上流の堰構造物の影響も検討する．

以下では解析結果を中心に記述する．ALB計測データの測量精度，および本研究で用いた河床変動解析手法(iRIC)に関しては著者等の既報[1)]およびiRICマニュアル[2)]を参照されたい．

２．ALB データを用いた河床変動解析

本研究で対象とする旭川祇園地区（**図**-1）は河道が湾曲し，瀬や淵，中州が存在する複雑な河道形状となっている．こうした河道で定期横断のみを内挿して地形データを作成した場合，詳細な地形を再現することは容易ではない．LP を用いることで高水敷や砂州などの陸域の詳細な再現は可能だが，水域に関しては基本的に定期横断データを用いるため，陸域・水域の連続的な地形, 水域の詳細な地形は不明瞭なままである．

一方，ALBデータは面的な河道形状を取得できるため，祇園地区のような河道形状が複雑な箇所でも，水域を含めた地形を詳細に再現することが可能である．

解析に用いる地形データによって，流況に変化が生じることから，それに伴って，河床変動の傾向も変化することが考えられる．

そこで本章では，ALBデータと定期横断測量データを用いて，2017年に岡山県旭川で発生した2つの洪水を対象とした河床変動解析を行う．得られた解析結果と洪水前後に計測された2時期のALB計測の河床高の標高差分を比較し，用いる地形データが河床変動解析に及ぼす影響を検討した．

(1) 解析条件

本研究で対象とするのは，旭川のKP14.4～16.4区間である（**図-1**）．解析に用いた計算格子は流下方向に581分割，横断方向に57分割，格子幅約4mである．また，計算時間間隔は0.05秒とした．

本解析では 2 つの地形データを用いて解析結果の比較を行う：①2017 年 3 月 ALB 計測から得られた地形データを用いた Case-A，②水域に 2013 年定期横断測量（縦断間隔 200m）の内挿データ，陸域に 2017 年 3 月の ALB データを用いた Case-MIP-A である．①は格子幅約 4m の計算格子の格子点から一番近い ALB データを抽出して作成した．ここで，抽出に用いた ALB データは，計測されたランダムな点群を，内挿補間により 2m 間隔の正方格子に格納したデータである．②は，近年，陸域で LP 計測のデータが多く利用されていることを踏まえ，陸域を ALB のデータに置き換えた．それぞれの河床高のコンター図と河床高の差分（Case-A の河床高から Case-MIP-A の河床高を差し引いた値：水域のみ）を**図-2** に示す．**図-2**(a),(b)の黒破線で囲んだ箇所のように，Case-A は Case-MIP-A に比べ，堰周辺の急な地形の変化や，中州周辺の複雑な地形等，水域の地形も詳細に再現できている．**図-2** (c)を見ても，低水路内は Case-A の方が河床高の低い箇所が広範囲で確認できる．これは，Case-MIP-A の場合，測線間は線形内挿されるため，深掘れ等の急な河床高の変化が再現できないためと考える．例えば，KP15.0～KP15.2 や KP15.6～KP15.8 の測線間では両データには 5m 程度相違があり，ALB の有用性が理解できる．

上流端流量は，旭川で発生した 2017 年 9 月洪水（2017 年 9 月 18 日／ピーク流量：1142m^3/s），10 月洪水（2017 年 10 月 23 日／ピーク流量：1317 m^3/s）である（生起確率約 1/2 年）．また，下流端水位は，9 月洪水では解析範囲下流端付近に設置されていた水位計の値を与えた．10 月洪水では水位計が設置されていなかったため，解析範囲の上流端を KP17.4，下流端を三野観測所のある KP11.6 まで広げて，別途行った流況解析結果から得られた KP14.4 地点の水位を与えた．それぞれの流量-水位ハイドログラフを**図-3** に示す．ここで，9 月洪水，10 月洪水は各ハイドロを与え，別々に解析を行っている．なお，10 月洪水の初期地形データに関しては，9 月洪水の河床変動解析結果を反映させた地形データ（9 月洪水の初期地形データに 9 月洪水の解析の河床変動量を加えた値）を用いて解析を行った．また，9 月洪水と 10 月洪水の間の流量は平水流量であったため，河床変動はほとんど生じていないと考える．

植生高については，**図-4** に示すように，計算格子の格子点から半径 2m 以内の ALB の植生高データ（DSM-DTM）を抽出し，それらを平均した値を解析

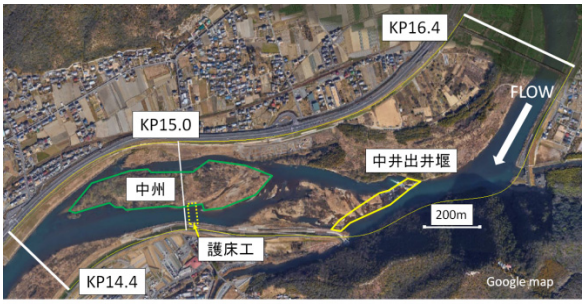
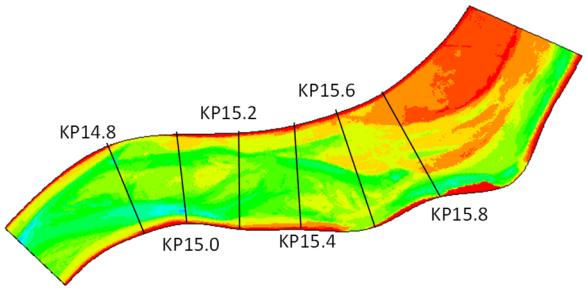
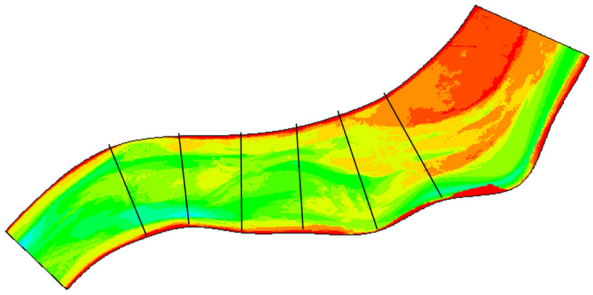


図-1　解析範囲



(a)　Case-A


(b)　Case-MIP-A

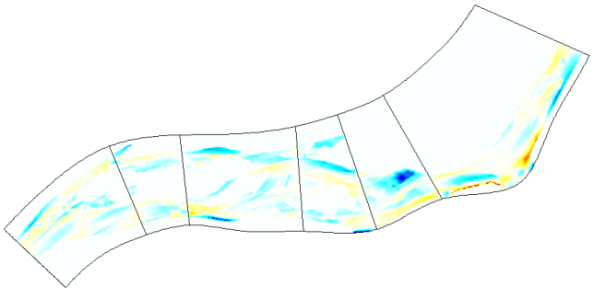
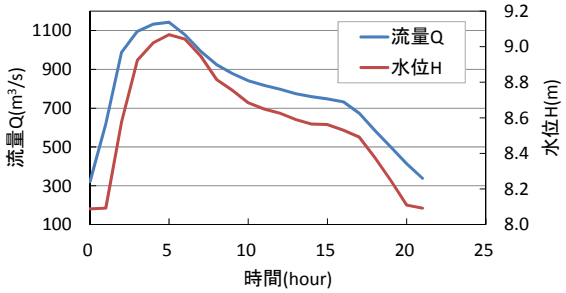
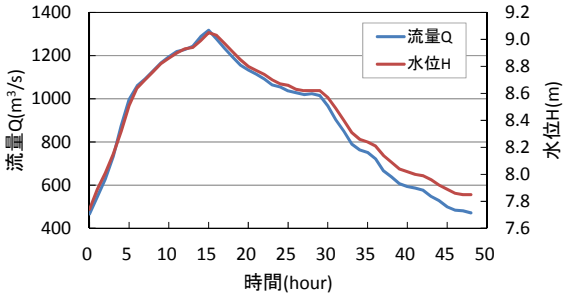

(c)　河床高差分（Case-A－Case-MIP-A：水域のみ）

図-2　河床高データ



(a)　2017 年 9 月洪水



(b)　2017 年 10 月洪水

図-3　流量-水位ハイドログラフ

に用いる植生高とした．密生度は，吉田ら [1)]と同様の方法で 2m 間隔の ALB データごとに算出し，植生高と同様の抽出方法で，抽出範囲内に占める植生種ごとに割合を付けて平均した値を用いた．ここでの密生度の定義は，単位面積あたりの(樹木の本数)×(胸高直径の平均値)である．また，竹林は別途航空写真で判別し（**図-5**），実測値を基に算出した値である 0.286m^{-1} を与えた．植生高・密生度のコンター図を**図-6** に示す．ここで，竹林の密生度は iRIC のソフト上で直接与えたため，**図-6**(b)では竹林の密生度は含まれていない．

粒度分布は，低水路では解析範囲内で 2013 年に行われた岡山河川事務所の河床材料調査の平均的な結果を用いた．砂州・高水敷では，本研究室で行った現地調査で採取した祇園地区中州上の河床材料（2017 年 5 月）の粒度分布を用いた．各々の粒度分布を**図-7** に示す．

また，2017 年 3 月の ALB 計測で，KP15.0 左岸付近の低水路内に護床工が存在していることが確認できた（**図-1**：黄破線箇所）．水面下の構造物は目視が困難なため，定期横断の測線からずれてしまうと位置や範囲が把握できず，構造物を含めた地形データの作成は難しくなる．構造物周辺では局所的な洗掘が生じやすく，解析において無視できないデータであると考え，Case-A では，護床工を固定床として設定した．一方，中井出井堰は目視で確認できる構造物のため，Case-A と MIP-A の 2 つのケースで固定床とした．本解析では固定床とした箇所は洗堀が生じないものとする．また，上流端からの流砂量の条件は平衡流砂量とした．

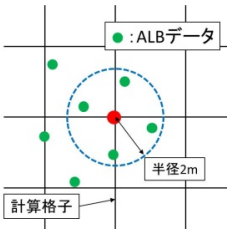
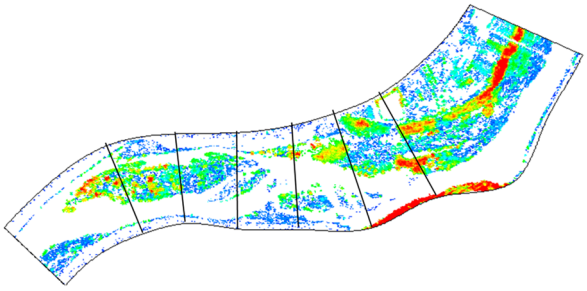


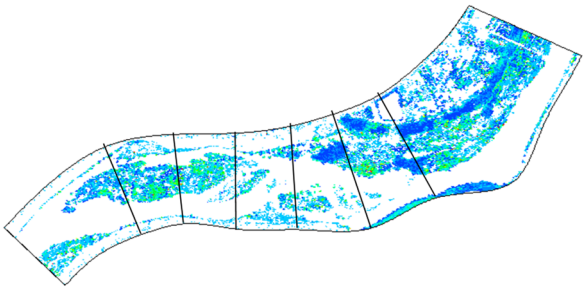
図-4　植生データ抽出方法



図-5　竹林範囲（赤色部分）



(a)　植生高



(b)　密生度

図-6　植生データ（白抜き箇所：値 0）

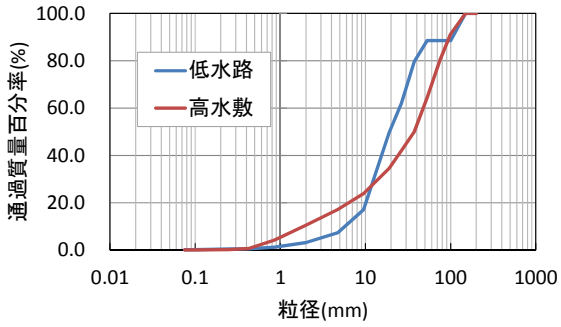
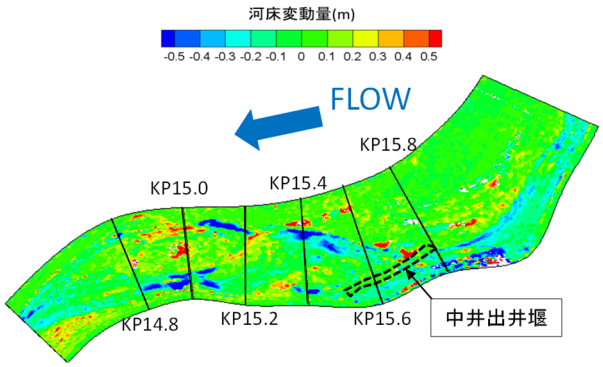


図-7　粒度分布

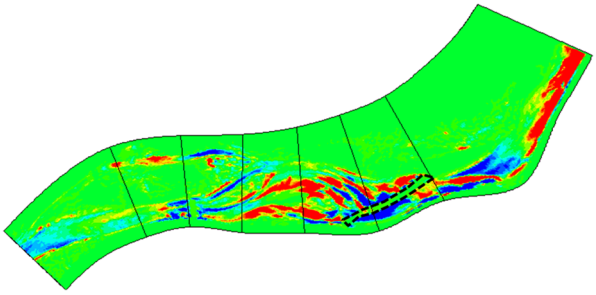
(2) 解析結果と実測値の比較

解析による最終的な河床変動量と，2017 年 3 月・11 月の ALB 計測の地形データの差分を**図-8** に示す．ここで，**図-8**(a)の白抜き部分は草本や水深などによる欠測のため 2 回の計測の差が算出できなかった箇所とする．ここで，差分の算出に用いた ALB データは，地形データの作成に用いる場合のように内挿補間を行っていないため，前述のような欠測箇所が存在する．2 章の精度検証を踏まえ，ALB 計測が妥当とした上で解析結果を検討する．

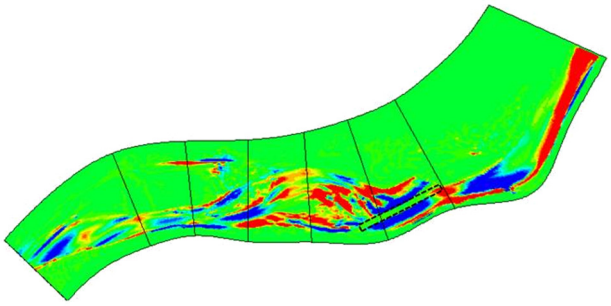
図-8(b)，(c)は，Case-A，Case-MIP-A の河床変動量の合計である．図を見て分かるように，どちらの解析結果も上流や堰の周辺で，差分とは異なる過剰な洗



(a) ALB計測差分(2017年11月-2017年3月)



(b) Case-A

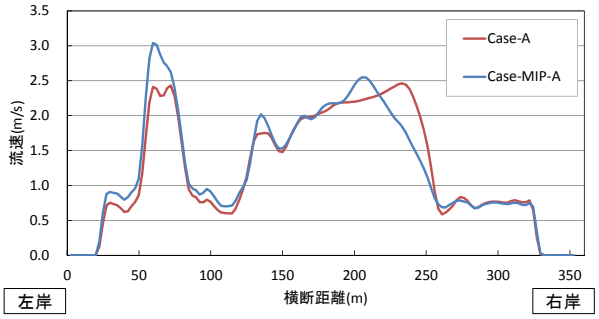


(c) Case-MIP-A

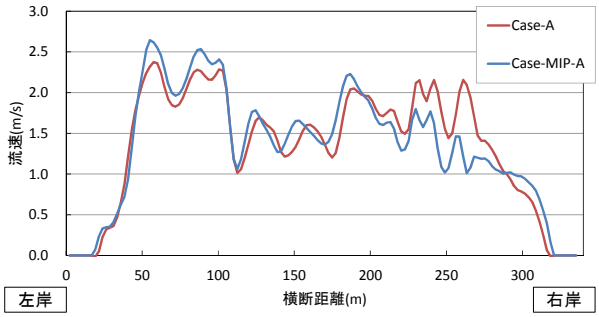
図-8 河床変動量



(a) 分岐前後の測線



(b) 測線を通過する流速（分岐前）



(c) 測線を通過する流速（分岐後）

図-9 分岐前後の測線と流速

堀・堆積の傾向が見られる．まず，堰より上流側の低水路では，差分では全体的に洗掘傾向が確認できるのに対し，解析では，上流側での堆積が見られ，その下流で局所的に洗掘・堆積が生じていることが分かる（**図-8**(b)，(c)：黒破線）．次に，解析において堰周辺では，堰上流側で大きく洗掘しており，堰下流では過剰な堆積・洗掘が生じている．これらの違いは，上流端からの供給土砂量が現地の状況とは異なっていることや，堰周辺の三次元的な流れを再現できないことが影響していると考える．

一方，KP15.2 より下流のように，平面二次元で流況を扱えるような箇所においては，まず，Case-MIP-A（**図-8**(c)）では，KP15.2 より下流の左岸側で洗掘と堆積が繰り返し生じており，ALB 計測の差分とは異なる河床変動の傾向が目立つ．それに対し，Case-A（**図-8**(b)）では，KP14.8～15.2 右岸側に見られる洗掘・堆積の広がり方など，差分と近い傾向を示した．これは，中州によって分岐した左右岸の流路での流速の違いが要因と考える．**図-9**(b)の赤丸で示すように Case-MIP-A では，分岐前から流れが左岸側に偏っていることが分かる．そのため，分岐後も流れは左岸側に集中しており（**図-9** (c)），これにより，左岸側での過剰な河床変動が生じたと考える．一方で，Case-A は分岐前後ともに左右岸での流速にあまり偏りがない（**図-9**(b), (c)）．**図-2**(c)の KP15.2～15.4 区間の右岸側では Case-A の方が河床高が低いことが確認できる．このことから，右岸側にも洪水流が流れ易くなり，Case-MIP-A に比べて，分岐後の右岸側で流速が大きくなっていることが分かる（**図-9**(c)**赤丸箇所**）．以上のことから，流路の分岐箇所での地形の再現性により， 左右岸での流速の違いが生じ，河床変動の傾向に影響を及ぼしたと考える．

このことから，ALB データを用いることで流路の分岐点等の急な流路変化が生じる箇所の地形を再現でき，平面二次元解析で流況を扱えるような箇所で実際の河床変動の傾向と近い結果を得られると考える．

次に，堰周辺の過剰な河床変動結果に焦点を置き，現地の状況を踏まえ，更なる解析条件の改善を試みる．一般に，堰周辺の流れは 3 次元的であり，平面 2 次元

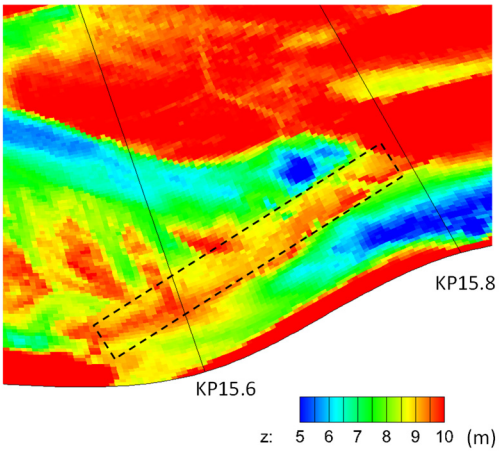


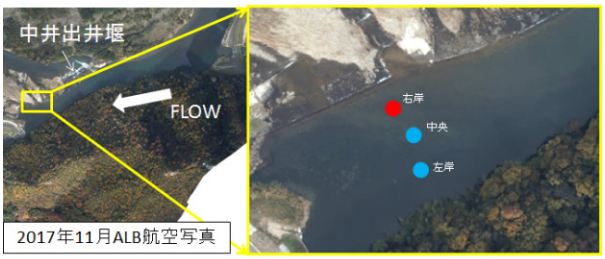
図-10　中井出井堰(黒破線)周辺の河床高(2017年3月，ALB)



図-11　堰下流の航空写真

モデルによる堰周辺の河床変動の再現は困難と考えられるが，河床と堰頂の落差や縦断勾配によっては流れの 3 次元性が弱く，平面 2 次元モデルで近似的に扱える場合があるものと考えられる．**図-10** には中井出井堰（黒破線）周辺の河床高(2017 年 3 月，ALB)を示す．図より，KP15.8 に比べて KP15.6 付近では河床勾配は緩く，現地条件の精査により平面 2 次元モデルによって河床変動の再現性が向上する可能性が考えられる．

堰上流の航空写真（**図-11**）を見ると，堰に沿って粗い粒径が存在していることが確認できた．2013 年国土交通省の河床材料調査 KP15.6 地点右岸の粒度分布を**図-12** に示す．図から分かるように，河床材料の大半が粗い粒径であり，このような粗い粒径を有する粒度分布が堰に沿って一定の範囲で広がっていたため，実際には洗掘に至らなかったと考える．また，堰下流側に関しては陸域に草本が密生していることが分かる（**図-11**）．このように陸域が全体的に草本に覆われているような状況の場合，草本によって河床の洗掘が妨げられる可能性がある．河床変動に対する植生の影響に関しては，永多らの研究において，植生の根系を短繊維で模式化した移動床実験から，河床材料に繊維状の物質が混入すると流砂量が低減することが示されている．つまり，植生が密生している箇所では洗掘が生じにくいことが考えられるが，本解析方法では植生の情報が直接的に河床変動に影響することはないため，



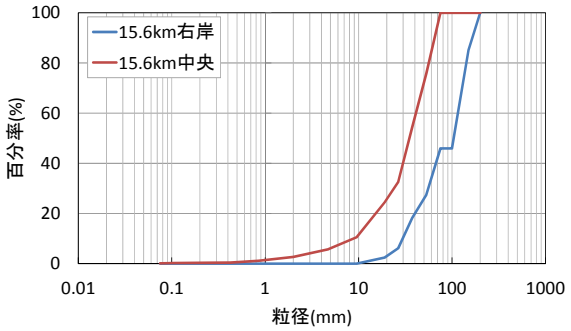


図-12　2013年国交省河床材料調査結果
（赤丸：KP15.6右岸の採取箇所）

実現象と違いが生じたと考える．

そこで，以下の点を変更し，Case-A の解析を再度行った．まず，**図-13** の範囲で**図-12** に示す KP15.6 右岸の粒度分布を与えた．ここで，約 20m 左岸側で採取されている KP15.6 中央の粒度分布（**図-12**）が，解析で低水路に与えている粒度分布とそれ程変わらなかったことから，**図-13** の範囲（流下方向に 4m メッシュ約 5 つ分）のみを KP15.6 右岸の粒度分布とした．次に，堰の表面は凹凸があることから，堰上の流速は低減すると考え，堰の粗度を $0.035 m^{-1/3}s$ に変更した．最後に，堰下流の草本で覆われた箇所では洗掘が生じないとして，**図-14** の範囲を固定床に設定した．

変更後の解析結果を**図-15**に示す．まず，粒度が粗くなったことにより，堰上流で生じていた深掘れが抑制されたことが分かる．また，堰下流の左岸側では，ALB 計測差分で河床変動が生じていないのに対し，解析結果では堆積が確認できる．これは，ALB計測では植生被覆区間で最大で約30cm程度の誤差が確認されていることから，**図-11**のように草本が繁茂する箇所では草本の高さよりも低い箇所に溜まった土砂をALB計測では捉えられなかった可能性があると考える．また，解析モデルでは草本周辺では流水抵抗のため流速が低減して土砂堆積が促されるが，実際の草本類は洪水中に倒伏し，滑面水路のように土砂を輸送するメカニズムも考えられる．そのため，本解析結果ではALB計測結果と比べて過剰な土砂堆積が生じたと考えられる．いずれにせよ，この箇所で現地での地上計測は実施して

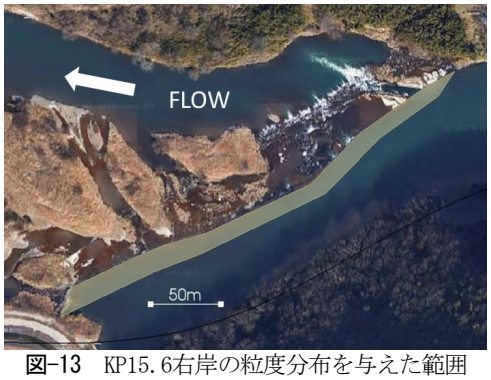


図-13　KP15.6右岸の粒度分布を与えた範囲

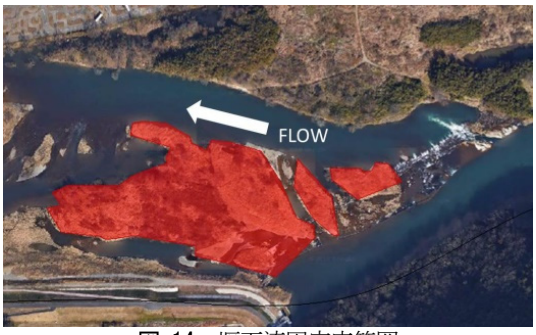


図-14　堰下流固定床範囲

おらず詳細は不明のため，今後検証は必要である．一方で，**図-14**の箇所を固定床に設定したことにより，河床変動の傾向が変化し，変更前には見られなかった低水路での洗掘が確認できる（**図-15**(b)：黒破線）．実際の差分と比べると，やや上流側で生じているものの，堰下流の主流の部分で洗堀が生じるという，差分と同様の傾向が見られた．

6. まとめ

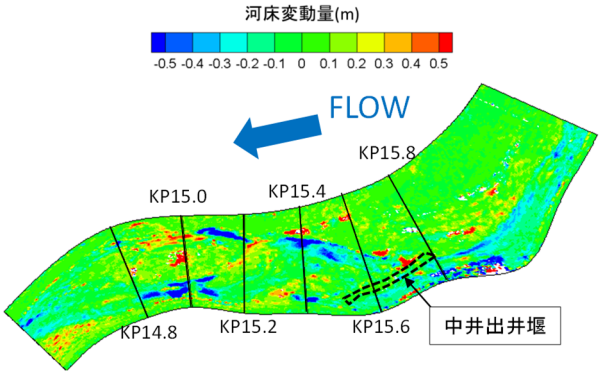
本研究で得られた知見を以下に纏める．

(1) 定期横断測量や，TS による現地計測結果と比較した結果，ALB 計測データは陸域・水域を問わず，現地の河道地形を良好に再現した．

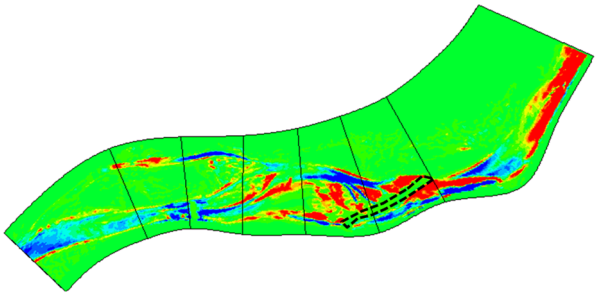
(2) 中井出井堰周辺より下流箇所では，計算初期地形に ALB データを用いた解析結果（洗掘・堆積傾向）が，より差分結果に近いことを示した．

(3) 堰周辺の現地の状況を踏まえ，河床の粗粒化と草本類の浸食抑制効果を簡易に扱って解析条件を変更したところ，解析結果は ALB 計測の差分結果の洗掘・堆積傾向により近づくことが分かった．

以上のように，定量的な観点からはまだ十分ではないが，初期地形の再現や解析条件の改良を通じて，ALB 計測データは洪水時の河床変動解析の再現性の検討や向上に役立てられることが分かった．また，特に，平面2次元モデルによる河床変動解析では中井出井堰の影響が堰の上下流での過剰な堆積や，その反動として



(a)　ALB計測差分(2017年11月-2017年3月)



(b)　Case-A

図-15　河床変動量（条件変更後）

さらに下流でのやや過剰な河床洗掘に現れ，現地の状況(ALB差分結果)と異なるが，KP15.4より下流の河床変動の傾向は現地と大きく異なることはない．そのため，本解析で解析条件を改良したことで中井出井堰より下流の祇園地区の河床変動の堆積・洗掘傾向の再現性は向上したものと考えられる．一方，本研究では解析の上流端からの供給土砂の条件を適切に設定できなかった．また，植生による土砂の堆積作用のモデル化についても十分でない．そのため，今後，検討を行って改善を試みたい．

参考文献

1) 吉田圭介ら：ALB 点群を用いた樹木群の密生度算定法の検討，土木学会論文集 B1（水工学），Vol. 74, No. 4, I_547-I_552, 2018.

2) 河川シミュレーションソフト iRIC, http://i-ric.org/ja/

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提供頂きました．記して謝意を示します．さらに，株式会社パスコの間野耕司様ならびに岡山大学大学院 山口華穂さん，小川修平君には現地調査，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．

歴史的砂防施設“別所砂留”の持続可能な保存整備に向けた調査研究

岡山大学大学院環境生命科学研究科

樋 口 輝 久

広島県福山市の“別所砂留”は、その規模、築造数から近世最大の歴史的砂防施設である。半世紀以上、手つかずで、鬱蒼としていた山中から、地域住民が新たに発見したこの砂留は、民有地内に存在することから、行政の管理下にない。したがって、現在ではボランティア団体である「別所砂留を守る会」が、草刈り等の定期的な整備作業と必要に応じて修復作業を実施している。そこで本研究では、世代が交代しても、将来的な石積の保存修復や砂留の維持管理が、継続的にできるように、修復作業の手法や様子を記録するとともに、３Ｄレーザースキャナ計測を行い、点群データを取得して図面を作成した。

１．はじめに

広島県福山市は、江戸時代に築造された石造の砂防施設である「砂留」が 50 基程度現存している全国でも希な地域である。その市内芦田町の有志が、平成 21（2009）年から平成 26（2014）年にかけて、半世紀以上にわたって人の手が入ることがなかった山中から、新たに 36 基から成る「別所砂留」を発見した。それは、1 渓流としては最多の数で、鎧積みやアーチ形状等、様々な形態があることに加え、既存の砂留の規模を超えるものもあり、わが国における近世砂防の歴史を大きく塗り替える砂留であった [1)]。

しかしながら、「別所砂留」は、その存在自体が知られていなかったため、当然、管理者が存在しない。これらの砂留は現在でも砂防施設として機能しており、長年にわたって土砂災害を防いできた歴史的砂防施設でもあるが、地権者 500 名以上の民有地にあるため、行政が土地を取得し、通常の砂防施設として維持管理することは現実には不可能である。そこで現在では、地域住民による「別所砂留を守る会」が中心となって定期的な草刈り等の整備作業を実施しているが、長年にわたって管理されていなかったうえに、近年の頻発する豪雨のため、徐々に崩壊が進んでいる。技術的にも資金的にも行政からの支援がないボランティア活動の中で、土砂災害を防止するために、砂留の保存修復ならびに継続的な維持管理をして行かなければならない [2,3)]。しかも、現在のメンバーは、60～70 歳代が中心で、農業従事者が多いため、様々な機具を所有し、これらの作業にも慣れているが、人口の減少、離農が進んでいる今日、将来的にこうした人材、技術を維持していくことは困難が予想される。

そこで本研究では、ボランティア団体である「別所砂留を守る会」が、砂留の保存修復、維持管理を世代が交代しても継続的に実施できるように、これまでの作業を記録保存するとともに、実施可能な方法を検討し、最終的には砂留の整備保存マニュアルを作成することを目指している。今年度は、7 月豪雨で九番砂留の一部が崩壊したため、その修復作業を記録した。

また、平成 28（2016）年 10 月に七番砂留の一部が崩壊した際に、「別所砂留を守る会」が初めて石積の修復作業を実施したが、崩落した約 100 個の石材のうち元通りに復元できたものは半数であった。別所砂留は、国指定重要文化財にも匹敵する価値も有しているため、できるだけ元通りに修復することが望まれる。将来的な石積の修復作業や今後の維持管理に向けて、砂留の現況を記録保存しておくために、３Ｄレーザースキャナ計測を行い、点群データを取得するとともに、それを基に図面を作成した。

２．保存修復方法の記録保存

平成 30 年 7 月豪雨によって、九番砂留の水通し部の石材が一部崩落した（**写真-1**）。平成 28（2016）年に七番砂留が崩壊した際は、ユンボが入る場所で



写真-1　修復前の九番砂留



写真-2　修復後の九番砂留



写真-3　崩落防止対策工



写真-4　超小型ユンボによる石材の運搬



写真-5　三つ又による石材の据え付け



写真-6　じょうせん、玄翁による据え付けの調整

あったが、九番砂留は急勾配なうえに、両岸が迫った狭い谷に築造されているため、ユンボを導入することができない。そこで、石材は超小型のユンボで運搬したが（**写真-4**）、据え付けは三つ又を用いた人力で行った（**写真-5**）。

用いた道具は、超小型ユンボ、チェーン、鉄筋、ロープ、鉄パイプ、チェーンブロック用三脚ヘッド、チェーンブロック、じょうせん、玄翁、てみである。

まず、①崩壊箇所の上部が雪崩式に崩れないように、鉄筋を打ち込んで、ロープで牽引し、作業の安全を確保した（**写真-3**）。②流出した石材を超小型のユンボで運搬した。なお、九番砂留は平成 28（2016）年２月に３Ｄレーザースキャナ計測を実施し、図面を作成していたが、崩壊した箇所は、この度の豪雨で土砂が流出し、新たに姿を現した箇所であったため、石材の特定ができない。そこで、九番砂留の下流にある大きめの転石を数個選んだ。③チェーンをかけた石材を三つ又でつり下げ、崩壊部と石材の形状が合う箇所、向きに据え付けた。その際、砂留の表面の高さが揃うように、据え付ける石材の下にぐり石を入れ、調整を行った。ぐり石は周辺の小石を

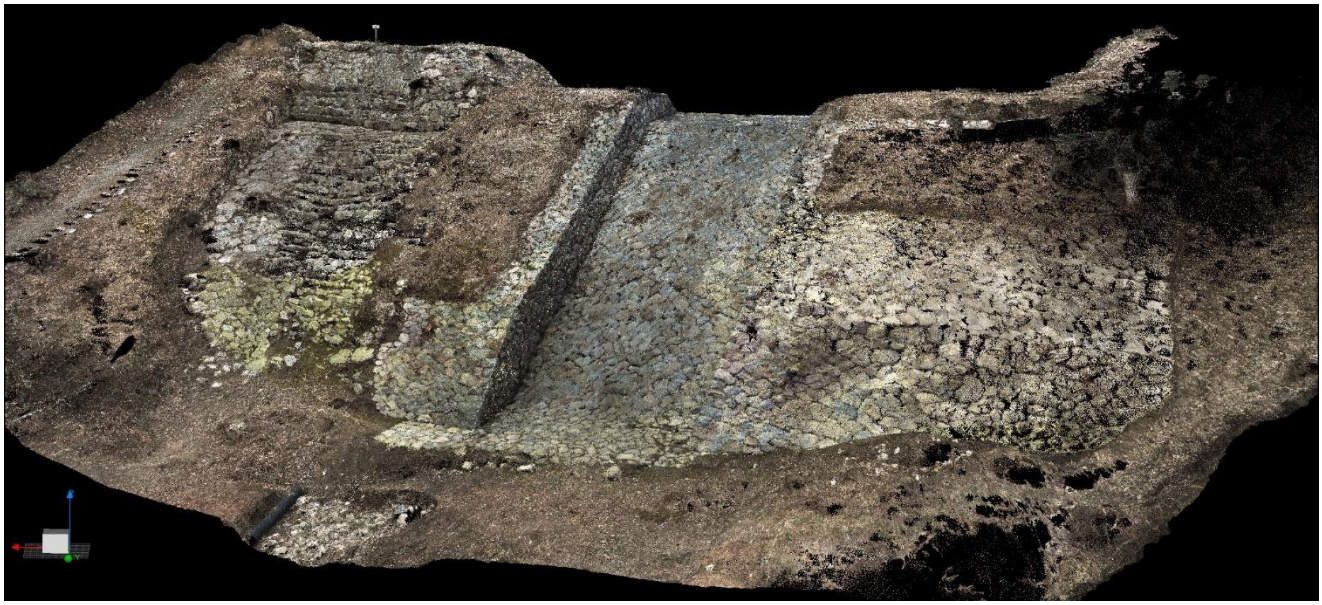


図-1　七番砂留の点群データ

てみで集めておいたものである。④据え付けた石材が隣の石材と接し、収まり良く座るように、じょうせんで微調整をする（**写真-6**）。⑤据え付けた石材と石材の間に、形状の合う小石を詰めて、玄翁でしっかりとはめ込む。

作業は、平成 31（2019）年 3 月 13 日の 1 日で終了し、既存の石積と違和感なく修復できた（**写真-2**）。この様子を動画および写真で撮影し、作業手順、必要な道具、注意点とともに記録しておいた。

３．３Ｄレーザースキャナ計測と図面の作成

平成 31（2019）年 2 月 21 日に、五番、六番、七番砂留の 3 基について、株式会社ウエスコに委託し、３Ｄレーザースキャナ計測を実施した。土堰堤部分や両岸の斜面も含めた周辺部の点群データ（**図-1**）と石積のみの点群データの 2 種類を納品して頂いた。それをもとに、石の輪郭のみを描いた図面を、各砂留について平面図、下流から見た正面図、上流からの背面図をそれぞれ作成した（**図 2～4**）。

４．まとめ

地域住民で組織された「別所砂留を守る会」が、砂留の保存修復、維持管理を世代が交代しても継続的に実施できるように、平成 30 年 7 月豪雨で欠損した九番砂留の石積の修復作業の様子を動画および写真で記録保存した。なお、当初予定していた専門家を招聘し、維持管理や修復保存方法の指導を受けることは、予算の関係で実施できなかったため、今年度、申請額が採択されれば、実施したい。

また、洪水や地震などの災害で砂留が崩壊した場合でも、元通りに修復できるようにするための３Ｄレーザースキャナ計測と図面の作成は、本研究助成で 3 基が実施できた。これで四番～十番砂留の 7 基が完了したので、残る 7 基についても、今年度以降の助成金の獲得をめざし、2 年程度で実施したい。

参考文献

1) 近世最大の砂防施設群“別所砂留“ ― その実態と地域住民による保存整備活動（第一報）―，樋口輝久・戸谷宥貴・山科直生, 土木史研究(講演集)，Vol.36，2016.5，pp.243-246.
2) 近世最大の砂防施設群“別所砂留“（第二報）― 七番砂留の修復と今後の維持管理について―，樋口輝久・山科直生・秋田哲志, 土木史研究(講演集)，Vol.37，2017.5，pp.65-68.
3) 近世最大の砂防施設群“別所砂留”（第三報）― 保存活用に関わる行政の支援―，樋口輝久・光成良秀，土木史研究（講演集），Vol.38，2018.5，pp.37-40.

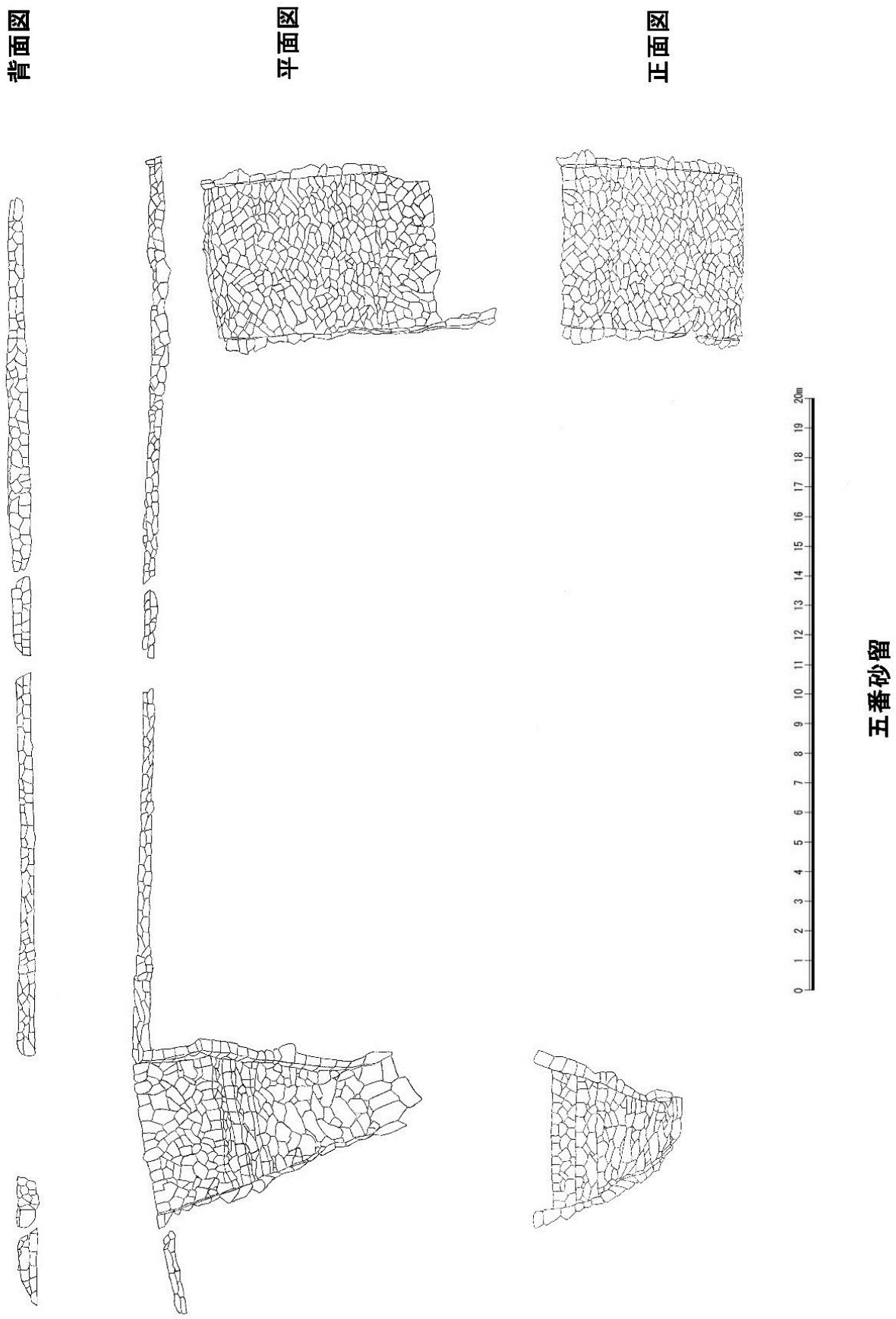


図-2　五番砂留の図面

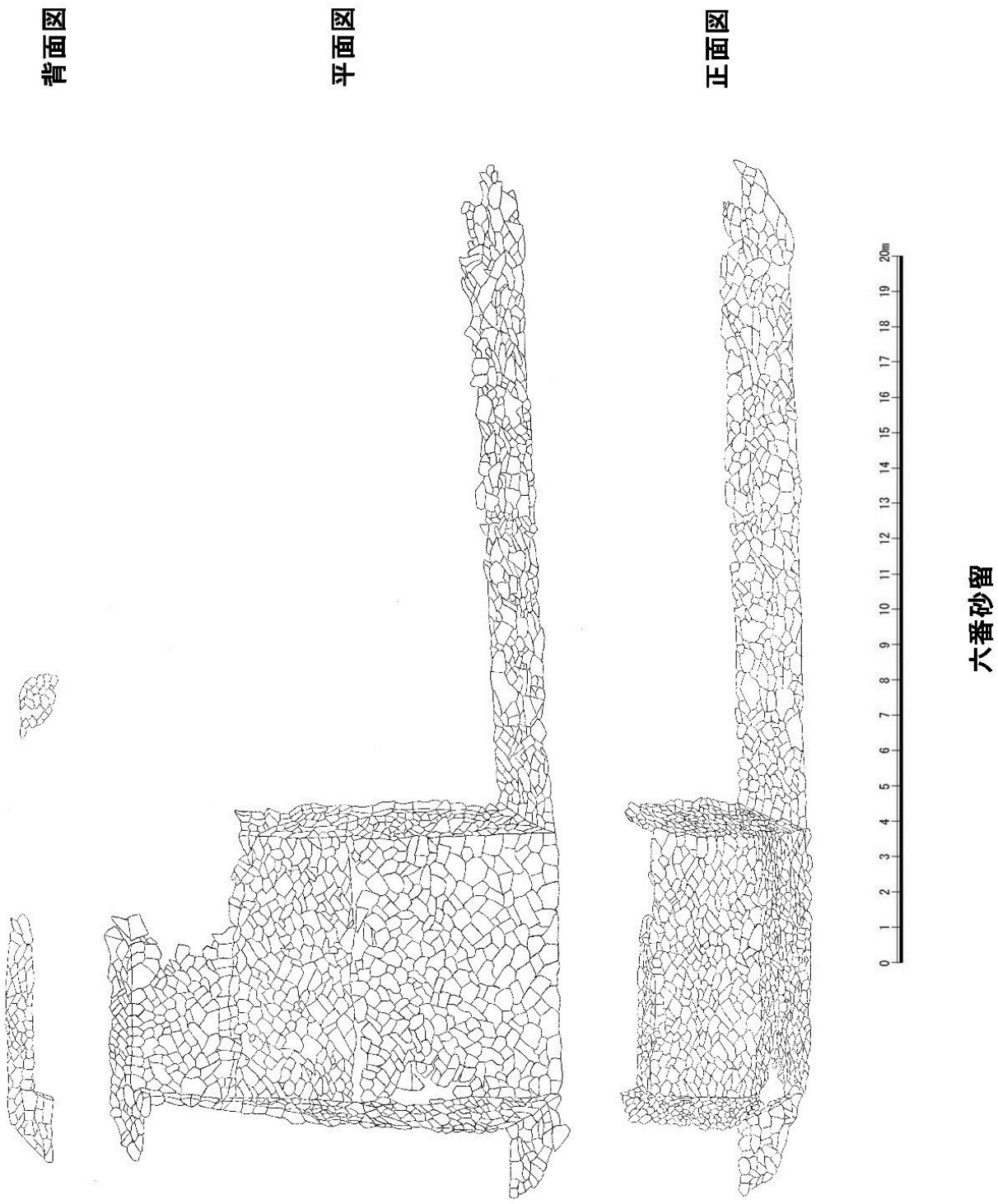


図-3　六番砂留の図面



七番砂留

図-4　七番砂留の図面

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:
－ 疎水性地盤材料の混合比による力学特性の影響 -

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。遮水層の土材料として疎水性地盤材料を用いるには，経済性や施工管理，地盤の安全性などの検討が必要である。そこで，H30 年度では親水性地盤材料と混合し，疎水性地盤材料の混合率 0%，25%，50%，75%，100%を調整し，混合率による不飽和土力学特性を定量的に評価した。本研究の結果として，一定含水比圧縮試験の結果により，疎水性地盤材料の混合率が増加するほど，土のせん断強度が減少することが確認できた。また，三軸圧縮試験(CU)の結果からも同様の結果が得られ,親水材に比べ，疎水材は摩擦力が低い材料であると確認された。さらに，保水性試験の結果により，疎水材混合率が増加すると，水浸入値(WEV)が小さくなり，ヒステリシスが大きくなることが分った。一方，SSM により得られたサクション応力や見かけの粘着力(Δc)の関係により，疎水材混合率による不飽和土のせん断強度の増分や飽和状態の破壊基準との関係が明らかになった。

1. はじめに

近年, 豪雨による地盤災害が頻繁に発生している。その解決策の 1 つとして，地盤表層部に遮水層を設けることが挙げられ，遮水シートのような様々な遮水層が適用されている。しかし，それらの多くは自然に存在しない材料から成るものが多く，自然環境負荷が大きいと考えられる。そこで，自然材料である疎水性地盤材料の適用が考えられるが，疎水性地盤材料のみを遮水層の全体に用いるためには，コストや施工管理，安全性などを検討する必要がある。よって，本研究では日本の標準砂である親水性と疎水性豊浦砂を混合させ，一定含水比圧縮試験によりその力学特性について調べた。特に，不飽和土力学理論に基づいて，疎水材混合率によりサクション応力(suction stress, p_s) [1)]や見かけの粘着力(Δc) [2)-4)]の関係を検討した。

2. 保水性試験

2.1 試験概要及び条件

本研究では，図 1 に示している連続加圧式の加圧版方式の試験装置を用いて保水性試験を行った。段階加圧方式では供試体に対してある一定の空気圧力を与えて維持し，その状態での供試体の吸排水量が平衡状態になってから次の圧力段階に移行する。これに対して連続加圧方式では，供試体に与える空気圧を連続的に増加・減少させながら試験を行う。特に，この試験装置に設置されているマイクロテンシオメーターから供試体内の間隙水圧を読み取り，保水性を把握できる。連続加圧式を用いた試験装置により，不飽和状態から飽和状態に移行する吸水過程の水分特性曲線を迅速に，工学的に充分な精度で得ることができると考えられる。

試験対象試料は，疎水材（water repellent soil, WRS）の混合比=25%，50%，75%であり，親水性(WRS=0%)と疎水性豊浦砂(WRS=100%)の場合は，前年度の研

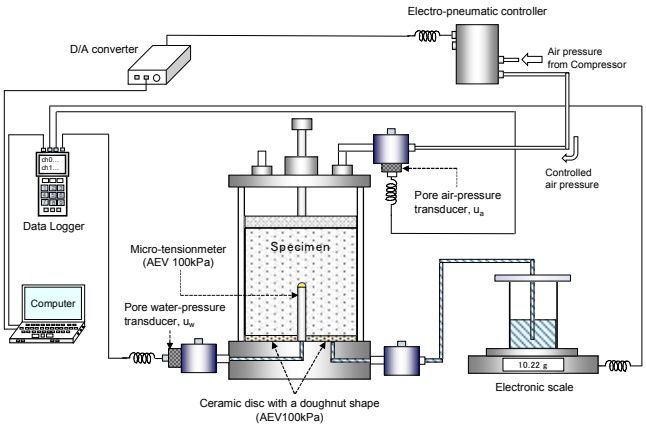


図-1　連続加圧方式の保水性試験装置の概念図

究成果 [5]を利用した。本研究での供試体は，疎水材混合率 WRS=25%，50%，75%の条件で混合された標準砂を用いて三層静的締固め法によって作製した。供試体サイズは，直径 50mm，高さ 50mm であり，初期乾燥密度は，1.50g/cm^3 である。保水性試験における各供試体の初期条件は，**表**-1 にまとめている。

2.2　保水性試験結果

疎水材混合率(WRS) =0%，25%，50%，75%，そして 100%における保水性試験の結果は，図-2 に示している。図より，疎水材混合率が大きくなる程，ヒステリシスが大きく，保水性に差があることが分かる。しかし，WRS=0%と WRS=25%，さらに WRS=50%と WRS=75%では水分特性曲線に大きな差は見られなかった。本研究で用いた試料が砂質土であるため，求められるサクションの範囲が狭いためであると考えられる。また，各疎水材混合率における水分特性曲線より得られた空気侵入値(air entry value, AEV)と水浸入値(water entry value, WEV)を表-2 にまとめている。空気侵入値(AEV)は疎水材混合率によらず，ほぼ類似であった。しかし，水浸入値(WEV)は疎水材混合率が大きい方がその値が小さいことが分かる。つまり, 疎水材混合率が増加すると，吸水しにくいということである。これは疎水材の水を反発する特性が働いているものと考えられる。また，排水経路においてはあまり差がないが，吸水経路においては WRS=25%の場合，水分特性曲線の傾きが最も急になっていることが確認される。疎水材は親水材に比べ，水が入りにくく，一度浸潤が始まると，徐々に水が入る特性があると考えられる。さらに疎水材が 25%程度混合された場合に水みちが形成されやすく, 浸潤が早い状態であると判断される。

表-1　連続加圧方式による保水性試験の初期条件

WRS(%)	w_i	ρ_{di} (g/cm^3)	S_{ri} (%)
25	0.10	1.57	40.4
50	0.11	1.55	41.8
75	0.11	1.56	41.5

Note:　w_i：初期含水比, ρ_{di}：初期乾燥密度,
S_{ri}：初期飽和度

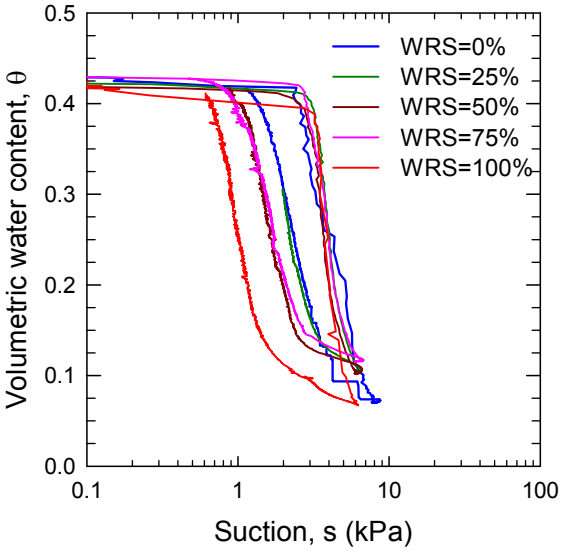


図-2　疎水材混合率による保水性試験結果

表-2　空気侵入値(AEV)と水浸入値(WEV)

WRS(%)	AEV(kPa)	WEV(kPa)
0	2.4	1.3
25	3.0	1.6
50	2.7	1.0
75	2.8	0.9
100	2.9	0.6

3. 一定含水比圧縮試験

3．1　試験概要及び条件

一定含水比圧縮試験とは, 供試体を飽和させずに, 初期含水比を一定に保った状態で鉛直荷重のみを載荷し圧縮を行う試験のことである。すなわち，不飽和状態での非圧密非排水三軸圧縮試験である。実験

表-3 各供試体の初期条件

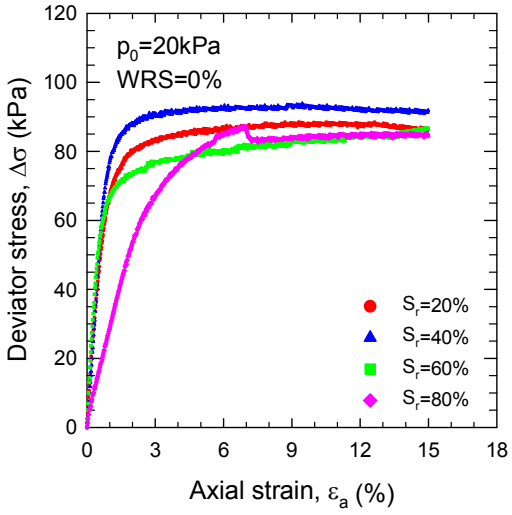
WRS (%)	S_r (%)	w_i	ρ_{di} (g/cm^3)	S_{ri} (%)
0	20	0.06	1.46	18.4
	40	0.11	1.48	35.5
	60	0.17	1.48	55.4
	80	0.23	1.47	75.3
25	20	0.05	1.47	17.5
	40	0.13	1.44	41.8
	60	0.16	1.48	55.0
	80	0.24	1.46	78.2
50	20	0.06	1.46	19.8
	40	0.12	1.46	37.7
	60	0.15	1.49	52.4
	80	0.24	1.47	78.4
75	20	0.06	1.46	19.0
	40	0.12	1.45	40.3
	60	0.15	1.50	51.7
	80	0.23	1.48	75.8
100	20	0.06	1.46	18.5
	40	0.12	1.48	40.0
	60	0.17	1.48	56.3
	80	0.21	1.47	68.6

Note: S_r ：目標飽和度, w_i：初期含水比, ρ_{di}：初期乾燥密度, S_{ri}：初期飽和度

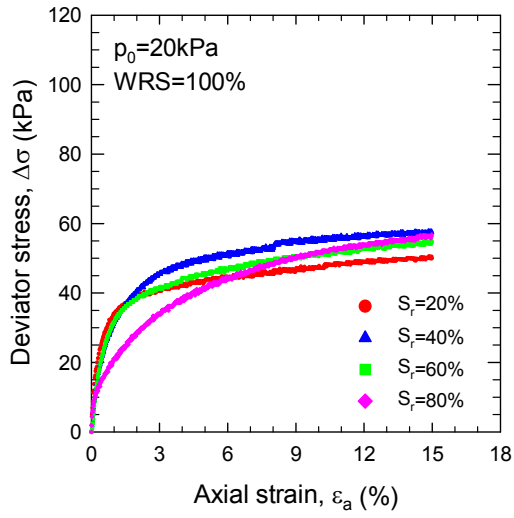
の流れとしては，試料準備，供試体の作製，供試体の凍結，供試体の設置，供試体の解凍，そしてせん断の順に実験を行う。試験対象は WRS=0%，25%，50%，75%，100%である。それぞれに対し，初期飽和度(S_{ri})20%，40%，60%，80%に対する 20 パターン行った。供試体の作製に関して，初期乾燥密度(ρ_{di})が 1.50g/cm^3 となるようにモールドに詰めた。各供試体の初期条件は，表-3 にまとめている。また，供試体を設置した後，有効拘束圧力を 20kPa 掛けた状態で供試体を解凍させた。さらに，解凍が確認された後も 20kPa の有効拘束圧力を保ったまま，0.1%/min のせん断速度でせん断を行った。

３．２　試験結果

図-3 は，疎水材(WRS)混合比 0%と 100%における軸ひずみ(ε_a)と軸差応力($\Delta\sigma$)の関係を示す。まず，疎水材混合率が増えるほど，各疎水材混合率におけるピーク軸差応力の結果が低下する傾向を示している。これにより，親水材より疎水材の方が摩擦力の低い材料であることが明らかになった。



(a) WRS=0%

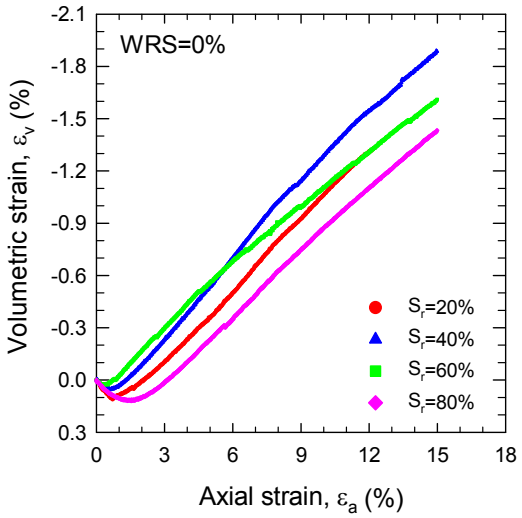


(b) WRS=100%

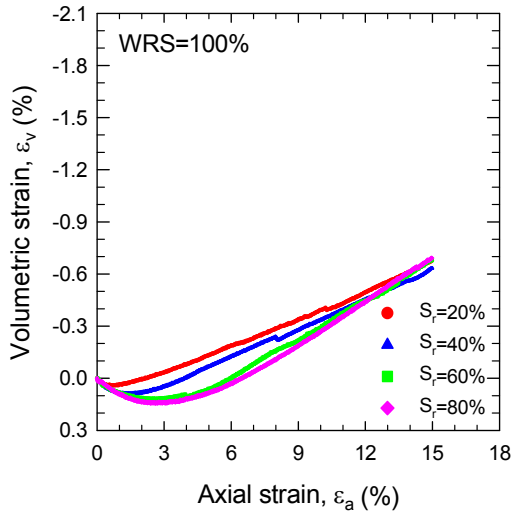
図-3　疎水材混合率による応力-ひずみ曲線

また，各疎水材混合率において，軸ひずみ(ε_a)が 1%～3%の間に急激に上昇し，それ以降は緩く増加するという傾向を示した。これは，軸ひずみ(ε_a)と体積ひずみ(ε_v)の関係を示している図-4 の体積ひずみ曲線より，圧縮から膨張に変わるタイミングと同じであることが確認できるが，疎水材混合率や初期飽和度(S_{ri})に関わらず，ピーク値を示すことはなかった。

一方，軸ひずみ(ε_a)と体積ひずみ(ε_v)の関係の図-4 より，全ての試験結果においても軸ひずみが大きくなる程，体積ひずみが大きくなり，膨張していることが確認された。また，疎水材混合率が大きい程，体積ひずみが小さくなり，圧縮から膨張になる変化が遅くなることが分かった。



(a) WRS=0%



(b) WRS=100%

図-5　疎水材混合率による体積ひずみ曲線

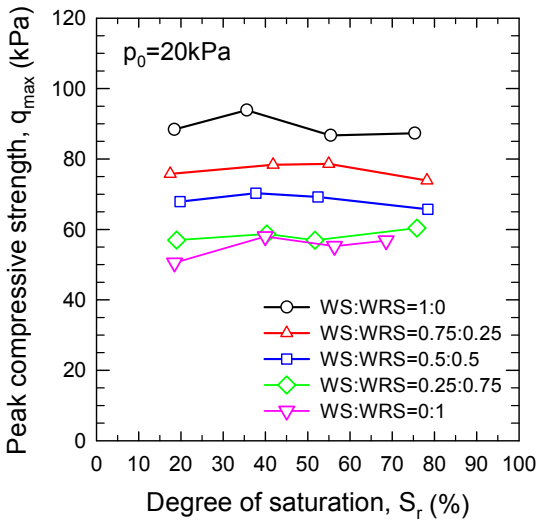


図-6　初期飽和度(S_{ri})と最大軸差応力(q_{max})の関係

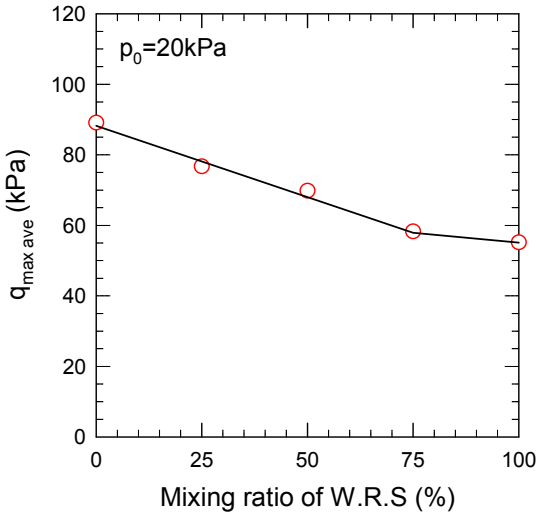


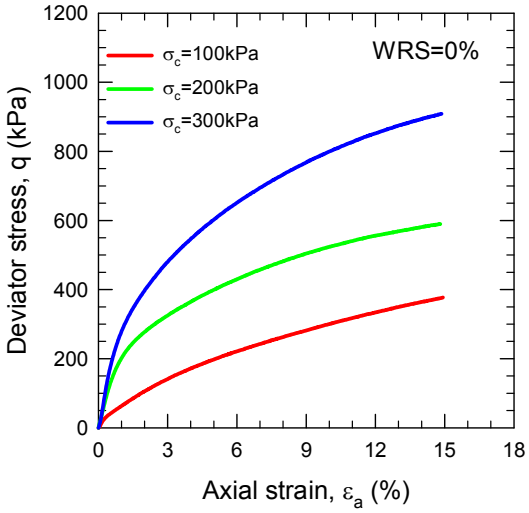
図-7 疎水材混合率と $q_{max\ ave}$ の関係

３．３　初期飽和度と最大軸差応力の関係

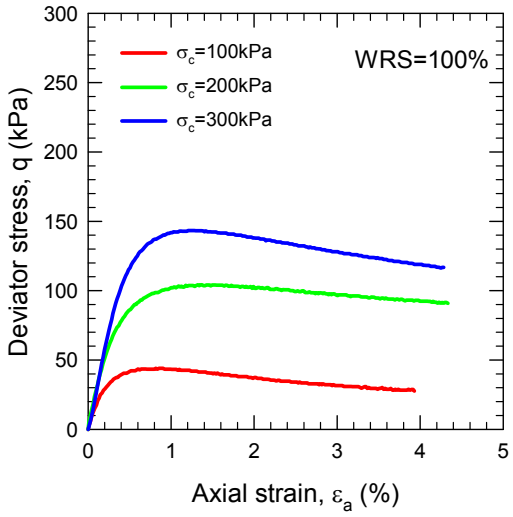
図-6 は，各疎水材混合率における初期飽和度(S_{ri})と最大軸差応力(q_{max})の関係を示している。各疎水材混合率において，初期飽和度(S_{ri})による最大軸差応力(q_{max})の差は微小ではあるが，初期飽和度(S_{ri})が40%～60%の場合にそれぞれピーク値を取っている。これは，試験時の初期飽和度(S_{ri})が約 20%～80%であり，この飽和度(S_r)の範囲は保水性試験から得られた水分特性曲線（図-2）より，空気侵入値(AEV)である約 2.4kPa～3.0kPa を越えている。つまり，メニスカス水が徐々に増加していく過程に対応している。特に，初期飽和度(S_{ri})が 40%～60%でメニスカス水を持つ接点が多くなり，サクションの影響によりピーク値が得られたと考えられる。また，前述したように疎水材混合率が大きいほど最大軸差応力(q_{max})が小さくなることが確認された。これは疎水材の表面にはシラン処理によるコーティングが施されており，その影響によりメニスカス水が存在しにくい。そのため，サクションの影響が小さく，見かけの粘着力が小さくなったと判断される。

３．４　疎水材混合率と平均最大軸差応力の関係

図-7 は，疎水材混合率とその混合率における平均最大軸差応力($q_{max\ ave}$)の関係を示している。疎水剤混合率が大きくなるほど平均最大軸差応力は小さくなることが確認された。しかし，平均最大軸差応力の低下率は一定ではなく，特に WRS=75% と WRS=100%では，変化が少ないことが確認できる。

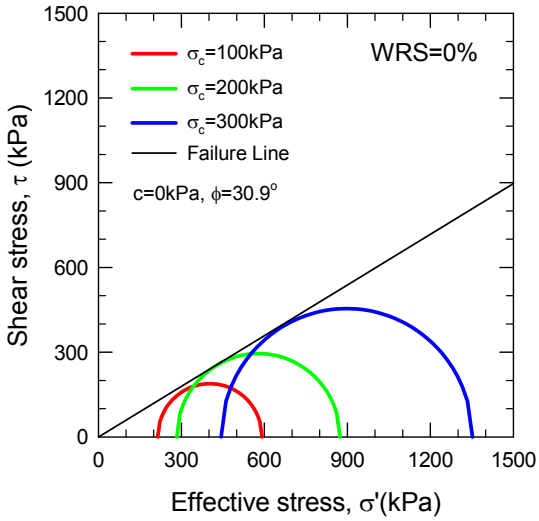


(a) WRS=0%

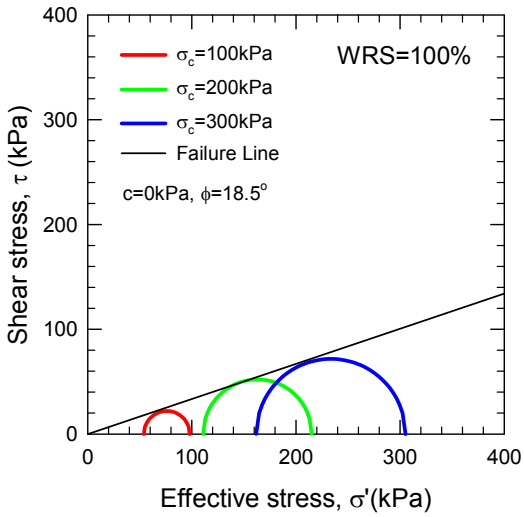


(b) WRS=100%

図-8　各疎水材混合率においての応力-ひずみ曲線



(a) WRS=0%



(b) WRS=100%

図-9　モールの応力円とクーロンの破壊基準

これは，小さい摩擦力を持つ疎水材の量が 75%以上になると，土のせん断強度の増加にあまり寄与できないことであると判断される。

また，疎水材混合率と平均最大軸差応力($q_{max\ ave}$)の関係により，以下のように WRS=75%を境に 2 つの関係式が求められた。この式により，疎水材混合率によるせん断強さの関係が予測できると期待される。

$$q_{max} = -0.4\times(WRS(\%)) + 88.2 \qquad \text{(式-1)}$$

$$q_{max} = -0.12\times(WRS(\%)) + 67.5 \qquad \text{(式-2)}$$

4. 圧密非排水三軸圧縮試験(CU)

試験対象は WRS=0%，25%，50%，75%，100%であり，初期乾燥密度(ρ_{di})は 1.50g/cm^3 とである。また，供試体の作製や設置後の解凍，せん断速度については一定含水比圧縮試験と同様に行った。

図-8 に軸ひずみ(ε_a)と軸差応力(q)の関係の結果を示す。WRS=25%，50%，75%において軸ひずみが 1%前後で変曲点が現れ，それぞれのせん断強度の増加傾向が類似していることが確認された。しかし，変曲点が現れた後も少し緩やかにはなるが，軸ひずみ 15%まで供試体がせん断されながら強度がずっと増加するということが分かった。一方，WRS=100%の場合のみ，ピーク値が現れた。

表-4 強度定数の結果

WRS(%)	c (kPa)	ϕ(°)	M
0	0	30.9	1.24
25	0	30.8	1.23
50	0	28.0	1.18
75	0	25.4	1.00
100	0	21.1	0.82

図-9 にモール応力円とモール・クーロンの破壊規準による求められた強度定数を示す。また，内部摩擦角(φ)と共に軸差応力(p)と平均有効応力(q)の傾きである M の結果を**表-4** にまとめている。

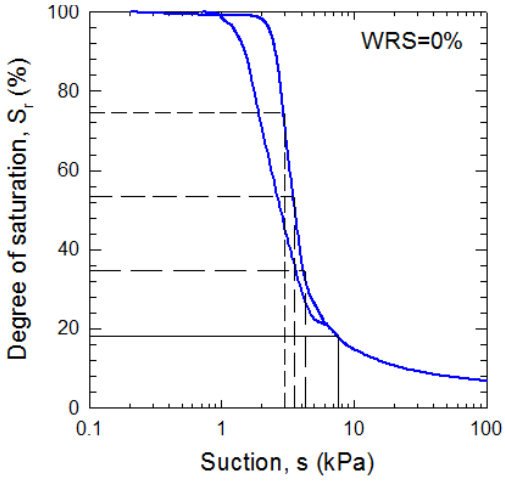
5．不飽和土せん断強度に対するサクション応力の適用

不飽和土のせん断強度は，サクションによる影響が大きいことは一般的に知られている。本研究では，不飽和土のせん断強度に及ぼす疎水材混合率の影響を評価するため，圧密非排水三軸圧縮試験(CU)と一定含水比圧縮試験(CWCC)を行った。よって，本章では，一定含水比圧縮試験においてのサクションによるせん断強度の増分の関係を明らかにするため，疎水材混合率による各供試体のサクション応力(p_s)を，有効拘束圧力として適用し，疎水材混合率による不飽和土せん断強度の変化と飽和状態の破壊線の関係を評価する。また，式-3 から算定した見かけの粘着力(Δc_1)と飽和破壊線及び不飽和破壊線に基づいて求めた見かけの粘着力(Δc_2)の値を比較する。

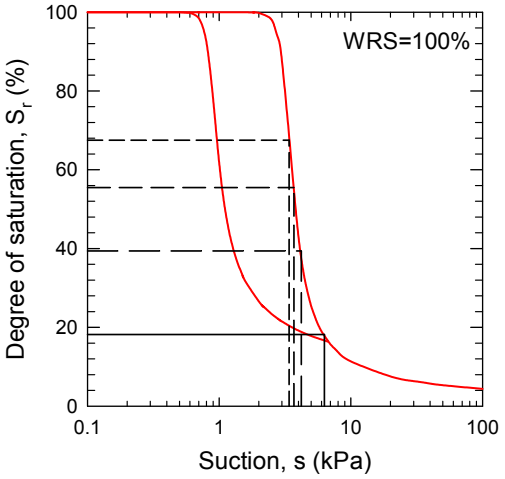
$$\Delta c = \left(\frac{S_r - S_{r0}}{100 - S_{r0}} \cdot s \right) \times \tan \phi \qquad \text{(式-3)}$$

5．1　サクション応力の適用

不飽和土せん断強度は，サクションの影響により増加されるため，疎水材混合土におけるその関連性について調べた。特に本研究では，疎水材混合率によるサクションの変化がせん断強度に及ぼす影響について注目した。そこで, 図-2 の水分特性曲線から，WRS=0%，25%，50%，75%，100%においての破壊時における飽和度(S_{rf})のサクションの値を SSM [6]に



(a) WRS=0%



(b) WRS=100%

図-10　SSM によるサクションの推定 [6]

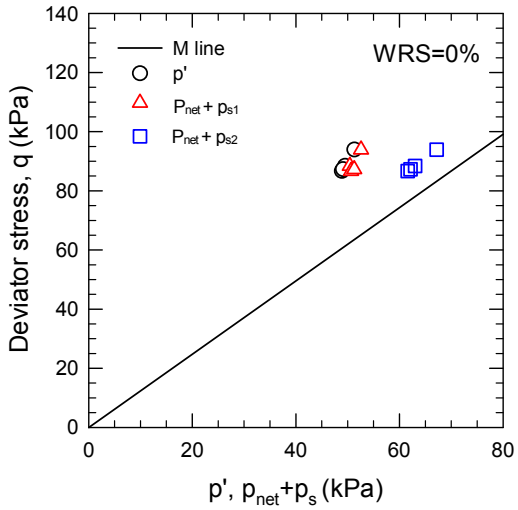
より読み取り(図-10 参照)，計算されたサクション応力(p_{s1})を式-4 より計算した。

$$p_s = \frac{S_r - S_{r0}}{100 - S_{r0}} \cdot s^* \qquad \text{(式-4)}$$

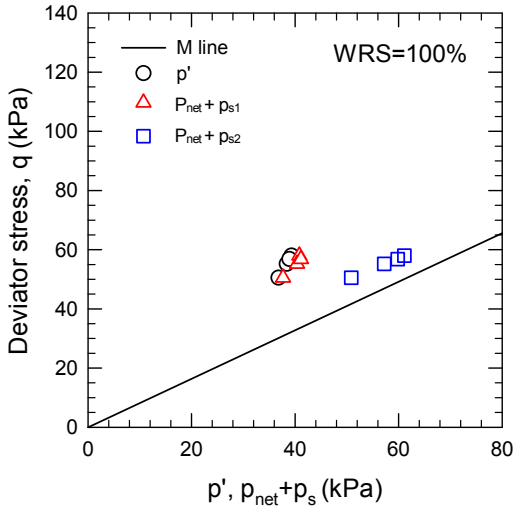
ここで，s*は，SSM により水分特性曲線から求めたサクションである。

図-11 は，破壊時の飽和度によるサクション応力の関係を示している。図により，本研究で用いた豊浦砂の場合，サクションが小さい範囲になるが，飽和度が増加すると，サクション応力が大きくなることが分った。

また，一定含水比圧縮試験の結果における(p_{net}, q)の関係について SSM により求めたサクション応力(p_{s1})を適用した結果，($p_{net}+p_{s1}$，q)の関係により，

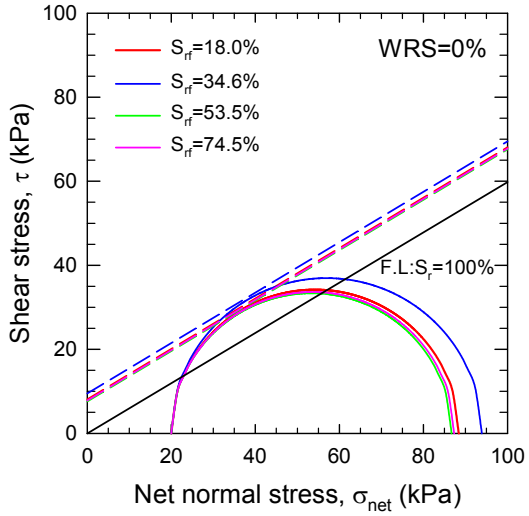


(a) WRS=0%

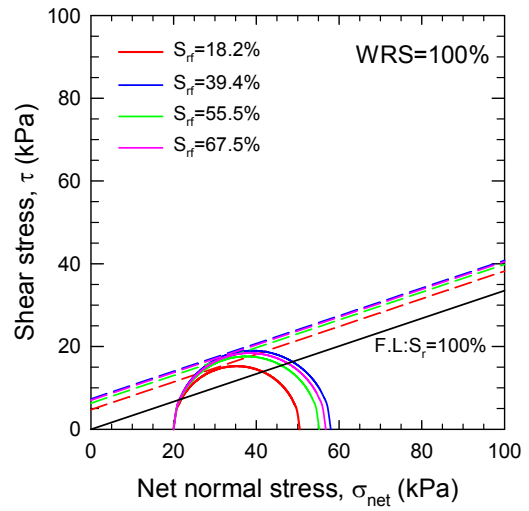


(b) WRS=100%

図-11　サクション応力の適用



(a) WRS=0%



(b) WRS=100%

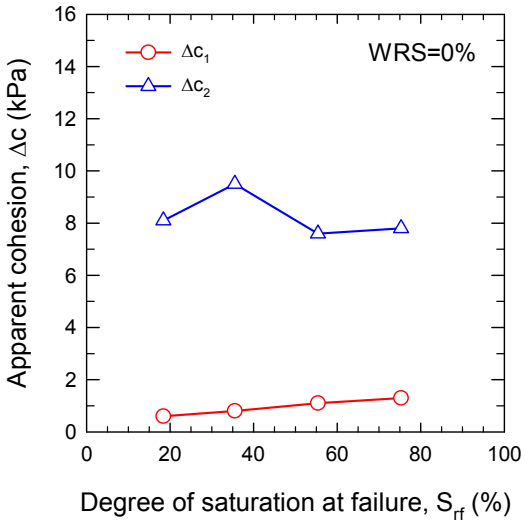
図-12 一定含水比圧縮試験の見かけの粘着力(Δc_2)の求め方

三軸圧縮試験の結果から求めた M ライン(p'と q の傾きを表す直線)に近づくが，その変化量は微小であった(図-11 参照)。そこで，飽和破壊線及び不飽和破壊線から求めた見かけの粘着力(Δc_2)により新たにサクション応力(p_{s2})を求め，同様に比較した。その結果，　($p_{net}+p_{s2}$，q)の関係の方がより M line に近づく結果となった。これは，サクションにより増加したせん断応力の増分と，低拘束圧条件(すなわち，20kPa)での過圧密状態の影響が供試体に働いて推定値より試験結果が大きくなったと推定される。

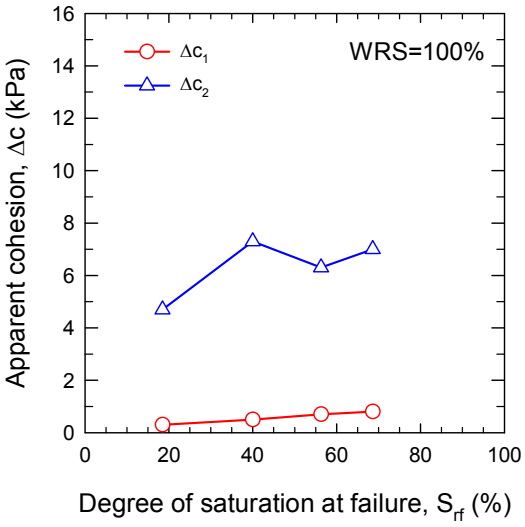
５．２ 見かけの粘着力（ΔC）の比較

理論式(式-3)から算定した見かけの粘着力(Δc)は，SSM によるサクション応力(p_{s1})と三軸圧縮試験(CU)で得た tan φ を用いて導く[6]。一方，試験結果から求めた見かけの粘着力(Δc_2)は，図-12 に示している通り，三軸圧縮試験(CU)から求めた飽和破壊線の粘着力(c)と，一定含水比圧縮試験から求めた不飽和破壊線の粘着力(c)を比較し導く。ここで，各供試体の不飽和破壊線は，一定含水比圧縮試験から得たモールの応力円に飽和破壊線の傾きを適用して求めた。

二つの方法によって導いた見かけの粘着力(Δc)を図-13 に示す。疎水材混合率 WRS=0%，25%，50%，75%において，見かけの粘着力(Δc_1)はほとんど差がない。これは豊浦砂が示すサクションの範囲が非常に狭く，飽和度の差によるサクションの差が小さい



(a) WRS=0%



(b) WRS=100%

図-13 見かけの粘着力(Δc)の比較

ため，サクションによるせん断強度の増加を正しく反映することに限界があると判断される。一方，見かけの粘着力(Δc_2)は疎水材混合率が大きくなる程，小さくなっている。これは三軸圧縮試験(CU)で得た内部摩擦角(ϕ)にあまり差がないのに，せん断強度の低下が大きいからであると考えられる。しかし，WRS=100%の場合には大きい値を示している。これは 2 つの試験の拘束圧条件がかけ離れていることが影響を及ぼしたと判断される。

6. 結論

本研究では，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するため，日本の標準砂である豊浦砂をシラン処理により疎水性地盤材料を作製し，親水材と疎水材の混合砂（WRS=0%，25%, 50%, 75%, 100%）における力学特性について調べた。強度試験としては，圧密非排水三軸圧縮試験(CU)，一定含水比圧縮試験を行った。さらに，サクションによる不飽和土せん断強度の増分の関係を調べるため，保水性試験により水分特性曲線を得た。これらの結果を用い，不飽和土力学理論に基づいて検討を行い，得られた結論を以下に示す。

(1) 一定含水比圧縮試験の結果により，疎水材混合率が増えるほど，各疎水材混合率におけるピーク軸差応力の結果が低下する傾向が確認された。また，疎水材混合率とその混合率における最大軸差応力の平均($q_{max\ ave}$)の関係から，平均最大軸差応力の低下率は一定ではなく，特に WRS=75%と WRS=100%では，平均最大軸差応力からあまり差がないことが確認された。これは，小さい摩擦力を持つ疎水材の量が 75%以上になると，土のせん断強度の増加にあまり寄与できないことを意味する。

(2) 圧密非排水三軸圧縮試験(CU)の結果により，WRS=25%，50%，75%において軸ひずみが 1%前後で変曲点が現れ，それぞれのせん断強度の増加傾向が類似していることが確認された。しかし，変曲点が現れた後も少し緩やかにはなるが，軸ひずみ 15%まで供試体がせん断されながら強度がずっと増加するということが分かった。一方， WRS=100%の場合のみ，ピーク値が現れた。これは，疎水材の摩擦力が低いので，ピーク後の圧縮に耐えらなかったと判断される。

(3) 理論式と試験結果によって導いた 2 つの見かけの粘着力(Δc)には大きく差があり，傾向も異なっていた。これはサクションによる影響と疎水材のシラン処理による摩擦力の低下と共に，低拘束圧条件(すなわち，20kPa)での過圧密状態の影響が結果に影響を及ぼしたと考えられる。したがって，サクション応力の適用によるサクションとせん断強度の関係性の究明までは至らなか

ったため，拘束圧条件の変更や他の土試料を用いた研究を今後行う必要があると考えられる。

参考文献

1) 軽部大蔵，加藤正司，浜田耕一，本田道識：不飽和土の間隙水の状態と土塊の力学的挙動の関係について, 土木学会論文集, No. 535, pp. 83-92, 1996.
2) Bishop, A.W., and Blight, G.E.: Some aspects of effective stress in saturated and partly saturated soils, Geotechnique, Vol. 13, No.3, pp. 177-197, 1963.
3) Fredlund, D.G., Morgenstern, N.R. and Widger, R.A.: The shear strength of unsaturated soils, Canadian Geotechincal Journal, Vol. 15, No. 3, pp. 313-321, 1978.
4) Vanapalli, S.K., Fredlund, D.G., Pufahl, D.E. & Clifton, A.W.: Model for prediction of shear strength with respect to soil suction, Canadian Geotechnical Journal, Vol.33, No.3 pp. 379-392, 1996.
5) 金 秉洙: 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, 平成 29 年度研究成果報告書集, 公益財団法人ウエスコ学術振興財団, 平成 30 年 3 月, pp. 17-22, 2018.
6) Kim, B.S., Shibuya, S., Park, S.W., and Kato, S.: Application of suction stress for estimating unsaturated shear strength of soils using direct shear testing under low confining pressure, Canadian Geotechnical Journal, Vol. 47, No. 9, pp. 955-970, 2010.

高精度氾濫解析と避難経路解析を組み合わせた防災シミュレーターの開発

岡山大学大学院環境生命科学研究科

赤穂　良輔

近年、集中豪雨の発生頻度が急増し、深刻な氾濫被害が頻発している。現在、多くの自治体で作成されているハザードマップでは，浸水範囲や避難場所の確認を住民はできるものの，被災時おける迅速な避難行動へつながる情報提供は未だ不十分であると考えられる。したがって、より高度なソフト面からの防災・減災対策を策定していくためには、高精度な氾濫シミュレーションおよび避難シミュレーションを利用した防災計画の検討が今後より重要となってくると考えられる。本研究では、申請者が開発を進めて行きた高精度氾濫解析モデルと簡易型の避難シミュレーションモデルである避難経路策定モデルを組み合わせた防災シミュレーターの構築を目的とし、氾濫解析モデルに用いられている床上浸水による建物内への浸水を考慮できる半透過モデルの再現性の検証および、構築した防災シミュレーターによる 2018 年 7 月洪水による岡山県倉敷市真備町での避難時間と避難領域の時間変化について検討を行った。

１．序論

近年，全国各地で予測を大きく上回る集中豪雨の発生頻度が急増しており，深刻な氾濫被害が頻発している．今後，大規模な洪水氾濫が発生する可能性は益々高くなると予想される．そこで，ハード対策面だけでなくソフト面の防災対策の拡充が重要な課題となっている．ソフト対策には氾濫の数値解析が非常に有効なツールであり，高精度の市街地氾濫解析によって，市街地域の氾濫水の挙動と危険度を事前に把握し，適切な防災策を講じることが重要である．氾濫水の挙動を精度良く予測し，かつ広範囲の領域における氾濫解析を実施するためには，市街地内の建物や道路の配置を効果的に考慮できるモデルを用いる必要がある．

現在の氾濫流解析には、浅水流方程式を用いた平面二次元解析モデルが一般的に使用されている。このモデルは、氾濫域の水深と流速の面的な分布を予測することが可能であり、洪水や津波による浸水想定区域図の作成に用いられている。一方で、より綿密な治水計画を策定するためには、建物など複雑な地物形状や配置による影響まで精度よく計算できる、高精度の氾濫解析モデルを用いる必要がある。これらの地物形状を全て計算格子で表現するためには、膨大な計算コストがかかる。そこで、近年はサブグリッドスケールの地物をモデル化した研究が進められている。

建物のモデル化としては、BP モデル(Building-Porosity model)が注目されている。本モデルは、各計算格子に含まれる建物占有率を算出し、空隙率を乗じた浅水流方程式を基礎方程式として用いられ、実用的な計算コストで高精度な氾濫解析を行うことが可能である。ただし、実際の氾濫被害の再現計算の妥当性については、最大浸水深の分布による検討に留まっている研究が多い。特に、氾濫流況の時間的変化の再現性の検証が今後必要であると考えられる。

そこで、本研究では、高精度な氾濫解析モデルと避難経路策定モデルを組み合わせ、実用的な避難計画策定を支援する防災シミュレーターの構築を目的とし，以下の 2 つのテーマについて研究を実施した。

(1)半透過建物モデルの再現性に関する実験的検討

浸水領域が市街地の場合、建物内への浸水量の影響は無視できないことを文献 [4]で示している。同研究では，建物境界線を半透過壁として取り扱うモデルを使用しているが，同モデルによる流況再現性については行われていない。そこで、本研究では、基礎的な模型実験を実施し，半透過モデルの流況再現性について検討を行った。

(2)実際の被災地域を対象とした本防災シミュレーターを用いた避難計画例の策定

同氾濫解析モデルを用いて、実際の被災地域における氾濫シミュレーションを実施した。対象とした災害は、2018 年 7 月に発生した小田川氾濫による真備町の浸水災害とした。また、避難経路策定シミュレーションを実施し、歩行及び自動車による避難時間の変化について検討を行った。

本報告書の構成は、以下のようになる。第２章では、本研究で用いる計算モデルについて、第３章では、半透過建物モデルの再現性に関する実験について、第４章では、対象災害の氾濫シミュレーションについて、第５章では、避難経路策定シミュレーションについて、それぞれ記述し、第６章で、結論を述べる。

２．計算モデルの概要

赤穂・石川が開発した洪水氾濫解析モデル [1]を用いる．このモデルは二次元浅水流方程式を基礎式とし，三角形非構造格子に有限体積法を適用して離散化し，Roe 法 [2]により解を求める．詳細は文献 [1]を参照いただきたい．本報告書では、半透過建物モデルについてのみ記載する。

(1) 半透過建物モデル

本モデルでは、格子線が建物の境界に沿うように計算格子を設定する．建物外壁を以下では建物境界という．建物内部が浸水しない場合には建物境界を不透過境界とすればよい．しかし2章で述べた被災調査実際によれば，浸水区域のほとんど全ての建物の内部に氾濫水が侵入した．そこで建物境界を半透過とし，フラックスQを式(1)のように仮定した．

$$Q = \begin{cases} S_p V_p & \text{if } h_{out} > h_{in} \\ -S_p V_p & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1)$$

$$\text{where} \begin{cases} S_p = C \times \dfrac{h_{in} + h_{out}}{2} B \\ V_p = \sqrt{2g|h_{out} - h_{in}|} \end{cases} \quad (2)$$

ここに S_p は透過面積，V_p は透過速度，h_{out} は建物境界外側の水深，h_{in} は内側の水深，B は当該セルの建物境界長さである．式(2)のように，透過速度は水頭差を用いた一般的な形で与えた．一方，透過面積は，窓や崩壊した壁の穴などに相当し，透過係数 C を用いて表現した．C=0 は不透過，C>0 で半透過となる．

3．半透過建物モデルの再現性に関する実験的検討

(1) 模型実験の概要

密集市街地における建物密度および建物配置による氾濫挙動への影響を検討するために，循環水路を用いた基礎的な氾濫実験を実施した。

(2) 実験装置および建物配置

図-3.1 に示すように，実験装置は上下流側の貯水槽部（木製）と氾濫域部（アクリル製）より構成されている。上流側の貯水槽と下流側の貯水槽は水中ポンプで接続されており，一定流量での循環が可能な機構になっている。氾濫域部は幅 1.3m，長さ 2.0m の長方形断面の直線水路であり，勾配は 0.001 となっている。また流入部は幅 10cm の開口型で，流入時は水が波状に広がるようになっている。建物模型は，BH モデルにおいては発泡スチロール板を用いた。また半透過モデルでは**図-3.2** に示すように，3D プリンタを用いてモデル内に水が流入できるよう，高さ 6mm 部分に横幅 3 c m，縦幅 5mmの流入出口を上流側と下流側に設けた。模型のサイズは両モデルとも 10 c m正方形である。氾濫域部は図-3.3 に示すように，建物モデルが格子状と交互に設置されている。ここで建物配置の各パターンの名称は，BH と半透過（half）H，模型配置は，格子状（latticed）L と交互（mutual）M，模型間隔 x（x=2,4）とすると，case-BH-lx のように表す。

(3) 測定項目および計測方法

貯水槽部から氾濫域部へ一定流量を通水し，開口部から流入した時点から定常状態に至るまでの各パターンにおける段階的な水深を計測した。測定位置は，**図-3.3** に示す箇所で，上流側からポイント 1,2,3 と設定し，各箇所にメジャーを設置し計測した。

また，水中ポンプの流量を測るため，**図-3.1** の 5 箇所の黄色の楕円で示すように 0.3m で下流の流れを切り，容積 $3.0\times10^{-3}m^3$ のケースが水で貯まるまでの所要時間を測定し，単位幅流量を求め，その単位幅流量を水路幅で積分することにより流量を求めた。その結果，0.0018 m^3/s と算出され，この値を数値解析の流量とした。

(4) 実験結果と解析結果の比較

上述の実験条件より得られた水深の時間変化と、半透過モデルを用いた氾濫解析モデルによる解析結果との比較を行った。計算条件としては、計算格子サイズは一律に 1cm，地盤高は氾濫原部を 0cm，水槽部を-50cm，氾濫原部の勾配を 0.001 と設定し，粗度係数は，一律 0.018 とした。上流端境界条件には、流量 $0.0018m^3/s$ を与え，下流端境界条件には自由流出条件を与えた。式(2)に示した透過係数 C については，0.0(BH モデル)、0.05,0.15,0.2 の 4 パターンについて実施した。なお、BH モデルについての再現性については文献[3]で検討しており、本モデルによる流況再現性について示されているため、本報告書では、半透過建物モデルを用いた場合の結果のみ示す。

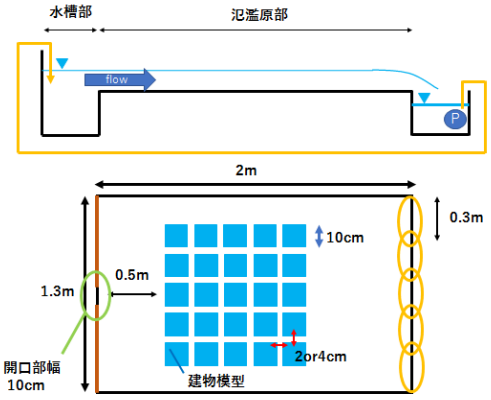


図-3.1 模型実験の概略図

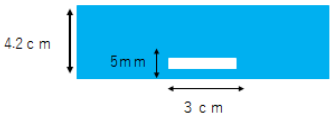


図-3.2 半透過壁を持つ建物模型

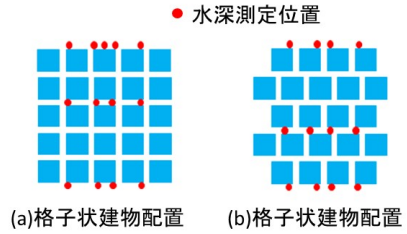


図-3.3 氾濫域の建物配置

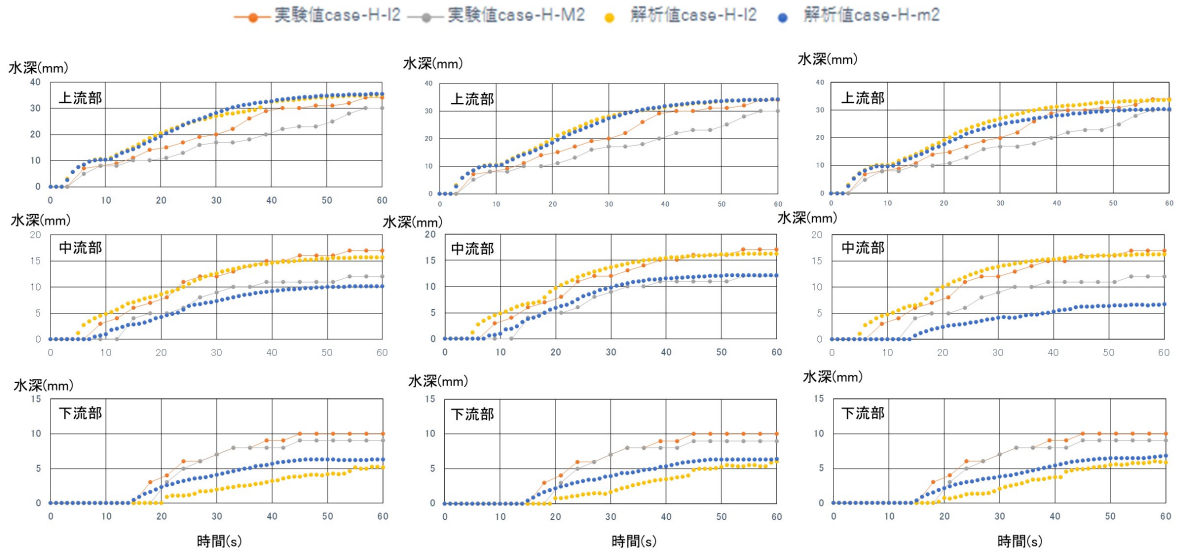


図-3.4　水深の時間変化の比較

図-3.4 に，半透過建物模型を用いた格子状配置と交互配置による水深の時間変化について、C=0.05, 0.15, 0.2 とした場合の半透過モデルによる解析結果との比較を示す。上流部及び下流部では、より建物による抵抗が大きくなる交互配置の方が、格子状配置よりも水深が小さくなっていることが分かる。これは、建物配置部の抵抗が大きくなり、氾濫域主要道路部へより多くの氾濫水が流入していることが要因であると考えられる。また下流部へ行くと水深が小さくなり、射流場になっていると考えられる。建物配置部の中心に相当する中流部において、本解析モデルはC の値を適切に与えることで、建物配置による影響および建物内への流入について良好な再現性が示されている。一方、上流部、下流部ではC の値によらず再現性が低い結果となっている。上流部については流況の３次元性、下流部については射流場になっていることが要因と考えられ、本解析モデルでは、今後再現性を向上されるためにより詳細な検討がひつようであると考えられる。

4．真備町における氾濫シミュレーション

本研究では，河道および堤内地を含む全域を三角形非構造格子で分割し，洪水流と氾濫流を同時に解析する包括型氾濫解析モデルを用いて検討を行った．

(1) 解析領域と解析メッシュ

解析領域を図-4.1 に示す．高梁川は上流端を日羽観測所（27.6 km），下流端を船穂観測所（6.4 km）とし，小田川は矢掛観測所（13.0 km）を上流端とした．堤内地側は，現地調査から推定された氾濫域を含む形で設定した．また，小田川支流の末政川，高馬川，真谷川，高梁川支流の新本川についても図-4.2 (a) の末政川のメッシュに示すように全て二次元格子で表現した．更に，建物の取扱方法として，国土地理院が公開している基盤地図情報の建築物の外周線データより作成したポリゴン（建物ポリゴン）を作成し，建物ポリゴンを含有する計算格子に，赤穂らにより提案された半透過

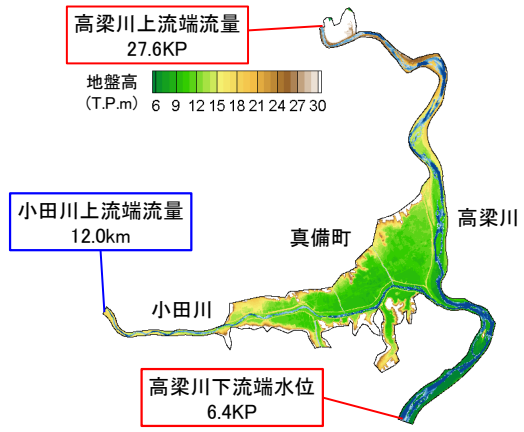


図-4.1　解析領域

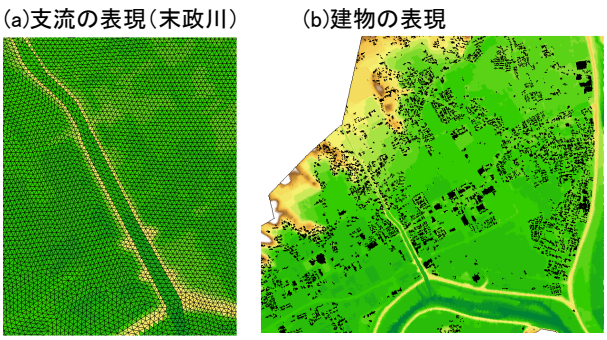


図-4.2　地物の表現

建物モデルを適用した（図-4.2 (b)）．計算格子サイズは，約 10 m とし，計算格子数は 649,669 である．

(2) 解析条件

地盤高は，堤内地および河道内高水敷には，2013 年の国土地理院の 5m メッシュ標高データ，河道低水路については 2011 年の定期横断測量データをそれぞれ用いて作成した．ただし，堤防天端高については，5 m メッシュ標高データのみを使用した場合過小となる可能性があるため、高梁川及び小田川については定期縦断測量データ,支流についてはRTK-GPS を用いた測量データを併用して作成した。

高梁川および小田川の上流端流量は，国土交通省の 2017 年度の H-Q 式を用いて算出された値を用いた．また，支流

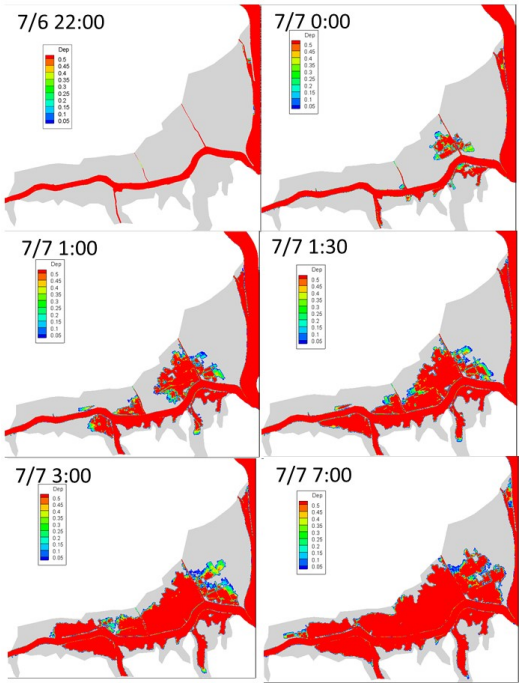


図-4.3　水深の時間変化

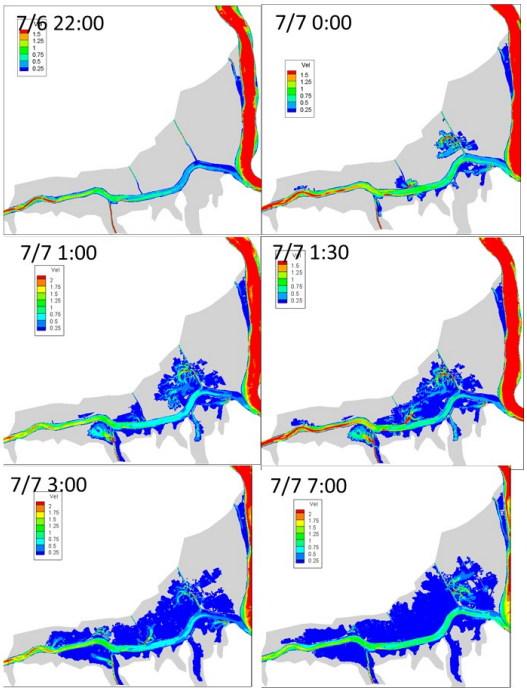


図-4.4　流速の時間変化

の上流端流量は，佐山らがRRIモデルより算出した流量ハイドロを使用した．堤防決壊は，該当箇所の地盤高を30分かけて堤防周辺の地盤高と同じ高さになるように線形に減少させることで表現した．

(3) 解析結果

図-4.3 及び **4.4** に氾濫解析から得られた水深と流速の時間変化を示す。避難勧告が発令された7月6日22時のデータでは浸水は見られない。7月7日0時のデータでは，末政川の右岸側で一部流速が1.5m/sを超えている範囲がある。これは，末政川右岸の堤防が決壊したためである。そのほかの地域では流速は比較的遅いが，水深は浸水範囲の大部分で0.5mを超えることがわかる。避難指示が発令された1時30分のデータでは，水深0.5mを超える浸水範囲が広がり，また，一部の地域では，流速が1.5m/sを超えており，避難困難地域が広がっている。これは高齢者の歩行限界水深，歩行限界流速を超えており，高齢者は歩行不可能となる。また，自動車の走行限界水深，走行限界流速であるため，自動車も走行不可能となる。その後，時間が経つにつれて，浸水範囲が広がり，水深・流速ともに大きい地点が増えていくので，通行及び避難は困難になると予想される。ただし、本報告書で示している氾濫解析結果については速報値であり、境界条件や堤防決壊条件、粗度設定についてはさらなる検討が必要である。

5．避難経路策定シミュレーション

(1) ダイクストラ法を用いた避難経路の策定

本研究では、ダイクストラ法を用いた避難経路の策定を行った。ダイクストラ法は，最短経路問題を効率的に解くグラフ理論における動的なアルゴリズムで、近い場所の明らかなことから順次確定していき，その確定した情報を基にさらに遠くまで確定していく方法であり，スタート地点からゴール地点までの最短経路と距離を求めることが可能となる。コストは主に距離や時間であるが，本研究では距離と，水深や流速，勾配からの影響を考慮した歩行速度から算出した時間をコストとする。

まず，スタートとゴールを設定し，スタートの位置からいくことのできる場所への最短距離を算出し，その中でも最短のものを最適解として確定させる。次に確定した場所から辿れる経路を確認し，辿った場合の距離を算出し。その段階で判明している距離より大きい倍位は更新せず，距離が小さい場合のみ新たな経路を採用することで最短経路を更新していく。この手順を繰り返し，経路を確定させていくことで，ゴールまでの最短経路・最短距離が確定する。この方法を利用し，避難場所をスタートとし，他のすべての点までの最短経路及び最短距離を求めることで，すべての地点から避難場所までの最短経路及び最短距離を求めることができる。

(2) 避難速度の設定方法

氾濫解析から得られた水深及び流速から受ける抵抗，道路幅員による歩行速度，自動車走行速度の低下を考慮した避難速度の算出をする。道路の点がそれぞれどの三角形格子に対応しているかを抽出することで，各点における水深及び流速が算出でき，避難速度

表-5.1　自動車の避難速度に用いる係数の設定

道路幅 d(m)	H_{max}(m)	U_{max}(m/s)	V_{max}(m/s)
d <1.9	0.5	2.0	0
2.0≦ d <3.5	0.5	2.0	2.7
3.5≦ d <5.0	0.5	2.0	5.4
5.0≦ d <6.5	0.5	2.0	8.1
6.5≦ d <8.0	0.5	2.0	10.8
8.0≦ d	0.5	2.0	13.5

が求められる。避難速度に関して，以下に示す避難速度減衰モデルを用いた。

$$v = v_{\max}\left|1 - \frac{h}{h_{\max}} - \frac{u}{u_{\max}}\right| \qquad (3)$$

ここで，H_{max}は避難限界水深,U_{max}は避難限界流速,V_{max}は最大避難速度を示す。また，Hは水深，Uは水の流速，Vは避難速度を表す。本研究では，歩行者の避難経路策定については高齢者を想定し、文献[4]で用いられているH_{max}=0.3, U_{max}=1.5 V_{max}=1.2とした解析を行った。

一方、自動車の避難経路策定については, d ,H_{max}, U_{max} V_{max}, を**表-5.1**に示す。また,自動車による避難の際，幹線道路である国道486号線など，避難所までの道路において渋滞が発生しており，自動車走行速度は小さくなると考えられるため，渋滞を考慮した場合は，国道486号線を含めた大通りにおける自動車走行速度の計算係数を変えた試行計算を行った。

(3) 避難場所の設定

図-5.2に真備町における避難所を示す。真備町の洪水時の避難所は避難所3の岡田小学校だけであるため，今回の解析では，氾濫域の外に避難することを想定し，解析範囲外につながる道路を避難所として設定した。以下，避難所0から避難所7とする。

(4) 歩行避難解析と自動車避難解析の比較

歩行避難解析及び自動車避難解析の解析結果から得られた避難時間の分布をそれぞれ**図5-3，5-4**に示す。避難勧告が発令された7月6日の22時に避難開始した場合，河川氾濫による浸水は起きておらず，歩行避難では避難所に近い地域では600秒前後での避難が可能であり，避難所から遠い避難所では1200秒程度の避難時間で避難可能となっている。一方，自動車避難では，どの地域も避難時間に大きな差は見られず，おおよそ300秒前後で迅速な避難が可能であることがわかる。避難指

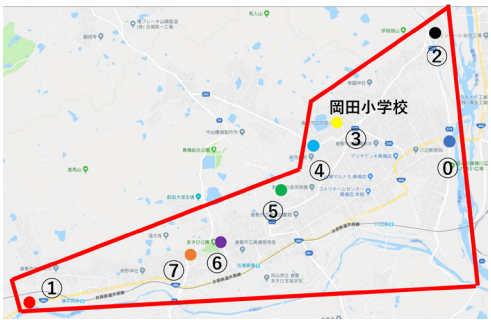


図-5.2　解析に用いた避難所位置

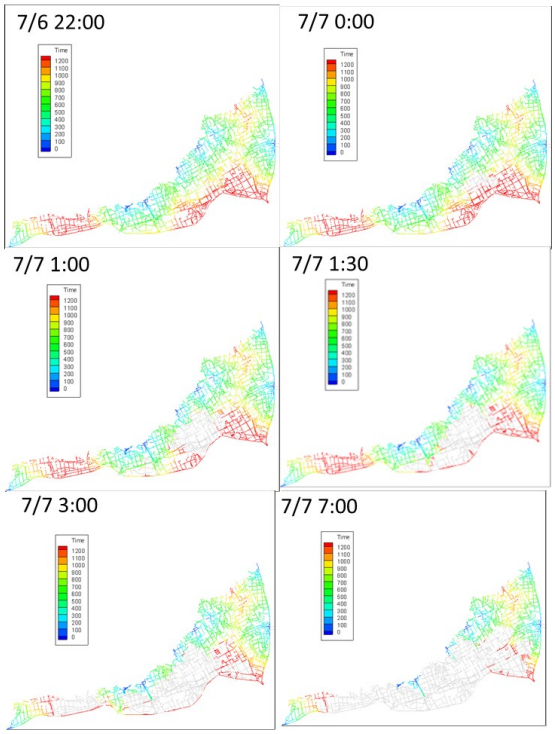


図-5.3　歩行避難解析から得られた避難時間の分布

示が発令された7月7日の1時30分に避難開始した場合，河川氾濫による浸水が発生しており，歩行，自動車ともに限界水深を超え，避難が不可能となる地域がある。この地域は，真備町で被害者の多かった地域であり，避難指示が発令されるより前の避難が必要である。また，一部の地域で最短避難所が変わっている。これは，浸水により避難所までの最短経路が通行不可能となってしまい，迂回する必要があるためである。よって，この地域は，避難に要する時間が増えることが予想される。また，0時30分には，またこの地域は，1時には通行不可能地域になっており，歩行避難では避難時間がかかり過ぎてしまい，氾濫に巻き込まれる恐れがある。自動車による避難では，300秒前後の避難時間であり，自動車による避難が必要となる。0時には，高馬川右岸も決壊しており，0時のデータからも浸水が確認できる。この範囲は，歩行避難では避難所5が最短避難所であるが，自

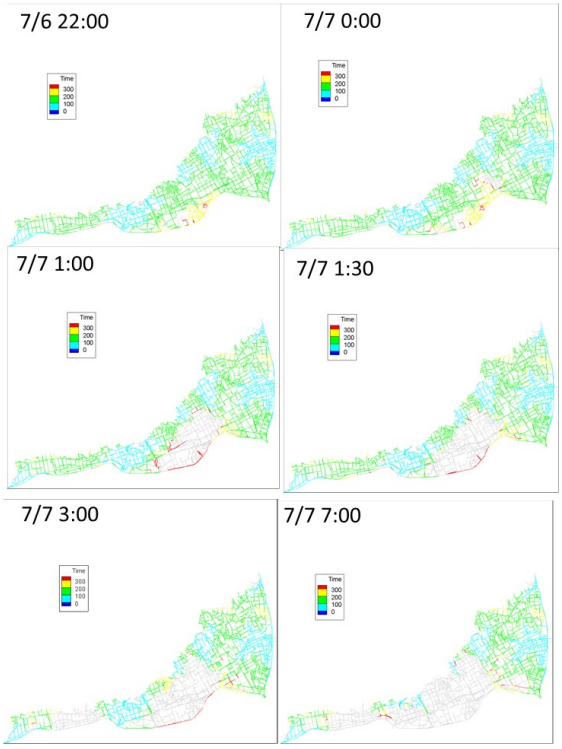


図-5.4　自動車避難解析から得られた避難時間の分布

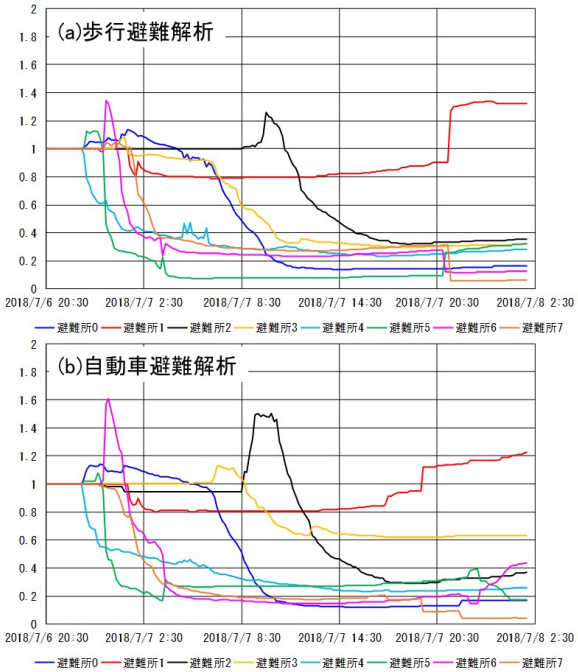


図-5.5　相対的な避難範囲の時間変化

動車避難では，避難所6が最短避難所となっている。理由として，この範囲の北側に国道486号線があり，自動車避難の場合，国道486号線を利用することで避難速度が速くなり，避難時間の短縮になるためと考えられる。このことから，自動車避難の場合，国道486号線を使った避難が主な避難経路であると予想される。

図-5.5に浸水を考慮しない場合の避難範囲に対する相対的な避難範囲の時間変化を示す。歩行避難解析では，避難所3の避難範囲は7日の0時頃に減少しはじめるのに対し，自動車避難解析では，7日の7時ごろに減少しだすことがわかる。このことから，避難所3を最短の避難所とする地域では自動車による避難が有力的であることが分かる。対照的に，歩行避難解析では，避難所2の避難範囲は7日の8時30分まで変化が無いのに対し，自動車避難解析では，7日の0時頃に減少することが分かる。

6．結論

本研究で得られた主要な成果を以下に示す。

(1) 床上浸水による建物内への浸水を考慮した半透過モデルの再現性について、模型実験との比較から検討を行った。その結果、建物の配置が異なる場合においても、建物密集領域では同程度の再現性が確認できた。

(2) 氾濫解析モデルと避難経路策定モデルをカップリングさせ、避難時間および避難領域の時間変化に関する検討を、2018年7月に真備町で発生した氾濫を対象に実施した。歩行および自動車による避難速度を考慮した試行計算を行った結果、具体的な避難計画の策定に今後利用可能であることが示唆された。

参考文献

1) 赤穂良輔，石川忠晴，畠山峻一，小島崇，都丸真人，中村恭志：岩手県釜石市街地における2011年東北地方太平洋沖地震津波の氾濫解析，土木学会論文集B1，Vol.71，16-27，2015.

2) Roe, P. J. : Approximate Riemann Solvers, Parameter Vectors, and Difference Schemes, *J. Comput. Phys.*, Vol. 43, pp. 357-372, 1981.

3) 赤穂良輔，前野詩朗，小川俊，吉田圭介：都市氾濫解析に用いる建物群の空隙率の設定方法に関する実験的検討、土木学会論文集B1（水工学）Vol.74，No.4，I_1525-I_1530, 2018.

4) 赤穂良輔，前野詩朗，高橋巧武，工代健太，吉田圭介：”市街地レイアウトを考慮した岡山市における津波到達前後の浸水範囲および避難時間の検討”，土木学会論文集B2(海岸工学)，Vol. 72, No.2, I_289-I_294，2016.

日本で高度に多様化した植物群テンナンショウの多様性維持機構の解明

岡山大学大学院環境生命科学研究科

廣部 宗

サトイモ科テンナンショウ属は全 180 種のうち 53 種が日本に分布し，野外ではしばしば 2〜5 種が混生している．テンナンショウ属の多くの種は人為交配によって容易に雑種化するが，混生集団では雑種個体は稀である．したがって，何らかの機構が異種間での花粉移動を抑制する (生殖隔離) ことで種間交雑が生じず，テンナンショウ属複数種の共存が実現していると予想される．そこで本研究では，テンナンショウ属 5 種が混生する岡山県北部において，異種間での花粉移動の制限因子となり得る，5 種の分布標高 (空間的隔離)，開花時期 (季節的隔離)，花粉運搬者 (送粉者隔離) の種間差を検証した．その結果，テンナンショウ属 5 種は分布標高によって高地性 1 種・中間性 1 種・低地性 3 種に，開花時期によって早咲き系 3 種・遅咲き系 2 種に大別できた．いずれの種も主要な送粉者は双翅目昆虫だったが，キノコバエ科が優占する 3 種・クロバネキノコバエ科が優占する 1 種・2 科が優占する 1 種が存在した．以上の結果から，テンナンショウ属 5 種の全組み合わせ (計 10 通り) のうち，少なくとも 7 通りには 1~3 つの生殖隔離が存在することが示唆された．

はじめに

種間交雑は種の境界を曖昧にし，ときに短期間で種を絶滅させうるため (Wolf *et al.*, 2001)，近縁種同士の共存には交雑を防ぐ生殖隔離が不可欠である (Coyne & Orr, 2004)．実際に，近縁複数種が混生する場合には，さまざまな生殖隔離によって交雑が防がれている（Lowry *et al.*, 2008）．

サトイモ科テンナンショウ属 *Arisaema* Martius (Araceae) は，全 180 種のうち 53 種が日本に自生しており (邑田ほか, 2018)，2 ~ 5 種のテンナンショウが混生することも珍しくない (邑田, 1995; 松本ほか, 2018b)．テンナンショウ属のほとんどの種間では人為交配による雑種形成が容易なため (Murata & Ohno, 1989; 邑田ほか, 2018)，種間での花粉交換が生じる前の生殖隔離が存在すると考えられる．これまでテンナンショウ属の生殖隔離として，分布標高の種間差 (空間的隔離，Murata & Ohno, 1989; 小林, 2000) や, 開花時期の種間差 (季節的隔離, 増田ほか, 2004; 邑田ほか, 2018) が示唆されてきた．しかし，これらには種間での重複がしばしば認められるため，実際には花粉運搬者 (送粉者) の種間差 (送粉者隔離，Vogel & Martens 2000) も併せて，複数の隔離障壁の組み合わせにより種間交雑を抑止していると予想される．しかしながら，生育環境や開花時期の種間差を定量評価した事例は限られており，同所的に分布する種間で送粉者相を比較した例は皆無である．

本研究では, テンナンショウ属複数種の共存を実現する生殖隔離機構を網羅的に解明することを目的と，岡山県北部で同所的・側所的に分布するテンナンショウ 5 種を対象に (松本ほか, 2018b), 分布標高，開花時期，送粉者の種間差を検証した．

材料と方法

調査地

調査地は，岡山県英田郡西粟倉村大茅の若杉峠 (標高 1,050 m) から大茅スキー場 (標高 650 m) までの道路沿いの林床で，年平均気温は 8.2 ℃，年降水量は 2,500 mm，積雪深は 1.5 m である (水永・中島, 1997)．若杉天然林周辺はブナ，ホオノキ，ミズメの優占する冷温帯落葉広葉樹林で，標高 900 m 以下の場所はスギあるいはヒノキ人工林が広がっている．林床には，ウメガシマテンナンショウ *A. maekawae* J. Murata & S. Kakishima，ホソバテンナンショウ *A. angustatum* Franchet & Savatier，ヒロハテンナンシ

表 1. 岡山県北部に分布するテンナンショウ属 5 種の生殖隔離

種名	分布	開花期	訪花昆虫 (上位 80 %を頻度順に抜粋)
ウメガシマ	低地性	早咲き	キノコバエ科，クロバネキノコバエ科，タマバエ科，ユスリカ科
ホソバ	低地性	早咲き	キノコバエ科，ユスリカ科，タマバエ科
ヒロハ	中間性	早咲き	キノコバエ科
ミヤマ	高地性	遅咲き	クロバネキノコバエ科，ユスリカ科，タマバエ科，キノコバエ科
コウライ	低地性	遅咲き	キノコバエ科，クロバネキノコバエ科，ノミバエ科，ユスリカ科

ョウ *A. ovale* Nakai，ミヤママムシグサ *A. pseudoangustatum* Serizawa var. *pseudoangustatum*，コウライテンナンショウ *A. peninsulae* Nakai の 5 種が自生する (松本ほか, 2018b). 以降，和名の「テンナンショウ」または「マムシグサ」を省略して示す.

生殖隔離の検証

2018 年 4 月 24 日から 7 月 7 日まで，下記 3 項目について調査した．まず，調査地内を走る道路 (若杉天然林内は登山道) の両脇 25 m の範囲に自生するテンナンショウ属 5 種の全開花個体を対象に，携帯型 GPS により自生場所の標高を記録した．次に，テンナンショウ 5 種の開花個体から各種 40~70 個体を任意に選出し，開花開始日と開花終了日を記録した．さらに，上述の調査個体を対象に，花序に訪花した昆虫を吸虫管によって開花期間中に毎日採取した．採取した昆虫は冷凍によって固定後，室温で乾燥させ標本化した．実体顕微鏡下での観察により，双翅目以外の訪花昆虫は目レベルで同定し，双翅目昆虫は科レベルで同定した.

結果

テンナンショウ属 5 種は分布標高によって，800~900 m を分布の上限とする低地性種であるウメガシマ (n = 251, 666~845 m), ホソバ (n = 94, 671~909 m)，コウライ (n = 117，662~890 m)，800 m 台を分布の下限とする高地性種であるミヤマ (n = 110，810~1,083 m)，そして調査地全域に分布するヒロハ (n = 516，669~1,073 m) の 3 群に大別された.

個体群内での開花開始日と終了日に注目すると，4 月下旬~6 月中旬に開花する早咲き種であるウメガシマ (n = 61, 4/25~6/21), ホソバ (n = 53, 4/28~6/21), ヒロハ (n = 67，4/27~6/16)，5 月中旬~7 月上旬に開花する遅咲き種であるミヤマ (n = 58，5/18~7/5) とコウライ (n = 44，5/15~7/9) の 2 群に大別された.

テンナンショウ属 5 種の訪花昆虫は，90 %以上が双翅目昆虫によって構成されていた．一方で，双翅目昆虫の科レベルでの構成比は種間で明瞭に異なり，過半数をキノコバエ科が占めるホソバ (キノコバエ科 59 %)，ヒロハ (キノコバエ科 88 %)，コウライ (キノコバエ科 51 %), 過半数をクロバネキノコバエ科が占めるミヤマ (クロバネキノコバエ科 53 %), 2 科の比率がともに高いウメガシマ (キノコバエ科 36 %，クロバネキノコバエ科 24 %) に大別された.

考察

本研究の結果から，テンナンショウ属 5 種の全 10 組み合わせのうち 7 組に，空間的隔離・季節的隔離・送粉者隔離の 3 つ (ウメガシマ–ミヤママムシ，ホソバ–ミヤママムシ)，送粉者隔離と季節的隔離 (ヒロハ–ミヤママムシ) もしくは送粉者隔離と空間的隔離の 2 つ (コウライ–ミヤママムシ)，季節的隔離のみ (ウメガシマ–コウライ，ホソバ–コウライ，ヒロハ–コウライ) が存在することが示唆された. 加えて，明瞭な生殖隔離が認められなかった 3 組 (ウメガシマ–ホソバ，ウメガシマ–ヒロハ，ホソバ–ヒロハ) のうちヒロハを含む 2 組では，本研究で注目しなかった生殖隔離が重要な可能性もある．ヒロハテンナンショウは狭義マムシグサ群に属する残りの 4 種と系統的に異なるほか (邑田ほか, 2018) 染色体数も異なるため (Watanabe *et al.*, 1998)，種間での花粉交換が生じて結実したとしても雑種個体が不稔性を示す

場合がある (Kobayashi *et al.*, 2005). したがって，本調査地のテンナンショウ 5 種では，ウメガシマ–ホソバを除くすべての組み合わせにおいて何らかの生殖隔離が存在すると考えられ，このことはウメガシマ–ホソバ間でしばしば中間型が認められること (松本ほか, 2018a) と矛盾しない.

その一方で, 早咲き種と遅咲き種では開花期間が 1 か月ほど重複していたため，ウメガシマ–コウライ，ホソバ–コウライ，ヒロハ–コウライにおいて季節的隔離が単独で種間での花粉交換を防止しているとは考え難い．本研究では訪花した双翅目の分類を科レベルで行っているが，主要送粉者がキノコバエである地生ラン *Pterostylis* 属では，それぞれの種が特定のキノコバエの種のみを利用することが報告されている．実際に，日本産テンナンショウ属の花序形態は多型に富むため (邑田, 1995)，それぞれの種が特異的な送粉者に適応している可能性は十分に考えられる. 今後, 送粉者隔離のより適正な評価のために，属・種レベルでの訪花昆虫の同定を実施する必要がある.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，多大なご支援をいただきました公益財団法人ウエスコ学術振興財団に深く感謝申し上げます．なお，本研究は岡山大学大学院環境生命科学研究科の宮崎祐子博士，同博士後期課程の松本哲也氏との共同研究です.

引用文献

Coyne JA, Orr HA. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Massachusetts.

小林禧樹. 2000. テンナンショウ属ノート (1) 神戸市域におけるテンナンショウ属の生育地と地質. *兵庫の植物* **10:** 39–42.

Kobayashi T, Murata J, Watanabe K. 2005. Two new putative natural hybrids in Japanese *Arisaema* (Araceae). *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* **56:** 105–110.

Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA, Willis JH. 2008. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **363:** 3009–3021.

増田理子, 泉 勝也, 西村文武. 2004. 交雑域保全の重要性に関する考察—エヒメテンナンショウ雑種起源の可能性の検討を基として—. *土木学会論文集 VII* **755:** 67–73.

松本哲也, 佐薬信也, 邑田 仁. 2018a. 岡山県新産のホソバテンナンショウとミヤママムシグサ (サトイモ科). *植物研究雑誌* **93:** 143–146.

松本哲也, 佐薬信也, 邑田 仁. 2018b. 岡山県北部に産するマムシグサ群 (サトイモ科) の分類学的検討. *植物研究雑誌* **93:** 253–268.

水永博己, 中島嘉彦. 1997. ブナ–ホオノキ林分の林分構造とホオノキ実生稚樹の生存. *森林立地* **39:** 21–28.

Murata J, Ohno J. 1989. *Arisaema ehimense* J. Murata et Ohno (Araceae), a new species from Shikoku, Japan, of putative hybrid origin. *Journal of Japanese Botany* **64:** 341–351.

邑田 仁. 1995. マムシグサ群の多様性. *植物分類, 地理* **46:** 185–208.

邑田 仁, 大野順一, 小林禧樹, 東馬哲雄. 2018. 日本産テンナンショウ属図鑑. 北隆館, 東京.

Thalwitzer L, Kelly D, Smissen RD, Butler R, Sucking DM, El-Sayed A. 2018. Species-specific male pollinators found for three native New Zealand greenhood orchids (*Pterostylis* spp.) suggest pollination by sexual deception. *Australian Journal of Botany* **66:** 243–254.

Vogel S, Martens J. 2000. A survey of the function of the lethal kettle traps of *Arisaema* (Araceae), with records of pollinating fungus gnats from Nepal. *Botanical Journal of the Linnean Society* **133:** 61–100.

Watanabe K, Kobayashi T, Murata J. 1998. Cytology and systematics in Japanese *Arisaema* (Araceae). *Journal of Plant Research* **111:** 509–521.

Wolf DE, Takebayashi N, Rieseberg LH. 2001. Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology* **15:** 1039–1053.

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

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、安価な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の検討を行い、フラノース環上のジオール部分の保護基として TBDMS 基などの嵩高いものにすることで､高い立体選択性でフルオロ基を導入することに成功し、Nucleocidin の形式合成を達成した。しかしながら、既報ではスズ試薬などを用いていたことから、ヨード基からスルファモイル基への直接置換を試みたが、フルオロ基の存在により反応性が低くなっていると言う知見を得た。直接的な官能基の導入はあきらめ、二重結合を有する重要中間体に対してエポキシ化剤と MeOH を用いてエポキシ化と開環、ついでスルファモイル化と脱保護によって Nucleocidin のメトキシ誘導体 を合成した｡今後はメトキシ基を種々の置換基への変換反応を検討する予定である。

【背　景】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、フルオロ基) 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 (4'位) にフッ素が結合した独特の構造を持っており、生合成経路に興味がもたれている。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、

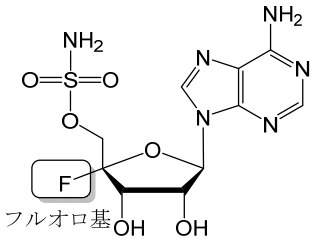


Fig. 1　Nucleocidin

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、医農薬としての可能性を検討することとした。

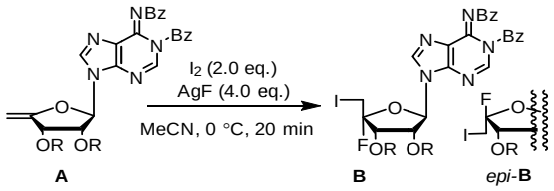
【アデノシン誘導体の合成】

二重結合を有する重要中間体を大量に合成する目処はすでに前年度の段階で達成[1]できたので､本年度の重要な課題として、二重結合へのフルオロ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。

合成した二重結合体 **A** (**1** ～ **3**) に対して、ヨウ素とフッ化銀を作用させ、ヨード基とフルオロ基の導入を試みた (Table 1)。既報通りにヒドロキシ基の保護基としてイソプロピリデン基で架橋した化合物 **1** を用いてヨードフルオロ化を行ったところ、目的物 **4** と立体異性体 epi-**4** が 3 : 2 の割合で生成していた (Entry 1)。この立体選択性の低さを打開するため、嵩高い置換基で保護した **A** を用いて、ヨードフルオロ化を試みた。ベンゾイル基で保護し

た **2** では、副生成物が多く精製が困難であったが、**5** を低収率ながらも高い立体選択性で得ることが出来た（Entry 2）。そこで、さらにかさ高い *tert*-butyldimethylsilyl（TBDMS）基で保護した **3** を用いたところ、高い立体選択性かつ高い収率で **6** を得ることが出来た（Entry 3）。

Table 1　ヨードフルオロ化の検討



Entry	A (R=)	B: yield	B : *epi*-B
1	**1**: $C(CH_3)_2$	**4**: 80%	3 : 2
2	**2**: Bz	**5**: trace	99 > : 0
3	**3**: TBDMS	**6**: 79%	99 > : 0

6 の構造および立体選択性の確認は、NMR 測定により行った。まず、^{19}F-NMR において、−94.0 ppm にシグナルピークを観測したことから、フッ素原子の導入を確認した。さらに、^{1}H–^{19}F ヘテロ核種相関（^{1}H–^{19}F Hetero g-cosy）によって、5'-H と 4'-F 基間の強い相関を確認したことから、目的とする化合物を合成できたと考えた（Fig. 2）。

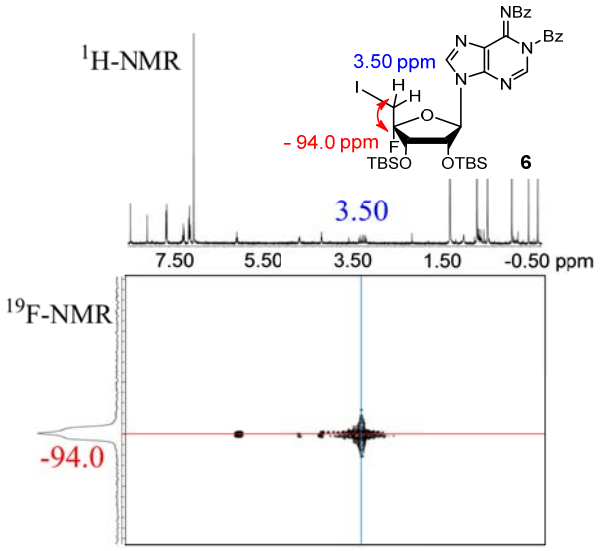
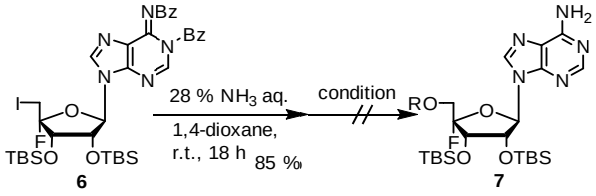


Fig. 2　フルオロ体 **6** の ^{1}H–^{19}F Hetero g-cosy

化合物 **6** のアミノ基保護基である Bz 基とヒドロキシ基保護基である TBDMS 基を脱保護した化合物は、Nucleocidin を合成するための既知化合物[2]である事から、既報に従うことによって、Nucleocidin の効率的な形式合成を達成したと考えた。

二重結合への付加反応（ヨードフルオロ化）の立体選択制の向上については解決できたので、次に、大量合成には不向きであるアジド化や毒性のあるスズ試薬を用いる反応の代替法について検討した。何故なら、重金属は国際医薬品規制調和国際会議のガイドラインにおいて医薬品中への残留が極めて厳しく管理されている。また過酸化物やアジ化合物を大量に使用する場合には、その爆発危険性の懸念が生じる。以上のように、原薬合成における大量合成を含め、医薬品製造に適した安価、安全、および環境負荷の小さな酸化反応の開発に対する要求が未だに存在する。5'位にヨード基が結合していることから、容易に S_N2 反応などによってヨード基を他の置換基に交換ができると考えて種々の反応を行ったが、既報であるアジド化反応を含め未反応、あるいは反応が進んだとしても僅かであった（Table 2）。以上の結果から、4'位に強い電子求引性を有するフルオロ基の影響により、ヨード基が結合しているものの 5'位の δ^+ 性が低くなり反応性が低くなっていると考えた。

Table 2　ヨード基の官能基変換の検討

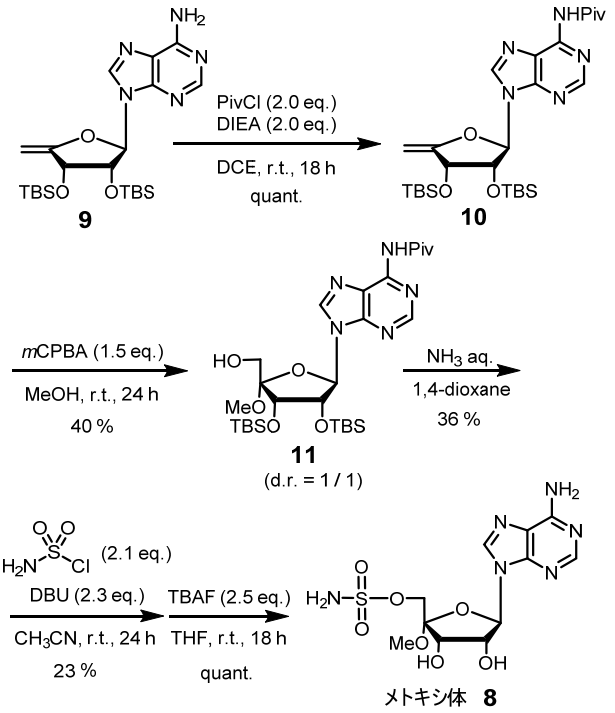


Entry	Reagent	Solvent	temp.	R	Yield
1	NH_2SONa	DMF	120 °C	NH_2SO	n.r.
2	CH_3CO_2Ag	MeCN	120 °C	CH_3CO	n.r.
3	CH_3CO_2Ag	DMI	120 °C	CH_3CO	n.r.
4	$AgNO_3$	acetone/H_2O	r.t.	H	n.r.
5	$AgNO_3$	DMI/H_2O	r.t.	H	n.r.

【Nucleocidin メトキシ誘導体の合成】

電子求引基であるフルオロ基が 5'位の反応性を低下させていることを確認する事も含め、フルオロ基の代わりにメトキシ基を有する誘導体 **8**（Scheme 1）

を合成することとした。化合物 **3** に MeOH 溶媒中 *m*CPBA を作用させ、一度にヒドロキシ基とメトキシ基が導入された化合物の合成を試みた。MeOH 溶媒中、低温下で *m*CPBA と $NaHCO_3$ を作用させたところ、微量ではあるが目的化合物を立体選択的に得ることが出来たが、収率の悪さや再現性に乏しかった。そこで、反応温度を室温に上げ反応時間を長くしたところ、TLC 上で目的化合物の生成を確認できたが、多量の塩が生成し精製は困難であった。以上の結果を受け、核酸塩基部分のアミノ基の保護基を Bz 基から変更することにした。種々論文検索を行った結果、核酸塩基部分の一級アミノ基を ピバロイル（Piv）基により保護した **10** が付加反応に有効であることが分かった[3]ため、Piv 基に変更することにした。別途合成した **10** の MeOH 溶液に *m*CPBA を加え、室温で 24 時間撹拌したところ、メトキシ体 **11** を収率 40%で得ることができた。立体異性体との比は 1:1 であり、シリカゲルカラムトグラフィーを用いて容易に分離出来た。**11** にアンモニア水を作用させて Piv 基の脱保護、スルファモイル化、最後に TBDMS 基の脱保護を行って、Nucleocidin の誘導体であるメトキシ誘導体 **8** を得た（Scheme 1）。



Scheme 1　メトキシ体の合成

以上の結果から、メトキシ体ではスルファモイル化においてスズ試薬が不要であったことから、ヒドロキシ基の活性化をフルオロ基による誘起効果によってヒドロキシ基の反応性が低下させられていることが確認できた。今回得た知見を基にして、種々の求核試薬を用いてエポキシ化と求核反応を行って、様々な Nucleocidin 誘導体の合成を試み、ライブラリーの構築を目指す。

【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調整した二重結合を有する重要中間体 **A** を用いてヨードフルオロ化について検討した結果、フラノース環上のジオール部分の保護基として TBDMS 基などの嵩高いものにすることで、高い立体選択性でフルオロ基を導入することに成功し、Nucleocidin の形式合成を達成した。しかしながら、既報では毒性のあるスズ試薬などを用いていたことから、ヨード基からスルファモイル基への直接置換を試みたが、フルオロ基の存在により反応性が低くなっていると言う知見を得た。直接的な官能基の導入はあきらめ、二重結合を有する重要中間体に対してエポキシ化剤と MeOH を用いてエポキシ化と開環、ついでスルファモイル化と脱保護によって Nucleocidin のメトキシ誘導体 **8** を合成した。今後はメトキシ基を種々の官能基への変換反応を検討し、ライブラリーの構築を目指す予定である。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・井上千枝李の実験結果である。また、NMR 機器測定は松本 恵 氏（岡山大学自然生命科学研究支援センター）のご指導・ご協力により測定したものである。

【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] 泉　実, ウエスコ学術振興財団平成 29 年度研究成果報告書, 50-53.

[2] S. O. Thomas *et al.*, *Antibiot. Annu.*, *716*, (1956-1957).

[3] Y Kubota *et al.*, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy,* **19**(5), 210 (2009).

【本研究助成により公表した研究成果】

1. Ryo Ota, Yumi Okamoto, Christopher J Vavricka, Takuji Oka, Emiko Matsunaga, Kaoru Takegawa, Hiromasa Kiyota, Minoru Izumi. Chemo-enzymatic Synthesis of *p*-Nitrophenyl β-D-Galactofuranosyl Disaccharides from *Aspergillus* sp. Fungal-type Galactomannan. *Carbohydrate Research*, **473**, 99-103 (2019).
2. Multigram-Scale and Column Chromatography-Free Synthesis of L-Azetidine-2-carboxylic Acid for the Synthesis of Nicotianamine and Its Derivatives. Takaishi, T., Wakisaka, K., Vavricka, C. J., Kiyota, H., and Izumi M., *Heterocycles*, **96**(12), 2126-2134 (2018).
3. 小出祐実・小岩美月・清田洋正・泉　実,「NAADP アンタゴニスト Ned-19 が有する植物生長阻害活性」, 2017 年日本化学会中国四国支部大会, 高知大学 (高知), 2019 年 1 月.
4. 井上千枝李・造田みなみ・松本 恵・清田洋正・泉　実,「化合物ライブラリーの構築を指向した含フッ素天然化合物 Nucleocidin の合成研究」, 2018 年日本化学会中国四国支部大会, 愛媛大学 (愛媛), 2018 年 11 月.
5. 岡本有未・太田　涼・林　健太・Vavricka Christopher J・岡 拓二・松永恵美子・竹川 薫・清田洋正・泉　実,「*Aspergillus* 属真菌型ガラクトマンナンに存在するガラクトフラノース含有糖鎖の化学酵素的合成」, 2018 年日本化学会中国四国支部大会, 愛媛大学 (愛媛), 2018 年 11 月.

母体−初期胚間の情報伝達を担う卵管エクソソーム中マイクロ RNA の網羅的解析

岡山大学 大学院環境生命科学研究科

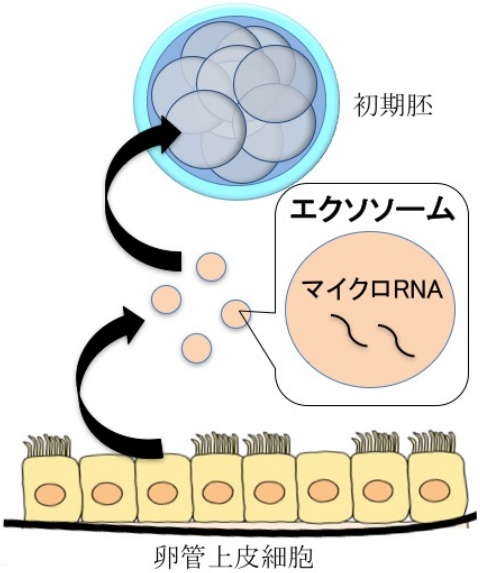
山本ゆき

哺乳動物において、卵管で受精した後の初期胚は発育しながら数日間をかけて卵管内を進み、子宮に到達する。この時に卵管が分泌する様々な因子が、初期胚の発生に影響を与える。母体-初期胚相互に関わる因子として、卵管細胞が放出するエクソソームに着目し、特にエクソソームが内包する核酸の一つであるマイクロ RNA (miRNA) の役割を調査することを目的とした。そこで、ウシ卵管内液を各発情周期ステージ (1-4) で回収し、エクソソーム中 RNA の抽出および次世代シーケンサーによる網羅的発現解析を行った。全てのサンプルから 100 以上の既知の miRNA 発現が確認された。発現している miRNA の Stage 特異性を調べたところ、全てのステージで発現していた遺伝子数は 67 で多かったが、各 Stage のみで発現している遺伝子も複数確認できた。また、Stage 間で発現量の異なる遺伝子を比較解析したところ、有意な変化を示すものが複数存在した。これらの miRNA がどのような機能に関与するのかを調べるため、Target gene の予測を行なった。今回発現が明らかになった miRNA の役割を明らかにするために、今後もさらに詳細な検討を進める予定である。

＜緒言＞

近年、女性の社会進出や晩婚化による出産の高齢化に伴い、全国的に不妊治療件数が増加している。主な不妊治療技術である体外受精では、母体の卵巣から卵子を取り出して体外で受精させた後子宮内へと移植する。ところが体外受精で得られた新生児は低体重になる割合が高く、さらに他の動物種においても、体内で受精・発育した初期胚と体外培養胚では遺伝子発現やエピジェネティック制御の状態が異なることが明らかになっている。これらは現在の体外受精・胚培養液や培養システムが未完成の状態であることを示唆しており、その改良は喫緊に解決すべき課題である。体内において、卵管で受精した後の初期胚は発育しながら数日間をかけて卵管内を進み、子宮に到達する。この時に卵管が分泌する様々な因子が、初期胚の発生に影響を与える (母体-初期胚間相互作用) ことが報告されている。近年、細胞間の情報伝達を担う新たな因子として「エクソソーム」が注目されてきた。エクソソームとは細胞から放出される直径 50-150 nm の細胞外小胞の一種であり、内部には核酸やタンパク質などを含んでいる。特にエクソソームが内包する核酸の一つであるマイクロ RNA (miRNA) は、標的細胞内でメッセンジャーRNA と結合してその翻訳を制御する。

そこで、卵管細胞が放出したエクソソームが初期胚に取り込まれ、その中の miRNA が初期胚の状態を制御するとの仮説を立てた (下図)。本研究ではより生体に近い体外受精および胚培養液作製に貢献するべく、ヒトと胚の発生機構が類似しているウシをモデル動物として用い、新たな情報伝達因子としての卵管内エクソソームの機能解析を目的とした。



仮説：エクソソーム miRNA による
母体−初期胚間相互作用

＜材料と方法＞

1.　ウシ卵管の採取および分類

食肉処理センターにおいて採取したウシ卵管を氷冷した生理食塩水に浸漬して研究室に持ち帰った。卵管間膜および子宮広間膜から卵管を切り取り解剖台に固定し、脂肪組織や結合組織などの余分な組織を除去した。その後、卵巣及び子宮の肉眼的観察から排卵後日数を推定し、Stage 1 (排卵後 1-4 日)、2 (排卵後 5-11 日)、3 (排卵後 11-17 日)、4 (排卵後 18-20 日) に分けた。

2.　卵管液の採取とエクソソーム精製

それぞれの卵管内部に膨大部側からリン酸緩衝液 (PBS) 500 mL をシリンジにて流し入れ、峡部側より排出される PBS を回収した。血液が混入したものは除外した。その後遠心分離にて、混入している細胞などの不純物を沈殿させて取り除いた。

卵管液中のエクソソームを超遠心法によって精製、回収した。回収したエクソソームからトータル RNA を抽出し、解析まで -80 C にて凍結保存した。

3.　解析用サンプルの調整

3-1. RNA クオリティチェック

RNAnanokit (Agilent) を使用し、BioAnalizer (Agilent) で RNA の濃度とクオリティをチェックし、シーケンスに用いるサンプルを決定した。

3-2. ライブラリ調整

3-1 で選択したサンプルを用い、1000 ng の RNA を Illumina Truseq Small RNA Library Prep Kit を使用してライブラリ調整を行なった。調整の流れは以下の通りである。

1) アダプターの付加
2) RNA を鋳型とした二本鎖 cDNA の合成
3) PCR 増幅 (15 サイクル)
4) ゲル精製 (18-30 bp の miRNA 由来のライブラリのみ抽出)

3-3. ライブラリのクオリティチェック

バイオアナライザ (DNAHighSensitiveityKit) でライブラリの断片長をチェックし、qPCR (KAPA Library Quantification Kit) で濃度をチェックし、各サンプル等量になるように希釈した。

4.　次世代シーケンス

Nextseq (Illumina) を使用してシーケンスを行なった (Single Read 75 bp)。シーケンスに用いたいずれのサンプルからも、 1G base 以上のクオリティの良いシーケンスデータを得た。

5. フィルタリング

シーケンスリードの中からさらに質の良いものだけをふるいにかけた。以下のフィルタリング条件を適用した。

・シーケンス時に使用したアダプター配列の除去
・miRNA 由来ではないと思われる 15 bp 未満のおよび 50 bp 以上の配列を除去
・Qvalue 10 未満のクオリティの低い配列を除去

フィルタリング後も各サンプルで 600 万リード以上の配列が残っており、これらの配列を以降の解析に用いた。

＜結果＞

1. 検出されたウシ miRNA

各サンプルにおいて 100 以上の既知の miRNA が発現していた (表 1)。

表 1. 検出された miRNA の数

Sample	Stage	Number of Expressed miRNA
5	Stage1	113
13	Stage1	138
6	Stage2	111
14	Stage2	137
3	Stage3	141
11	Stage3	171
12	Stage4	174
16	Stage4	107

2. Stage 特異的 miRNA の検出

各ステージで発現する遺伝子のリストを作成し、その情報を用いてベン図を作成した (図 1)。全ての Stage で確認されたものは 67 遺伝子あったが、Stage 1 のみは 12 遺伝子、Stage 2 のみは 4 遺伝子、Stage 3 のみは 24 遺伝子、Stage 4 のみは 5 遺伝子の発現が確認された。



図 1. 各 Stage で発現する miRNA のベン図

3. サンプル間における発現プロファイル

ヒートマップを作成して各サンプルの発現プロファイルを可視化した。発現量を Zscore に換算して示した (図 2)。その結果、サンプル間での相違点および類似点は確認できたが、Stage ごとの特徴は確認されなかった。

4. Target gene の解析

各 Stage 間で発現の異なる miRNA について、Target gene の予測を行なった。予測は Targetscan と miranda にて、ヒト、マウス、イヌ、ラット、ニワトリのオーソログ情報を使用し (ウシのデータが存在せず)、両方のプログラムで予測された遺伝子を Target gene とした。Target gene として予測された遺伝子の数を表 2、3 にまとめた。

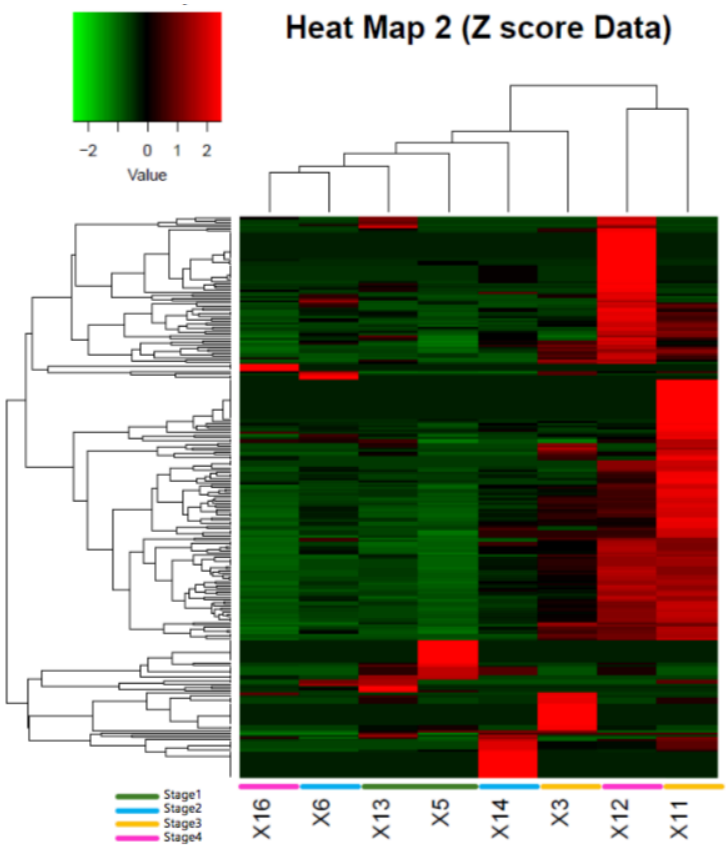


図 2. 各サンプルの発現プロファイル

発現量の高いものは赤、低いものは緑、中間は黒で示されている。

表 2. 各発現変動 miRNA において Target gene と予測された遺伝子の数

miRNA	Target gene
bta-miR-574	164
bta-mir-25	3
bta-mir-181b	44
bta-mir-182	550
bta-mir-34b	95
bta-miR-151-5p	4
bta-let-7c	4
bta-miR-2285m	937
bta-miR-92b	3
bta-miR-146b	4
bta-miR-1468	63

表 3. 各 Stage 間で発現変動した miRNA 全体で Target gene と予測された遺伝子の数

Stage	Target gene
Stage1-Stage2	164
Stage1-Stage3	164
Stage1-Stage4	548
Stage2-Stage3	1528
Stage2-Stage4	304
Stage3-Stage4	758

＜まとめおよび今後の展望＞

本研究において、ウシ卵管液から次世代シーケンス解析に十分な量および質の RNA が回収された。しかしながら解析に十分でないクオリティのサンプルも多くあったことから、サンプリングの時期や方法を再度検討する必要があると思われる。

シーケンスおよび解析の結果、Stage 間において発現している miRNA に特徴が見出せなかったものの、Stage 特異的な miRNA 遺伝子の発現も確認された。Target gene の予測結果も得られたことから、今後はそれらの遺伝子の機能解析も進めていく必要がある。しかし、現在のデータベースではウシ miRNA に関する情報が十分ではなく、卵管液中には未知の miRNA も含まれていることが考えられる。未知の遺伝子の機能についても検討を進めていきたい。

本研究では哺乳動物の胚発生に影響を与えうる新たな因子として卵管液エクソソーム中の miRNA を検討した。数多くの様々な miRNA が含まれていることが明らかになったため、これらの中で胚発生に必要な機構を制御するものが存在する可能性は高いと考えられる。今後さらに検討を進め、より詳細な胚発生メカニズムを解明し、生殖補助医療や家畜繁殖技術の向上への貢献を目指したい。

＜謝辞＞

本研究に多大なご支援をいただきました公益財団法人ウエスコ学術振興財団に、心より感謝申し上げます。さらに、多大なご助言をいただきました木村康二博士 (岡山大学教授) に深謝いたします。また、技術的援助をいただきました東京農業大学生物資源ゲノムセンターに感謝申し上げます。

岡山県特産セイヨウナシ‘パスクラサン’果実の成熟機構解析とその応用による貯蔵・流通技術の確立

岡山大学大学院環境生命科学研究科

久保　康隆

【概要】　低温遭遇前でも‘パスクラサン’果実はプロピレン処理により軟化したが、エチレン生成は誘導されなかった。一方、5℃以下の低温に６週間遭遇するとエチレン生成が誘導され、果実成熟が進行した。RNA seq 解析により、低温遭遇前でもエチレンに応答する 437 個の DEGs(differentially expressed genes)を同定し、グループ１(G1)とした。さらに、低温処理に応答する合計 763 個の DEGs を抽出し、1-MCP 処理を利用して、低温遭遇によって誘導されるエチレン信号伝達系に依存するグループ２(390 DEGs,G2)とエチレンに依存しない低温特異的遺伝子グループ３(373 DEGs,G3)に分類した。G1 の中には果実軟化に重要なペクチン分解酵素 PG 1 が、G2 にはエチレン生合成の鍵因子である ACS1 が含まれていた。G3 には転写因子である ERF98 や信号伝達系因子である WAT1-like が含まれており、これらが低温誘導性果実成熟の鍵因子であることが推察された。エチレン処理と低温処理の組み合わせにより、‘パスクラサン’果実の成熟を必要に応じて制御できることが明らかになった。

【緒言】　高貴な香りととろけるような舌触りを持つ晩生セイヨウナシ‘パスクラサン’は、明治から大正にかけて輸出品として岡山各地で広く栽培されていた。現在では、赤坂地域の特産高級贈答品果実として、生産・販売されている。この果実は食味品質が極上ではあるが、貯蔵・成熟管理が難しく、「食べごろ」期間が短いこと、貯蔵病害「輪紋病」に弱いことなどから、その生産・流通量は限定されているのが現状である。

セイヨウナシ果実は低温遭遇によって植物ホルモンであるエチレン生成が誘導され、それが引き金となって成熟することが知られている(Klee, Giovannoni, 2011.)。特に、晩生の‘パスクラサン’の成熟には低温遭遇が必須であるとされている。セイヨウナシ果実のエチレンと成熟については、筆者らの以前の研究も含め遺伝子レベルで解析が進んできたが、低温応答の分子機構については、ほとんど不明のままである。

最近、筆者らはエチレンによって成熟するとされているキウイフルーツ果実の貯蔵技術研究の中で、「低温遭遇によってエチレンの作用なしに成熟する」という全く予想外の現象を発見した(Asiche et al., 2016,2018, Mworia, , et al. 2011, 2012)。また，成熟に必ずしもエチレンを必要としないミカンに注目し未熟果実を収穫後種々の温度下に保持したところ，２０℃以上では着色の進行が抑制されたが、10-15℃の温度域で顕著に着色が促進されることを確認した。さらに、キウイフルーツでは次世代シーケンサーを使った RNAseq 法によって、網羅的遺伝子発現解析を行い、約 3000 個の成熟関連遺伝子を特定し、鍵となる転写因子遺伝子を抽出するとともに、エチレン信号伝達系と低温応答信号伝達系の共通性と特異性を解析した (Asiche et al.2018, Mitalo et al.,2018,2019。これらの観察、経験から、セイヨウナシを含む温帯性多年植物では低温遭遇が未知の信号伝達系を介して果実成熟を誘導することが示唆された。そこで、本研究では、プロピレン処理と低温処理、RNAseq 解析、Real-Time PCR 解析を利用して、‘パスクラサン’果実の成熟機構の分子解析を行った。

【材料及び方法】実験果実として 2016 年 10 月 25 日に岡山県赤磐市の農園から収穫した商業的収穫熟度のセイヨウナシ(Pyrus communis L.) ‘パスクラサン’果実を用いた。収穫した果実を直ちに岡山大学農学部に輸送し、極端に大きさが異なる果実、病

害果実、エチレン生成果実を実験より除外した。収穫直後の一部果実に対して、エチレンアナログであるプロピレンを 10 日間、連続的に処理した(McMurchie,et. al.,1972,5000ppm、20℃)。残りの果実は、0℃、5℃、10℃、20℃に 6 週間貯蔵した後、全果実を 20℃に 6 日間移し追熟処理を行った。また、5℃貯蔵果実のみ一部の果実で収穫時から 2 週間毎に 1-MCP 処理(2ppm)をする区も設けた。乾燥による水分損失を防ぐために、実験で用いた全ての果実をポリエチレン袋で包装した。1-MCP(SmartFreshTM、Rohm and Hass 社、アメリカ)およびプロピレンの処理時間は 12 時間とし、Mworia ら(2010、2012)と同様の方法で行った。

＜エチレン生成量の測定＞

エチレン生成量は、果実を密閉容器で 1 時間インキュベートした後、2ml のヘッドスペースガスを、FID 検出器付きガスクロマトグラフ(GC8 CMPF モデル;島津社、日本)に注入した(Mworia et al.,2012)。インキュベートはそれぞれの貯蔵温度下で行った。

＜果実硬度の測定＞

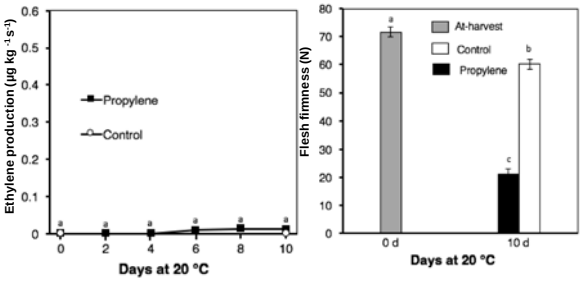
収穫直後、プロピレン処理 10 日後、貯蔵後(6 週目)、追熟後(6 週+6 日目)の果実を用いて、貫入硬度の測定を各 3 反復で行った。硬度は果皮を取り除いた後、赤道部の貫入抵抗を直径 5mm のプランジャーを備えた貫入度計(SMT-T-50 モデル；東洋測器社、日本)で 2 回ずつ、一果実計 4 回測定した (Asiche et al.,2016)。

＜RNAseq 解析と qPCR 解析＞

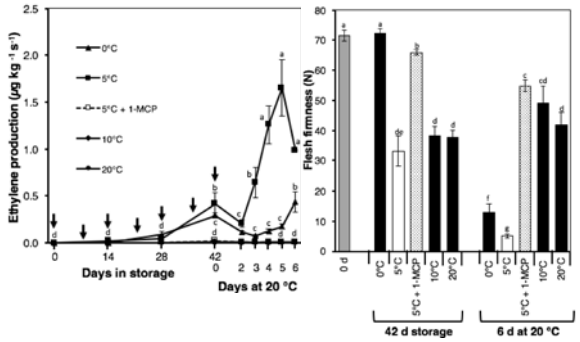
Hot Borate 法を用いて、冷凍保存した果実の全 RNA を抽出した(各処理区 3 反復)。抽出後、RNA Clean-up キット(Favorgen Biotech 社、台湾)を使って、DNase 処理による RNA 精製を行った。全 RNA を用いて cDNA ライブラリーを構築し、次世代シーケンサーを用いて、RNAseq 解析を行った。また q-PCR 解析を CFX ConnectTM Real-Time System(BIO-RAD 社)のプロトコールに基づいて行った。

【結果と考察】　収穫直後に処理したプロピレン処理果実は 10 日間の連続処理にも関わらず、エチレン生成は有意に上昇しなかった(図 1)。一方、果実硬度は処理によって低下し、収穫時には 72N であった硬度が、処理 10 日目には 20N に低下した。

6 週間の貯蔵期間中、エチレン生成は 0℃、5℃貯蔵でのみ検知された(図 2)。0℃、5℃貯蔵果実では 2、3 週目よりエチレン生成が検出された。貯蔵 6 週目のそれぞれの貯蔵温度下での生成量は 0.842 nl/g/h、1.20 nl/g/h であった。10、20℃貯蔵果では貯蔵・追熟期間中のエチレン生成は見られなかった。6 週間後の追熟処理では、0℃、5℃貯蔵果実で数日間の一時的な低下の後、エチレン生成量は急増した(図 2B)。ピーク時のエチレン生成量はそれぞれ 6.70 nl/g/h、4.76 nl/g/h (追熟 5 日目)であった。1-MCP 処理によって、5℃貯蔵果の貯蔵中、後の追熟時エチレン生成は抑制された。



第1図　プロピレン処理がパスクラサン果実のエチレン生成量と果肉硬度に及ぼす影響

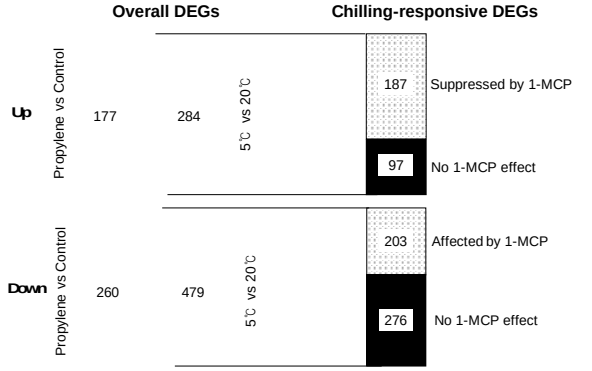


第2図　低温処理と1-MCP処理がパスクラサン果実のエチレン生成量と果肉硬度に及ぼす影響

果実硬度は 5℃貯蔵果実でのみ低下し、貯蔵 6 週目では 0℃、5℃それぞれ 72N、33N であった。6 週間後の追熟処理では、0℃、5℃貯蔵果実で数日間の一時的な低下の後、エチレン生成量は急増した。また、追熟 6 日目でのそれぞれの果実硬度は 13N、5N であった。1-MCP 処理によって、5℃貯蔵果の貯蔵中、後の追熟時エチレン生成は抑制された。

第３図に RNAseq 解析による DEGs の発現パターン

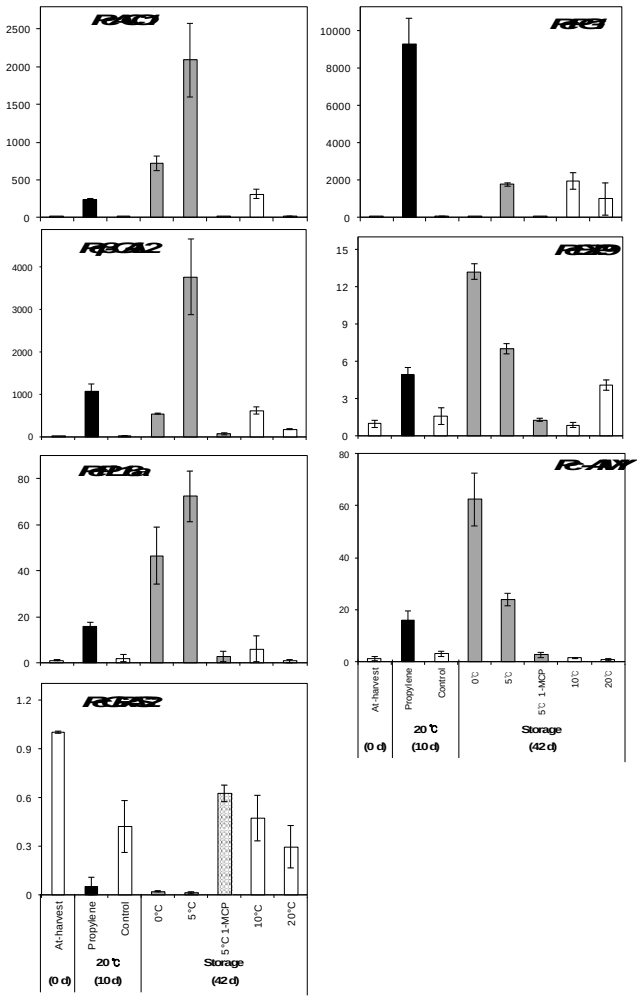
別の分類を示した。低温遭遇前のプロピレン処理によって発現が増加する遺伝子が 117 個、減少する遺伝子が 260 個、合計 377 個の遺伝子が抽出され、グループ１とした。



第3図　プロピレン処理、低温処理、1-MCP処理によるDEGsの分類

5℃また 20℃下で６週間貯蔵した果実における RNAseq 解析によって、低温遭遇によって有意に発現レベルが高くなる遺伝子が 264 個、低くなる遺伝子が 479 個同定された。さらに、エチレン作用阻害剤 1-MCP 処理によって発現レベルが変動する遺伝子として 187+203=390 個が抽出された。これらは、低温遭遇によってエチレン応答性を獲得した遺伝子と定義され、グループ２と命名した。一方、1-MCP 処理に応答しない遺伝子としては 97+276 個が抽出され、グループ３とした。この遺伝子群はエチレン信号伝達系の支配を受けず、低温刺激に特異的に応答すると考えられ流。この中に、セイヨウナシ果実の低温誘導成熟機構の初発眼科医を制御する遺伝子が含まれると考えられる。

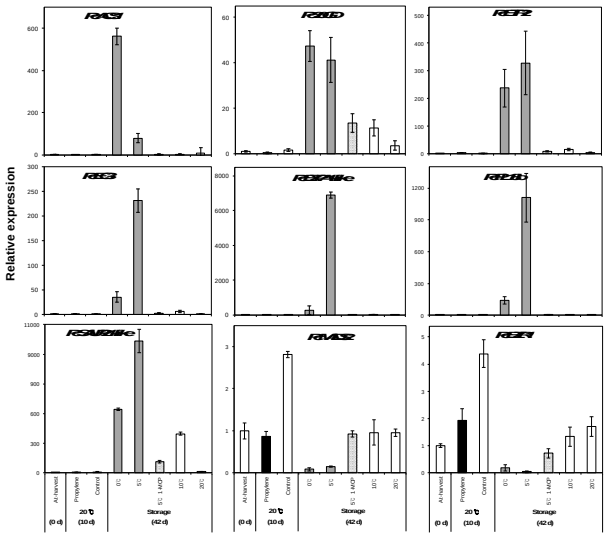
さらに遺伝子発現制御機構を解析するために、Real-Time PCR 法を用いて DEGs の遺伝子発現パターンの詳細解析を行った。グループ１には、エチレン生合成の最終段階を触媒する ACC 酸化酵素遺伝子(ACO1)、果実軟化に主要な役割を占める細胞壁分解酵素であるポリガラクチュロナーゼ遺伝子(PG1)，β-ガラクトシダーゼ(β-GAL)、ペクテートリアーゼ(PL18a)、デンプン分解酵素遺伝子である α-アミラーゼ(α-AMY)および転写因子である GRAS などが含まれていた。これらの遺伝子は低温遭遇前のプロピレン処理によって顕著に発現が促進または抑制された。また、低温遭遇によっても発現が変動する一方で 1-MCP 処理によってその発現変動は抑制された。すなわち、これらの遺伝子群は、エチレンシグナルの有無によって発現が制御される、完全エチレン依存性遺伝子であると考えられた。すなわち、これらの遺伝子群は、パスクラサン果実が低温遭遇前であってもエチレン信号に応答し、一定の成熟プロセスを進行させる能力を担っていると考えられる。



第4図　パスクラサン果実におけるグループ1遺伝子の発現様相

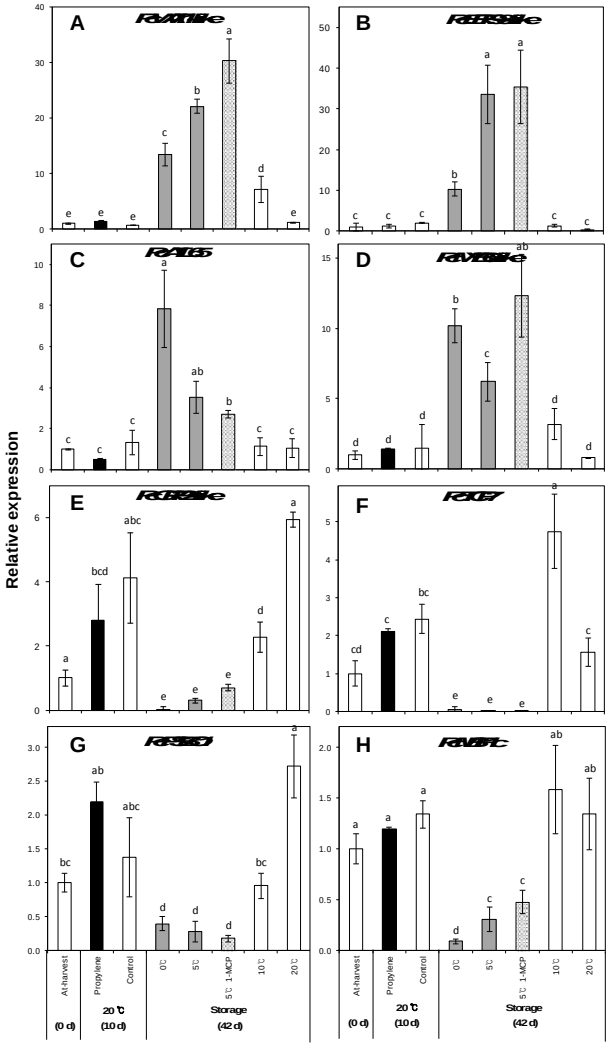
第５図には、グループ２に属する 9 個の遺伝子の発現様相を示した。これらの遺伝子は、低温遭遇前にはプロピレン処理にも全く応答しないが、低温遭遇によって成熟が進行するセイヨウナシ特有の生理現象に強く関わっている。ただし、エチレン作用阻害剤である 1-MCP 処理によって発現変化が抑制されることから、これらの遺伝子はエチレン信号の支配下にあることは明らかである。この中にはエチレン生合成の鍵因子である ACC 合成酵素遺伝子(ACS1)が含まれ、この遺伝子の活性化が低温誘導性エチレン

を担っていると考えられる。なお、この遺伝子の低温誘導性現象は、Lelièvre ら(1997)の先行研究でも示されている。エチレン受容体遺伝子(ETR2)、転写因子(MADS2,BZR1)もこのグループに含まれており、エチレン信号伝達系の活性化が推定された。また。これらの遺伝子発現変化がエチレンの自己触媒的エチレン生合成を担っていると考えられる。また、細胞壁に作用するエンドグルカナーゼ遺伝子(EG3)、エクスパンシン遺伝子(PXPA1-like)、ペクテートリアーゼ遺伝子(PL18a)も低温遭遇によって誘導されたエチレンによって制御されていることが明らかになった。すなわち、これらの遺伝子群は低温遭遇によって初めて、エチレン誘導性を獲得したものであり、低温誘導性成熟の最終段階を担っていると考えられる。



第5図　パスクラサン果実におけるグループ2遺伝子の発現様相

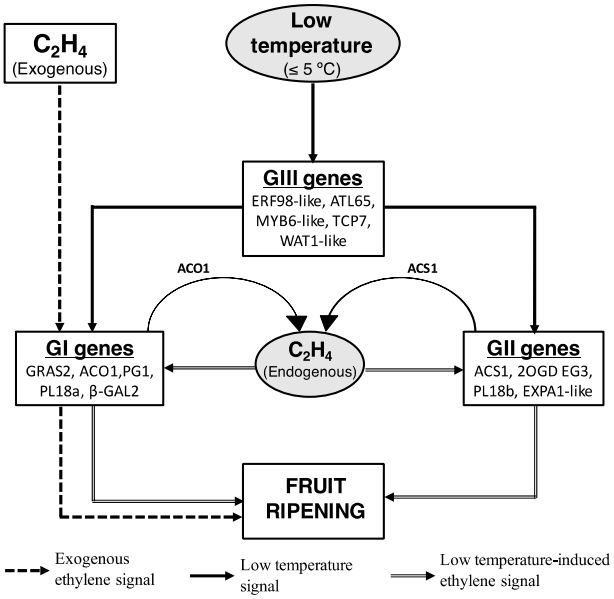
第６図にはグループ３の主要な遺伝子群の発現パターンを示した。これらは低温遭遇前のプロピレン処理には応答せず、低温遭遇によって発現が有意に増減し、その変動は 1-MCP 処理によっても影響を受けない遺伝子群である。すなわち、これらは低温応答特異的遺伝子であり、低温誘導性果実成熟の支配遺伝子が含まれていると想定できる。グループ３には転写制御遺伝子(ERF98-like,MYB6-like,GRF2-like)および信号伝達系遺伝子(WAT1-like,TCP7)が含まれており、これらの遺伝子が低温誘導性成熟現象の中で最も中心的役割を果たしていると考えられる。なお、ERF98-like 遺伝子は早生系セイヨウナシ品種のバートレット果実でも低温遭遇によって発現が誘導されることが示されている（久保ら未発表）。



第6図　パスクラサン果実におけるグループ3遺伝子の発現様相

以上の結果を総合して、パスクラサン果実の成熟制御機構をまとめた模式図を第７図に示している。セイヨウナシ果実は低温遭遇前にもエチレン信号が ON になるとペクチン分解関連遺伝子を含む一定数の細胞壁分解関連遺伝子が活性化され、果実軟化が進行すると考えられる。ただし、この段階ではエチレン生合成の鍵因子である ACC 合成酵素遺伝子の活性化が見られないので、エチレン生成そのものは誘導されない。この遺伝子群の制御には転写制御因子の GRAS2 が関与していることが推察される。果実が 5° C 以下の低温に６週間程度曝されると、

ERF98-like 遺伝子を始めとする転写制御因子と WAT1-like 遺伝子のような信号伝達系遺伝子が活性化され、これらの変動によって多数の遺伝子がエチレン応答性を新たに獲得し、低温遭遇前からエチレン誘導性を持っているプループ１の遺伝子群と共同して、果実自らのエチレン生成によって成熟プロセス進行すると考えられる。



第7図　パスクラサン果実における成熟制御機構の模式図

これらの知見から、パスクラサン果実を収穫後、すぐに成熟させたい場合には、外生エチレン処理による一定の果実軟化とデンプン分解による甘みの向上作用が利用できる。エチレン処理には興行的に合成されたエチレンガスやエスレルなどのエチレン発生剤を使用することもできるが、簡易には傷害や病気によってエチレン生成が誘導された果実を発生源として用いることもできる。一方、果実供給に一ヶ月以上の余裕期間がある場合には、5° C 以下の低温貯蔵によって、徐々に果実成熟を進めることが推奨される。低温遭遇によって活性化される転写因子、信号伝達因子によって、新たにエチレン誘導性を獲得した多数の遺伝子群が、内生エチレンによって協調的に制御され、果実成熟を総合的に進行させると考えられる。これによって、パスクラサン果実が持つなめらかな食感と上品な甘みが確実かつ均一に得られると考えられる。すなわち、低温貯蔵は果実成熟を誘導すると同時にその進行を抑制する両方の役割の両方がある。必要な貯蔵期間に応じた適切な低温(0-5° C)を利用することによって、パスクラサン果実の持つ最高品質を引き出すことができる。

【引用文献】

Asiche, W.O., Mitalo, O.W., Kasahara, Y., Tosa, Y., Mworia, E.G., Owino, W.O., Ushijima, K., Nakano, R., Yano, K., Kubo, Y., 2018. Comparative transcriptome analysis reveals distinct ethylene-independent regulation of ripening in response to low temperature in kiwifruit. BMC Plant Biol. 18, 47. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1264-y.

Asiche, W.O., Mworia, E.G., Oda, C., Mitalo, O.W., Owino, W.O., Ushijima, K., Nakano, R., Kubo, Y., 2016. Extension of shelf life by limited duration of propylene and 1-MCP in three kiwifruit cultivars. Hortic. J. 85, 76-85. https://doi.org/10.2503/hortj.MI-066.

Klee, H.J., Giovannoni, J.J., 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. Ann. Rev. Genet. 45, 41-59. https://doi.org/10.1146/annurevgenet-110410-132507.

Lelièvre, J.M., Tichit, L., Dao, P., Fillion, L., Nam, Y., Pech, J.C., Latchè, A., 1997. Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in Passe-Crassane pear (*Pyrus communis* L.) fruits. Plant Mol. Biol. 33, 847-855. https://doi.org/10.1023/A:1005750324531.

McMurchie, E.J., McGlasson, W.B., Eaks, I.L., 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about biogenesis of ethylene. Nature 237, 235-236. https://doi.org/10.1038/237235a0.

Mitalo, O.W., Asiche, W.O., Kasahara, Y., Tosa, Y., Owino, W.O., Mworia, E.G., Ushijima, K., Nakano. R., Kubo, Y., 2018. Characterization

of ripening-related genes involved in ethylene-independent low temperature-modulated ripening in 'Rainbow Red' kiwifruit during storage and on-vine. Hortic. J. 87, 421-429. https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-035.

Mitalo, O.W., Asiche, W.O., Kasahara, Y., Tosa, Y., Tokiwa, S., Ushijima, K., Nakano, R., Kubo, Y., 2019. Comparative analysis of fruit ripening and associated genes in two kiwifruit cultivars ('Sanuki Gold' and 'Hayward') at various storage temperatures. Postharvest Biol. Technol. 147, 20-28. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.017.

Mworia, E.G., Yoshikawa, T., Salikon, N., Oda, C., Asiche, W.O., Yokotani, N., Abe, D., Ushijima, K., Nakano, R., Kubo, Y., 2012. Low-temperature-modulated fruit ripening is independent of ethylene in 'Sanuki Gold' kiwifruit. J. Exp. Bot. 63, 963-71. https://doi.org/10.1093/jxb/err324.

Mworia, E.G., Yoshikawa, T., Yokotani, N., Fukuda, T., Suezawa, K., Ushijima, K., Nakano, R., Kubo, Y., 2010. Characterization of ethylene biosynthesis and its regulation during fruit ripening in kiwifruit, *Actinidia chinensis* 'Sanuki Gold'. Postharvest Biol. Technol. 55, 108-113.https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.08.007.

光化学系 II 修復過程におけるタンパク質酸化損傷の役割の解明

岡山大学 資源植物科学研究所

加藤 裕介

光は光合成に必要であるが、同時に光合成を担う光化学系タンパク質複合体に損傷を与える。これは光損傷と呼ばれ、光合成生物は光損傷を克服するために効率的なタンパク質修復機構を発達させた。光合成装置において、光化学系 II は光損傷の主なターゲットであり、この修復(光化学系 II 修復)こそが強光下での光合成機能維持に重要である。光化学系 II 修復は多段階の行程によって進められるが、光損傷がこれら行程にどのように関与するかは未解明である。本研究では、光損傷によって引き起こされたと考えられる光化学系 II 複合体構成タンパク質 CP43 のアミノ酸の酸化修飾に着目し、これが光化学系 II 修復に与える影響を解析した。実験では、CP43 タンパク質内で酸化修飾が認められた 2 ヶ所のトリプトファン残基をアラニンもしくはフェニルアラニンに置換し、その影響を検討した。その結果、フェニルアラニンへの置換では特に目立った影響が見られなかったが、2 ヶ所のトリプトファン残基をともにアラニンに置換した場合では、光化学系 II 複合体への影響が認められ、これら２ヶ所のトリプトファン残基が CP43 タンパク質の光化学系 II 複合体への結合に重要であることが示唆された。

1. 研究背景と目的

光損傷は光合成生物にとって宿命的で、決して避けられない事象であり、光合成生物は光損傷を克服するために効率的なタンパク質修復機構を発達させている。光によりタンパク質の損傷は、光合成装置のひとつである光化学系 II タンパク質複合体に集中するため、タンパク質修復機構では、特定のタンパク質の分解・新規合成により機能的な光化学系 II タンパク質複合体を再構築する(図 1)。光化学系 II では反応中心クロロフィルへの酸化力の過剰蓄積により、一重項酸素 $^1O_2$ が産生する。そのため、活性酸素種によるタンパク質の酸化損傷が光損傷の実体と考えられるが、その詳細については未解明な部分が多い。

我々が光によるアミノ酸酸化修飾を新たに解析した結果、これまでに光化学系 II タンパク質の特定のトリプトファン残基(Trp)が酸化修飾を受け、N-formylkynurenine (NFK)になることが新規に見出された。これら Trp 残基の酸化損傷は、一重項酸素により引き起こされやすいことから、酸化修飾は光損傷を示すものと考えられ、タンパク質の損傷シグナルとなることが予想された。タンパク質修復機構において、CP43 タンパク質は光化学系 II 複合体から解離する (図 1)。そこで本研究では、酸化修飾が見つかった CP43 タンパク質の２つの Trp 残基

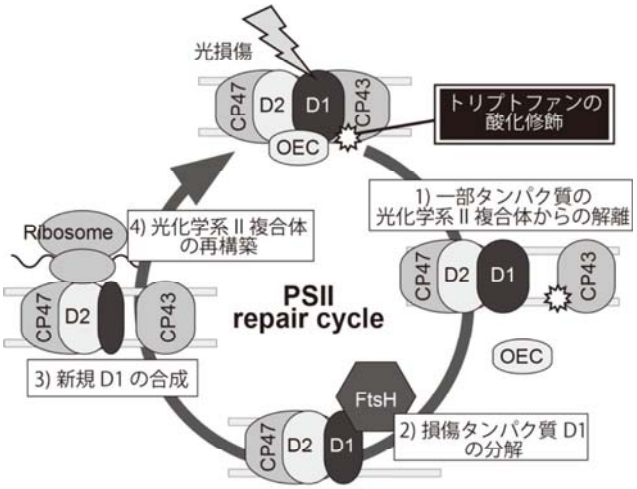


図 1 光化学系 II 修復サイクルの模式図

図 1 光化学系 II タンパク質修復機構

光による損傷は光化学系 II タンパク質複合体の D1 タンパク質に集中する。修復機構では 1)酸素発生系タンパク質ならびに CP43 タンパク質の光化学系 II 複合体からの解離、2)損傷を受けた D1 タンパク質の分解、3)新規 D1 の合成とプロセッシング、4) 光化学系 II 複合体の再構築により行われる。

(Trp365, Trp387)をアラニンもしくはフェニルアラニンに置換し、Trp 残基の酸化的修飾が CP43 タンパク質の光化学系 II 複合体からの解離に寄与する可能性を検証した。

2. 材料および方法

CP43 タンパク質の酸化修飾はモデル植物であるシロイヌナズナで見つかった。一方、CP43 タンパク質は葉緑体ゲノムにコードされ、植物の生育に必須である。CP43 タンパク質の改変には葉緑体ゲノムの組み換えが必要であるが、シロイヌナズナでの葉緑体形質転換系は確立しているとは言えない。このため、本実験には光合成研究に多く用いられる他のモデル生物である緑藻クラミドモナスを使用した。クラミドモナスでは葉緑体形質転換が容易な上、光合成非依存的な生育が可能であるため、本来は光合成に必須であるタンパク質の変異導入に適している。本研究では、CP43 タンパク質の２つの Trp 残基(Trp365, Trp387)をアラニンもしくはフェニルアラニンに置換したクラミドモナス形質転換体を作成し、解析に用いた。

3. 結果および考察

はじめに CP43 タンパク質の 2 つの Trp 残基をアラニンもしくはフェニルアラニンに置換した CP43 置換系統 CP43-W365A, CP43-W365F, CP43-W387A, CP43-W387F, CP43-W365A/W387A, CP43-W365F/W387F ならびに Control 系統の 7 系統をパーティクルボンバードメント法による葉緑体形質転換作成した。一般的な生育光条件(30 µmol photons/m^2s)、TAP 培地(クラミドモナスの一般的な完全培地、従属栄養生育可能)上で、これら形質転換体は control 系統と同等の生育を示した。また、HSM 培地(最少栄養培地、光独立生育用)においても、CP43-W365A, CP43-W365F, CP43-W387A, CP43-W387F, CP43-W365F/W387F の生育に差が認められなかった。一方で、CP43-W365A/W387A の系統においては、光独立的な生育はわずかに認められたものの、その生育速度は非常に遅くなっていた (図 2)。この結果は、CP43-W365A/W387A において光化学系 II 複合体に何らかの異常があり、光合成機能が低下していることを示唆した。次に TAP 培地で生育させた各形質転換系統における光合成活性を、クロロフィル蛍光測定を用いて測定した。光化学系 II の最大量子収率を示すパラメーターである Fv/Fm の値を比較した結果、control 系統と各形質転換系統間において、有意な差は認められなかった。また興味深いことに、光独立的な生育が認められなかった CP43-W365A/W387A 系統においても、同等の Fv/Fm の値が測定された (表 1)。さらに同様に TAP 培地で生育させた各形質転換系統の光化学系 II 複合体を構成するタンパク質量の蓄積を、抗 D1 タンパク質抗体ならびに抗 CP43 タンパク質抗体を用いて解析した結果、これらタンパク質が CP43-W365A, CP43-W365F, CP43-W387A, CP43-W387F, CP43-W365F/W387F の各系統では control と同等に、CP43-W365A/W387A 系統では control のおよそ 1/4 量蓄積していることを確認した (図３)。CP43-W365A/W387A においては十分なタンパク質が蓄積できなかった原因として、CP43 タンパク質が適切に光化学系 II タンパク質複合体に組み込まれなかったことが考えられる。一方で、光化学系 II の最大量子収率 Fv/Fm は control と同等の値を示し、CP43-W365A/W387A においても組み上がった光化学系 II タンパク質複合体は機能的なものと推測された。CP43 タンパク質内で見つかったは、二箇所(Trp365, Trp387)の Trp 残基の酸化修飾は、酸素発生系タンパク質や反応中心タンパク質 D1 との接面付近に存在する。今回の結果は、これらトリプトファン残基が存在する場所が、光化学系 II タンパク質複合体の構成において重要であることを示唆するもので、今後、酸化修飾によるトリプトファン残基の構造変化が光化学系 II 全体にどのように影響するかをシミュレーションにより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、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。

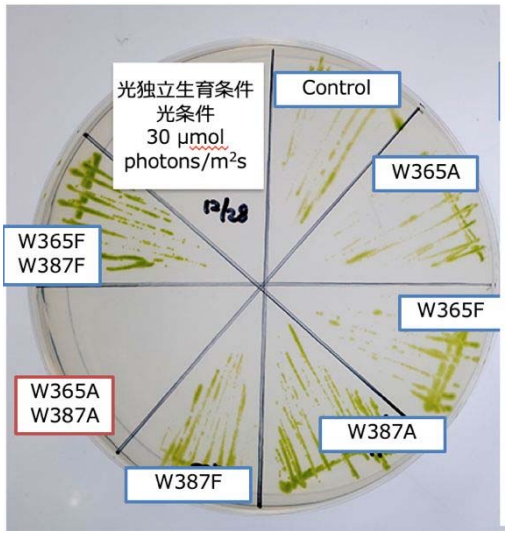


図 2　光独立生育条件下における各形質転換系統の生育

HSM 培地に各系統を画線後、30 μM photons/m²s 連続光条件下により 1 週間培養後の写真を示す。

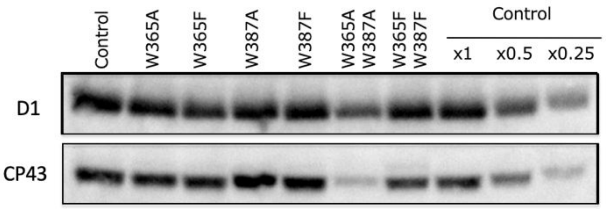


図 3 TAP 培地で生育させた各形質転換系統における光化学系 II 構成タンパク質の蓄積

TAP 液体培地（30 μM photons/m²s 連続光照射、振盪培養）で生育させた各系統を回収した。SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、PVDF メンブレンに転写した。一次抗体として抗 D1 抗体(5000 倍希釈)ならびに抗 CP43 抗体(5000 倍希釈)、二次抗体として抗ウサギ IgG 抗体を用いて、ウエスタン解析を行った。各サンプルの泳動量はクロロフィル量を基準にした。

測定系統	Fv/Fm 平均値
Control	0.569
W365A	0.556
W365F	0.667
W387A	0.604
W387F	0.555
W365A W387A	0.623
W365F W387F	0.558

表 1　クロロフィル蛍光による光化学系 II の最大量子収率(Fv/Fm)の測定

水素吸蔵法とμSR法を用いた新規イリジウム酸化物超伝導体の開発

岡山大学　異分野基礎科学研究所

堀金和正

本研究課題ではメカニカルアロイ法による La 置換に加え、水素吸蔵による水素置換により 20%におよぶ電子ドープをおこなった $Sr_{2-x}La_xIrO_{4-y}H_y$ を合成し、高温超伝導体を開発することを目標としている。さらに、Sr_2IrO_4 の超伝導は銅酸化物の類似性や磁気秩序相の近傍に超伝導相の存在が理論的に指摘されていることから Ir の磁性が超伝導メカニズムに強く関与していることが考えられる。そこで、本課題では磁性に敏感なミュオンスピン回転（μSR）法を用いることにより母物質 Sr_2IrO_4 の反強磁性絶縁体状態から超伝導相までの磁気相図を決定する。具体的にはすでに報告がなされている $Sr_{2-x}La_xIrO_4$(x=0, 0.1)を補完する濃度である x=0.05 および 0.15 のμSR 実験を実施した。

(1) 高圧下における粉末 $Sr_{2-x}La_xIrO_{4-y}H_y$ の合成および物性評価

これまで試料合成に成功している $Sr_2IrO_{4-y}H_y$ では、化学量論比よりも酸素量を増やして合成・焼成することで、より純度の高い試料が得られていたため、生成物の酸素量依存性について検証を行った。具体的には、$Sr_{2-x}La_xIrO_{4-y+z}H_y$ の $x = 0.1$ 及び $y = 0.2$ で固定し、酸素量 z のみを変化させた $Sr_{1.9}La_{0.1}IrO_{4-y+z}H_{0.2}$（$z = 0$、0.1、0.2）の合成を行った。

出発物質として SrO (1000℃で 24 h 加熱), La_2O_3 (900℃で 24 h 加熱), IrO_2, Ir, SrH_2 を用いた．秤量については、SrH_2 以外の物質は大気中で速やかに秤量し、SrH_2 は Ar 雰囲気のグローブボックス内にて秤量を行った。秤量したそれぞれの試料をグローブボックス内にて混合し、超高圧合成に用いる Au セルに詰めた。 キュービック型の超高圧装置を用い、2GPa・1150℃・15min の焼成条件で合成を行った。図 1 に、合成した試料の粉末 X 線回折測定の結果を示す（Sr_2IrO_4 はメカニカルアロイを用いて合成した）。酸素量を増加させるにしたがって不純物である $Sr_3Ir_2O_7$ の生成が抑制されていることが分かる。ここから、単純に H 置換が起こっているのではなく、OH^- としてエレクトロンドープが行われている可能性が示唆される。また、図 2 に直流磁化率温度依存性測定の結果を示す。酸素量の増加に伴って磁気転移温度が系統的に減少していることが確認できる。最も低い $Sr_{1.9}La_{0.1}IrO_4H_{0.2}$ で 磁気転移温度 T_N は 90 K 程にまで減少している。この結果は、水素置換のみを行った過去の報告（T_N ~ 190 K ）や La 置換のみの結果（T_N ~ 114 K）と比べても低い値で、La 置換によるエレクトロンドープの効果の表れだと考えられる。

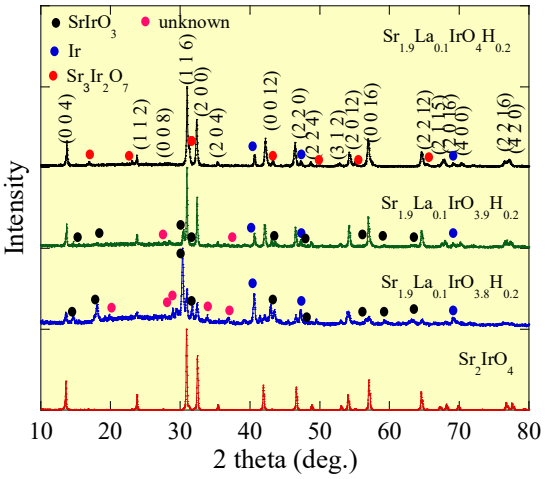


図 1 $Sr_{1.9}La_{0.1}IrO_{4-y+z}H_{0.2}$ の粉末 X 線回折測定結果

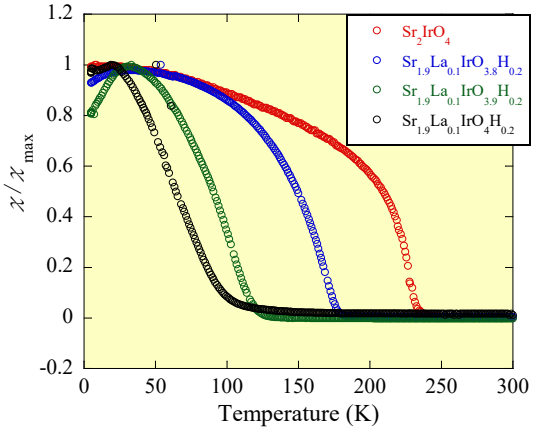


図 2 $Sr_{1.9}La_{0.1}IrO_{4-y+z}H_{0.2}$ の直流磁化率温度依存

図 3 に、$Sr_{1-x}La_xIrO_4H_{0.2}$ の直流磁化率温度依存性について示す（Sr_2IrO_4 及び $Sr_{1.9}La_{0.1}IrO_4$ はメカニカルアロイを用いて合成）。これまでの研究で $Sr_2IrO_{4-y}H_y$ では水素量が磁気転移温度に大きく影響していないことを示したが、La および H を同時置換した場合は大きく影響していることが分かる（$La_{0.05}Sr_{1.95}IrO_4H_{0.2}$：$T_N$＝170 K　$La_{0.1}Sr_{1.9}IrO_4H_{0.2}$：$T_N$＝90 K）。また、メカニカルアロイの La 置換試料と比較して磁気転移がシャープであり、高圧合成で均一に置換することに成功している。

母物質と比較すると磁気転移温度は劇的に減少しているが（Sr_2IrO_4：T_N＝240 K　$Sr_{1.9}La_{0.1}IrO_4H_{0.2}$：$T_N$＝90 K）、マイスナー効果は見られずキャリア量がまだ不足していると思われる。

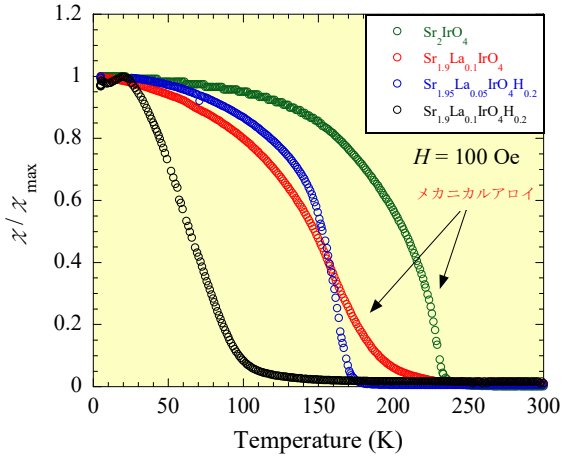


図 3 $Sr_{1-x}La_xIrO_4H_{0.2}$ の直流磁化率温度依存性

(2) μSR 法による $Sr_{2-x}La_xIrO_4$ の磁気相図の決定

x = 0.1 のゼロ磁場(ZF)-μSR タイムスペクトルより La を x=0.1 置換することにより長距離秩序が完全に消失し短距離秩序（グリフィス相）が実現している可能性があることを指摘した。この結果より x = 0 と x = 0.1 の間で長距離秩序が消失する転移点があることが予想される。そこで長距離秩序から短距離秩序への変遷を詳しく調べるために x=0.05 の試料を、そして、さらにドープ量を増やすことにより起こる変化について調べるために x = 0.15 の試料について同様に μSR による測定を実施した。

x = 0.05 の ZF-μSR タイムスペクトルを図 4 -(a)に示す。室温付近ではゆっくりとした指数関数的な緩和が見られる一方、磁気転移温度以下 (T_N ≈ 190 K) で微弱ではあるがミュオンの回転信号が観測された。このことより、x=0.05 では長距離秩序相が存在しており、x=0.05 から x=0.1 の間で長距離秩序が完全に消失することが考えられる。また、19 K 以下の低温ではスペクトルに浅い落ち込みが見られる。このことより 19 K 以下の低温では x = 0.1 と同様にスピングラス状態が実現していることが示唆される。

x = 0.15 の ZF-μSR タイムスペクトルを図 4-(b)に示す。室温付近では x = 0.05 と同様にゆっくりとした指数関数的な緩和が見られ 50 K 付近からその緩和はより顕著になる。さらに T_N 以下の回転信号が見られない。また、最低温付近で乱れた磁気秩序による浅い落ち込みが見られる。これらより x=0.1 と同様に長距離秩序が消失しており、また、低温でスピングラス相が実現していることが考えられる。

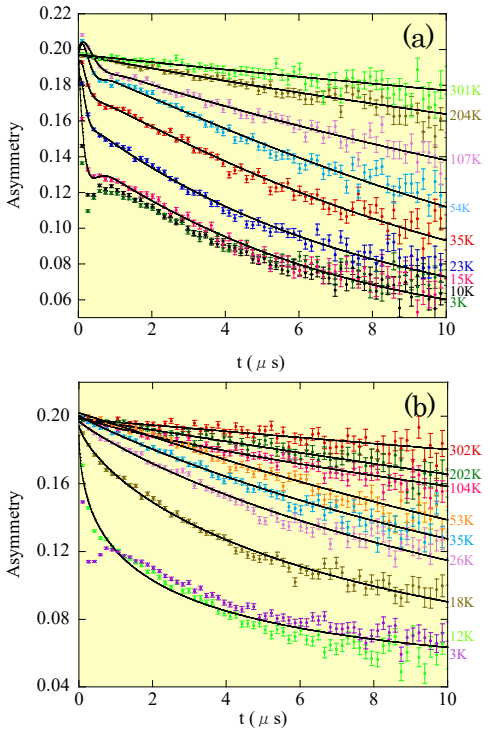


図 4 $Sr_{1-x}La_xIrO_4$ (a)x=0.05(b)x=0.15 におけるゼロ磁場 μSR スペクトル

次に縦磁場(LF)-μSR タイムスペクトルの解析により、La ドープに伴い変化する Ir モーメントの大きさを算出した。x = 0 の時、Ir モーメントは$|\mu_{Ir}|$ = 0.4 μ_B であったのに対して x = 0.05 で$|\mu_{Ir}|$ = 0.053 μ_B、x = 0.1 で$|\mu_{Ir}|$ = 0.045 μ_B、x = 0.15 で$|\mu_{Ir}|$ = 0.033 μ_B と求まった。この結果より Ir モー

メントは系統的に減少するのではなく $x=0$ から $x=0.05$ の間で大きく減少し、それ以降は僅かに減少することが示された。このことより、$x=0.05$ の付近で Ir モーメントに何らかの変化があることが考えられる。La のドープ量が $x=0.096$ を超えると La 原子の周りのギャップが変化しギャップが不均一な状態が出現するという報告がある [Nat. Phys. 13, 21 2016] 。これらより、$Sr_{2-x}La_xIrO_4$ の磁性が大きく変化する La のドープ量が存在することが考えられる。

最後に得られた研究結果をまとめる。本研究では $Sr_{1.9}La_{0.1}IrO_4H_{0.2}$ の合成し、磁気転移温度 T_N~90K まで抑制することに成功した。また、これまで報告がなされてこなかった x=0.05 および x=0.15 の μ SR 実験を行う事により磁気秩序状態を明らかにし、中性子実験では決定が困難であった Ir モーメントの大きさを決定した（図 5）。しかし、水素置換によりキャリアドーピングには成功したものの超伝導化には至らず絶縁体相から超伝導相までの磁気相図の決定には至らなかった。今後は更なる H 置換を試みるとともに F 置換等の他元素置換により超伝導化を目指す。

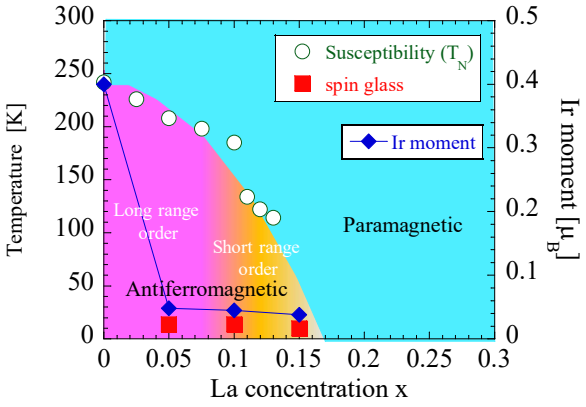


図 5　直流磁化率測定および μ SR 測定により決定した $Sr_{1-x}La_xIrO_4$ の磁気相図

(3) 主な発表論文等

[1] K. Horigane, M. Fujii, H. Okabe, K. Kobayashi, R. Horie, H. Ishii, Y. F. Liao, Y. Kubozono, A. Koda, R. Kadono and J. Akimitsu, MLF annual Report 2017, p54 (2018).

[2] 堀金和正、藤井正徳、岡部博孝、小林夏野、堀江理恵、石井啓文、廖彦發、久保園芳博、幸田章宏、門野良典、秋光純, メカニカルアロイ法による $Sr_{2-x}La_xIrO_4$ の磁気相図, J-Physics:多極氏伝導系の物理 平成 30 年度領域全体会議、東北大学片平ホール、2018 年 5 月 25 日.

[3] 町田一樹、堀金和正、藤井政徳、岡部博孝、小林夏野、堀江理恵、石井啓文、久保園芳博、幸田章宏、門野良典、秋光純, μ SR 法を用いた $Sr_{2-x}La_xIrO_4$ の磁気相図の決定, 2018 年　日本化学会中国四国支部大会、愛媛大学城北キャンパス 2018 年 11 月 18 日

[4] 町田一樹、堀金和正、藤井政徳、岡部博孝、小林夏野、堀江理恵、石井啓文、久保園芳博、幸田章宏、門野良典、秋光純, μ SR 法を用いた $Sr_{2-x}La_xIrO_4$ の磁気相図の決定, 日本物理学会　第 74 年次大会、九州大学伊都キャンパス 2019 年 3 月 15 日

岡山県内の障害者就労支援に関する実態調査

岡山大学全学教育・学生支援機構※1　　岡山理科大学経営学部※2

池谷　航介※1　　原田　新※1　　川島　聡※2

従業員に一定の割合で障害者を雇用することと定めた，いわゆる法定雇用率の明示（「障害者雇用促進法」）により，障害者の就労機会の拡充が進められてきた。本研究は，障害者と社会の接点事業といえる「障害者就労移行支援事業」の調査を進めることにより，社会側・企業側における課題や問題点を把握するための基礎的な知見を得ることを目的とする。岡山県内全ての「障害者就労移行支援事業」事業所を対象に質問紙を送付し，その回答の分析と考察を行った。その結果，(1) 事業所スタッフが所有している主な資格は社会・精神保健・介護の 3 福祉資格で半数以上を占めるが，その他の専門職の配置も進み，さらに対応範囲の拡大が目指されている事業所もあること，(2) 個々の事業所の特色や強みが多様化してきていること，(3) 地域交流・企業開拓・余暇支援・産学連携による学生向けのサービス展開等といった機能拡充が図られてきていること等，事業の今後の展開とそれに伴う課題が確認された。

Ⅰ　問題

障害者の就労機会を確保するため,我が国では「障害者雇用促進法」によって是正が進められてきた。同法は 1960 年に「身体障害者雇用促進法」として定められてから，1987 年に知的障害者も対象とする現行法に改正され，後にその対象として精神及び発達障害者が追加されるに至っている。同法では，従業員に一定の割合で障害者を雇用することと定めた，いわゆる法定雇用率が示されており，2018 年 4 月の改正からは，精神及び発達障害者もこの法定雇用率の算定基礎に加えられることとなった。しかしながら，この定めによって既存の就労の枠組みに障害者雇用を位置付けることが進んだものの，いずれの場所や場面においても多様性が受け止められ得る社会の在り方自体を問うまでには至っていない。未だ我が国における障害者を対象とした就労支援は，就労開始期と就労定着期において,「社会的なスキルを伸長させること」と「特性に応じたケアを実施すること」等，個々の障害者側に向けられたものが大勢を占め，社会側・企業側の姿勢や理解度に影響を与えるアクションとしては，十分に推進されていない状況であるといえるだろう。

他方，2014 年の「障害者の権利に関する条約」批准以降，法令等の整備も含め，条約に基づく共生社会を標榜する取り組みが進みつつある。しかしながら，教育や生活の場面において，障害の有無に関わらず共に参加できる枠組みはまだまだ不十分であり，共生社会の醸成は諸に就いたばかりである。現状では,「障害者が参加しにくい社会構造」と「障害者との接し方が分からない多くの人」という二重の社会障壁が，障害者就労において存在していることが考えられる。

本研究では,障害者と社会の接点事業といえる「障害者就労移行支援事業」の把握を実施し,「障害者の権利に関する条約」あるいは「障害者基本法」の示す理念に則りつつ，障害者就労の問題を支援の方法論ではなく，社会構造の瑕疵として検討することがねらいである。そのため，本調査を基礎的探索的な知見収集の段階と位置づけ，まず，岡山県内の「障害者就労移行支援事業」事業所に対象を絞って調査を進めることにより，今後のさらに広域的な研究の方向性を検討できればと考えている。

Ⅱ　方法

1　調査の対象および調査時期

岡山県内全ての「障害者就労移行支援事業」事業所 (全 29 事業所) を対象に質問紙による調査を送付し，回答を得た。回答数は 18 件 (回答率 62.1%) で，無効回答は認められなかった。調査は 2019 年 3 月に実施した。

2　調査内容

(1) 事業所に関する基本情報

①事業所名，②法人で他に実施している事業（就労継続支援（A 型)，就労継続支援（B 型)，障害児通所支援（放課後デイ等)，就労定着支援，その他)，③年間利用者数，④事業所専任スタッフ（パート・非常勤含む）の性別，年代，役職，主な取得資格，⑤現在対応可能な障害種別，⑥実施している「就労移行支援事業」範疇のサービス内容およびその中でも特に重点を置いているサービス 3 点，⑦貴事業所のサービスの特色（強み）について尋ねた。

(2)「就労移行支援事業」の範疇とは言い切れないが，利用者に必要と考えられるサービス

①有料プログラムとして実施しているもの（実施予定のもの),②無料プログラムとして実施しているもの（実施予定のもの)，③実施（および実施予定）はしていないが，就労移行支援利用者の社会参加をさらに促進するため，障害者総合支援法が拡充されれば実施したいサービスについて，全て自由記述での回答を求めた。

(3) 就労移行支援事業を実施する上での課題（課題や困難さ，あるいは制度の拡充が必要と思われる点等）について，自由記述での回答を求めた。

3　倫理的な配慮

本研究は，岡山大学学生総合支援センター生活支援部門研究倫理委員会による倫理審査において承認（番号 201803）を受け，各調査対象から同意を得た上で実施している。

Ⅲ　結果

1　就労移行支援事業以外に法人で実施している事業等

事業所を運営する法人が就労移行支援事業以外に実施している事業は（Table 1）の通りであった。この中で，就労継続支援事業（B 型）と就労定着支援事業については半数以上の事業所が行っていることが確認された。

なお，その他としては，共同生活援助・自立訓練・相談支援・生活介護等事業が記載されていた。

(Table 1) 就労移行支援事業以外に法人が実施する事業

事業	件数（%）
就労継続支援事業（A 型）	2（11.1）
就労継続支援事業（B 型）	10（55.6）
障害児通所支援事業	3（16.7）
就労定着支援事業	11（61.1）
その他	8（44.4）

2　事業所スタッフ

(1) 事業所スタッフの性別及び年代

施設長を含む事業所スタッフの性別及び年代構成の割合は（Table 2）の通りであった。なお，年代別の割合は年代が不明なものを除いて算出している。特に 20 代と 30 代のスタッフが全体の 66%以上を占めることが確認された。

(Table 2) 事業所スタッフの性別及び年代構成

	男性	女性	合計 人数（%）
20 代	2	12	14（21.5）
30 代	12	17	29（44.6）
40 代	5	6	11（16.9）
50 代	3	5	8（12.3）
60 代	3	0	3（4.6）
不明	4	22	26
合計人数	29	62	91
(%)	(31.9)	(68.1)	

(2) 事業所スタッフが取得している主な資格

施設長を含む事業所スタッフの取得している主な資格は，（Table 3）の通りであった。複数の資格を保持する場合はどちらも計上し，延べ件数を分母として割合を算出した。なお,「サービス管理者」については「その他」からも除いている。社会福祉士，精神保健福祉士が割合としては最も多く，次いで介護福祉士が多いことが確認された。一方，医療（看

護師）と心理（臨床心理士・公認心理師）系の資格保持者は比較的少なかった。

なお，その他は「手話関連の資格」や「調理師」等といったものが記載されていた。

(Table 3) 事業所スタッフの取得している主な資格

資格	人数（%）
社会福祉士	15（21.1）
精神保健福祉士	15（21.1）
介護福祉士	10（14.1）
保育士	6（8.5）
作業療法士	6（8.5）
社会福祉主事	5（7.0）
看護師	2（2.8）
臨床心理士	2（2.8）
公認心理師	1（1.4）
その他	9（12.7）

(3) 事業所スッタフ 1 人あたりの利用者数

施設長を含むスタッフ 1 人あたりの利用者数を算出したところ，平均値は 4.91 人（＝年間利用者総数 506 人／スタッフ総数 103 名）（標準偏差 1.71）で，スタッフ 1 人あたりの担当人数が最も多い事業所は 8.29 人，最も少ない事業所で 1.67 人であった。

3　対応可能な障害種別

(1) 対応状況による分類

各障害種別への対応状況を概観したところ，発達・精神・知的障害の全てかそのいずれかに特化して対応している事業所（限定型）と，広く全般に対応している事業所（総合型）に分類することができた。回答のあった全 18 事業所中，限定型が 3 事業所，総合型が 15 事業所であった。

(2) 障害種別ごとの対応状況

障害種別ごとにみた対応状況は（Table 4）の通りであった。

なお，その他は「難病」や「高次脳機能障害」であった。

(Table4) 障害種別ごとの対応状況

障害種別	件数（%）
知的障害	17（94.4）
発達障害	17（94.4）
精神障害	16（88.9）
内部障害	13（72.2）
肢体不自由	12（66.7）
聴覚障害	11（61.1）
視覚障害	9（50.0）
その他	4（22.2）

4　サービス内容

(1) サービス内容の実施状況

就労移行支援事業に含まれるサービス内容の実施状況について，項目ごとに集計すると，（Table 5）の通りであった。

この中で特に，「オリエンテーションや研修（障害理解等）」及び「企業の雇用担当者を対象とした相談（障害の様子や就労事例のレクチャー等）」は行っていない事業所が，比較的多くみられた。

なお，その他には「生活支援・余暇支援・家族支援」，「余暇支援・同行支援」を行っている事業所があった。

(Table 5) サービス内容の実施状況

サービス内容	件数（%）
相談支援（メンタルケア・手帳取得相談等）	16（88.9）
事業所での基礎技能トレーニング（体力づくり等）	17（99.4）
事業所での職業技能トレーニング（軽作業・PC 技能等）	18（100.0）
事業所でのソーシャルスキルトレーニング（あいさつや対話・生活習慣等）	18（100.0）
事業所での就職対策トレーニング（面接・履歴書作成支援等）	17（94.4）

オリエンテーションや研修（障害理解等）	13 (72.2)
企業訪問・見学	16 (88.9)
企業でのトレーニング(職業体験等)	16 (88.9)
合同面接会・合同説明会等への参加支援	17 (94.4)
企業の雇用担当者を対象とした相談（障害の様子や就労事例のレクチャー等）	8 (44.4)
就職後の定着支援	17 (94.4)
その他	2 (11.1)

(2) 重点が置かれているサービス内容

(Table 5) の各サービス内容項目の中から，個々の事業所において特に重点を置いていると考えるものを３つ選択してもらい，頻度の高いものから並べると，(Table 6) の通りであった。

「事業所でのソーシャルスキルトレーニング（あいさつや対話・生活習慣等)」や「事業所での職業技能トレーニング（軽作業・PC 技能等)」に重点を置く事業所が比較的多く，個に応じた技能等の向上が図られている状況が確認できた。

(Table 6) 重点が置かれているサービス内容

サービス内容	割合 (%)
事業所でのソーシャルスキルトレーニング（あいさつや対話・生活習慣等）	66.7
事業所での職業技能トレーニング(軽作業・PC 技能等)	46.7
企業でのトレーニング（職業体験等）	40.0
就職後の定着支援	40.0
相談支援（メンタルケア・手帳取得相談等）	33.3
事業所での基礎技能トレーニング(体力づくり等)	33.3
企業訪問・見学	33.3

※他の項目はいずれの事業所からも選択無し。

5　自由記述事項のまとめ

(1) 事業所の特色（強み）

特色（強み）に関する自由記述について記述内容ごとに分類名を付与してまとめると，(Table 7) のようになった。

(Table 7) 事業所の特色（強み）

分類名	具体的な内容
個々への対応	・利用者の長所を活かす。 ・個々のニーズに応じたプログラムを設定する。 ・個々のペースに合わせて活動する。
体験活動	・スタッフとともに職業体験を行う。 ・有給の実習を実施している。
企業開拓	・実習先を多様な職種に広げる。
地域交流	・地域のボランティア活動等を行う。 ・農福連携による体験を行う。
専門性	・臨床心理士・作業療法士等を配置し，専門的な支援を進める。 ・障害種別を限定して，特化している。
トレーニング	・就労の基盤となる生活全般を支援する。 ・コミュニケーションスキル・マナー等の向上を促す。

余暇支援	・生活の質を向上させるための余暇支援（交流会・レクリエーション体験等）
支援の質	・スタッフの正規社員化を進める。
就労後の支援	・就労後もサポートを継続する。
関係機関連携	・家族との連携を行う。 ・医療機関との連携を行う。

(2) 事業外プログラム

事業外に実施しているプログラムに関する自由記述をまとめると，(Table 8) のようになった。

(Table 8) 事業外プログラム

有料プログラム	・講座開催（キャリアデザインワークショップ） ・余暇支援（旅行体験・調理実習・宿泊体験・婚活・飲み会体験）
無料プログラム	・地域活動（美化活動・祭への参加） ・余暇支援（ダンス・ミュージックセラピー・花見・調理実習・外出体験・読書） ・トレーニング（ビジョントレーニング・コミュニケーション・通勤練習・身だしなみ・安全運転講習） ・その他のサポート（通院同行・送迎）
その他，今後に計画しているプログラム	
・家族支援	
・産学連携（就学中の就労支援やひきこもり対策）	
・訪問型の移行支援	
・関係機関と連携したチーム支援	
・社会奉仕活動への参加支援	

(3) 就労移行支援事業に関する課題

就労移行支援事業に関する課題の自由記述について記述内容ごとに分類名を付与してまとめると，(Table 9) のようになった。

(Table 9) 就労移行支援事業に関する課題

分類名	具体的な内容
多様化への対応	・テレワーク等，多様な就労形態に応じる。
関係機関連携	・他の福祉機関との連携を進める。 ・医療機関との連携を進める。 ・行政との連携を進める。
産学連携	・学生を対象とする。
制度の拡充	・離職した場合は再支援を進める。離職後支援の拡充を進める。 ・転職支援の拡充を進める。 ・定着支援制度の拡充を進める。(期間の延長・定義から外れる場合への対応充実・単価設定の見直し) ・実費負担を軽減する。 ・(特に遠隔地の) 交通費を支援する。 ・訪問時や通院同行時，通勤時の支援に関する算定の見直しを行う。 ・利用機関の拡充を進める。
生活の支援	・就労の基盤となる生活の質の向上を進める。
支援の質の向上	・スタッフの資質向上を図る。 ・スタッフのモチベーション維持を図る。
企業への啓発	・企業側の理解を促すための働きかけを行う。

Ⅳ　考察

1　事業所の概要

就労移行支援事業以外の実施事業として，企業への移行支援後に想定される定着支援事業に次いで就労継続支援事業（B 型）が多かったが，雇用形態をとらない支援事業として従来からある B 型に加え，

就労移行支援事業を拡充する法人も多かったのではないかと推察される。また，事業所スタッフの年代別構成をみると，20 代 30 代が全体の 66%を占め，2006 年の制度化以降，企業における障害者雇用の拡充が進んできたことを受け，新しい事業所の参入が増加してきた様子がみてとれる結果となった。

スタッフが所有している主な資格は社会・精神保健･介護の 3 福祉資格で半数以上が占められており，作業療法士や臨床心理士といった他の専門資格が散見された。さらに発展的な事業の拡充を図るために，福祉士系以外の専門職が配置されつつある事業所が確認された。今後は調査を継続し，どのような専門職のニーズが増しているか，把握を進めたいと考えている。

なお，スタッフ 1 人あたりの利用者数は年間で 4.91 人となっており，利用者平均から算定した従業員（職業指導員･生活支援員･就労支援員）･管理者･サービス管理責任者で構成されるスタッフ定員を考えると，2 年満期利用だけではなく短期で利用者が入れ替わっている状況も推察される。詳細な利用期間の実態に関しては今後の調査課題としたい。

2　事業所の多様化

対応可能な障害種別について事業所ごとにみていくと，障害種別を例えば精神・発達・知的障害の全てかそのいずれかに特化している限定型の事業所と，障害種別を限定せず広く全般に対応する総合型の事業所に分類できると推察された。制度化から十余年が経過し，ひとえに「就労移行支援事業所」と括られるのではなく，各々の特色が多様化してきていると推察される。このことは地域全体で捉えると，様々なニーズのある利用者にいずれかの事業所が対応可能ということになり，個々の利用者にとって有益であるだろう。今後は個々の事業所の重点サービスについてインジケーターを表示する等，各々の特色が利用者にも分かりやすくなるような仕組みがあれば，利用者が事業所を選ぶ際に指標とできるのではないかと考える。

また，特色（強み）･事業外プログラム･課題それぞれの自由記述をまとめたところ，就労移行支援事業を進めることによって，その周辺に存在するニッチなニーズの掘り起こしが進んでいる印象を得た。例えばスタッフで他の専門職を配置することによって対応範囲を拡充する，あるいはスタッフの資質を向上させるといった「内部の機能強化」，あるいは地域交流・企業開拓・余暇支援・産学連携による学生向けのサービス展開等といった「外部への機能拡充」，といったことが確認された。中でも，就労そのものだけに着目して支援するのではなく，例えば「余暇を充実させる」といった生活の質の向上も含め，利用者の生活を総合的に支援するアプローチは重要といえるだろう。多様なアプローチを実施できるようにするためにも，支援期間や単価設定等，現状の制度における具体的な課題が多数言及されており，より総合的な制度が検討されるべきではないだろうか。

3　今後の展望と課題

事業所のサービス内容の重点及び自由記述内容を総合的にみると，企業が求める人材像に合わせて利用者をトレーニングし，マッチングすることに重点が置かれている場合が多く，利用者の長所の活用方法を提案する等，企業側に働きかける仕組みといった言及等は少数であった。利用者の雇用を決定するのはあくまでも企業側であり，このような関係性のもとで就労移行支援あるいは定着支援の範疇において企業側への働きかけを行っていくことは，構造上容易ではないだろう。

今回の調査ではこの点について詳細に把握することができなかったが，今後は，事業所あるいは利用者（及び家族等）を対象に社会側・企業側の理解といった状況について聞き取りを進めていくことに加えて，企業側への調査も実施し，本研究の目的である社会側・企業側の構造的な課題の検討に努めたいと考えている。

謝辞

本研究に多大なる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。また，貴重なご回答いただきました岡山県内の各就労移行支援事業所の皆様にも心より感謝申し上げます。

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

【目的】佐藤ら(2013)は、母親の愛着が低いほど虐待傾向が強いことを報告し、Tikotzky(2016)は、母親のマターナルボンディングに、睡眠が影響すると明らかにした。本報告は海外との比較の事前調査として行い目的は産後1か月時の母親の睡眠と産後4か月のマターナルボンディングの関連を確認することである。

【方法】研究対象者：産科医院に1か月健康診査のため訪れた母親149名。調査期間：2017年9月～2018年6月末。調査方法：1か月健診時に研究協力への依頼を配布し、協力の同意を得た女性に産後4か月に調査票を送付し、郵送にて回収した。調査内容：調査内容は基本属性（年齢，家族構成，職業有無，最終学歴，経済状況)、出産歴、育児状況、ピッツバーグ睡眠調査票（PSQI）日本語版、Postpartum Bonding Questionnaire日本語版、エジンバラ産後うつ自己評価表（EPDS）である。分析方法：記述統計およびロジスティック回帰分析を行った。統計学的分析はSPSSversion22.0を使用した。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)。

【結果および考察】対象者149名のうち144名(97.2%)から回答が得られ、産後4か月に継続して回答が得られた59名(40.9%)を分析対象とした。対象の平均年齢は31.5(±4.5)歳、初産婦25名、経産婦34名であった。6点以上を睡眠障害とするPSQIは1か月で平均得点7.6点、睡眠障害あり48名(81.4%)、4か月で平均得点が5.8点、睡眠障害あり27名(45.4%)であった。従属変数を4か月のマターナルボンディング、独立変数を産後1か月の睡眠の質、母親の年齢、帝王切開有無、子供の数、産後うつ傾向としロジスティック回帰分析を行った。子供の数（β=-.294 ）と産後うつ傾向(β= .311）が有意な結果として得られたが、産後1か月の睡眠の質は有意な結果ではなかった。しかし、産後1か月時に睡眠障害のない人は4か月にボンディング障害はなく、産後1か月時に睡眠障害のある人の中から、ボンディング障害となる人が生じていた。ボンディング障害は1か月の睡眠障害が4か月に改善していても生じていた。このことから1か月時に睡眠障害があれば、4か月時にボンディング障害の可能性があるという視点を持ち、専門職によるアセスメントが必要である。

1. はじめに

佐藤ら(2013)92は、乳児健診時に母親のボンディングが低いほど虐待傾向が強いことを報告している。また、Brockington(1996)は、ボンディング障害は、養育の拒否、ネグレクト、虐待へと発展する可能性を含んでいると報告している。また、北村ら(2013)はボンディング障害は、虐待に影響を及ぼす可能性があると報告している。そのため、乳児期に母親にボンディング障害がある場合、子供の発達にかかわる深刻かつ長期的な母子関係に影響を及ぼすことが考えられる。

Klaus&Kenell(1982)は、ボンディングとは、赤ちゃんとの大人の間にみられる相互の愛情(affection)を意味するのではなく、子供たちに対して一方向性をもった関心および愛情によって、いかに関わり合えるようになったかという現象を表す用語と定義している。また、Brockington (2011) (83)は、自分の子供に対して愛情がわかず、世話をし守りたいという感情が弱く、かえってイライラしたり、敵意を感じたり攻撃したくなるなどの衝撃が出てくるような病理な心理状態をボンディング障害(bonding disorder)、あるいはボンディング不全(bonding failure)と定義し、これらは同じ意味の言葉として使用されている。母親の子への情緒的な絆は、子の健全な発育の為に重要であり、虐待予防や子育ての視点からも、母親から子供へのボンディン

グすなわちマターナルボンディングは重要であるといえる。よって、本研究ではマターナルボンディングに着目した。

ボンディングに影響する要因として、金子ら(2008)は母親が抑うつ状態にあると、子供へのボンディングが低くなることを明らかにし、下中(2017)は､産後1か月のマターナルボンディングにEPDS得点、子供の数、主観的な睡眠の質が影響していることを報告している。また、Tikotzky(2016)は、産後3か月から産後18カ月児を育てる母親のマターナルボンディングに、母親の睡眠や、時間、覚醒時間、覚醒回数が影響することを明らかにしている。これらの先行研究より、産後のマターナルボンディングに睡眠が影響を与えていることがわかる。産褥期の女性の睡眠に焦点を当てた先行研究では、藤田(2015) ⑥は産後1か月の母親の8割以上の母親が睡眠に満足していないことを示し、江藤ら(2000)53は産後4か月の母親に、育児をしている中で夜中に沸き起こる気持ちを尋ねたところ､69.9%の母親が途方に暮れ､63.2%の母親が夜中の世話を誰かに変わってほしいと考えていたことを報告し、産褥期の多くの女性が睡眠に悩まされていることが考えられる。

したがって本研究の目的を、産後1か月時の母親の睡眠の質が産後4か月時のマターナルボンディングを予測できるかを明らかにすることとする。母親の睡眠の質からマターナルボンディングを予測できるかを明らかにすることで、マターナルボンディングを考慮した産後の女性の睡眠へのアセスメントの視点や介入方法を考える一助としたい。

2. 目的

産後1か月時の母親の睡眠の質が、産後4か月時のマターナルボンディングを予測できるかを明らかにする。

3. 研究方法

1) 研究デザイン

自己記入式質問票による量的調査の手法を用いた量的縦断研究である。

2) 調査対象と調査時期

対象者は、 研究協力の得られた A 県内にある産婦人科医院において産後1か月の女性に協力を得た。そのうち、産後4か月までの継続的な研究協力に同意が得られた女性を継続調査の対象として、 随時、調査を依頼した。

調査期間は2017年9月～2018年6月末である。

3) 調査方法

事前に研究フィールドとして協力を得ている産婦人科医院における責任者に対して、研究目的、方法、倫理的配慮を書面と口頭で説明し承認を得た。調査は、産後1か月、4か月の2時期に無記名自記式による質問調査を実施した。産後1か月は、1か月健康診査のための来院機会を利用し、継続調査への協力が得られた者を対象とした。産後4か月は郵送にて随時調査票を送付し、返信をもって同意とみなした。

4. 調査内容

1) 睡眠の質:Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI-J)

睡眠の質はピッツバーグ睡眠調査票(PSQI)を用いて測定した。PSQIはピッツバーク大学精神科学教授Kupfer らによって開発された睡眠の質に関する標準化された 18 項目の質問からなる自記式質問票である。土井ら(1998)によって日本語版が作成された。18項目､4段階のリッカート尺度の自記式質問票で、各項目を得点化しているものである。睡眠の質、入眠時間、睡眠時間、睡眠効率、睡眠困難、眠剤使用、日中覚醒困難の7要素(0～3点)を加算し、合計得点PSQI(0～21 点)を算出する。各項目のいずれも、高得点ほど睡眠が障害されていると判断し、合計得点のカットオフポイントは6点とされている。6－8点を軽度障害あり、9 点以上を高度障害ありと判断される。

2) Postnatal Bonding Questionnaire: PBQ

PBQ は産後の母親から子どもへのボンディングを測るための尺度である。日本語版は金子(2010)によって翻訳され、信頼性妥当性が検証されている。25項目6件法で愛着形成、育児不安、児に対する拒絶

や怒りの感情、虐待リスクの4因子により構成される自記式質問票で、国際的にも広く普及されている。

3) 産後うつ

エジンバラ産後うつ自己評価表とは、産後うつのスクリーニングを目的としてCoxら(1987)によって開発された尺度である。産後うつのスクリーニングツールとして国際的に広く普及、活用されている。EPDSは産後うつを診断するものではなく、スクリーニングに使用するものであり、臨床診断によって産後うつは診断される。10項目4件法で構成される自記式質問票であり、合計得点は30点となり、9点以上は抑うつ傾向が高いとされている。

5. 分析方法

記述統計を行い、2群間の平均値の比較にはt検定、カテゴリカルデータの検定にはカイ二乗検定を用いた。産後1か月時の母親の睡眠の質を独立変数、4か月時のPBQを従属変数としたロジスティック分析を行った。先行研究では、ボンディングに影響を与える因子として、若年(Kinsey,2014) 、帝王切開(Sockol,2014)、産後うつ、子供の数(下中ら,2017)が影響していることを報告している。よって、その他の独立変数を、年齢、帝王切開有無、子供の数、産後うつ傾向とした。

6. 倫理的配慮

本研究は、岡山県立大学倫理審査委員会の承認を得て実施した。(平成29年　承認番号：17-11)。

7. 結果

1)研究協力者の背景

産後1か月の回答者144名(回収率97.2%)のうち、産後4か月まで継続して回答が得られた59名を分析対象とした(有効回答率 4　0.9%)。1 か月時の研究協力者の平均年齢は31.5±4.5歳、歳少年齢は22歳、最長年齢は43歳であった。初産婦が25名(42.4%)、経産婦が34名(57.6%)であった。分娩方法は経腟分娩が 54 人(91.5%)と多かった。里帰り出産は 22 名(37.3%)が行い、37 名(62.7%)は里帰り出産を行っていなかった。育児サポートありと回答した者は 1か月時と 4 か月時ともに 58 名(98.3%)であった。最終学歴は高卒以上が58名(98.3%)、家族構成は核家族が57世帯(96.6%)、三世代同居2世帯(3.4%)であった。

2)研究脱落者の概要

1か月での研究協力者は144名で、有効回答者は140名であった。4か月までの研究継続者は59名であった。継続者と脱落者の背景を分析するために、カイ二乗検定を行った結果、職業の有無と、2 回目の調査時期である4か月まで育児休暇を取得しているかの有無で脱落者と継続者に有意差があった($p<0.05$)。しかし、1か月時の、ボンディング障害、睡眠障害、産後うつ傾向の有無等では有意差は得られなかった。

3)産後1か月と4か月のPSQI・PBQ・EPDS得点の平均とその変化

(1)産後 1 か月と産後 4 か月の睡眠障害の割合において、PSQIの平均点は産後1か月で7.6±2.4点、4 か月は 5.8±2.7 点となり 4 か月の方が下がった($p<0.05$) 。睡眠障害とされた人は1か月時では48名(81.4%)で、4 か月時では 27 名(45.7%)となった。

(2)ボンディングを測るPBQにおいては、平均点は1か月時が 12.9±9.5 点に対し、4 か月は 11.1±8.3点となり4か月の方が低い傾向にあった。ボンディング障害とされた割合は1か月が4名(6.8%)で4か月が6名(10.2%)となり、4か月に増加傾向があった。下位因子の愛着形成は1か月時が4名(6.8%)、4か月時が5名(8.5%)であった。拒絶や怒りは1か月時、4か月時ともに1名(1.7%)、育児不安は1か月時と4か月時ともに2名(3.4%)、虐待リスクは1か月時と4か月時ともに0名であった。4か月時にボンディング障害のあった6名の背景をみると、6名の内5名が初産婦であった。また、6人全員が1か月時に睡眠障害であった。

(3)産後うつ傾向を測るEPDSにおいては、平均点は

1 か月時が 3.2±3.4 点で 4 か月が 2.7±2.8 点で 4 か月の方が低い傾向にあった。産後うつ傾向の割合は 1 か月と 4 か月共に 4 名(6.8%)であった。

4)4 か月時のマターナルボンディングの予測

従属変数を、4 か月のマターナルボンディングの得点、独立変数を産後 1 か月の睡眠の質、母親の年齢、帝王切開の有無、子供の数、産後うつ傾向とし、ロジスティック分析を行った。Hosmer と Lemeshow の検定の結果、求めたモデルはデータに適合していると判断され、マターナルボンディングの予測度と期待度との関係(正判別率)は 89.8%、R^2 は.207(Cox&Snell)，.43(Nagelkerke)であった。研究仮説である、産後 1 か月の睡眠の質は、本研究では有意な結果としては得られなかった。予測因子としては、産後うつ傾向がオッズ比 1.368(95%CI:1.044-1.792)で有意な結果として得られた。

5)産後 1 か月の睡眠障害と産後 4 か月のボンディング障害

(1)産後 1 か月の PSQI と産後 4 か月の PBQ

睡眠は 6 点以上、ボンディング障害は 26 点以上がそれぞれのカットオフポイトであり、それ以上高い場合が、睡眠障害あり、ボンディング障害ありと判断される。1 か月時に睡眠障害がない人は 4 か月時にボンディング障害はなく、1 か月時に睡眠障害のある人の中に 4 か月時にボンディング障害があることが示された。

(2)産後 1 か月の PSQI と産後 4 か月の PBQ 下位因子 1：愛着形成

1 か月時の睡眠と 4 か月時の PBQ の下位因子 1 である愛着形成についても、1 か月時に睡眠障害がない人は 4 か月時の愛着形成に問題はなく、1 か月時に睡眠障害がある人の中に 4 か月時に愛着形成に問題があることが示された。

(3) 産後 1 か月の PSQI と産後 4 か月の PBQ 下位因子 2：拒絶や怒りの感情

下位因子 2 の拒絶や怒りの感情についても、拒絶や怒りの感情ある人は少ないが、1 か月時に睡眠障害のない人は 4 か月時に拒絶や怒りの感情はなく、睡眠障害のある人の中に 4 か月時に拒絶や怒りの感情があることが示された。

(4) 産後 1 か月の PSQI と産後 4 か月の PBQ 下位因子 3：育児不安

下位因子 3 の育児不安においても、1 か月時に睡眠障害のない人は 4 か月時に育児不安はなく、1 か月時に睡眠障害のある人の中に 4 か月に育児不安があることが示された。

6)産後 1 か月で睡眠障害のない人の特徴

産後 1 か月では、81.4%と多くの母親が睡眠障害かある中で、睡眠障害がないとされた人は 18.6%であった。睡眠障害のない群の特徴としては、ある群に比べ、1 か月時の EPDS 平均得点は 2.81 点、PBQ 平均得点は 9.36 点で共に低い傾向にあり、産後うつ傾向の人もボンディング障害の人もいなかった。また、睡眠障害のない群の 72.7%が経産婦であるという特徴があった。

7. 考察

1)対象者の背景

脱落者と継続者には、職業の有無と、2 回目の調査時期である 4 か月まで育児休暇を取得しているかの有無で有意な差があった($p<0.05$)。よって、産後 4 か月時は育児休暇を終え、仕事を再開している場合もあるため、アンケートを行う時間の確保が難しく 4 か月までの調査の継続は困難だったと考える。

また、1 か月時の産後うつ傾向や、睡眠障害のボンディング障害の有無等では継続者と脱落者に有意差はなかったが、4 か月にボンディング障害や、産後うつや睡眠障害などの影響を受けている人が、脱落者となった可能性もあると考える。

2) 産後 1 か月と 4 か月の PSQI・PBQ・EPDS

(1)PSQI：睡眠の質

産後 1 か月と 4 か月の PSQI 平均点は産後 1 か月で 7.6±2.4 点、4 か月は 5.8±2.7 点となり 4 か月の

方が下がった(p<0.05)。乾ら(2010)71 の調査では、産後 1 か月の PSQI 平均値 6.6±3.1、4 か月の PSQI 平均値は 5.3±2.1 点となり、1 か月時では平均点がカットオフポイントの 6 点を超えるが、4 か月時ではカットオフポイントよりも低いという結果であった。本研究も産後 1 か月では PSQI の平均値はカットオフポイントを超えるが、産後 4 か月ではカットオフポイントより低いという同様の結果であった。また、睡眠障害とされた産後の女性は 1 か月時で 81.4%であった。産後 1 か月は、産後の生理的変化や､新しい家族を迎えての生活環境やリズムの変化、授乳や育児によって睡眠の質が低下しているため、多くの女性が睡眠障害とされたと考えられる。國分ら(2004)33 は、産後 4 か月の時点が出産後の睡眠と覚醒のリズムが安定し始める転換時期であり、睡眠時間と眠気とだるさ等の疲労自覚症状は改善する傾向にあったことを報告している。よって、産後 1 か月と比較すると、産後 4 か月では母親の睡眠のリズムが安定してきたことや、児を迎えての新たな生活に慣れてきたことにより、本研究でも、睡眠障害の人は減少したと考えられる。また、新小田ら(2001)㊿は児の睡眠･覚醒リズムの発達とともに産後 12 週以降に、母親の睡眠・覚醒リズムも復帰していくことを示している。しかし、産後 4 か月においても 4 割以上の女性が睡眠障害とされていたことから、産後の女性の睡眠への支援の必要性は示唆された。また、産後の女性は長期的に睡眠の影響を受けていることが明らかとなり、睡眠障害を抱えながら育児をしていることが考えられる。よって、母親の睡眠の状態も含めたアセスメントを行い支援につなげる必要があると考える。

(2)PBQ:ボンディング

PBQ の平均点は、1 か月時が 12.9±9.5 点に対し、4 か月は 11.1±8.3 点となり 4 か月の方が低い傾向にあった。ボンディング障害とされた割合は 1 か月が 6.8%で 4 か月が 10.2%となり、増加傾向にあった。よって、産後 1 か月以降に新たにボンディング障害になる可能性があるという視点を持ち、専門職が関わり、支援を行う必要があると考えられる。また、4 か月時にボンディング障害のあった 6 名の内 5 名が初産婦であった。下中ら(2017)は、子どもの数が多いほど、マターナルボンディングがよいことを明らかにしていることから、初産婦は、育児経験が少なく、子どもをかわいいと思える心のゆとりが経産婦に比較し少ないと考えられる。

(3)EPDS：産後うつ傾向

産後うつに関しては、EPDS の平均点は 1 か月時が 3.2±3.4 点で 4 か月が 2.7±2.8 点で 4 か月の方が低い傾向にあり、1 か月と 4 か月ともに 6.8%が産後うつの傾向があった。中板ら(2012)の研究では、産後 1 か月時の産後うつ傾向が 13.4%、産後 4 か月時が 12.1%であり、本研究は、先行研究より産後うつ傾向の割合は少ない傾向にあった。理由として、先行研究では産後 1 か月時は新生児訪問時、4 か月時は乳児健診時に直接回答を得ているため、幅広い対象者から継続的に研究協力が得られたと考えられる。本研究は、産後 4 か月時は質問紙を郵送し、回答を得ているため、産後うつ傾向のない対象者からの回答の方が得やすく、産後うつ傾向にある対象者の割合は先行研究に比べ低かったと考える。また、金子ら(2008)62 は、産後 1 か月の抑うつ傾向にサポートの有無が影響していることを報告している。本研究では、産後 1 か月時と 4 か月時ともに、98.3%がサポートを受けていると回答しているため、産後うつ傾向のある対象者の割合は、先行研究と比較し低かったと考える。

3)産後 4 か月のマターナルボンディングの予測因子

本研究においては、研究仮説である産後 1 か月時の母親の睡眠の質は、産後 4 か月のマターナルボンディングを予測することはできなかった。産後 4 か月のマターナルボンディングを予測できる変数としては、産後うつ傾向が有意な結果として得られたと。つまり、産後 1 か月時にうつ症状が高い母親は、産後 4 か月に子供への否定的感情が高くなる可能性があると考えられる。佐藤ら(2013)92 は新生児訪問時の産後うつ傾向が乳幼児健診時のマターナルボンディングに影響していることを報告し、本研究ではそ

れらを支持している結果となった。よって、産後 1 か月の母親の抑うつ傾向は、その後のマターナルボンディングにも影響するため、産後うつ症状とボンディング障害を視野に入れた支援が必要と考える。また、産後 1 か月睡眠の質が有意な結果として得られなかった要因としては、1 か月時の研究対象者の 8 割が睡眠障害レベルであったことと、縦断研究のため、4 か月まで継続できた人数に限りがあったこと、脱落者の中にボンディング障害のある人がいた可能性があると考えられる。

4) 産後 1 か月の PSQI と産後 4 か月の PBQ

本研究結果より、睡眠障害の人の割合は、産後 1 か月と 4 か月では、4 か月の方が減少し、ボンディング障害の割合は産後 4 か月の方が増加傾向にあった。更に、産後 1 か月時に睡眠障害のない人は、産後 4 か月時にボンディング障害はなかった。つまり、1 か月の睡眠障害を軽減することで、4 か月時のボンディング障害を防ぐ可能性があると考えられる。よって、1 か月までの母親の睡眠状態も含めた評価と継続的な支援が必要であると考える。また、1 か月時で睡眠障害ない群の 7 割以上が経産婦であったことから、初産婦と比較し経産婦の方が産後の睡眠の質は保てると考えらえる。新小田ら(2001)は、経産婦と比較し、初産婦は産後 2 週から 6 週までの睡眠効率の減少が大きく、その後は両群の差は縮小していくことを明らかにしている。そのため、本研究でも、産後 1 か月では、睡眠障害のない割合は経産婦の方が多いという結果になったと考えられる。よって、初産婦へのきめ細やかな支援が必要と考えられる。Bienfait M(2011)は、マターナルボンディングに支障をきたしている母親を特定しにくいとの報告をしているため、1 か月に睡眠障害の人は 4 か月時に睡眠障害が改善されても、4 か月時に愛着障害のある人もいるという視点を持ち、専門職によるアセスメントが必要であると考える。

現在、国では産後うつの予防や新生児への虐待予防等を図る観点から、産後 2 週間、産後 1 か月など出産後間もない時期の産婦に対する健康診査の重要性が指摘されているを実施している。平成 29 年度からは、市町村による産婦健康診査事業が開始され、産後の初期段階における母子に対する支援が強化されている。(国民衛生の動向)。よって、産婦健診等で退院後の母親の状態を専門職が評価し、支援につなげていくことは母子を支援する上で重要な機会となると考える。先行研究では、1 か月時のマターナルボンディングに睡眠が影響していることを報告しているが、それらは横断的な調査であり、睡眠とマターナルボンディングの関係を一時点でみている。本研究では、4 か月時に新たにボンディング障害となった人もいた。母子の状態や周囲の環境の変化等、子育て環境は経過とともに変わることから、一度支援の必要性がないと判断された者でも、その後、手厚い支援が必要な状況に陥ってないか、継続的に状況を把握することが重要であると考える。よって、産後長期におよびボンディング障害になる可能性があるという視点を持ち専門職が関わることがボンディング障害や虐待予防を含む、育児支援として重要となると考える。久慈ら(2018)は、母親はなじみの専門スタッフの継続的な関わりや、母親仲間との子育ての共有により安心感や喜びが持てることを報告している。よって、専門職の継続的な関わりは、母親が安心して育児ができることにつながると考えられる。また、鈴木ら(2015)は、ネウボラの保健師は継続的な支援を通して家族の潜在的問題を早い段階で見つけ出し、早期介入を行うことが可能であることや、必要時に適切な支援につなげていくことができる母子保健システムの重要性を述べている。平成 29 年より、母子健康包括支援センターを市町村に設置することが努力義務とされ、平成 32 年度末までに全国展開を目指すこととされた(厚生労働省　子育て世代包括センター業務ガイドライン)。時代の流れとともに変化する育児環境の中で、育児に関するすべての支援を 1 つの機関に集約することは困難ではあるが、母子健康包括支援センターが軸となり、関係機関を連絡調整し、切れ目のなく必要な支援を受けられるような体制のさらなる強化が今後重要となると考える。

身体性アバタを介したリフレクションによる看護コミュニケーション教育支援システム

岡山県立大学保健福祉学部看護学科

高林範子

看護の方向性として看護実践力の向上が求められており，看護者がどのように考え，判断しているかといった考える力を涵養するような教育が重要である.「反省」「振り返り」「省察」とも訳されるリフレクション（reflection）は，そのような看護実践の基盤となる科学的問題解決志向を含む思考の仕方であり，看護者が直面する複雑で多様な問題に対応する力となることで,看護基礎教育にもその導入が試みられている.そこで,看護コミュニケーションにおけるリフレクションに着目し，リフレクション機能を付加したシステムを開発している[1)]．本研究では，開発システムを用い，視線や心拍などの生体反応を含めてリフレクションを行うことで，看護コミュニケーションにおけるリフレクションの有効性の検証，および生体反応リフレクションの有効性を検証した．先行研究[1)]と同様にリフレクション機能の有効性が示され，視線行動のリフレクションでは，普段自身では把握することができない視線変化を客観的に見ることができる点が評価され，個人での振り返りが困難な部分を可視化することによるコミュニケーションスキル向上への有効性が示された.

１．はじめに

看護において，看護者が患者やその家族など対象となる人と意志の疎通を図ることは，援助的人間関係の確立のために大変重要である．そのため，看護学生の看護実践時におけるコミュニケーション能力の向上が求められている．そのための教育方法として，近年ロールプレイングや模擬患者（Simulated Patient:SP）をコミュニケーション演習に活用する試みがなされているが，さらなる看護師の実践能力向上にはリフレクション（reflection）が有効であると認知されつつある．田村らは「経験からの学びを基盤にするリフレクションは，看護師のレベルに拘りなく，自己の成長への学びを得る最適なスキルである」,「リフレクションは思考のスキルであり，トレーニングすれば身に着けることが出来る」と述べている[2)]．リフレクションには行為の中での振り返り（reflection in action）と行為の後の振り返り（reflection on action）の二つがある．本研究では特に行為の後の振り返りに焦点を当てた．著者らはこれまで看護教育現場でのコミュニケーション教育の支援を行うため，リフレクション機能を付与した看護コミュニケーション教育支援システムを開発してきた[1)]．このシステムは仮想空間内で自己アバタを介してのコミュニケーションを行うため，友人同士のロールプレイングによるリアリティ不足や模擬患者演習における過緊張を緩和することが期待できる．さらに仮想空間内での視点切替が可能なため相互のインタラクションをリアルタイムで観察することができるので，客観的に自己の行動を把握することができる．また，リフレクション機能によりロールプレイング後も自身の行動を振り返り，落ち着いて自己分析をすることが可能である.

コミュニケーションにおいて相手の目を見て対話をすることはとても重要だといわれている.福井は,対人関係において最も基本的な出発点は二人の人間の目の出会いから始まると述べており，相互の一瞥がお互いの心を開くきっかけとなり，対話へと発展するか，または警戒心を引き起こして関係を断ってしまうかを決定するとしている[3)]．看護においても患者・家族との信頼関係を構築するための重要な非言語的メッセージの一つとされており，コミュニケーション教育において体験的な学習を通し，自己の視線行動の特徴を捉え，より良いコミュニケーションスキルの修得に繋げる必要がある.

そこで本研究では，看護コミュニケーション教育支援システムを用い，視線や心拍などの生体反応を含めてリフレクションを行うことで，看護コミュニケーションにおけるリフレクションの有効性の検証，および生体反応リフレクションの有効性を検証する．

2．システム概要

対話者のうなずき，身振り等の上半身の動きを身体性アバタの動きとして忠実に再現するために，対話者の頭頂部，背中，両手首につけた 4 つの磁気センサ（POLHEMUS FASTRAK）で計測する各部位の角度と位置に基づいて，うなずき等を含む頭部の動き，胴体の動き，及び左右の腕の動きを表現する身体性アバタが構築されている [4]．リフレクション機能は身体動作データと音声データを保存し，その情報をもとにロールプレイング時の空間を再現することができる．視線動作の計測ではアイマーク解析ソフトウェア(EMR-dStream2)，心拍状態の測定では自律神経バランス分析器（TAS9 VIEW）を使用した．アイマーク解析ソフトウェア(EMR-dStream2)は，ディスプレイ外側に赤外線センサが設置されていることで視線を測定することができ，ディスプレイ入力を切り替えることにより視線計測結果画面を見ることができる．それにより視線の動きを測定することができ，計測結果はゲイズプロットやヒートマップなど様々な観点から確認することが可能である．自律神経バランス分析器（TAS9 VIEW）は．左人差し指にセンサを装着してもらい，心拍変動の測定及び周波数解析を行った．ロールプレイング開始の 1 分後から 2 分 30 秒間計測した．システムの構築概要を図 1 に示す．

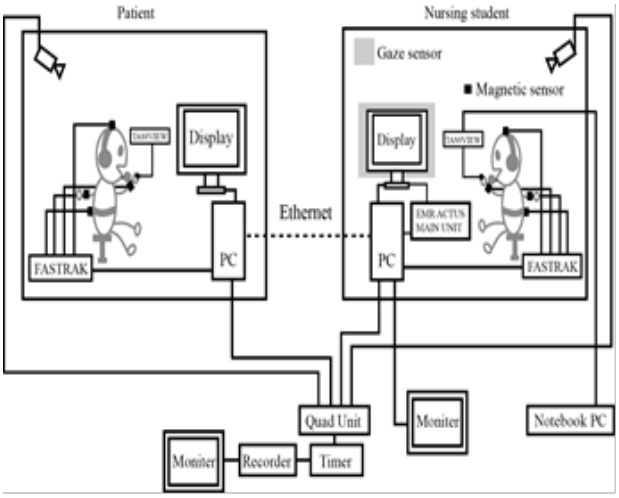


図 1 システム概要



看護学生　　模擬患者

図 2 実験場面

3． 評価実験

3-1．実験方法

看護学生と模擬患者（実際の患者の症状や会話を再現する専門家：50 代女性）とのロールプレイングによるコミュニケーション実験を行った（図 2）．ロールプレイング時の視線の動きと心拍変動を計測し，実験協力者本人に提示することで，リフレクション効果を検証した．実験はまず，4 分間のロールプレイングを行った．視点は 3 人称視点から 1 人称視点の順番に 2 分経過時点で自動で切り替えた．終了後に 8 項目の 7 段階評価と自由記述アンケート(A) を行った．

次に，ロールプレイング中の心拍に基づく自律神経活動等の評価結果，および視線計測による視線の動的変化を実験協力者に提示した．提示した自律神経活動等の評価結果の一例を図 3 に，視線計測結果の一例を図 4 と図 5 に示す．その後，ロールプレイング時の様子をリフレクション機能を用いて閲覧させた．終了後に 9 項目の 7 段階評価と自由記述アンケート（B）を行った．なお，今回使用したシナリオは患者の病状などの状況設定のみ行い，身体動作や会話内容は実験協力者のアドリブで行った．実験協力者は看護学科 1 年生 16 名，4 年生 8 名の計 24 名である．

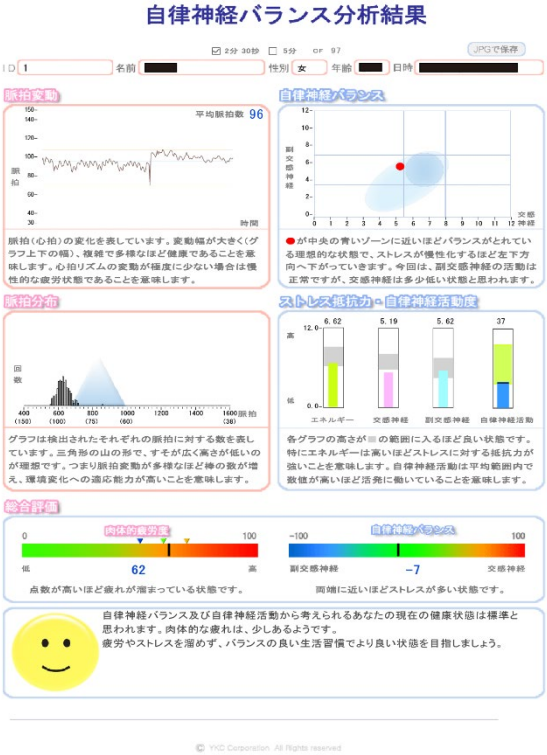


図 3 提示した自律神経活動結果の一例

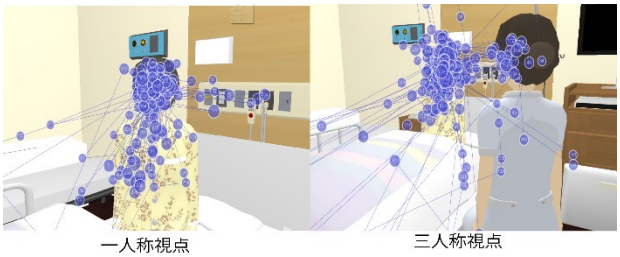


図 4 提示したゲイズプロットの一例

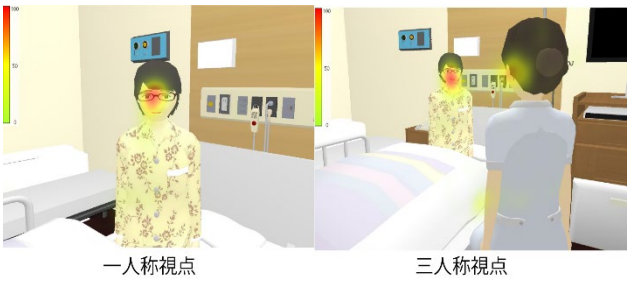
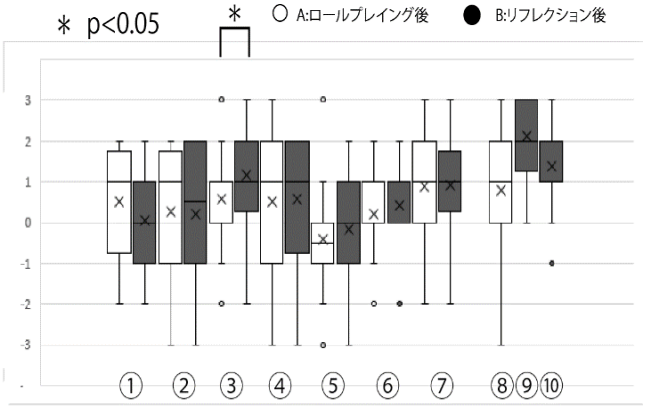


図 5 提示したヒートマップの一例

3−2．実験結果

箱ひげ図を用いて，ロールプレイング後とリフレクション後での 7 段階評価を比較した結果を図 6 に示す．図に中央値と四分位，外れ値，そして平均値を示す．Wilcoxon 符号順位検定を行った結果，「コミュニケーションに対する課題を明確にできたか」の項目において有意水準 5 %で有意差が認められた．自己の視線・心拍状態のリフレクション機能についての 7 段階評価では，とくに視線変化のリフレクションが高く評価された．



①患者の思いを聴き出すことが出来たか
②患者の様子を観察することが出来たか
③コミュニケーションに対する課題を明確にできたか
④自己のふるまいを意識できたか
⑤患者との一体感を感じることが出来たか　⑥好み
⑦今後、このシステムを使用したいか　⑧緊張していたか(Aのみ)
⑨視線の変化を意識することはスキルの向上に役立つ(Bのみ)
⑩緊張状態を意識することはスキルの向上に役立つ(Bのみ)

図 6　7 段階評価結果

自由記述においてはリフレクション機能については「自分の発言・視線・所作が振り返ることができる良いシステムだと思った」といった自己を客観視できる特性について評価する声が多く見られた．また，視線リフレクションについては「表情をしっかり見ていないことが多いということが視線を見て気付いた」などの視線の変化を意識することで新たな気づきを得た評価も見られた．心拍状態リフレクションについての感想はあまりなかったが，「ロールプレイングを振り返る前に見た自分の心拍は安定していたが，自分の中では緊張していた」「驚くくらい緊張していて緊張しやすいのだと分かった」という自分の認識と実際測った心拍状態のずれに驚く声もあった．これらのことから普段意識し辛い自己の言動や生体反応を自覚することのできるシステムは，コミュニケーションスキルの向上において有効であると考えられる．一方で，「表情が分からないので非言語的な思いを十分読み取れなかった」「画面上で得られる情報が少なく，表情などは声のトーンから聞き取ったので普段のコミュニケーションより難し

く感じた」など表情をリアルタイムで把握できない本システムの難点に触れる記述もあり，機能における課題が残された.

４．考察

４−１．７ 段階評価について

７段階評価では，ロールプレイング後とリフレクション後で比較して,「コミュニケーションに対する課題を明確にできたか」の項目において有意水準５ %で有意差が認められた．しかし，その他の項目については有意差は認められなかった.「コミュニケーションに対する課題を明確にできたか」の項目についてリフレクション後の評価が明らかに上がったことは生体反応リフレクションおよびリフレクション機能の有効性を示している.

４−２．自由記述結果について

リフレクション機能・視線リフレクション機能に対しての評価の声は多く聞かれたが，心拍状態リフレクションについての自由記述は少ない傾向にあった．これは普段から自身の心拍状態（緊張状態）は比較的自覚しやすい生体反応であり，提示した結果と自身の認識にギャップが少なかったことが原因なのではないかと考えられる．また.「ロールプレイングを振り返る前に見た自分の心拍は安定していたが,自分の中では緊張していた」という意見もあり，数値的な結果はあまり評価されていない傾向にある．看護コミュニケーションシステム自体への評価は,システムを介してコミュニケーションの様子を振り返ることができ，コミュニケーションに対する課題を見つけることができる等の意見が多く見られた．看護コミュニケーション支援システムによるロールプレイング・リフレクション練習がコミュニケーションスキルの向上および，リフレクションという行為に対しても理解を深めることに有効であるといえる．視線リフレクションでは，普段自身では把握することが難しい視線変化を客観的に見ることができる点が評価され，個人での振り返りが困難な部分を可視化することによるコミュニケーションスキル向上への有効性を示した.

５．おわりに

本研究では，看護コミュニケーション支援システムを用いて，生体反応リフレクションを行うことで看護学生も意識していなかった課題を自覚することができ，より効果的なコミュニケーション教育が可能であることを示した.

謝辞

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

参考文献

1）高林, 石井, 渡辺：リフレクション機能を付加した看護コミュニケーション教育支援システム, 人間工学(2017).

2）田村, 池西：看護の教育・実践にいかすリフレクション，南江堂（2014).

3）福井：まなざしの心理学，創元社, pp156−191 (1991).

4）高林, 山本, 小野, 渡辺, 石井：アバタに微笑みと眼球動作モデルを付加した看護コミュニケーション教育支援システム，人間工学（2016).

性同一性障害に関する看護師の知識･理解が影響を及ぼす看護ケアの態度

岡山県立大学大学院保健福祉学研究科看護学専攻

西 百々佳　　井上 幸子

日本ではLGBTに関する知識を学ぶ機会はほとんどなく，それは医療従事者であっても同様であり，現状では，看護師がケア対象者の理解のための十分な知識を持たないまま看護を行なっている.本研究は，看護師の性同一性障害の知識と理解の実態について明らかにし，その知識と理解がどのように看護ケアを行う際の態度に影響を及ぼしているか明らかにすることを目的に実施する.まず,性同一性障害の知識や理解の程度を測定するための調査票を作成するため，医療機関に勤務している看護師および看護学生の計120名を対象に，無記名自記式オンライン調査を用いた調査を実施した.基本属性，性同一性障害に関する知識，性同一性障害に関する理解と，看護ケアの態度について尋ね，得られたデータから，自己作成した調査票の質問項目について主成分分析を行い調査票の修正を行った.性同一性障害の知識は10項目，性同一性障害に関する理解は15 項目を抽出した.今後は，本研究で作成した調査票を用いて全国に勤務する看護師を対象に，性同一性障害の知識や理解の実態について調査を行い,看護ケアに対してそれらがどのように影響しているか検証する.

I.　はじめに

近年,LGBTをはじめとするセクシュアルマイノリティに対する人々の意識は著しく変化してきている.1987年米国精神医学会が発行した精神疾患の分類と診断の手引き改訂第3版（DSM-Ⅲ-R）の診断名リストから同性愛が削除され，1992年には，世界保健機関World Health Organization（以下，WHO）が発行する疾病及び関連保健問題の国際統計分類第10版（ICD-10）から同性愛という用語が削除された（米国精神医学会，1987；WHO，1992）.性自認に関しては2013年出版のDSM-5の診断名から「性同一性障害」が「性別違和」に名称変更された.また日本では電通ダイバーシティ・ラボが2018年に「LGBT調査」を実施し，LGBTに該当する人は8.9%で，2015年調査(7.6%)から増加していると報告している(電通ダイバーシティラボ，2015；電通ダイバーシティラボ,2018）.また，トランスジェンダーと該当する者は0.7%である（平松,2019）.日本におけるトランスジェンダーの人数について正確に把握することは困難であるが，性に関する違和感を持ち，医療機関に受診した者は2015年の時点で29,000人と推測されており,受診者数は増加している(中塚,2017).

日本における性同一性障害に関する動きとして，1997 年に日本精神神経学会により性同一性障害に関する答弁と提言の中で「性同一性障害の診断と治療のガイドライン（初版)」を公表した（日本精神神経学会・性同一性障害に関する特別委員会，1997）[14].このガイドラインを踏まえ，1998年日本で初めてとなる性別適合手術が行われた.2004年には,「性同一性障害の性別の取り扱いの特例に関する法律」が施行され，一定条件のもと，戸籍上の性別変更が可能となった.戸籍上の性別変更に至るまでには,一定条件を満たしている必要があり，その条件の中には性別適合手術を受けなければ，条件を満たすことができないものもある.しかし,2014年にWHOは「生殖機能をなくすような手術の強制は人権侵害である」とし，性別変更の条件として「生殖腺除去手術」を挙げている国は，その条件を削除するように求めたが，現在日本では法改正は行われていない（中塚,2017）.一方で，医療現場では，2018 年に診療報酬改定により性別適合手術に対して公的医療保険が適用となり，医療体制の整備が進むにつれ，性別適合手術以外にも，現在は保険適用ではないホルモン療法を受ける人口の増加も見込まれ，性同一性障害と

日本の医療とのつながりも大きくなると考えられる.

2019 年に当事者の日常生活での困難をリスト化した「性的指向および性自認を理由とするわたしたちが社会で直面する困難リスト(第 3 版)」によると，医療に関して，医療従事者の知識不足，偏見が原因となった当事者の不快感，苦痛が日常生活での困難として挙げられている（LGBT 法連合会，2019）. さらに若者の LGBT は同年代の人口と比べて薬物使用，性感染症，がん，循環器疾患，肥満，いじめ，孤立，拒絶，不安，うつ病，自殺のリスクが高く（Hafeez et al.，2017），ホルモン治療により，骨粗しょう症になる可能性が高まる（Sedlak et al.，2017）. ホルモン治療による副作用や性別適合手術による合併症のリスクは数多くあり，見過ごせないものである. このような現状にあっても，性同一性障害の者は保険証を提示することや身体を見られること，フルネームで呼ばれることに抵抗感を抱き，医療機関への受診を避けることから，重症化するまで医療機関を受診しない者が多く(平松，2019；富岡・中塚，2010)[5) 17)] 有病率の高い集団であると考えられる. このように，疾患リスクの高い集団であることを踏まえると，医療従事者は LGBT に関する知識を持っておく必要があると考えられるが，現状では，義務教育あるいは看護師養成課程において，LGBT に関する知識を学ぶ機会はほとんどない（岩田ら，2017）. さらに，先行研究によると，看護場面における性同一性障害に対する差別的な対応は，看護師の知識の欠如によるものであり，当事者に疎外感を感じさせていることが明らかにされている（Anderson et al.，2017）. これは，看護師が対象理解のための十分な知識を持たないままケアを提供している可能性があることを示唆している.

そこで本研究は，看護師の性同一性障害の知識・理解の実態を明らかにし，その知識・理解がどのように看護ケアの態度に影響を及ぼしているかについて調査することを目的とし，調査のための質問紙を作成し信頼性・妥当性を検証することを目的に実施した. 今後実施する本調査において，この質問紙を用いて，看護師の性同一性障害に対する知識や理解について明らかにすること，さらに性同一性障害を含む性の多様性に関する教育の必要性を明らかにすることにより，多様な性に対する看護師の理解を深める方法の検討や，性同一性障害当事者に対するよりよい支援を検討することができる.

II. 方法

まず，本調査の概要について述べる. 研究デザインは，観察的横断研究で，無記名自己回答式によるオンライン調査とした. 本調査の対象者は，国内の病院に勤務する看護師とし，性別適合手術の保険適用が認定された国内 6 病院を含む全国の入院施設を要した病院を無作為に抽出する. そのなかから，研究協力への同意が得られた各病院 10 名程度ずつ，合計で看護師 1000 人程度にオンライン調査への参加を依頼する計画である. 性別適合手術の保険適用認定病院では，性同一性障害患者と関わる部門の看護師に回答を依頼し，いずれの医療機関においても外来・病棟看護師の別は問わない. 本調査の前に，質問紙の信頼性・妥当性の検証を行うため，看護学生および看護師計 120 名を対象にプレテストを行なった. 本研究報告では，プレテストまでを実施したので，その内容について報告する.

1. プレテストの調査内容

基本属性，性同一性障害に関する知識についての正誤問題 21 項目（以下，知識），性同一性障害に関する理解について 4 件法 18 項目（以下，理解），性同一性障害患者に対する看護ケアの態度として，状況設定問題 6 項目（以下，態度）について尋ねた. 知識，理解，態度についての調査は，本研究において独自に設定した質問項目である.

(1) 参加者の基本属性

参加者の属性について，年齢，性自認および性的指向，セクシュアルマイノリティと関わった経験の有無，性教育を受けた経験の有無，メディアや SNS でセクシャルマイノリティに関する情報に暴露した経験の有無，セクシュアルマイノリティに対する否定的思考をもつ家族や友人などの存在，宗教，性同一性障害の患者を受け持った経験の有無と受け持った際の困難感の有無・その内容につ

いて回答を求めた.性同一性障害に対する知識や理解の程度は年代により差があると考えられる.また，和田（2008）は，女性よりも男性の方が同性愛について好ましく思っていないと述べており，セクシュアルマイノリティに対する知識や理解の程度には性差があると考えられる.性同一性障害を含むセクシュアルマイノリティ関して暴露した経験は，過去に性の多様性について意識する機会があった集団であると推測され，性同一性障害に関する知識や理解の程度に影響を及ぼしていることが考えられる.家族や友人など周囲にセクシュアルマイノリティに否定的な考えを持つ者が身近にいることや，宗教上認められていないことも知識や理解の程度に影響を及ぼしていることが考えられる.また，看護業務において，性同一性障害の患者を担当した経験の有無も，知識や理解に影響を与える可能性がある.

(2) 性同一性障害に関する知識

性同一性障害についての知識は，日向ら（2007）が作成したGIDについての知識の項目を一部参考にし，独自で作成した（表１）.質問21項目の各項目に対して，正・誤・わからないの3つの選択肢を設けた.「わからない」を回答に加えることにより，憶測での回答を減らし，正しい知識を有しているかをより正確に尋ねることができる.

(3) 性同一性障害に対する理解

性同一性障害に対する理解は，牧田（2006）が作成した統合失調症に対する社会的距離尺度（SDSJ），日向ら（2007）の「性別適合手術に対する考え方」「GID 者の戸籍の性別変更についての考え方」を参考に独自で作成した（表2）.合計18項目で「3点：よく当てはまる」「2点：少し当てはまる」「1点：あまり当てはまらない」「0 点：全く当てはまらない」の４件法で回答を得て合計点を算出する.

(4) 看護ケアの態度

看護ケアにおける態度については，LGBT法連合会（2019）が報告した医療における当事者の困難リストを参考に独自で作成した（表3）.医療現場で生じる患者-看護師のやりとりについて，6つの状況を設定し，その状況で，調査対象者がどのような看護ケアを行うか，実際に行うケアと理想だと感じるケアについて別々に回答を求めた.これは,勤務先医療機関の規則や方針に影響を受けるケアと，規則に影響を受けない理想的な看護ケアが異なる可能性を想定

表１ 性同一性障害に関する知識の質問項目の例

1.性自認と性的指向は同じである.
2. FTM（身体の性：女性，心の性：男性）はホルモン療法により声が低くなり，月経が止まる.
3.戸籍の性別欄を変更することができる.
4.性同一性障害の人はうつ病に陥りやすい.
5.性同一性障害と性分化疾患（インターセックス）は同義語である.

表２ 性同一性障害に関する理解の質問項目の例

1.私は私的に性同一性障害の人とは関わりたいと思わない.
2.私は性同一性障害の人を一人の人間の個性として見るべきであると考える.
3.私は職場で性同一性障害の患者のケア等をしたいと思わない.
4.私は性同一性障害の人と同じ職場で働きたいと思わない.
5.もし，看護の対象者が性同一性障害であるならば，私は配慮してあげたいと思う.

表３ 性同一性障害患者に対する看護ケアの態度の状況設定問題の例

状況設定	看護ケアの選択肢
Aさん，18歳.性同一性障害FTM（身体の性：女性，心の性：男性）が骨折をして大部屋に入院予定.Aさんの意向は男性の大部屋希望.部屋の配置をする看護師の立場であなたならばどのように対応しますか.	a.女性の大部屋に入ってもらう. b.男性の大部屋に入ってもらう. c.男性の大部屋には規則として入室できないことを A さんに伝え，個室料金を払い,個室に入ってもらうようにする.

したためである.

2.　アンケートの配布・収集方法

(1) プレテスト

医療機関に勤務している看護師および看護学生計120 人を対象にプレテストを行った.独自作成したオンラインアンケートについて，再テスト法を用いて信頼性を検証した.対象者には,研究の概要と研究目的や同意方法について記載した説明文書を配布し,調査に同意できる場合に回答の送信ボタンを押してもらい，送信完了をもって調査に同意したとみなすことを説明した.再テストは2週間後に実施し,対象者が個別に入力した識別記号によって1回目と2回目の回答データをペアリングした.

(2) 本調査

本研究により再構成した調査票を用いて，今後本調査を実施する.国内の協力可能と回答のあった病院の看護師を調査対象として，郵送により調査票を配布する.回答はオンライン調査に直接回答する方法で実施する.

3.　倫理的配慮

プレテスト，本調査ともにオンライン調査の最初のページに，研究説明文，研究協力の依頼文，協力可能な場合にアクセスし，回答の送信をもって同意したものとみなすことを明記する.回答を収集したデータは施錠できるロッカーなどの保管庫にて厳重に保管し，本研究以外に使用することや，研究者以外のものがデータを利用することはなく，情報の保護に最大限の配慮をする.調査は無記名で匿名性を遵守する.本研究開始前に,岡山県立大学倫理審査委員会の承認を得て実施している（2018 年 11 月 22 日承認，受付番号 18-60）.

4.　分析方法

質問項目について検討するために実施するプレテストの1回目調査のデータを用いて主成分分析を行なった.再テスト法による信頼性の検証では，kappa 係数を算出した.

調査項目の検証後に実施する本調査では，独立変数を性同一性障害の知識および理解とし，従属変数を看護ケアへの態度として，重回帰分析，多変量ロジスティック回帰分析を用いて関連性を検証する.

III. 研究結果

プレテストは，120 名を対象に配布し，80 名から回答を得た（66.6%）.再テスト法における1回目調査と2回目調査の回答に欠損のない有効回答者は43名であった.

プレテスト1回目データを用いて，知識，理解の質問項目について，主成分分析を用い質問項目の調整を行なった.まず，知識に関する質問 21 項目のうち，先行研究をもとに再検討した結果，知識の内容として含めることが適切でないと判断した1項目を削除した（市原ら，2016；日本精神神経学会・性同一性障害に関する特別委員会，2012）.残りの 20 項目を用いて主成分分析を行った.成分数を一つに設定し，負荷量が 0.40 未満の項目を削除した結果，知識の質問は最終的に 10 項目で構成された（Cronbach’s α=0.699）.理解に関する質問 18 項目について，知識と同様に一つの成分数を設定して主成分分析を行なった結果,負荷量 0.40 未満の項目を除いた項目数は15項目であった.この15項目を理解について尋ねる質問の構成要素とした(Cronbach’s α=0.827）.

再テスト法による質問紙の妥当性は，主成分分析において抽出された知識 10 項目，理解 15 項目において kappa 係数を算出する方法で検証した.いずれの項目も kappa 係数 0.4〜0.6 の範囲で有意であり，1 回目の回答データと 2 回目の回答データには中程度の一致があると判断され,概ね信頼性が示された.

看護ケアの態度を尋ねる状況設定問題は，各設問の内容および教示文について再検討を行い，4 問を本調査に使用可能であると判断した.

IV. 結論

本研究において，性同一性障害に対する知識および理解を測定するための質問項目を検証した.知識について10項目,理解について15項目が抽出され,概ね信頼性も示された.看護ケアの態度についても,

今回作成した状況設定問題を用いて調査することが可能である.

V. 今後の計画, 方針

今回作成した調査票を用いて, 全国の医療機関に勤務する看護師約 1000 名を対象に調査を実施し,看護師の性同一性障害に対する知識や理解が看護ケアにどのように影響しているか検証する.

VI. 参考文献

1) The American Psychiatric Association 編, 高橋三郎 訳. DSM-Ⅲ-R 精神障害の診断・統計マニュアル. 米国精神医学会. 1988.医学書院. 東京
2) 厚生労働省. 疾病, 傷害及び死因の統計分類とは. https://www.mhlw.go.jp/toukei/sippei/index.html（最終アクセス 2019 年 4 月 10 日）
3) 電通ダイバーシティラボ：LGBT 調査 2015, http://www.dentsu.co.jp/news/release/2015/0423-004032.html
4) 電通ダイバーシティラボ:LGBT 調査 2018, http://www.dentsu.co.jp/news/release/2019/0110-009728.html
5) 平松英寿:すべての診療科においてトランスジェンダーの方々が安心して受診できるような医療環境づくり, GID 学会第 21 回研究大会・総会収録集,39,2019.
6) 中塚幹也:封じ込められた子ども, その心を聴くー性同一性障害の生徒に向き合うー,ふくろう出版,2017
7) 日本精神神経学会・性同一性障害に関する特別委員会:性同一性障害に関する答弁と提言,1997 http://www.geocities.co.jp/CollegeLife-Labo/7835/gid/tousin_2.pdf
8) LGBT 法連合会:性的指向および性自認を理由とするわたしたちが社会で直面する困難リスト（第 3 版）, 2019. http://lgbtetc.jp/
9) Hafeez H, Zeshan M, Tahir M, Jahan N, Naveed S: Health Care Disparities Among Lesbian, Gay, bisexual, and Transgender Youth: A Literature Review. Cureus9 (4) ,2017.
10) Sedlak CA, Roller CG, Dulmen M, Alharbi HA, Sanata JD, Leifson MA, Veney AJ, Alhawatmeh H, Doheny MO: Transgender Individuals and Osteoporosis Prevention. Orthop Nurs36 (4) 259-268,2017.
11) 富岡美佳,中塚幹也:性同一性障害当事者と支援者の医療システムに対する要望,母性衛生 51 巻 3 号 246,2010.
12) 岩田歩子,野崎章子,舘祥平:セクシュアルマイノリティの生きづらさと性教育に対するニーズ調査, 日本性科学会雑誌 35 巻 1 号 37-44, 2017.
13) Anderson AE, Moberg C, Bengtsson Tops A, Garmy P:Lesbian, gay and bisexual parent’experiences of nurses’attitudes in child healthcare,J Clin Nurs26(23-24),2017.
14) 和田実:同性愛に対する態度の性差-同性愛についての知識, 同性愛者との接触, およびジェンダータイプとの関連-,日本思春期学雑誌 26 巻 3 号,2008.
15) 日向桂子,高田谷久美子,近藤洋子:看護学生と他領域の学生の性同一性障害に対する態度や知識と性差観に関する研究,山梨看護雑誌6巻1号,2007.
16) 牧田潔：統合失調症に対する社会的距離尺度（SDSJ）の作成と信頼性の検討,日本社会精神医学会雑誌 14 巻 3 号,2006
17) 市原浩司,舛森直哉:性同一性障害の現状と治療-身体的治療：ホルモン療法-,医学のあゆみ,256 巻 4 号,2016.
18) 日本精神神経学会・性同一性障害に関する特別委員会:性同一性障害に関する診断と治療のガイドライン（第 4 版）,精神神経学雑誌 114 巻 11 号,2012

筋電・筋音ウェアラブルモニタを応用した骨格筋機能の可視化システムの開発

1．岡山県立大学，2．中村学園大学

綾部誠也[1]，花巻大成[1]，大山剛史[1]，熊原秀晃[2]

本研究は，筋電・筋音ウェアラブルモニタを応用した骨格筋機能の可視化システムを開発するための基礎的研究として，大腿四頭筋を被検筋として，温熱冷却刺激条件下での筋電図・筋音図と筋疲労との関連性を検討した．右脚の大腿直筋について温熱，冷却を行った前後にて下肢筋力，筋硬度，筋電,・筋音を測定した．下肢筋力，筋硬度，筋電図積分値，筋音図/筋電図，%iEMG は，温熱と冷却の条件と処置前後での交互作用が認められた．下肢筋力，筋音図/筋電図は，温熱時に上昇し，冷却時に減少した．筋硬度，筋電図積分値，%iEMG は，温熱時では減少し，冷却時は上昇した．しかし，筋音図積分値，%iMMG は，温熱と冷却の交互作用が認められなかった．また，温熱冷却前後の変化量は下肢筋力，筋硬度，筋電図積分値，筋音図/筋電図，%iEMG は，温熱に比して有意な差が認められたが，筋音図積分値，%iMMG では認められなかった．本研究の結果は，局所の温熱冷却刺激に伴う骨格筋のコンディションの変化をウェアラブル筋電・筋音センサを用いて可視化することが可能であるということを示唆する．

１．緒言

ヒトが日常生活を過ごすためには筋肉の働きが必要不可欠である．筋肉の種類は通常 3 つに分けられている．骨格筋，心筋および内臓筋である．心筋や内臓筋は袋状または管状の内臓の壁を作っている筋で,心筋はすなわち心臓の壁を構成している筋である．また，胃腸や膀胱，子宮などの壁を作っているのが内蔵筋である．これらに対して骨格筋とは，手，足，胸，腹などの皮膚のすぐ下にあって，骨と骨との間に張られている．その中で，ヒトが身体活動を行うためには骨格筋の収縮が必要不可欠である．骨格筋の特徴としては，意志によって収縮させることが出来ることである．心筋と内臓筋は脳幹や脊髄側柱にある自律神経細胞からの繊維を受けているが，これらの神経細胞は運動野からの線維を受けていない．したがってこれらの筋を自分の意志で動かすことはできない．それに対して骨格筋は，脊髄前柱にある運動神経細胞から 1 本の突起が長く伸びていわゆる運動神経線維となり，その末梢が骨格筋線維にまで到達しているので,運動神経を伝わってくる命令(興奮)は筋繊維に伝えられ,筋線維は収縮するのである．運動神経細胞は大脳皮質のうち随意運動に関係ある運動野から下る神経線維と接続しているので,結局,骨格筋は意志によって収縮させることが出来る．この筋の興奮収縮連関の効率(筋収縮機能)を示す尺度として,筋電図の比(力/筋電図)を用いる方法がある．これは単位当たりの神経系入力が加わった際に発揮しうる収縮能力を見たものである．筋収縮機能が低下する疲労筋や委縮筋ではこの値が著しく減少することが明らかになっている．しかし，この方法には欠点が存在する．それは，関節を介して測定される力信号は主動筋のみならず協働筋や拮抗筋の影響を受けやすく，対象とする筋だけの力を取り出すことが難しいとされている．また，筋音図と筋電図の比(筋音図/筋電図)を用いる方法である.筋音図を用いることによって協働筋や拮抗筋の影響を受けることなく特定の筋の機械的活動を測定可能となる．筋電図と筋音図を 2 つ用いて実験を行った先行研究がある.そこでは,筋電図と筋音を手掛かりとした筋収縮能力の評価指標を提案し，これを中等度痙直型脳性麻痺患者の筋機能の分析に適用していた.

近年，ウェアラブル筋音・筋電同時計測ハイブリッドセンサが岡山大学により開発された．このセンサの誕生により従来では測定困難であった筋音図の計

測や筋音図と筋電図の比を用いることによって筋収縮能力を誰でも簡単に計測することが可能となった.ウェアラブル筋音・筋電同時計測ハイブリッドセンサを用いた先行研究がいくつかある.まず1つ目は、4名の被験者に対し，ペダル負荷の調節可能なリカンベントバイクを用いて，内側広筋の筋電図と筋音図の計測行っていた．また，筋パフォーマンスを表す指標として動的MMG/EMGを算出した．この研究の目的は，開発したセンサを用いて動的運動中に筋音図と筋電図を同時計測し，運動中の筋パフォーマンスを評価することを目的としていた．その結果，ペダルの負荷の増加に伴い，動的MMG/EMGはすべての被験者で減少傾向が見られた．この結果は，運動に対する抵抗が小さいほど高い筋パフォーマンスを発揮できることを示している．これにより，動的MMG/EMGは、動的運動中の筋パフォーマンスを反映された．次いで，20代男性2名において，右足に，センサを4個貼りつけ，両手は胸の前で組んだままで,スクワット動作(膝関節屈曲が浅い(部分的)場合と深い場合)を行っていた．センサは，大腿直筋，外側広筋,ハムストリングス,腓腹筋に貼付していた．スクワット動作の実験姿勢は，部分的スクワットでは膝関節屈曲角度が約75度，深いスクワットで約100度である．結果は，膝関節が屈曲を始めると大腿直筋EMGが増加し始め，最大屈曲でEMGも最大値となるが，大腿直筋の変位MMGはやや遅れて増加し始め，膝関節の伸展が始まるとEMGとともにMMGは減少し,立位姿勢に戻る直前にもう一度MMGは増加,減少する．これに呼応してEMGもわずかに増加，減少する.この傾向は深いスクワットでも同様である.しかし，膝屈曲角度が大きくなる深いスクワットでは,EMGの振幅が約2倍になり，それに呼応してMMGの振幅も二倍弱になっている．この結果より，従来では測定できなかった運動下でのMMGの測定がフォトリフレクタを用いたセンサを使用することによって計測でき，しかも同時計測されたEMGとの関係を考察することが可能になった.

本研究は，このウェアラブル筋電・筋音センサを用いて，筋コンディションの評価を試みた．筋のコンディションは，スポーツ分野や日常生活での活動制限などの幅広展開が期待される．本研究は，骨格筋の状態を外部刺激によって変化させ，その時の骨格筋コンディションの可視化が可能かどうかということを目的として実験を行った．温熱・冷却刺激により筋電図積分値は，温熱時では減少，冷却時では増加する.筋音図積分値と筋音図/筋電図は温熱時では増加し，冷却時では減少する．また，若者と比べて骨格筋のコンディションが悪い高齢者と冷却後の結果を比較すると有意な差が認められないと考え，結果，筋コンディションの見える化は可能であるという仮説を立てた.

2 方法

本研究の対象者は,研究参加に同意した健常若年男性であった.対象者は,実験前夜からの激しい運動,前日からのアルコール摂取，実験3時間前からの食べ物の摂取を制限された．研究実施に際して，全ての対象者に研究の目的や方法を説明し，研究参加の同意を書面にて取得した.

対象者は,右足の大腿直筋について20分間の冷却,温熱を行った前後にて筋電図・筋音図，下肢筋力,筋硬度の測定を行った.

冷却はアイスパック(日本シグマックス社製)で行った．温熱はホットパック(日本シグマックス社製)をタオルで覆って行った．冷却，温熱ともに座位姿勢をとらせバンテージで固定して行った．2 条件での実験の間には，3日以上の間隔を取った.2条件の施行順序は無作為に決定した．実験環境については室内で行い,室温を23.0±1.0℃に設定した.また,実験中の皮膚温の経時変化を確認するために皮膚温は DYNASCOPE(フクダ電子社製)のプローブを大腿直筋に貼付し，実験開始時，測定開始時，刺激開始 1分後，刺激開始2分後，刺激開始3分後，刺激開始4分後，刺激開始5分後，刺激開始6分後，刺激開始7分後，刺激開始8分後，刺激開始9分後，刺激開始10分後，刺激開始11分後，刺激開始12分後，刺激開始 13 分後，刺激開始 14 分後，刺激開始 15分後，刺激開始16分後，刺激開始17分後，刺激開始18分後，刺激開始19分後，刺激開始20分後，測定開始時，実験終了時の計25回を記録した.

筋電図と筋音図の装着部位は,右大腿直筋の筋腹とした．測定前にあらかじめ筋腹にマーキングした．筋電図・筋音図測定は，ウェアラブル筋電・筋音ハイブリッドセンサ(HOS-110)を用いて実施した.測定方法としては，10 秒間計測を行った．力発揮時の最大値を筋電図・筋音図の結果とした．高齢者の場合は，測定方法は同様で，最大筋力時のみを測定した．

被験筋は右大腿直筋の筋腹とした．測定前にあらかじめ筋腹にマーキングした．筋硬度測定は，筋硬度計(NEUTONE TDM-N1，TRY-ALL)を用いて測定した．マーキングの部位に対して 5 回測定を行い，最大値と最小値を除いた 3 回の測定値の平均値を筋硬度の評価値とした．

3．結果

温熱時の実験開始時の皮膚温は，30.8±1.0(29.8℃から 31.8℃)で温熱時の実験終了時の皮膚温は、35.5±0.7(34.8℃から 36.2℃)であった．冷却時の実験開始時の皮膚温は、30.5±1.0(29.5℃から 31.5℃)で冷却時の実験終了時の皮膚温は，22.0±2.1(19.9℃から 24.1℃)であった（図１）．条件間での皮膚温には有意な差が認められた．

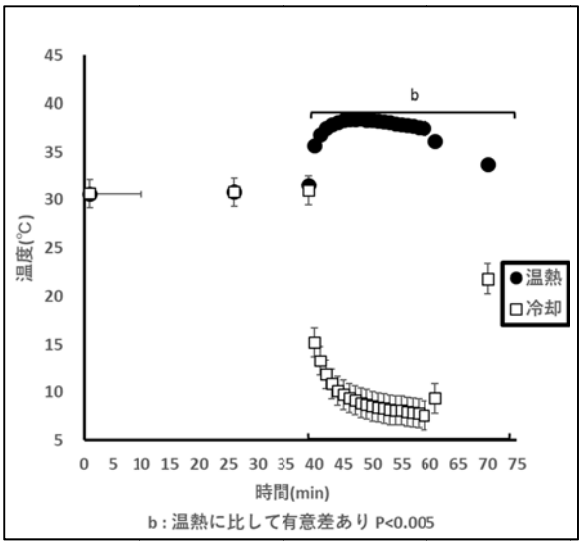


図１．冷却・温熱条件下での大腿部皮膚温の変化

下肢筋力は，二元配置分散分析により，実験条件(温熱と冷却)と時間(前後)で交互作用が認められた(図 2)．冷却時の変化量は温熱時に比して有意な差が認められた．温熱後の値は温熱前と比して有意に高かった．冷却後の値は冷却前と比して有意に高かった．

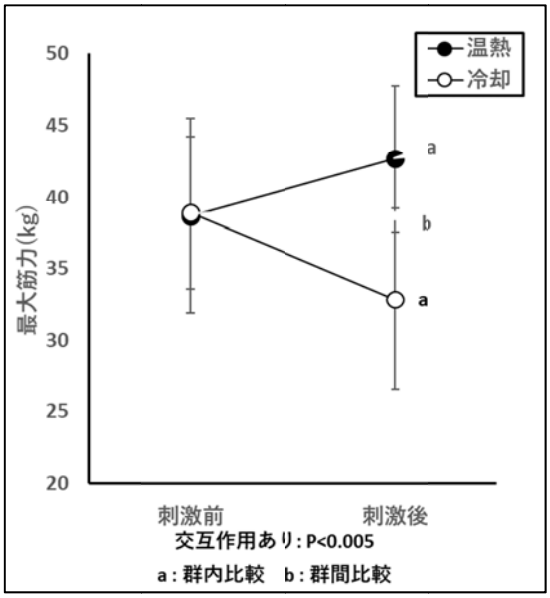


図２．冷却・温熱条件下での膝関節進展最大筋力の変化

筋硬度は，実験条件(温熱と冷却)と時間(前後)で交互作用が認められた（図 3)．冷却時の変化量は温熱時に比して有意な差が認められた．温熱後の値は温熱前と比して有意に高かった．冷却後の値は冷却前と比して有意に高かった．

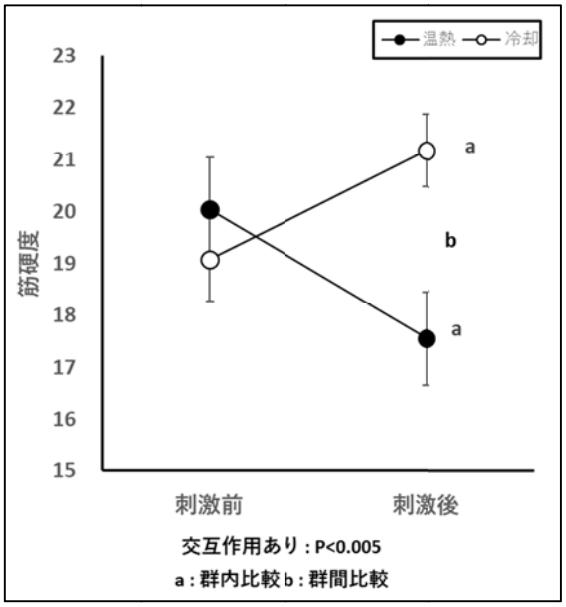


図３．冷却・温熱条件下での筋硬度の変化

筋電図積分値は，二元配置分散分析により，実験条件(温熱と冷却)と時間(前後)で交互作用が認められた(図 4)．冷却時の変化量は温熱時に比して有意な差が認められた．温熱後の値は温熱前と比して有意に高かった．

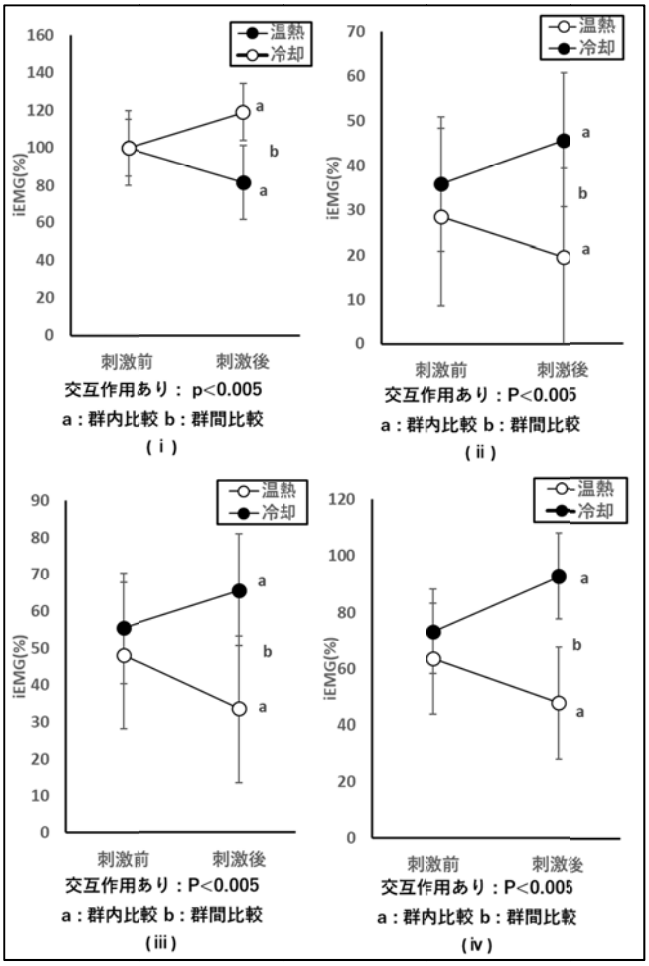


図４．冷却・温熱条件下での膝関節進展等尺性力発揮時の積分筋電図の変化

筋音図積分値は，二元配置分散分析により，実験条件(温熱と冷却)と時間(前後)で交互作用が認められなかった(図５)．

最大筋力時の筋音図/筋電図は，二元配置分散分析により，実験条件(温熱と冷却)と時間(前後)で交互作用が認められた（図６)．

4．考察

本研究は，骨格筋の状態を外部刺激によって変化させ，その時の骨格筋コンディション可視化の可能性を検討した．その結果，先行研究の知見通りに，温熱条件と冷却条件により，それぞれ，筋コンディションの改善と悪化が確認された．それに伴い，筋電図と筋音図から得られる指標は，条件間での交互作用を認めた．これらの結果は，本研究の仮説を支持するものであり，筋電・筋音ハイブリットウェアラブルセンサによる筋コンディション可視化の可能性を示すものである．

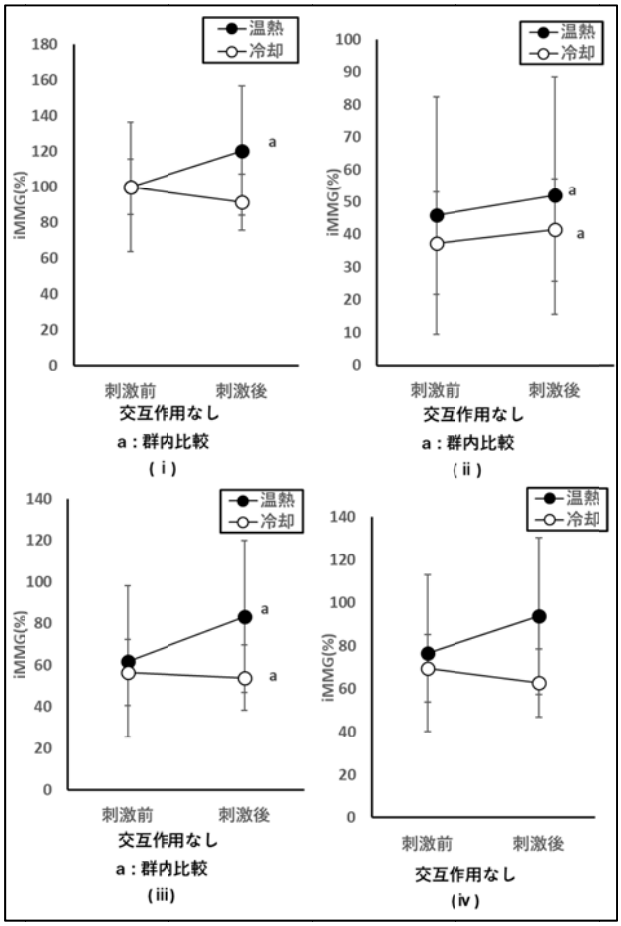


図５．冷却・温熱条件下での膝関節進展等尺性力発揮時の積分筋音図の変化

本研究のオリジナルの知見は，骨格筋への温熱冷却刺激を加えた時のコンディションの変化をウェアラブル筋電・筋音センサで見える化を可能であることを明らかにしたことである．本研究の結果は．温熱冷却刺激が骨格筋のコンディションを変化させその変化をウェアラブル筋電・筋音センサを用いて見える化が可能であるということを示した．まず，筋音図/筋電図と下肢筋力は，温熱による影響で，末梢神

経伝達速度の上昇や筋繊維電動速度上昇により温熱時上昇したと考えられ，冷却時の影響では，末梢血流速度の減少，神経伝達速度の減少によって減少したと考えられる．これらのことから，下肢筋力と筋音図/筋電図は，温熱時では上昇し，冷却時では減少したと推測した．また，筋硬度が温熱では減少し，冷却時では上昇した．これらの結果は，筋温の上昇が骨格筋の柔軟性を高め，逆に，筋温の減少が骨格筋の柔軟性を低下させたことを表している．下肢筋力の測定と筋音図/筋電図の算出は,様々な先行研究より筋収縮の評価指標とされている．さらに，筋硬度が温熱時では減少，冷却時では増加したことからウェアラブル筋電・筋音センサでの骨格筋のコンディションの変化を見える化は可能であったという結論に至った.

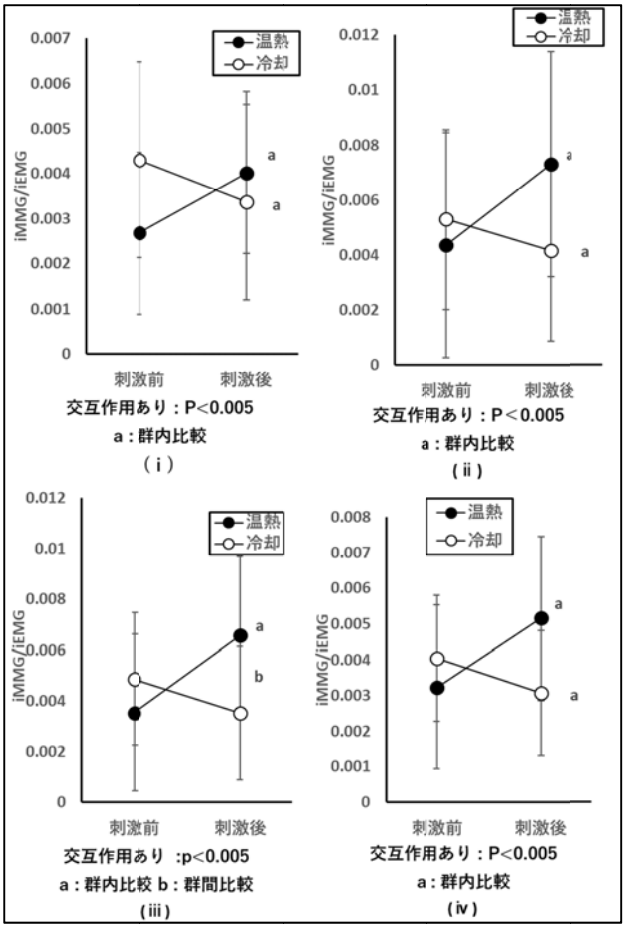


図６．冷却・温熱条件下での膝関節進展等尺性力発揮時の筋コンディション指標（筋電図/積分筋音図）の変化

本研究は，大腿直筋への温熱・冷却刺激による骨格筋のコンディションの変化をウェアラブル筋電・筋音センサを用いて筋電・筋音を同時に測定した．しかし，全てが仮説と同じにはならなかった．これまでの研究では，筋電のみもしくは筋音のみで評価したり，筋電と筋音を個々に測定し評価したり，筋電と発揮張力で骨格筋の収縮を評価したりというものは様々あったが，温熱・冷却刺激を行い，筋電と筋音を同時に測定し評価したことが本研究のオリジナリティーである．これまで，筋電や筋音などを用いて筋収縮力や骨格筋のコンディションを評価してきた研究がある．深部温と発揮筋力については，加温すると発揮筋力は末梢神経伝達速度の上昇，筋繊維電動速度上昇に伴う筋張力の増加が期待できると述べ，渡辺らは，冷却前と数パターンの冷却後の筋力を比較したところ冷却前が最も高値を示したことが報告されたいる．また，健常若年者と高齢者の比較した研究においては，健常若年者と比べて高齢者の筋音図/筋電図が低く,健常若年者より高齢者の方が筋収縮力は低下していることが明らかにされている．さらに，温熱冷却刺激前後の筋電図積分値における筋活動の変化についての研究成果によれば，冷却刺激を行ったときに増加し，温熱刺激を行ったときに減少し，冷却刺激では，錘外筋線維の粘弾性が低下し，筋に同一負荷でありながら効率の悪い活動が起こり，相対的に iEMG が上昇する結果になり，逆に，温熱刺激では，錘外筋線維の粘弾性が高くなり，最少の筋放電量にて同一負荷に抗する張力を生み出した結果，iEMG が減少する可能性が報告されている．皮膚表面温度と筋音図の関係については，骨格筋を加温することで，筋収縮がピークに達する時間が短くなり，冷却することで長くなることから，皮膚表面温度の変化による筋組織の粘性の変化や収縮速度の変化が筋音図に影響を与え，その結果，皮膚表面温度の変化により皮膚表面温度の上昇により筋音図の RMS は有意に増加し，皮膚表面温度の低下により筋音図の RMS は有意に減少する可能性が報告されている．これらの先行研究の知見は，本研究の結果を支持するものであり，本研究における加熱・冷却に伴う筋電信号の変化やその背景となる皮膚温や筋硬

度の変化を含めて，これまでの知見に基づいた合理性を有していた．筋音信号の一部に先行研究との違いが得られたことについては，その背景には言及できない．ただし，本研究において，加温・冷却の効果を皮膚温として確認し，また，筋硬度と発揮筋力も変化していたことから，生理的なメカニズムの不一致よりも，筋音信号の計測システムの違いも影響していると考えた．

本研究の結果は，ウェアラブル筋電・筋音センサが骨格筋のコンディションの見える化が可能であるということを示唆する．骨格筋のコンディションを簡便に評価することができれば，過度のウォームアップによる怪我リスクの軽減や疲労によるパフォーマンス能力が低下の予測，また，加齢現象としての骨格筋のコンディションの変化などの観察に有効な技術である．

本技術にはいくつかの課題がある．先ず，本研究の結果を含めて，計測値の個人間の変動については検討されていないことである．すなわち，本研究では，温熱・冷却前後での計測値について，その個人内での変化を検証したに過ぎず，個人間の計測結果の比較には至っていない．筋電図・筋音図については，個人間での比較に祭して正規化することが通常であり，本研究で利用した筋電・筋音ウェアラブルシステムについてもその必要性を排除できていない．次いで，本システムの再現性についてである．図４から図６に示す通りに，本研究の加温・冷却前の数値は，一定の差が認められた．このような筋電図信号の日差変動については，生理学分野では広く知られており，最大筋力発揮時などの対照条件での筋電図信号にて正規化することが原則である．ただし，本システムの一般化を考えれば，最大力発揮時などの計測を避けたい．簡便な筋コンディション評価の判定精度の確保を鑑みれば，最も困難な課題の一つであろうか．合わせて，上記のような測定条件の違いを考慮すれば，動的運動時の評価についても検討が必要であろう．その他、異なる被検筋や筋量，筋厚などが影響する可能性を否定できない．このように，本研究で示された筋電・筋音による筋コンディションの可視化については，その実用化に際しては多くの課題がある．本システムは，疲労や障害リスクに関係する指標になり得ることを踏まえて，慎重なエビデンスの積み上げにより，精度高い同定に基づく安全で信頼性の高いシステムを構築する必要がある．

５．謝辞

本研究の一部は，公益財団法人ウエスコ学術振興財団研究助成費の支援を受けて実施された．

接触により親近感を増大させる瞳孔反応ロボットの開発

岡山県立大学　情報工学部

瀬島　吉裕

人工知能の急速な発展により，高性能な音声認識機能が搭載されたインタフェースが数多く開発されている．今後，深化した人工知能により，言語レベルでは単純な会話を楽しむことができるコミュニケーションロボットが開発されると予想される．しかしながら，豊かな感情表現や親しみやすさといったコミュニケーションにおける本質ともいえる「かかわり」については，人工知能の発展・飛躍に比べ不十分である．今後，人間と同等のコミュニケーションがロボットに要求される以上，かかわりを支援する技術革新が強く求められる．

本研究の目的は，人とロボットとのコミュニケーションにおけるかかわりを促すことを目指して，コミュニケーション時の無意識的な感情や情動が反映される瞳孔反応に着目し，情動伝達メディアとして瞳孔反応を表現することでかかわりを強めるコミュニケーションロボットを開発することである．とくに，親しみやすさと密接に関係する「接触」を対象として，人とコミュニケーションロボットとの親近感を増大させるロボットのプロトタイプを設計し，その可能性を示している．

1．はじめに

近年の情報通信インフラの高性能化に伴い，Pepper[1]等の日常生活を豊かにする様々なコミュニケーションロボットが開発されている．その中でも，家庭向けに小型化を指向したコミュニケーションロボットの研究が精力的に行われており，人物識別機能[2]や音声認識機能[3]，感情認識機能[4]等，人と豊かなコミュニケーションを行うための機能について様々な研究が盛んに行われている．さらに，このようなコミュニケーションロボットには，会話機能だけでなく，ロボットに内蔵されたタッチセンサ情報に基づいて情動表現を行う等，人との触れ合いを通じて場を和ませ，かかわりを高める機能が求められる[5]．このかかわりが安心感や癒し等の心地よさや共感を生み出し，親密なコミュニケーションを形成している[6]．そのため，触れ合いを伴うコミュニケーションにおいて親和性を強める情動表現を開発することで，人の懐に入るようなコミュニケーションロボットの開発に繋がると期待される．

研究者はこれまでに，人の情動表出に強く関係する瞳孔反応[7]に着目し，コミュニケーションにおける瞳孔反応を表現する瞳孔反応インタフェースを開発してきた[8]．このインタフェースは，半球ディスプレイを用いて眼球を模擬しており，入力された発話音声に同調して，瞳孔が拡大・縮小反応等の情動表現を行うことができる．このインタフェースを用いてコミュニケーション実験を行った結果，対話相手の親近感や共感しやすさが向上する等，情動伝達効果を高めることを明らかにしてきた．

このように，コミュニケーションにおける情動伝達のメディアとして瞳孔反応を用いることで，対話相手へ親近感等の情動伝達効果が向上することが示されている．そのため，接触を伴う親和性強調表現を瞳孔反応により行うことで，情動伝達効果と親和性向上効果との相乗効果によりかかわりの促進が期待される．

そこで本研究では，瞳孔反応を用いた身体接触時のインタラクション表現を開発するために，人間同士の接触時における瞳孔反応を解析している．さらに，解析結果に基づいて，親和性を高める共感表現を付加した瞳孔反応ロボットを開発している．

2．接触を伴う瞳孔反応の解析

2.1 実験方法

実験システムの概略を図１に示す．実験システムは，ワークステーション PC，ビデオカメラ，瞳孔計

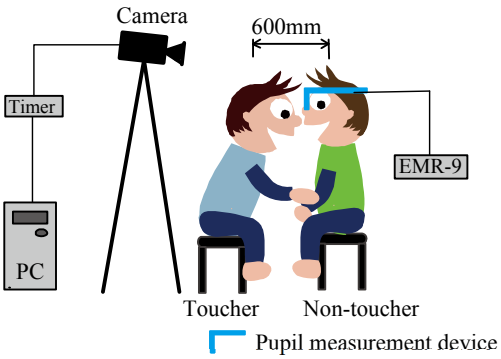
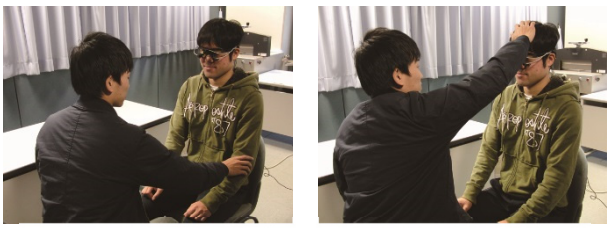


Fig.1 Setup of the experimental system.

測装置（nac EMR-9）から構成される．実験協力者間の距離は，親しい友人関係におけるパーソナルスペース[9]を考慮して 600㎜ とした．瞳孔は，瞳孔計測装置により 60Hz でサンプリングした．取得したデータはリアルタイムに記憶媒体に記録している．

コミュニケーションにおける接触は，その目的によって行為の速度や強度が異なる．本研究では，触れ合い等の接触における親近感を高める効果を目指しているため，看護場面で用いられている「撫でる」行為[10]を採用した．先行研究において快情動が喚起されやすい行為（撫で方）について調査を行っており，約 50 ㎜/秒の速度で触れた場合は副交感神経優位に伴うリラックス効果が高まり，約 200 ㎜/秒で触れた場合は交感神経優位に伴う覚醒度上昇があると報告している[11]．このことから，本研究では被接触者に対して約 50 ㎜/秒の速度（約 2 秒で 1 往復の運動）でゆっくり撫でる行為とした．また，接触部位は，先行研究において「手」「前腕」「上腕」「頭」が同性友人間で接触の多い部位であると報告されている[12]．そこで，男女 10 人に対して予備実験を行った結果，「前腕」と「頭」では，撫でられることで快情動が喚起されやすい傾向であったが，「手」と「上腕」では，快情動の喚起は困難であることを確認した．このことより，本研究では快情動が喚起されやすい「前腕」と「頭」の接触時における瞳孔反応の計測を行った．

実験は，以下の手順で行った．まず被接触者に瞳孔計測装置を装着させ，瞳孔径のキャリブレーションを 30 秒間行った．その後，接触者が被接触者に対して接触対象部位を 30 秒間撫でる行為を行った．本実験では，接触対象部位を(A) 前腕部，(B) 額付近の頭部として，ゆっくり撫でるよう指示した（図 2）．実験協力者は，19 歳～24 歳までの男女学生 24 人（男性 12 人，女性 12 人）であった．


(A) Forearm　　(B) Forehead
Fig.2 Experimental scene of physical contact.

2.2 接触時における瞳孔反応の解析

接触時における瞳孔反応を解析した．解析対象は，キャリブレーションの不具合によりデータ欠損が多い 5 人を除く 19 人とした．実験開始から終了までの 30 秒間における瞳孔径の時系列変化の一例を図 3 に示す．平常時となるキャリブレーションの瞳孔径と比較して，接触時では瞳孔が顕著に拡大している様子が観察された．また，接触部位に拘らず，散瞳に伴う変動は小さいことがわかる．そこで，キャリブレーション時の瞳孔を基準として，身体接触に伴う瞳孔の変化比率を評価した．ここで，コミュニケーションにおける瞳孔反応は大きさとして知覚されると予想されることから，瞳孔を正円と仮定して，瞳孔面積で評価した．具体的には，瞳孔径の平均値を 1/60 秒で算出し，その径に対する正円面積として算出した．

図 4(a)に瞳孔面積の変化比率の平均と標準偏差を示す．両接触条件において，瞳孔面積が約 1.5 倍に拡大することが示された．統計処理を行った結果，接触部位間において有意差は認められなかった．また，先行研究において，男性と比較して女性はスキンシップ許容度が高いことが報告されている[12]．

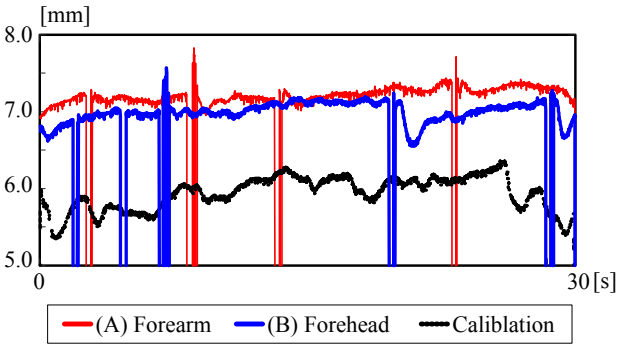


Fig.3 Pupil diameter variations with time.

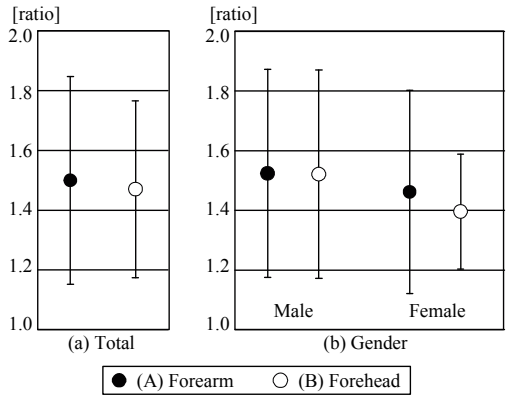


Fig.4 Result of ratio in the pupillary area.

そこで本研究においても性別による瞳孔反応を解析した．その結果を図 4(b)に示す．性別に拘らず，両条件において瞳孔面積が顕著に拡大することが示された．また，統計処理を行った結果，性別間および接触部位間において有意差は認められなかった．以上の結果は，接触部位や性別に拘らず，接触により瞳孔が顕著に拡大することを示している．

3．瞳孔反応ロボットの開発

3.1 コンセプト

前章の解析結果を基に，接触に伴う親近感を増大させる瞳孔反応ロボットを開発する．本ロボットのコンセプトを図 5 に示す．コミュニケーションロボットが親和性の高い情動表現を行うには，身体動作や視線方向を提示するだけでなく，情動に密接に関連する瞳孔反応による強調表現が有効である．提案する瞳孔反応ロボットは，これまでに開発してきた瞳孔反応インタフェース[8]を応用し，聞き手として対話者の発話音声に同調して瞳孔を拡大する．とくに，接触に伴う共感表現を行うことで，対話者は親近感を実感しつつ，かかわりを深めることができる．

3.2 瞳孔反応ロボットの開発

開発した瞳孔反応ロボットの概要を図 6(a)に示

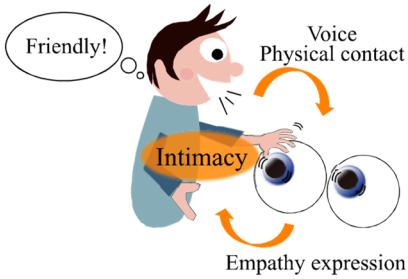
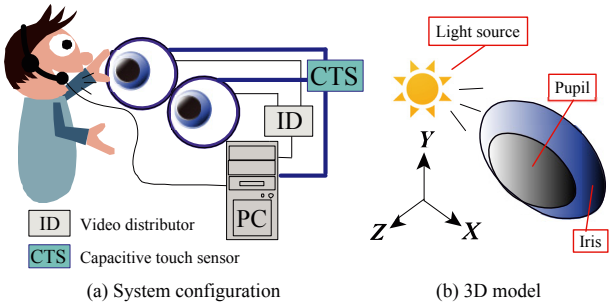


Fig.5 Concept of the developed robot.



(a) System configuration (b) 3D model

Fig.6 Setup of the developed robot.

す．本ロボットは，Windows7 を搭載したワークステーション PC，半球ディスプレイ (Gakken WORLDEYE)，映像分配器(SANWA SUPPLY VGA-HDSP2K)，ヘッドセット (BUFFALO BSHSH12BK)，静電容量型タッチセンサ (BitTradeOne ADFCS01) から構成される．本ロボットでは，瞳孔と虹彩の 3D モデル（図 6(b)）を半球ディスプレイに投影し，音声入力に同期して 3D モデルの瞳孔部を Z 軸方向へ前後移動させることで瞳孔反応を表現する．瞳孔反応は，通常時と比較して瞳孔面積が 1.5 倍に拡大する動作としている[8]．3D モデルの描画には Microsoft DirectX 9.0 SDK (June 2010) を用い，描画フレームレートは 30fps である．音声は，16bit 11kHz でサンプリングしている．静電容量型タッチセンサは，電導性のあるものに接続すると，領域内の静電容量の増減を取得できる．そこで本研究では，タッチセンサを鉛線に接続し，帯電性を持つ半球ディスプレイの周囲に巻くことで，ディスプレイ表面上のあらゆる方向から触れた場合においても，データの取得と自然な触覚入力を可能とした．さらに，前章の解析結果に基づいて，接触に伴う共感表現として，瞳孔反応を生成する．具体的には，タッチセンサからの触覚入力に基づいて，瞳孔面積が 1.5 倍に拡大する動作としている．ここで，先行研究の知見より，音声入力から生成される反応も瞳孔面積が 1.5 倍まで拡大する動作となっており[8]，対話者は接触に伴う共感表現として知覚しにくい．そこで本研究では，親和性を強調する共感表現としてハイライト表現を提案する．この手法は，眼球からの反射光を誇張することで，眼球表面上の水分の増減を表現[13]し，情動的共感を高める．そこで，図 6(b)に示すように，3D モデルを構成している仮想空間上に誇張用光源を新たに配置



Fig.7 Example of communication scene.

し,光度を変化させることでハイライトを表現する.さらに，自然なハイライトを生成するため，最大光量の調節機能と，また最大光量までに段階的な光量の調節機能を設け,予備実験よりそれらを設定した.このハイライト表現により，対話者は接触に伴う共感表現が音声入力とは異なる表現として容易に知覚できる.

開発した瞳孔反応ロボットの使用感を数人の協力者に求めた（図 7）.その結果,「ロボットに触りたくなる」,「ロボットの生命感を強く感じる」,「ロボットが嬉しそう」等のコメントが得られ，開発したロボットがかかわりを強める可能性があることを確認した.

4．おわりに

本研究では，親密なコミュニケーションの形成に重要な役割を果たしている接触に着目し，人間同士の接触時における瞳孔反応を解析した．その結果,接触部位や性別に拘らず，身体接触により瞳孔が顕著に拡大することが示された．さらに，解析結果に基づいて，これまでに開発してきた瞳孔反応インタフェース[8]を用いて親和性を高める共感表現を付加した瞳孔反応ロボットを開発し，その可能性を確認した.

参考文献

[1] Pepper：https://www.softbank.jp/robot/,(2019/3/12 access).

[2] 南保英孝，木村春彦，原未來，阿部孝司，田嶋拓也，癒し型ペットロボットの飼い主判別手法の改善， 電気学会論文誌 C， Vol.129,No.9,pp.1662-1668，2009.

[3] 船越孝太郎, 木村法幸, 中野幹生, 岩橋直人，音声対話ロボットによる語彙と言い回しの制限がない名称学習，電子情報通信学会誌，D，情報・システム，Vol.93,No.5，pp.610-620，2010.

[4] 館宜伸，辻澤成久，参沢匡将，阿部孝司，木村春彦，南保英孝，ペットロボットを用いた感情認識システム，電子情報通信学会誌，D，情報・システム，Vol.89,No.3，pp.447-456，2006.

[5] 柴田崇徳，和田一義，動物型ロボットを用いた心のケア「ロボットセラピー」， 電子情報通信学会誌，Vol.95,No.5，pp.442-445，2012.

[6] Tomio Watanabe，Human-Entrained Embodied Interaction and Communication Technology，Springer，Emotional Engineering，pp.161-177，2011.

[7] Eckhard H. Hess，Attitude and Pupil Size，Scientific American，pp.46-54，1965.

[8] Yoshihiro Sejima，Yoichiro Sato and Tomio Watanabe，Development of an Expressible Pupil Response Interface Using Hemispherical Displays， Proceedings of 24th IEEE International Symposium on Robot and Human Interactive Communication (RO-MAN2015)，pp.285-290，2015.

[9] 池田理知子， Kramer，E.M.，異文化コミュニケーション・入門， 有斐閣アルマ，2000.

[10] 堀内園子，触れるケア ―看護技術としてのタッチング―， ライフサポート社，pp.87-92，2010.

[11] 山口創，手の治癒力， 草思社，pp.74-77，2012.

[12] 大坊郁夫，しぐさのコミュニケーション ―人は親しみをどう伝えあうか―， サイエンス社，pp.47-49，1998.

[13] 中井優理子，岡崎龍太，蜂須拓，佐藤未知，梶本裕之，鏡面反射を利用した目がゆらぐぬいぐるみに関する研究，エンタテインメントコンピューティングシンポジウム 2014 論文集，pp.50-54，2014.

アバタ影コミュニケーションシステムを用いたインタラクション支援

岡山県立大学 情報工学部 情報システム工学科

石井　裕

（概要）先行研究において，対話者自身のアバタの頭部動作に自動生成によるうなずき反応を重畳合成した場合，内容を制限しない自由対話による評価実験では有効性が示されたものの，話し手聞き手を設ける役割対話においては，聞き手評価において期待されるほどの効果が得られなかった．コミュニケーション支援効果を狙ったうなずき反応であっても，対話者とアバタの間に身体的な矛盾によってインタラクションに影響を与えた可能性がある．本研究では，アバタの頭部動作にうなずき反応モデルによるうなずき反応を重畳合成した動作を行うアバタ影を開発した．アバタの影が対話者の語りかけに対し反応することにより，アバタと対話者の身体動作の間に矛盾を生じさせずにその反応を想起させ，円滑なコミュニケーションを支援することができると考えられる．このアバタ影を身体的バーチャルコミュニケーションシステムに導入した身体的引き込みアバタ影システム，及びアバタ影色を変化させて発話の盛り上がり効果を視覚化するシステムを開発し，コミュニケーション実験によってシステムの有効性を示している．

1. はじめに

仮想の対話空間において，アバタは対話者自身であり，仮面を持った身体として振る舞っていると考えられる[1]．対話者とアバタの間に身体的な矛盾を生じさせずにコミュニケーションを支援するため，対話者の代役であるアバタにとって非分離な存在であり，通常は強くその存在が意識されない対象として影に着目する．この影について河合の報告によると，シャミッソーの「シュレミールの不思議な物語」やアンデルセン童話「影法師」をイメージに，身体と影における主従関係の逆転を題材として，影が心の一部の表れであるとして二重身の心理現象が説明されている[2]．また一般にも影踏み遊びなど，影の存在は時にコミュニケーションの主体になり得る．

また実空間での影を利用した映像表現は，実体の存在強化と共に身体の拡張や相手とのつながりを想起させる効果的な演出として有効である[3]．よって仮想空間に存在するアバタに対しても，その影の利用が場面の演出に効果があると考えられる．

本研究では，アバタの頭部動作にうなずき反応モデルによるうなずき反応を重畳合成した動作を行うアバタ影を開発している．アバタの影が対話者の語りかけに対し反応することにより，アバタの身体動作と対話者の身体動作の間に矛盾を生じさせずにその反応を想起させ，アバタ影を操作することでアバタとアバタ影間に矛盾を生じさせて，対比的に身体動作を観察しながら対話を行うことができるため，円滑なコミュニケーションを支援することができると考えられる．このアバタ影を身体的バーチャルコミュニケーションシステム(Embodied Virtual Communication System: EV-COS)に導入し，身体的引き込みアバタ影システムを開発するとともに，日常会話を想定したコミュニケーション実験によってシステムの有効性を示している．

さらに，場の盛り上がりを熱伝達として捉え，熱伝導方程式を用いた場の盛り上がり推定モデルを用いて，身体的アバタ影に色表現を付加した身体的コミュニケーションシステムを開発し，システムを用いたコミュニケーション実験により身体的アバタ影に色情報を付加することの有効性を示している．

2. 身体的引き込みアバタ影システム

2.1 コンセプト

本システムのコンセプトを図１に示す．仮想空間で行われるアバタを介したコミュニケーションにおいて，アバタ影は他のオブジェクト同様に対話者に対し実体の存在や位置づけを強化する．ここでアバタ影は，その実体と同じ動作をするだけではなく，部分的に異なる振る舞いをすることにより，実体で

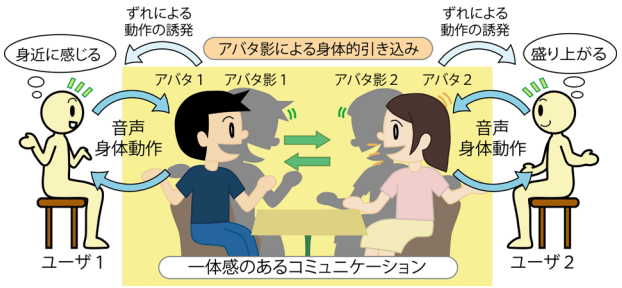


図 1 身体的引き込みアバタ影システムのコンセプト

あるアバタの振る舞いを想起させ，アバタ影が対話者間のインタラクションへ影響を与えることが可能である．著者らは対話音声と身体動作の引き込みに着目し，対話者の発話音声のリズムからコミュニケーション動作を自動生成する iRT（InterRobot Technology）を開発している[4]．アバタ影は，対話者の発話音声を入力とする iRT のタイミングに基づいてうなずき反応を重畳合成することで，仮想空間に一体感のあるコミュニケーション場が生成され，対話者はアバタ影と一体となって身体的リズムを共有することができる．この身体的引き込みにより，コミュニケーション場の盛り上がりを実感しつつインタラクションが促進される．

2.2 EVCOS

身体的バーチャルコミュニケーションシステム EV-COS は，仮想空間に自己と相手のアバタとして振る舞う CG キャラクタ VirtualActor(VA)を配置し，対話者が VA を介してコミュニケーションを行う．VA は対話者の頭部，背部，両手首に取り付けた 4 個の磁気センサ(POLHEMUS FASTRAK)によって各部位の角度と位置を計測し，それを基に，頭部の動き，胴体の動き，及び左右の腕の動きを生成している．対話者は同一空間内の VA を介することで，上半身の動きと音声のインタラクションを把握しながらコミュニケーションを行うことができる．VA はコミュニケーションリズムに着目したキャラクタ制作を行っており，互いの振る舞いによって対話相手との対応を確認できる．

2.3 アバタ影描画手法

アバタ影は，アバタのポリゴンにテクスチャを張り付け生成している．床や壁に落ちた物体の射影としての影の色を表現するため灰色の半透明テクスチャを使用した．アバタの足から壁までの影は床面へ平面描画を行い，壁の影はビルボードにより 2 次元的に描画している．アバタ影の描画において深度バッファテストにより深度値が小さく通過した部分は，半透明テクスチャを使用したためポリゴンが重なる部分ができる．したがってポリゴンが重なる部分の色が濃く描画されアバタ影全体の色の濃さを不均一にする．そのためステンシルバッファテストにより影の描画が重なる部分をマスクで覆い描画をピクセル単位で設定した．これにより，ポリゴンの重なりにより濃く描画されていた色の濃さを均一にした．

3. コミュニケーション実験

3.1 実験概要

アバタを介したコミュニケーションにおいて，アバタの影の存在とアバタの影がうなずき反応モデルの重畳合成によりうなずき反応を示すことによる効果を分析・評価するため，コミュニケーション実験を行った．比較モードとして，アバタに対し対話者の動作をそのまま反映させ，アバタの影の表示を行わない「A:計測動作」，アバタの影を表示させアバタとその影に対し対話者の動作をそのまま反映させる「B:アバタ影表示」，アバタの影を表示させアバタに対し対話者の動作をそのまま反映させ，その影に対し対話者の動作にうなずきモデルによるうなずき反応を重畳合成した動作をさせる「C:アバタ影うなずき」の 3 条件とした．実験参加者は 18 歳～24 歳までの同性同士 2 人 1 組の男女各 12 組ずつの計 24 組 48 名であった．各モードを 3 分ずつ合計 9 分間の対話を行わせ，各対話終了時に「楽しさ」，「好み」，「対話しやすさ」，「一体感」，「場の盛り上がり」，「親近感」の 6 項目による 7 段階のリッカート尺度（中立 0）の官能評価をさせた．続いて，2 モードを用い各モード 1 分ずつ順に対話を行わせた後，一対比較評価をさせた．

3.2 実験結果

実験参加者全体の官能評価結果を図 2 に示す．帰無仮説をモード間に差はないとして，Friedman 検定および Wilcoxon の符号順位検定によって評価した．「A:計測動作」と「C:アバタ影うなずき」の間に，全 6 項目において有意水準 0.1%の有意差が認められ，帰無仮説が棄却され，「C:アバタ影うなずき」が

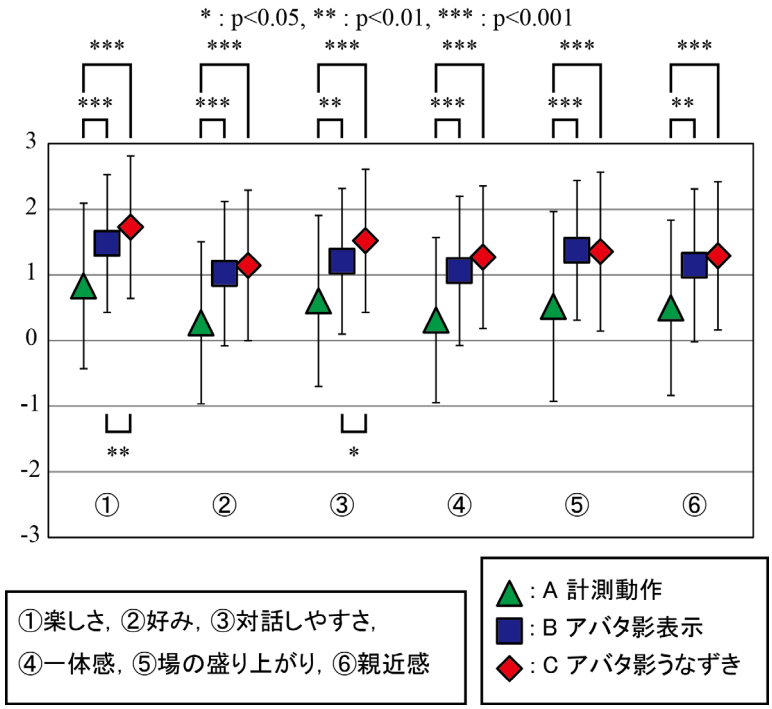


図 2　7 段階評価結果

高く評価された.「A:計測動作」と「B:アバタ影表示」の間に,「楽しさ」,「好み」,「一体感」,「場の盛り上がり」の 4 項目において有意水準 0.1%,「対話しやすさ」,「親近感」の 2 項目において有意水準 1%で有意差が認められたことから, 帰無仮説が棄却され,「B:アバタ影表示が高く評価された.「B:アバタ影表示」と「C:アバタ影うなずき」の間に,「楽しさ」の項目において有意水準 1%,「対話しやすさ」の項目において有意水準 5%で有意差が認められたことから,帰無仮説が棄却され,「C:アバタ影うなずき」が高く評価された.

次に一対比較結果に対して, Bradley-Terry モデルを想定し, モードの好ましさを定量的に評価した(図 3). 自由対話において「C:アバタ影うなずき」,「B:アバタ影表示」,「A:計測動作」の順に高く評価

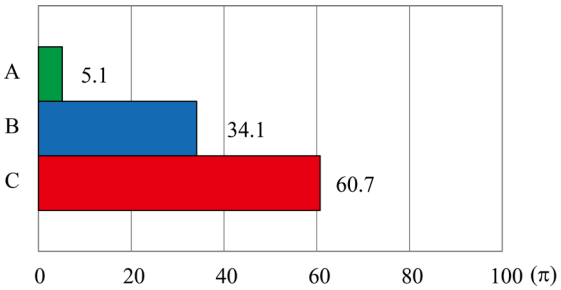


図 3　一対比較評価結果 Bradley-Terry モデルに
に基づく好ましさ π

され,「B:アバタ影表示」は「A:計測動作」に比べ約 7 倍の高い評価を受け,「C:アバタ影うなずき」は「A:計測動作」に比べ約 12 倍の高い評価を受けた.

3.3 考察

実験結果より, アバタ影を提示する手法については, 表示しないモードとの比較により有効性が確認された. また, 対話の流れに応じ, 話し手, 聞き手が交互に入れ替わるコミュニケーションモードである自由対話においては, アバタ影によるうなずき反応が高く評価され, 肯定的な影響を与えることが示された.

4. 身体的アバタ影色表現システム

人は人工物の色情報に対して感情や雰囲気等の印象を持つことが報告されている[5]. さらに, コミュニケーションにおいても, 色情報の付加が情動やインタラクションの表現を強めることが報告されている[6]. また, 勅使らは, エージェントロボットが状況に応じて目の LED を変化 (発色・発光パターン) させることで, 異なる感情を表現できることを示している[7]. このように, コミュニケーションにおける色表現は, 情動や場の盛り上がり等のインタラクション情報を伝達する手法として有効であると考えられる. したがって, アバタを介したコミュニケー



(A) 通常提示　　(B) 熱量提示　　(C) 盛り上がり提示

図 4　身体的アバタ影色表現システム

ションにおいても，色表現によるインタラクション情報を付加することで，コミュニケーション場における視認性が高まり，身体的インタラクションの促進が期待される．この表現メディアについては様々なメディアが考えられるが，身体そのものをメディアとして表現することで，直観的に把握しやすいと予想される．しかしながら，上述したように直接身体メディアに表現する場合，コミュニケーションにおいて本来共有されるべき身体性が損なわれる恐れがある．そのため，抽象的存在である身体的アバタ影を表現メディアとすることで，身体性を損なうことなく直観的に把握できる表現手法として期待される．

5 影色表現評価実験

5.1 実験概要

本システムでは，場の盛り上がりに応じて身体的アバタ影の色情報を変化させる[8]．この色情報については，人間の情動にはたらきかけ，かつ盛り上がりを直観的に把握できる色彩にすることで，効果的な支援が可能になると期待される．そこで，身体的アバタ影の色変化実験を行った．比較モードは，先行研究において暖色系の色が活動性を高める印象を与えることが報告されており，予備検討の結果，赤色(H:0, S:240, V:120)を採用する．色変化は，式(1)のように，身体的アバタ影の基準値となるグレー(S:0)からアバタ影としての違和感を与えないように彩度値のみを線形的に変化させた．

本実験では，自然に対話が盛り上がると想定される日常対話を対象として自由対話実験を行った．比較モードは，身体的アバタ影色が変化しない「(A)通常提示」，対話者それぞれの熱量に比例して各々の身体的アバタ影色が変化する「(B)熱量提示」，場の盛り上がり推定モデルにより得られた推定値に基づいて両者の身体的アバタ影色が同時に変化する「(C)盛り上がり提示」の 3 モードとした（図 4）．

実験は 2 人 1 組で行い，実験協力者にはそれぞれ別室でシステムを用いて対話を行わせた．各室の対話の様子はビデオカメラにより録画した（図 5）．実験協力者は友人の間柄で，18～24 歳までの同性同士の男女 12 組の計 24 人であった．実験は，以下の手順にて行った．実験概要説明後，実験協力者の 2 人をそれぞれ別室に入室させ，2 分間システムを試用させ，システムに慣れさせた．その後，3 モードの中から 2 モードをランダムに選択し，各モードを 2 分間使用させ，総合的に良い観点で一対比較を行わせた．次に，各モードを 3 分間使用させ，各モード終了時に，7 段階（中立 0）のアンケートを行わせた．ここでは，身体的インタラクションの促進の観点から「(a)楽しさ」「(b)対話しやすさ」，提示法による印象の差異を評価する「(c)盛り上がり」「(d)一体感」「(e)安心感」，直観的評価である「(f)好み」，提示による他者理解の支援を調査する「(g)(相手の)感情の理解しやすさ」の 7 項目とした．各モードの提



図 5　影色実験場面の一例

示順は順序効果を考慮して組ごとにカウンターバランスを取った.

5.2 実験結果

一対比較の結果を表 1 に示す. 得られた結果から, Bradley-Terry モデルを用いて各モードの好ましさを推定した. 推定されたモードの好ましさ π を図 6 に示す. このモデルの整合性を検討するために, 適合度検定および尤度比検定を行った結果, モデルは棄却されず, π の妥当性が保証された. 図 6 より, 影色が変化するモード(B)とモード(C)がともに高く評価され, 影色が変化しないモード(A)に対して約 4 倍好まれた.

表 1　一対比較結果

	(A)	(B)	(C)	Total
(A)		3	6	9
(B)	21		10	31
(C)	18	14		32

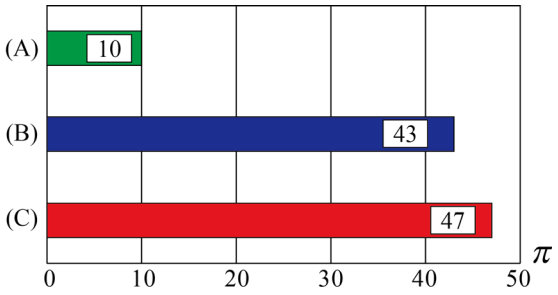


図6　影色実験における Bradley-Terry モデルに に基づく好ましさ π

次に, 7 段階評価結果を図 7 に示す. 図には参考として平均値とその標準偏差を示している. Friedman の検定および Wilcoxon の符号順位検定による多重比較を行った結果, モード(A)とモード(B)との間に「楽しさ」「対話しやすさ」「盛り上がり」「一体感」「好み」「感情の理解しやすさ」の項目において有意水準 1%で有意差が認められ, 「安心感」の項目において有意水準 5%で有意差が認められた. モード(A)とモード(C)との間には, 「楽しさ」「対話しやすさ」「盛り上がり」「一体感」「好み」「感情の理解しやすさ」の項目において有意水準 1%で有意差が認められ, 「安心感」の項目において有意水準 5%で有意差が認められた. また, モード(B)とモード(C)を比較した結果, 全ての項目において有意差は認められなかった. さらに, モード(B)に対する自由記述は, 「相手の感情を感じられる」, 「盛り上がって話すと楽しい」, 「相手の反応が少ないと, 相手はあまり楽しんでないように感じる」等の意見が得られた. モード(C)に対する自由記述は, 「笑ったときに両方の影が反応するので, 相手の感じが分かった」, 「会話の盛り上がりは一番感じられた」, 「相手の感情が分かりにくかった」等の意見が得られた. これらの結果から, 身体的アバタ影の色情報を変化させるモード(B)およびモード(C)が高く評価されたことより, 身体的アバタ影の色情報を盛り上がり等のインタラクション情報に応じて変化させることの有効性が示された.

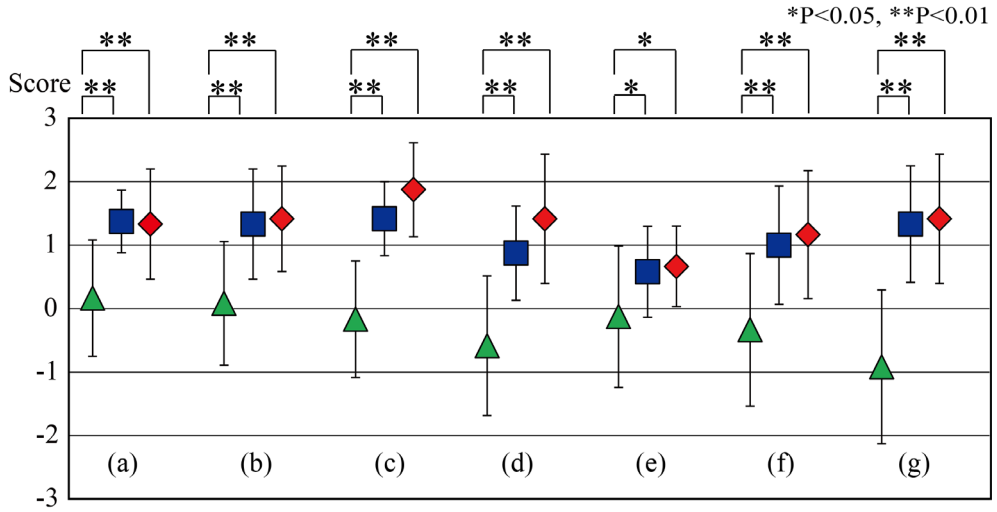


図 7　影色実験における 7 段階評価結果

5.3 考察

インタラクション情報の提示法によって対話者の印象が異なるという仮説を設定した．具体的には，自己の活性度合いを提示するモード(B) と，コミュニケーション場の活性度合いを提示するモード(C) では，たとえ同一のメディアであっても異なる印象が形成されると想定した．しかしながら，一対比較および 7 段階評価においてモード(B) とモード(C) との間に顕著な差が認められなかった．さらに，自由記述において，対話者は身体的アバタ影が表現するインタラクション情報が異なることを理解していた．これは，対話内容を自然に対話が盛り上がると想定される日常対話としていたため，話し手と聞き手が短時間で入れ替わり，自己の発話が影色として適度に反映されることから，提示法に差が見られにくかったと考えられる．加えて，両提示法における色表現と対話者の想定との差異が小さかったため，コミュニケーションに対する身体性が損なわれることなく「盛り上がり」や「一体感」等において高い評価が得られたと考えられる．これらのことから，自由対話というコミュニケーションスタイルでは，影色変化によるかかわりを可視化することが重要であり，提示法による印象の違いは小さかったと考えられる．ただし，この知見は場の盛り上がりモデルの前提条件となる，話者同士が活発にコミュニケーションを行う場面において適用可能であり，例えばじっくり話を聞くなどのコミュニケーションスタイルが異なる場合，提示法による差異が生じると予想される．そのため，対話における発話量等のコミュニケーションスタイルに応じた色表現やモデルを検討する必要があり，今後の検討課題として進めていく．

6 おわりに

本研究では，仮想空間においてアバタの影に対話者の身体動作と自動生成によるうなずき反応を重畳合成する身体的引き込みアバタ影システムを開発した．日常会話を想定した自由対話による実験を行った結果からアバタ影表示の効果が確認され，本システムの有効性が示された．また，場の盛り上がりに応じて身体的アバタ影の色情報を変化させる身体的コミュニケーションシステムを開発し，システムを用いたコミュニケーション実験において，身体的アバタ影に色情報し，場の盛り上がりを表現することの有効性を示した．

参考文献

[1] 鷲田清一，野村雅一編：表象としての身体，大修館書店，pp.153–173 (2005).

[2] 河合隼雄：影の現象学, 思索社, pp.5–103 (1976).

[3] Miwa, Y., Itai, S., Watanabe, T., and Nishi, H.: Shadow Awareness: Enhancing theater space through the mutual projection of images on a connective slit-screen, Leonardo, the journal of the International Society for the Arts, Sciences and Technology (SIGGRAPH 2011 Art paper), Vol.44, No.4, pp.325–333 (2011).

[4] Watanabe, T., Okubo, M., Nakashige, M., and Danbara, R.: InterActor: Speech-Driven Embodied Interactive Actor, International Journal of Human-Computer Interaction, Vol.17, No.1, pp.43–60 (2004).

[5] 長町三生, 瀬沼勲, 岩重律子, 室の雰囲気に関する感情分析, 人間工学, Vol.13, No.1, pp.7–14 (1977).

[6] 勅使宏武, 寺田和憲, 伊藤昭, ロボットの目の動的色発光が語り聞かせ時の人の感情認識に与える影響, ヒューマンインタフェース学会論文誌, Vol.17, No.4, pp.129–140 (2015).

[7] Degiorgi, M., Garzotto, F., Gelsomini, M., Leonardi, G., Penati, S., Ramuzat, N., Silvestri, J., Clasadonte, F. and Kinoe, Y., Puffy - an inflatable robotic companion for pre-schoolers, Proceedings of the 26th IEEE International Conference on Robot Human Interactive Communication, pp.35–41 (2017).

[8] Sejima, Y., Watanabe, T. and Jindai, M., Estimation model of interaction-activated communication based on the heat conduction equation, Journal of Advanced Mechanical Design, Systems, and Manufacturing, Vol.10, No.9, Paper No.15-00548, pp.1–11 (2016).

自然言語処理を用いたソフトウェア要件管理技術に関する研究

岡山県立大学　情報工学部　情報システム工学科

天嵜　聡介

ソフトウェア開発を成功に導く施策は様々であるが,中でも上流工程の強化は特に重要であると考えられている．上流工程では自然言語で書かれた文書の扱いが主である．そこで，自然言語処理を用いて，要件文書の分類やソースコードとのトレーサビリティなどを自動で管理する方法について検討及び調査を行なった．調査の結果，要求文書をデータとする際のベクトル化手法としては，古典的な TFIDF などだけでなく，Word2Vec など近年提案された手法を用いることで自動分類の精度が向上する可能性が明らかとなった.

1. はじめに

ソフトウェア開発を成功に導く施策は様々であるが，中でも上流工程の強化は特に重要であると考えられている［1]．上流工程では，何をソフトウェアで実現するのかについて日常用いられる言葉（日本語など）で要件として記述される．要件の管理は煩雑なため，自然言語で書かれた文書をデータとして扱い，要件文書の分類やソースコードとのトレーサビリティなどを自動で管理したいという要望は古くからある.

近年,計算機の性能向上や自然言語処理技術の発展によって，このような要望に応えるための研究が行われてきている．しかしながら，現状では，初歩的な自然言語処理技術のみが適用されるにとどまっており，そのため，多くの課題において性能改善の余地が残されている.

本研究では,ソフトウェア開発における労働集約的な作業を自動化し，価値を産む作業に人的資源を配分することで，小規模なソフトウェア開発組織であっても迅速にソフトウェアの開発や保守を可能にする技術の開発・評価に取り組んだ．具体的には以下の２点である.

a. 自然言語処理技術を用いた要件文書の自動カテゴリ分類手法の提案・評価
b. 要件文書とソースコードのトレーサビリティ管理技術の基礎調査

本報告では，a について詳しく述べていく.

2. 関連研究

自然言語処理(NLP)技術はソフトウェア工学分野から高い注目を集めている.例えば,バグ票の分析［1],バグ局所化［2],議論の分析[3],リンクトレーサビリティの管理［4]などが挙げられる．特に要求工学分野では自然言語で記述された文書を扱うことが多いため，NLP 技術の活用が盛んである［4-7].

収集された要求は，まず,個々の要求を様々なトピックに分類してから分析に回される[6].近年は要求の自動分類に関する研究が増加している.

Cleland-Huang ら[8]の提案では，カテゴリに特有のキーワードを定めた上で，それらのキーワードを含む割合などから個々の要求があるカテゴリに属する確率を計算している.

Abad ら［9]は，要求文書の記述の揺れを補正するための書き換え規則を提案している．その上で要求文書に登場する単語の出現頻度を用いたベクトル化を施した上で機械学習を用いた分類を行なっている.

Kurtanović と Maalej［10］は非機能要求の自動分類手法の精度評価を行なっている． Amazon のレビューに手作業でラベル付けを行ったデータセット［14]を用いた評価実験の結果,一定の精度で分類が可能であることが示された.

Munaiah ら［11]はセキュリティに関連する要求の識別に特化した手法を提案した．この手法では，Common Weakness Numeration (CWE)を用いて用語の収集を行なっている.

多くの研究では,単語の出現頻度を用いたベクトル

表 1: データセットの概要

Category	# of reqs	ratio (%)	ave. # of words
Functional	255	40.80	20
Availability (A)	21	3.36	19
Fault Tolerance (FT)	10	1.60	19
Legal (L)	13	2.08	19
Look & Feel (LF)	38	6.08	20
Maintainability (MN)	17	2.72	28
Operational (O)	62	9.92	20
Performance (PE)	54	8.64	22
Portability (PO)	1	0.16	14
Scalability (SC)	21	3.36	18
Security (SE)	66	10.56	20
Usability (US)	67	10.72	22
Total	625	100	–

化を用いているが，近年では Word2Vec など深層学習に端を発するベクトル化手法も提案されている．これらを比較評価することで有用なベクトル化手法を特定できる．

3. 実験方法

3.1. データセット

評価実験には，DePaul 大学の大学院生向け講義で得られた要求文書を用いた[8]．一般にデータが公開[17]されており，先行研究[9-11]でも用いられている．表 1 にデータを示す．カテゴリ分類の詳細は文献[8]を参照．

3.2. ベクトル化手法

実験対象としたベクトル化手法は以下の通りである．

1. Term Frequency (TF)[15]
2. TFIDF[15]
3. Word2Vec[16]
4. Doc2Vec[12]
5. SCDV[13]

Word2Vec, Doc2Vec, SCDV については，文献[18]を参考にパラメータを設定した．

3.3. 実験手順

最近の不具合予測研究[23]で採用された out-of-sample bootstrap を用いて評価実験を行なった．手順は以下の通り．

1. サイズ N の標本をデータから復元抽出する
2. 標本を用いて機械学習モデルを訓練する
3. 標本に含まれないデータで性能を評価する
4. 以上を 100 回繰り返す

本実験に用いた機械学習手法は，Logistic Regression[19], NaiveBayes[20], Support Vector Machine[21], Random Forests[22]である．

3.4. 評価尺度

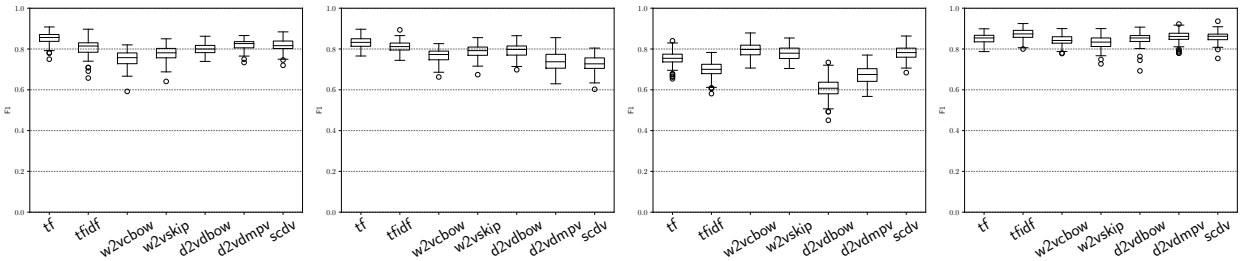
本研究では F1 値を用いて分類精度を評価した．これらの評価尺度は先行研究においても広く用いられている．

4. 実験結果

4.1. 機能・非機能要求の分類

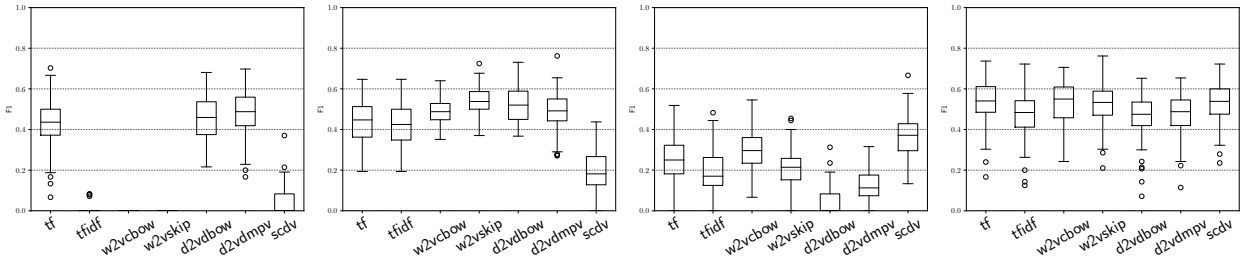
機能・非機能要求の分類精度を図 1 に示す．F1 値はどの箱ひげ図においても 0.8 程度であり，TF のような古典的な手法でも比較的高い分類精度が実現できていることが読み取れる．統計的検定[24]の結果からは Word2Vec などの方が高い性能であると読み取れるが，Word2Vec のような計算コストがかかるベクトル化手法を採用する理由が小さいことを示す．

図 1(c)は Random Forests を用いた実験結果であるが，性能が他と比べて極端に低下するベクトル化手法が存在した．具体的には Doc2Vec を DBOW オプションで用いた場合である．統計的検定を行なって，この差が有意水準 5%で有意であることが確認された．



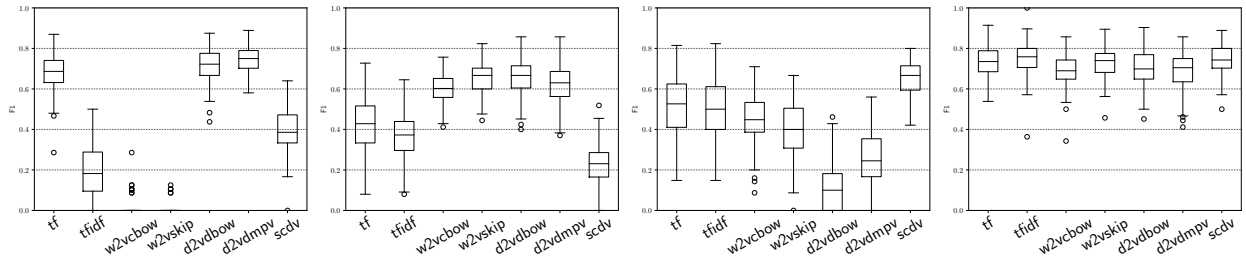
(a) Logistic Regression (b) Naive Bayes (c) Random Forests (d) SVM

図 1: 機能・非機能要求の分類性能（F1 値）



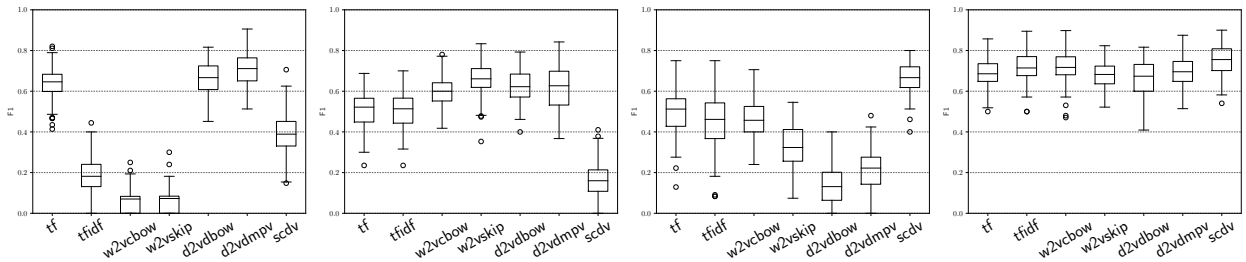
(a) Logistic Regression (b) Naive Bayes (c) Random Forests (d) SVM

図 2: Operational Requirements の分類性能（F1 値）



(a) Logistic Regression (b) Naive Bayes (c) Random Forests (d) SVM

図 3: Performance Requirements の分類性能（F1 値）

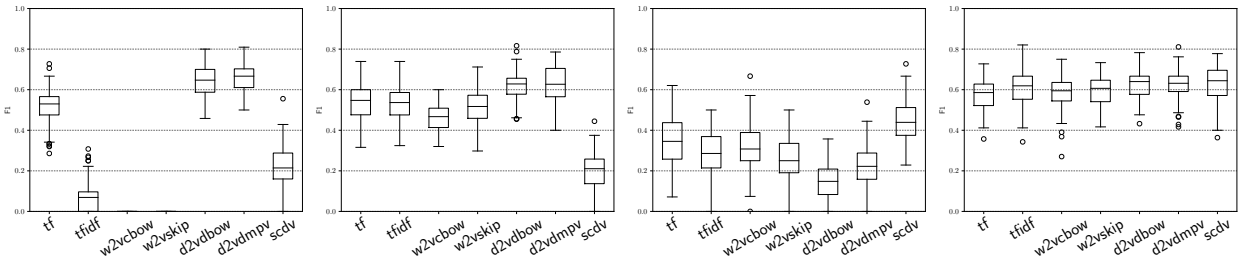


(a) Logistic Regression (b) Naive Bayes (c) Random Forests (d) SVM

図 4: Security Requirements の分類性能（F1 値）

4.2. Operational Requirements の分類

Operational Requirements の分類精度を図 2 に示す．先ほどと異なり，F1 値は 0.6 あたりを中心に大きくばらついている．図 2(a)，(b)から Doc2Vec の性能はそれなり高いが，SCDV の性能が低いことがわかる．Random Forests を用いた場合の結果は図 1 の場合と同様に低い傾向にあることがわかる．一方，TF や TFIDF が最良である場合が少ないこともわかる．



(a) Logistic Regression (b) Naive Bayes (c) Random Forests (d) SVM

図 5: Usability Requirements の分類性能 (F1 値)

4.3. Performance Requirements の分類

Performance Requirements の分類精度を図 3 に示す. F1 値は 0.0 から 0.8 程度まで大きくばらついており, ベクトル化手法の違いが大きな影響を及ぼすことがわかる. SCDV の性能は低い一方で Doc2Vec を用いた場合の性能は相対的に高い. 先ほどと同様に Random Forests の性能は低い. その中では SCDV が最も性能が高い. 一方, TF や TFIDF が最良である場合が少ないこともわかる.

4.4. Security Requirements の分類

Security Requirements の分類精度を図 4 に示す. 先ほどと同様に F1 値は 0.0 から 0.8 程度まで大きくばらついており, ベクトル化手法の違いが大きな影響を及ぼすことがわかる. SCDV の性能は低い一方で Doc2Vec を用いた場合の性能は相対的に高い. 先ほどと同様に Random Forests の性能は低い. その中では SCDV が最も性能が高い. 一方, TF や TFIDF が最良である場合が少ないこともわかる.

4.5. Usability Requirements の分類

Usability Requirements の分類精度を図 5 に示す. 先ほどと同様に F1 値は 0.0 から 0.8 程度まで大きくばらついており, ベクトル化手法の違いが大きな影響を及ぼすことがわかる. SCDV の性能は低い一方で Doc2Vec を用いた場合の性能は相対的に高い. 先ほどと同様に Random Forests の性能は低い. その中では SCDV が最も性能が高い. 一方, TF や TFIDF が最良である場合が少ないこともわかる.

5. まとめ

本報告では, 要求文書の自動カテゴリ分類において用いられる文書のベクトル化手法について, 分類性能に与える影響を評価した. 評価では複数の機械学習モデルを用いて, ベクトル化手法との関連性についても調査した. その結果, 以下の点が明らかとなった.

a. 機能・非機能要求の分類は TF など古典的な手法でも十分精度が高い
b. 非機能要求のカテゴリ分類には Word2Vec など新しい手法を用いることで分類精度が向上する可能性がある
c. ベクトル化手法と機械学習手法の間には相性があり, 適切な組み合わせを行わないと分類精度が著しく低下する

要求文書のベクトル化手法はトレーサビリティ管理技術にも大きく関係している. 次年度以降は, トレーサビリティに関する技術におけるベクトル化手法の影響を調査していく.

参考文献

[1] Qiang Fan, Yue Yu, Gang Yin, Tao Wang, and Huaimin Wang. Where Is the Road for Issue Reports Classification Based on Text Mining? In Proc. of ESEM, pages 121-130, 2017.

[2] Saket Khatiwada, Miroslav Tushev, and Anas Mahmoud. Just enough semantics: An information theoretic approach for IR-based software bug localization. Information and Software

Technology, 93:45-57, 2018.
[3] Chunyang Chen, Zhenchang Xing, and Ximing Wang. Unsupervised Software-Specific Morphological Forms Inference from Informal Discussions. In Proc. of ICSE, pages 450-461. IEEE, 2017.
[4] Teng Zhao, Qinghua Cao, and Qing Sun. An Improved Approach to Traceability Recovery Based on Word Embeddings. In Proc. of APSEC, pages 1-9, 2017.
[5] Eric Knauss, Daniela Damian, Germán Poo-Chaamaño, and Jane Cleland-Huang. Detecting and classifying patterns of requirements clarifications. In Proc. of RE, pages 251-260, 2012.
[6] Youngjoong Ko, Sooyong Park, Jungyun Seo, and Soonhwang Choi. Using classification techniques for informal requirements in the requirements analysis-supporting system. Information and Software Technology, 49(11-12):1128-1140, November 2007.
[7] Davide Falessi, Giovanni Cantone, and Gerardo Canfora. Empirical Principles and an Industrial Case Study in Retrieving Equivalent Requirements via Natural Language Processing Techniques. IEEE Transactions on Software Engineering, 39(1):18-44, December 2012.
[8] Jane Cleland-Huang, Raffaella Settimi, Xuchang Zou, and Peter Solc. The detection and classification of non-functional requirements with application to early aspects. In Proc. of RE, 2006.
[9] Zahra Shakeri Houssein Abad, Oliver Karras, Parisa Ghazi, Martin Glinz, Günther Ruhe, and Kurt Schneider. What works better? a study of classifying requirements. In Proc. of RE, pages 496-501, 2017.
[10] Z Kurtanović and Walid Maalej. Automatically Classifying Functional and Non-functional Requirements Using Supervised Machine Learning. In Proc. of RE, pages 490-495, 2017.
[11] Nuthan Munaiah, Andrew Meneely, and Pradeep K Murukannaiah. A Domain-Independent Model for Identifying Security Requirements. In Proc. of RE, pages 506-511, 2017.
[12] Quoc Le and Tomas Mikolov. Distributed representations of sentences and documents. In Proc. of ICML, 2014.
[13] Dheeraj Mekala, Vivek Gupta, Bhargavi Paranjape, and Harish Karnick. SCDV: Sparse Composite Document Vectors using soft clustering over distributional representations. In Proc. of EMLNP, pages 659-669, 2017.
[14] Zijad Kurtanović and Walid Maalej. Mining User Rationale from Software Reviews. In Proc. of RE, pages 61-70. IEEE, September 2017.
[15] Christpher D. Manning and Hinrich Schütze. Foundations of Statistical Natural Language Processing. MIT Press, 1999.
[16] Tomas Mikolov, Kai Chen, Greg Cornado, and Jeffery Dean. Efficient Estimation of Word Representations in Vector Space. In Proc. of Workshop at the International Conference on Learning Representations, 2013.
[17] The promise repository of empirical software engineering data, 2015.
[18] Jey Han Lau and Timothy Baldwin. An Empirical Evaluation of doc2vec with Practical Insights into Document Embedding Generation. In Proc. of Workshop on Representation Learning for NLP, pages 78-86, 2016.
[19] D. R. Cox. Two further applications of a model for binary regression. Biometrika, 45(3):562-565, 1958.
[20] P. Domingos and M. Pazzani. On the optimality of the simple bayesian classifier under zero-one loss. Machine Learning, 29(2-3):103-130, 1997.
[21] Corinna Cortes and Vladimir Vapnik.

Support-vector networks. Machine Learning, 20(3):273-297, 1995.
[22] L. Breiman. Random forests. Machine Learning, 45(1):5-32, 2001.
[23] Chakkrit Tantithamthavorn, Shane McIntosh, Ahmed E. Hassan, and Kenichi Matsumoto. An empirical comparison of model validation techniques for defect prediction models. IEEE Transactions on Software Engineering, 43(1):1-18, 2017.
[24] A. J. Scott and M. Knott. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. Biometrics, 30(3):507-512, 1974.
[25] Roel Wieringa and Maya Daneva. Six strategies for generalizing software engineering theories. Science of Computer Programming, 101:136-152, 2015.

無線ボディ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．加えて、物理層の性能を考慮した性能評価も行った．特に，プリアンブル検出のための SFD の系列として，ITU-T Rec. H.223 の 16 ビットフラッグを用いた場合，計算機シミュレーションの結果，SmartBAN プリアンブル単体や他の系列を用いた場合よりも良い特性が得られることを確認出来た．

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，病院等に情報が送られ，治療や診断に役立てられる（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]．

我々はこれまでの研究において，SmartBAN の物理層における性能評価を行った [14-16]．特に，[16] においては，[14, 15]で評価を行った誤り制御方式とプリアンブル構成について統合的に評価を行い，最適なペイロード長や Start Frame Delimiter (SFD) 長を計算機シミュレーションと理論解析により求めた．

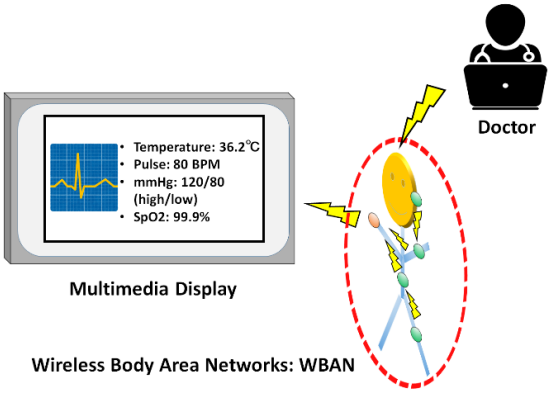


図 1: WBAN の概要．

本研究では，SFD の系列として，[17]で提案されている 16 ビットフラッグを用いて，プリアンブル検出と物理層における統合的な性能評価を行った．加えて，[14-16]で考慮していなかった MAC 層におけるアクセス制御方式の特性も考慮に加えた，クロ

スレイヤでの性能評価についても検討を行った．とりわけ，Control and Management (C/M) 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，ITU-T Rec. H.223 の有効性と，Slotted ALOHA を用いたランダムアクセス区間における許容遅延時間や最大スループットを達成するノード数について確認出来た．

2. SmartBAN MAC 層の概要

図 2 は SmartBAN のデータチャネル (D-Ch) における MAC 層のアクセス区間を表している．SmartBAN のアクセス区間は，ハブからノードへブロードキャストされる D-Beacon を送信するスロットと，何も送受信を行わない Inactive Period を除くと，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．

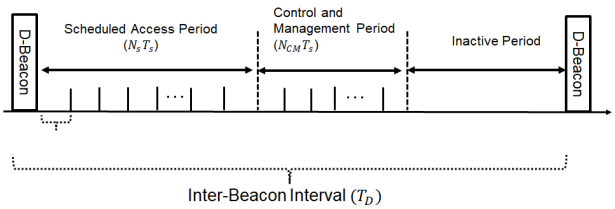


図 2: データチャネルのアクセス区間．

この時，C/M Period で用いる Slotted ALOHA では，データの優先度 (User priority: UP) に応じて Contention Probability (CP) の最大値 (CP_{max}) と最小値 (CP_{min}) が設定されている．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）

3. 修正プリアンブル構成とシステムモデル

[15, 16]ではプリアンブルの検出能力の向上のために図 3 のような修正を施した．この主な理由としては，標準規格のプリアンブル構造が非常に単純であり，医療・ヘルスケア情報を扱う場合，信頼性の高い通信を行うことが出来ないからである．具体的には，ノイズやフェージング等によってプリアンブルの前後に「10」の 2 ビットが検出された場合，PLCP Header の先頭の検出が失敗する．これにより，パケット誤りが頻繁に発生し，同時にエネルギー効率が大きく低下してしまう．

図 4 では，PLCP Header の位置を正しく検出するために，16 ビットのプリアンブルと PLCP Header の間に SFD が追加されている．プリアンブル信号を検出すると，既知の変調 SFD シンボルに対して相互相関が行われる．この方法の利点は，標準規格を大幅に変更することなく実現出来る点にある．つまり，16 ビットのプリアンブルも従来の役割を果たすことが可能となる．

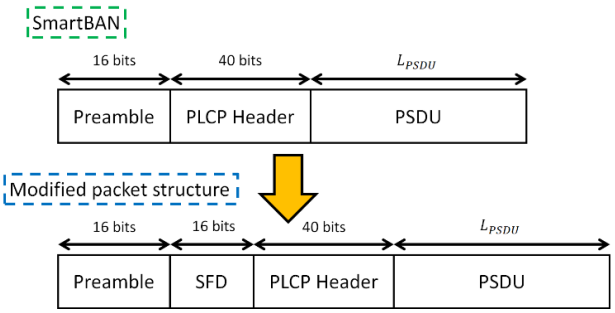


図 3: 修正された物理層パケット構成．

4. ノードの優先度に応じたCPの設定方法

本研究では，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も目的の一つである．そのため，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1のように設定した．ここで，NPがLowの方がCPを低くなるように設定している．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1: NPとUPに対するCP_{max}とCP_{min}

	NP: High		NP: Low	
UP	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

5. 計算機シミュレーションによる性能評価

本章では, SmartBAN物理層におけるプリアンブル検出を含めた統合的な性能評価，及びMAC層のC/M Periodを想定した物理層の特性を考慮に入れたクロスレイヤでの性能評価について，計算機シミュレーションにより行う．シミュレーション諸元は表2のとおりである．本性能評価では，修正された物理層パケット構成で追加されたSFDとして, [15, 16]で性能評価を行った16ビットのアダマール系列, 直交M系列，マンチェスター符号化直交M系列の他に，ITU-T Rec. H.223で提案された16ビットフラッグについても検討を行った．

表2: シミュレーション諸元

Channel model	IEEE model CM3
Pass loss model	IEEE model CM3
Frequency Spectrum	2401-2481 MHz
Bandwidth (BW)	2 MHz
Modulation	GFSK
Bandwidth-Time product	0.5
Modulation index	0.5
FEC (PLCP Header)	(36,22) 短縮BCH符号
FEC (PSDU)	(127, 113), (127, 64) BCH 符号
Transmission power (P_{tr})	0 dBm $\geq P_{tr}$
Thermal noise density (N_0)	-174 dBm/Hz
Implementation losses (I)	5 dB
Receiver noise figure (NF)	10 dB
Information bit length (L_{info})	678 bits
Time slot duration (T_s)	1.5 ms
Maximum number of transmissions	10
Symbol rate (R)	1.0 Msps

チャネルモデルについては, ウェアラブルWBANのチャネルモデルのひとつであるIEEEモデルCM3を使用した[18]．パスロスモデルも同様にIEEEモデルCM3をした．2.4GHz帯使用時のIEEEモデルCM3のパスロスモデルは以下の表3と式(1)で表される．本研究では，Hospital Roomのパラメータを用いた．

表3: IEEEモデルCM3パスロスモデルの各パラメータ

	Hospital Room	Anechoic Chamber
a	6.6	29.3
b	36.1	-16.8
σ_N	3.8	6.89

$$PL(d) = a \times log_{10} d + b + N \quad . \qquad (1)$$

aとbは線形化のための係数，dは送受信間距離，Nは平均 0，標準偏差σ_Nの正規分布の分散を意味する．一方，周波数フラットフェージング想定時のKファクタと各パラメータは表 4 と式(2)のとおりである．

$$K_{dB} = K_0 - m_k PL(d) + \sigma_k n_k \quad . \qquad (2)$$

表 4: IEEE モデル CM3 のKファクタに関する各パラメータ

K_0 [dB]	30.6
m_k [dB]	0.43
σ_k	3.4

各パラメータの意味については文献[18]を参照されたい．式(4)より，パスロスが大きくなるにつれて，K_{dB}が小さくなることがわかる．

図 4 は IEEE モデル CM3 環境におけるE_s/N_0に対する検出失敗率を示す．なお，Kファクタは送受信機間距離が約 d=1m の場合に相当する 4.5 とした．また，図 5 は IEEE モデル CM3 環境における送受信機間距離に対する検出失敗率を示す．この時，送信出力はP_{tr}=0 dBm とした．これらの図より，ITU-T Rec. H.223 の 16 ビットフラッグが最も良い検出特性が得られたことがわかった．とりわけ，10^{-3}以下の検出失敗率が得られたのはどちらの性能評価でも ITU-T Rec. H.223 の 16 ビットフラッグのみとなった．

図 6-9 は MAC 層の C/M Period を想定した物理層の特性を考慮に入れた平均遅延時間，送信成功率，送信回数，スループットを示す．なお，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，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)．また，比較対象として，SmartBAN プリアンブルのみを用いた場合，ITU-T Rec. H.223 16 ビットフラッグを用いた場合について評価を行った．図 6 より，ノード数が 15 まで増えた場合，SmartBAN プリアンブルのみを用いた場合の UP 0 の平均遅延時間はおよそ 100ms まで増加した．すなわち，今回の想定環境では 1 スロット長が 1.5ms であるため，C/M Period では最低でも 66 スロットを用意する必要があることが確認出来た．一方で，ITU-T Rec. H.223 16 ビットフラッグを用いた場合，SmartBAN プリアンブルを用いた場合よりも遅延時間を抑えることが出来た．これは，物理層でのプリアンブル検出能力の向上によるものである．また，図 7-8 での同様のことが言える．加えて，図 9 より，ネットワーク全体の平均スループットが最大となるのは，ノード数が 6 の時であることが確認された．また，SmartBAN プリアンブルのみの場合，ITU-T Rec. H.223 16 ビットフラッグを用いた場合より 10%程度最大スループットが減少することも確認出来た．ところで，各 CP について各 NP を比較すると，わずかながら High NP のデータの方が良い特性となった．しかしながら，想定よりも High NP と Low NP の差が小さかったため，各 NP における CP の設定には更なる検討の必要がある．

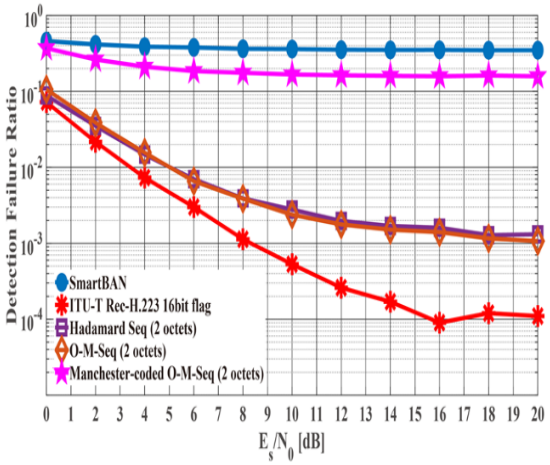


図 4: E_s/N_0に対する検出失敗率（K=4.5，$d \cong$ 1.0 m).

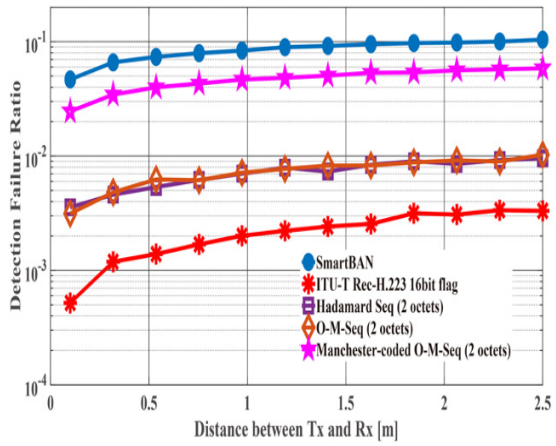


図 5: 送受信機間距離に対する検出失敗率（P_{tr}=0 dBm).

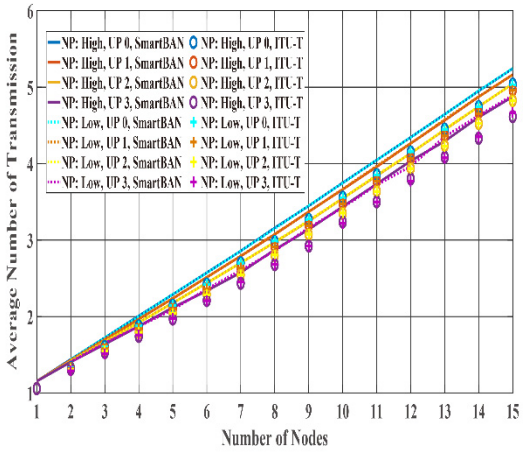


図 8: C/M Period を想定した平均送信回数（$d \cong$ 1.5 m, 飽和状態).

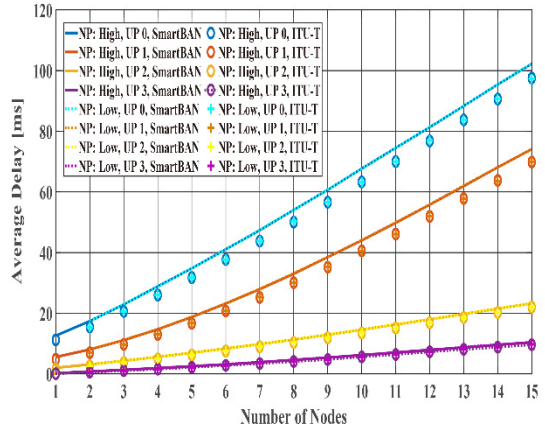


図 6: C/M Period を想定した平均遅延時間（$d \cong$ 1.5 m, 飽和状態).

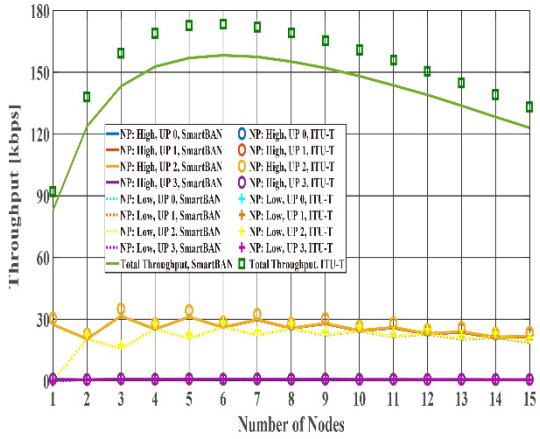


図 9: C/M Period を想定した平均スループット（$d \cong$ 1.5 m, 飽和状態).

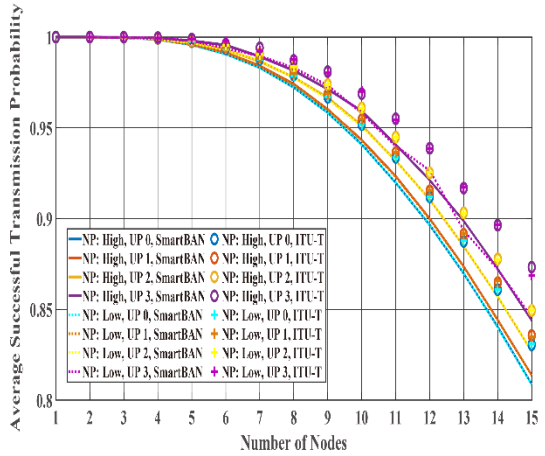


図 7: C/M Period を想定した平均送信成功率（$d \cong$ 1.5 m, 飽和状態).

6. まとめと今後の課題

本研究では，修正を行った物理層パケット構成で用いる SFD の系列として，新たに ITU-T Rec. H.223 で提案されている 16 ビットフラッグについて検討を行い，プリアンブル検出の性能評価を行った．加えて，MAC 層の C/M Period を想定し，物理層の特性も考慮に加え，データとセンサノードの両方の優先度を考慮した CP の設定方法を提案し，クロスレイヤでの性能評価についても検討を行った．計算機シミュレーションの結果として，ITU-T Rec. H.223 16 ビットフラッグの有効性と C/M Period における許容遅延時間や最大スループットを達成するノード数について確認することが出来た．

今後の課題として，Scheduled Access Period も考慮に入れた MAC スーパーフレーム全体での性能評価が挙げられる．

文　献

[1] C. R. Costa, L. E. Anido-Rifón and M. J. Fer-nández-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. Mo-bile Networks and Applications," Mobile Net-works and Applications, vol. 16, no. 2, pp. 171-193, Aug. 2010.

[3] H. Cao, V. Leung, C. Chow and H. Chan, "Ena-bling technologies for wireless body area net-works: A survey and outlook," IEEE Communi-cations 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 Chal-lenges," IEEE Communications Surveys & Tu-torials, 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 infor-mation exchange between systems - Local and metropolitan area networks- Specific require-ments: 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); En-hanced 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，ウーン ハウ チン，”高信頼なボディ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.

[14] Kento Takabayashi, Hirokazu Tanaka, Katsumi Sakakibara "Performance Evaluation of Error Control Scheme in ETSI SmartBAN PHY," in Proceedings of the 2018 Global IoT Summit (GIoTS　2018), Bilbao, Spain, pp.7-12, Jun. 2018.

[15] Kento Takabayashi, Hirokazu Tanaka, Katsumi Sakakibara, "Evaluation of Preamble Detection in ETSI SmartBAN PHY," in Proceedings of the 13th EAI International Conference on Body Area Networks (BODYNETS 2018), Oulu, Finland, Oct. 2018.

[16] Kento Takabayashi, Hirokazu Tanaka, Katsumi Sakakibara, "Integrated Performance Evaluation of the Smart Body Area Networks Physical Layer for Future Medical and Healthcare IoT," Sensors, 2019, vol.18, issue.1, 30, Dec. 2018.

[17] Multiplexing protocol for low bit rate multimedia communication, ITU-T Recommendation H.223, Jul. 2001

[18] Kamya Yekeh Yazdandoost, Kamran Sayrafian-Pour,"Channel Model for Body Area Network (BAN)," IEEE P802.15Working Group for Wireless Personal Area Networks (WPANs), IEEE P802.15-08-0780-10-0006, Apr. 2009.

使用者の状態推定に基づき動作と音声で反応する身体的引き込みキャラクタシステムの開発

岡山県立大学 デザイン学部

西田 麻希子

著者らは，発話音声の有無から身体的引き込みを伴ううなずきなどのコミュニケーション動作を自動生成する音声駆動型身体引き込みキャラクタ InterActor を開発してきた.従来の InterActor は発話内容に依存せず，身体性の共有に特化して開発・展開されており，使用者の状態によって動作を変化させる機能は実装されていなかった.そこで，これまでに InterActor に発話内単語の感情極性を用いて状態推定を行うシステムを開発した．しかし実際の人間の感情には多くの感情区分が存在する．そこで本研究では，発話活性度および発話内単語の感情極性から話者の感情を推定し，結果に基づいて反応動作を変化させる身体的引き込みキャラクタシステムを開発した．また開発したシステムを用いて，発話活性度を考慮した状態推定の有効性を検討する評価実験を行った.

1. はじめに

今日，音声認識・音声合成技術は日常的に使用できる身近な技術となっており，これらの技術を用いた受付ロボットや CG キャラクタなどの対話エージェントの研究開発も積極的に進められている．しかし，これらを活用した自動応答システムは言語情報に基づくもので，音声リズムなどの非言語情報に基づいた応答は十分に検討されていない．また，身体動作や情動表出による社会的相互作用に着目し，エージェントとのインタラクションに応用しようとする研究も進められており[(1)]，使用者の感情の推定に基づく応答動作を行うことで，より心地よいコミュニケーションのできる対話エージェントの開発が期待されている.

人の対面コミュニケーションでは，言葉だけでなく，音声に対する頷きや身振り・手振りが相互に同期することで対話者同士が互いに引き込み合い，円滑なコミュニケーションが行なわれている[(2)]．著者らは，これまでに会話音声と身体動作が同期する身体的引き込みに着目し，発話音声の有無から身体的引き込みを伴ううなずきなどのコミュニケーション動作を自動生成する音声駆動型身体引き込みキャラクタ InterActor を開発し,コミュニケーション支援の有効性を示している[(3)].従来の InterActor は発話内容に依存せず，身体性の共有に特化して開発・展開されてきた．そのため，自己否定などの否定的な発話内容に対してもうなずき動作を行い，使用者がそれを肯定動作と解釈した場合，否定的な発話感情を助長してしまう可能性がある．そこで，著者らはこれまでに発話内単語の感情極性から話者の感情を推定し，結果に基づいて反応動作を変化させる身体的引き込みキャラクタシステムを開発した[(4)]．しかし，実際の人間の感情には多くの感情区分が存在する[(5)] [(6)]．単語の感情極性のみの対応では，その単語が良い印象を持つか(Positive)，悪い印象を持つか(Negative)の判断しか行うことができず，使用者の多様な感情に対応することは困難であると推測される.

そこで本研究では，発話活性度および発話内単語の感情極性から話者の感情を推定し，結果に基づいて反応動作を変化させる身体的引き込みキャラクタシステムを開発した．また開発したシステムを用いて，発話活性度を考慮した状態推定の有効性を検討する評価実験を行った.

2. 発話活性度および発話内単語の感情極性に基づき反応動作を行う身体的引き込みキャラクタシステム

2.1 コンセプト

人の様々な感情を Arousal（覚醒度）と Valence（快・不快）の二軸で分類するラッセルの円環モデ

ル[7]（図 1）に基づいて，5 つの状態を推定したモデルを定義した（図 2）．本システムでは発話時間率 SpeechActivity(SA)を発話活性度とし，Arousal を SA，Valence の Pleasant を Positive，Unpleasant を Negative として位置付けている．キャラクタは，話者の語りかけに対して自動生成される身体的引き込み動作に加えて，推定した状態に対応した動作を行う．システム概要を図 3 に示す．

Positive，Negative の閾値は，従来の発話内単語の感情極性を用いたシステムと同様とした．SA の閾値は，実験参加者に「楽しかった話」「悲しかった話」をキャラクタに 2 分間程度話させ，全体の SA を算出した．各個人の SA を統計し，平均したものを SA の閾値とした．

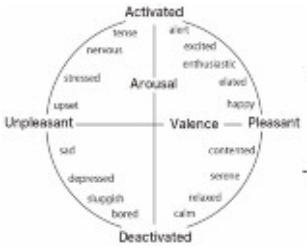


図 1：ラッセルの円環モデル

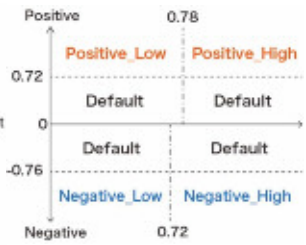


図 2：状態推定モデル

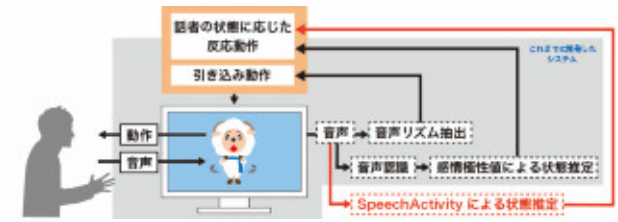


図 3：システム概要

2.2 InterActor のインタラクションモデル

音声駆動型身体引き込みキャラクタ InterActor のインタラクションモデルは，音声の ON-OFF パターンに基づくうなずき反応モデルを導入している．音声データは 16bit 22.050kHz でサンプリングし，閾値で二値化するとともに，音節間の短時間の無音区間による発話の断片化を除去するために 133msec でハングオーバー処理を施している．このモデルでは，マクロ層とミクロ層からなる階層モデルを用いて，InterActor のうなずきの予測を行っている．予測にはユニット以前のユニット時間率（ユニット区間での ON 区間の占める割合）の線形結合で表せる MA(Moving-Average)モデルを用いる．雑音は身体のゆらぎを示すノイズ成分である．予測値が閾値 0.20 を超えて，うなずきが存在すると予測された場合は，処理はミクロ層に移る．ミクロ層では音声の ON-OFF データ（30Hz，60 個）を入力とし，MA モデルでうなずきの開始時点を推定する．予測値が閾値 0.47 を超えた場合には InterActor をうなずかせる．瞬きについては，対面コミュニケーション時における瞬き特性に基づいて，うなずきと同時に瞬きをさせ，それを起点にして次の瞬きまでの時間間隔を指数分布させている．その他の身体反応の推定にはうなずきの予測値を用い，うなずきよりも低い閾値で InterActor の各部位（頭部，胴部，右肘，左肘）のうちいくつかを選択して動作させることで話し手の発話音声と関連付けている[8]．

2.3 感情極性値算出方法

本研究では，高村らの提案する単語感情極性対応表[9]を用い，発話文中の単語から正負の感情推定を行った．単語の感情極性は，その単語が一般的に良い印象（Positive）を持つか，悪い印象（Negative）を持つかを表した二値属性である．本システムでは対応表に登録された単語の一部を使用し，単語に紐づけられた極性値に基づいて発話文の極性値を推定した．

入力音声を音声認識ツールによってテキスト化し，得られたテキストを感情極性対応表内の単語と照合する．一致する単語があればその感情極性値を抽出する．一文中で一致した単語の感情極性値を x_i ，単語数を n とし，文全体の感情極性値を（1）の式にて算出した．文中に感情極性を含む単語が存在しなかった場合は値を 0 とした．

$$\text{文の感情極性値} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i \qquad (1)$$

2.4 発話活性度算出方法

図 4 のように，2 値音声をハングオーバー(133ms)処理した i ユニット（1 ユニットは ON 開始時点から

次の ON 開始時点までの区間）での ON 区間を $T(i)$, OFF 区間を $S(i)$とし，式 (2) を用いて逐次 SA を算出した.

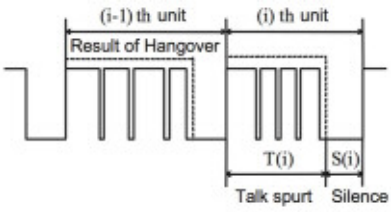


図 4 : Burst-pause of speech with hangover.

$$SA(i) = \frac{\sum_{j=1}^{6} T(i-j)}{\sum_{j=1}^{6}\left(T(i-j)+S(i-j)\right)} \qquad (2)$$

2.5 動作表現

推定された状態に対応した動作として，それぞれ 2 パターン用意した．Positive_Low では状態を維持するために 1:うなずき＋笑顔, 2:深いうなずき＋笑顔の同調動作，Positive_High では盛り上がりに呼応するために 3:連続うなずき＋笑顔, 4:うなずき＋拍手＋笑顔の盛り上げ動作を行う．Negative_Low では肯定的な発話へ変化させるために 5:手と頭を左右に振る，6:体を傾けて手を横に出す（ツッコミ動作）の否定動作，Negative_High では落ち着かせるために 7:口の開閉＋体を傾ける＋腕を上下させる（宥める），8:腕を組む＋首をかしげる（疑問）の緩和動作を行う（図 5）. また，感情極性値が Positive の閾値よりも小さく，Negative の閾値よりも大きい場合（Default）は通常のうなずき動作を行う.

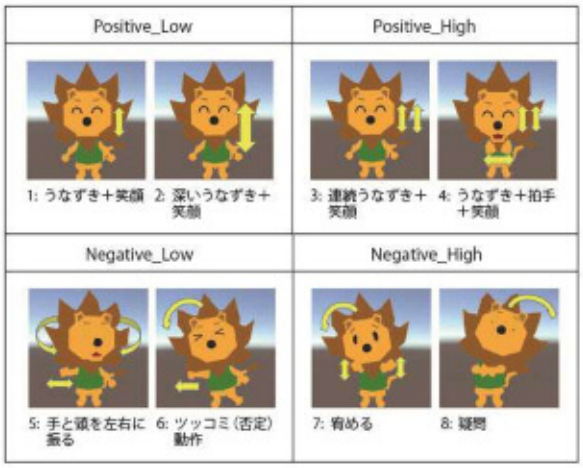


図 5 : 動作表現

3. 発話活性度および発話内単語の感情極性に基づいた状態推定の評価実験

3.1 実験方法

開発したシステムの有効性を評価するために実験を行った．実験は 2 つのモードを用意した． A モードは，従来の単語の感情極性を用いて推定した 3 つの状態 (Positive/Negative/Default) に対応してキャラクタが動作を行うモードで，キャラクタは，Positive/Negative それぞれ 4 種類の動作を行う．B モードは，SA および単語の感情極性を用いて推定した 5 つの状態に対応してキャラクタが動作を行うモードで，キャラクタの動作は前章で記述した通りである．実験参加者には発話感情（Positive または Negative）を指示し，自由に発話させた．指示した発話感情の順序は順序効果を考慮して，総当たりによるカウンターバランスをとった.

まず，各モード 3 分間ずつ話をさせ，どちらが良かったかを一対比較法により比較させた．次に，モード毎に 3 分間話をさせ，終了時に「楽しさ」「好み」「話しやすさ」「盛り上がり（Positive）／緩和されたか (Negative)」「親近感」「システムを使用したいか」の 6 項目について 7 段階官能評価を行った．また，自由記述欄に気づいたことを記入させた．実験参加者は 18～23 歳の学生 20 名（男性 10 名，女性 10 名）である.

3.2 実験結果

Positive な発話内容による実験について，一対比較の結果，両モードに大きな差は見られなかった(表 1)．また，7 段階評価の結果についても大きな差は見られず (図 6)，Wilcoxon の符号順位検定を行ったが有意差は見られなかった．Negative な発話内容による実験についても，一対比較の結果，両モードに大きな差は見られなかった (表 2)．また， 7 段階評価の結果についても大きな差は見られず（図 7)，Wilcoxon の符号順位検定を行ったが有意差は見られなかった.

	A	B	Total
A		12	12
B	8		8

表 1：一対比較結果

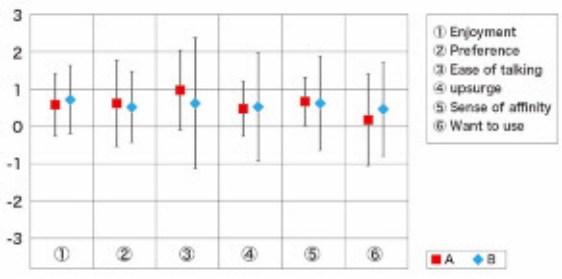


図 6：7 段階評価結果

	A	B	Total
A		11	11
B	9		9

表 2：一対比較結果

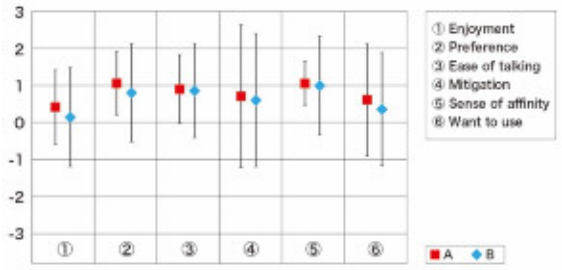


図 7：7 段階評価結果

3.3 考察

両モードに大きな差が見られなかった原因として，モードの判別の難しさが考えられる．本実験では自由に発話させたが，実験参加者に対して発話感情を指示したものの，Positive/Negative の閾値を超える単語があまり発話されなかった．また短時間の実験中で SA が大きく変動しなかったため，出現する動作が従来のシステムと比較して半分になっただけの場合や，偶然両モード共に高頻度で出現する動作がある場合など，実験参加者にはモードの判別がつきにくかった可能性がある．

キャラクタの動作表現については，Positive な発話内容に対する動作については「話の頂点で笑ってくれたときはうれしかった」などの肯定的な意見が見られた．一方で，Negative な発話内容に対する動作については，宥める動作は評価が高く，首を横に振るなどの否定的な動作については「ツッコミを入れるのは，話を聞いてほしいのでよくない」などの意見が見られ，評価が低かった．今後は各状態に適した反応動作の検討を行うことで，より話者の状態に対応したシステムになると考えられる．

4. 結語

本研究では，発話時間率に基づく活性度および発話内単語の感情極性を用いて話者の状態を推定し，推定に基づき反応動作を行う身体的引き込みキャラクタシステムを開発した．従来の発話内単語の感情極性による状態推定システムとの比較実験を行ったが，十分な効果は認められなかった．今後さらに検討が必要である．

謝辞

本研究を遂行するにあたり，ご支援賜りましたウエスコ学術振興財団に深く感謝いたします．

文献

(1) アレックス(サンディ) ペントランド著,柴田裕之訳，安西祐一郎監訳，正直シグナル非言語コミュニケーションの科学，みすず書房(2013)(原著：Pentland, A., Honest signals: how they shape our world, The MIT Press (2010)).

(2) Condon, W.S. and Sander, L.W., Neonate Movement is Synchronized with Adult Speech, Science, Vol.183 (1974), pp.99-101.

(3) Watanabe, T., Okubo, M., Nakashige, M. and Danbara, R., InterActor: speech-driven embodied interactive actor, International Journal of Human-Computer Interaction, Vol.17, No.1 (2004), pp.43-60.

(4) 西田麻希子，太田靖宏，渡辺富夫，石井裕：発話内単語の感情極性に基づき反応動作を行う身体的引き込みキャラクタシステム，日本機械学会論文集，vol.83,No.846(2017), p.16-00148

(5) Ekman, P., Friesen, W. V. and Ellsworth, P., “What emotion categories or dimensions can observers judge from facial behavior emotion in the human face”, New York: Cambridge University Press (1982), pp.39-55.

(6) Parrott, W., “Emotions in social psychology”, Psychology Press (2001).
(7) Russell, J. A. “A circumplex model of affect”, Journal of Personality and Social Psychology, Vol.39, No.6(1980), pp.1161-1178.
(8) Watanabe, T., Okubo, M., Nakashige, M. and Danbara, R., “InterActor: speech-driven embodied interactive actor”, International Journal of Human-Computer Interaction, Vol.17, No.1(2004), pp.43-60.
(9) 高村大也, 乾孝司, 奥村学, “スピンモデルによる単語の感情極性抽出”, 情報処理学会論文誌, Vol.47, No.2 (2006), pp.627-637.

展示空間の文脈を伝えるテキスタイルデザインの開発と提案①

岡山県立大学デザイン学部

岡本　汐加

短期間の展覧会では、会場としての空間は作品展示のための「箱」と化してしまう。展示内容を媒介として、会場訪問から作品鑑賞の経験と「場」の文脈とをつなぐことはできないだろうか。2020 年 3 月に岡山市天神山文化プラザ第 3 展示室にて個展開催の機会を得たことをきっかけとして抱いたこの問いが、本研究制作の発端である。これに対して、建築物として文化的価値の高い会場の展示空間そのものをテーマとして作品制作と展示行い、市民に対してその価値を伝えることができるのではないかと考えた。本年度は、筆者の専門で作品制作の分野であるテキスタイルデザインを開発するにあたり必要とするインスピレーションの探求として行った情報収集の結果について報告する。テーマとなる天神山文化プラザが前川國男による建築であることから、先ず氏の作品に対する知見を深める必要があるとし、主要作品の現地視察と文献調査を行い、時代とともに変遷する前川建築の意匠に関する傾向を明らかにし、天神山文化プラザという「場」におけるテキスタイルデザインの展望を広げた。

1. 背景

岡山市天神町に所在する文化施設である天神山文化プラザは、ホールや展示室を中心機能に備えた文化施設である。様々な芸術文化活動の発信拠点として活用されており、岡山県ゆかりの新人作家を紹介する展示「天プラ・セレクション」が定期的に開催されており、この度筆者は個展（テキスタイルデザインの展示）開催の機会を得た。当該施設は、日本のモダニズムを牽引した建築家・前川國男による設計で、1962 年に岡山県総合文化センターとして竣工した、岡山県を代表する近代建築物である。

今回開催する個展を通して筆者が挑戦するのは、展示空間そのものを制作のテーマとして取り上げ、鑑賞者がその「場所」の文化的価値を再確認するきっかけを与えることである。従来の作品展示では、作家による芸術作品を鑑賞することが目的であり―巡回展はその最たる例である―、「箱」としての施設そのものが価値ある作品であるという事実に出会う機会を得難い傾向にあると考えた。事実を陳列する歴史資料展示とは異なり、作家による創作がフィルターとなることで、鑑賞者の「気づき」を刺激できるのではないかと推測した。そこで、今回の個展でテーマとしたのが建築作品としての「天神山文化プラザ」である。展示空間では、より鑑賞者との距離を縮め内容を理解してもらうために、研究制作のプロセスや調査結果も展示物として扱い公開することを前提とする。

展示期間が 2020 年 3 月であることから、本年度は天神山文化プラザと前川國男による建築とその意匠性への理解を深めることに重点を置いた。

2. 方法

主題である天神山文化プラザの視察のほか、全国に現存する前川建築設計事務所による主要公共文化施設（美術館・市民会館等）を調査した。対象施設における場所や時代背景が、どのように建築デザインに影響を及ぼしているかを確認する為に、地域別に視察した。（図 1）オフィス施設、商業施設、個人邸等その他の種別に該当するものは対象外としたが、調査対象からごく近隣に存在する場合は、見学を行なった。また、舞台となる天神山文化プラザ第 3 展示室に入場制限がないことから、公にされた空間を対象とした。 具体的な項目は、筆者がデザインを開発するにあたり必要とする情報として以下とした。

①外観と周囲環境および経路
②各空間に付与された機能とその位置関係
④空間構成要素の意匠（天井・床・壁等）
③竣工当時との比較（当時の雑誌掲載情報参照）
⑤前川建築に起因する活動等

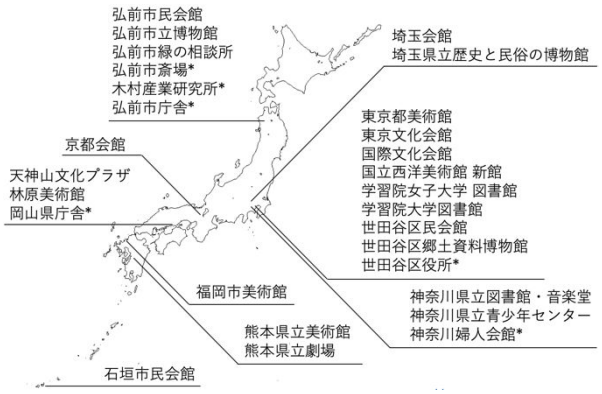


図 1.調査場所

©CraftMAP: http://www.craftmap.box-i.net/

3. 結果分析①

視察を終えた結果、地域・気候風土が意匠に決定的な影響を与えている印象は見受けられなかった。よって、調査結果を天神山文化プラザを基準として年代順(表 1)に着目した結果､以下のことが明らかとなった。

①外観と周囲環境および経路

1950 年代～1960 年代前半まではプレキャストコンクリート、1960 年代後半からは赤茶打込みタイルの外観へ移行している。埼玉会館において本格的な打込みタイル使用へと移行するまで、東京文化会館を頂点として天神山文化プラザは外観意匠の過渡期であったと考えられる。打込みタイルの使用と連動しているのが、正面入口に至る経路としてのエスプラナードと広いアプローチの導入である。

天神山文化プラザには低天井のピロティがあり、エントランスは別フロアに複数持ち、かつ西側は入館までに明らかな階段昇降があるという点で特殊である。これは、当初の図書館とホールを機能分割していたことに起因し立地が影響しているようだが、竣工時の周囲環境が屋根瓦だったことから、外観と行為により非日常が象徴されていたと考えられる。

②各空間に付与された機能とその位置関係

現状、天神山文化プラザでは西側 2 階から入館してすぐにロビーがあり、目前(東)に開口部(光庭)をもちながらもエントランス自体が広く開口部(西)となっている。同様の熊本県立劇場は主空間の大ホール側ホワイエも西に開口部をもち、共に西陽を遮るブラインドが設置されている。西陽に対して庇以外の対応が成されていない天神山文化プラザは竣工当初を考慮すると、現在は閉ざされている閲覧室の北側開口部が主であったと考えられ、神奈川県立図書館をはじめ多くの類似例のように入館時とは異なる性質の空間を体感し活動していたと考えられる。また多くの施設で喫茶等があり、南あるいは北に開口部をもつ例が圧倒であった。

③空間構成要素の意匠

極彩色使用は東京文化会館が発端だと考えられ、天神山文化プラザは弘前市民会館とも類似点が多い。以降は①の外観と同様の変化を辿り、内部空間床に赤茶網代張りや壁面タイルの侵入が恒例化し、より素材感を強調させた意匠が外部との境界を曖昧にする効果をもたらしている傾向がある。主要空間だけでなく便所や階段等の小空間でのアクセントカラーも目立った。

④竣工当時との比較

天神山文化プラザは図書館を主とする施設から機能が変化したため、前述のように旧閲覧室の窓を封鎖することにより展示室を創出した。機能が変化(削減)した他の例として京都会館と神奈川県青少年センターは大幅な改装を行っており、他施設においても老朽化・バリアフリー化を理由とした改装や増築が目立った。改装時には一時失われていた床壁面や家具の復元が成されるケースもあり、前川建築としての意匠が尊重される一方、天井の白塗り・照明増設・飲食/ラウンジスペースの追加等、現代的な感覚に適応する施策が見受けられた。名称変更した天神山文化プラザ(旧・岡山県総合文化センター)は、建築自体にメスを入れるような大幅な増改築等は耐震補強以外に行われておらず比較的維持状態が良く、独自の変遷を辿っている。

⑤前川建築に起因する活動等

前述のように意匠を復元・維持しての改装を行った施設においては、建築意匠を説明するリーフレットが配布されている傾向にあり、埼玉会館や東京都美術館などイベントを主催しているケースもある。2000 年代以降は近代建築の摩耗と老朽化により取り壊しやオーセンティシティの損失が相次ぐ中、昨今に「改装」を行うのは前川建築としての意匠を尊重しているのと同義であるといえよう。東京文化会館と並び、建築としての維持状態が良い天神山文化プラザは、現状のままで建築紹介等行うことができる稀な例であることが明らかとなった。

	施設名	竣工年	①外観と周囲環境および経路			②各空間に付与された機能とその位置関係					
			周囲環境	外観	正面経路	エントランス	ロビー/ホワイエ	閲覧室	主展示室/舞台	喫茶等	事務
1	神奈川県立図書館	1954	文化施設地帯	コンクリート	正面、段	東	北に開口部	北・東	-	-	西
2	国際文化会館	1955	繁華街から少し離れた市街地	コンクリート	坂道	北	南に開口部	南西	-	南に開口部	北・東
3	世田谷区民会館	1959	市庁舎隣接	コンクリート	ピロティとアプローチ	北	北・南に開口部	-	西部	南に開口部(半地下)	東
4	京都会館	1960	平安神宮近く、美術館隣接	コンクリート、赤茶タイル	広場アプローチ、ピロティ	南	南に開口部	-	北西部	南東に開口部	南西
5	東京文化会館	1961	上野公園内、文化施設地帯	コンクリート	庇	北東	北に開口部	北東部	南西部	北に開口部(内部)	南東部
6	国立国会図書館	1961	行政エリア	コンクリート	天井高アーケード	南東	天窓	南・北	-	北東	フロア別
7	神奈川県青少年センター	1962	文化施設地帯	コンクリート	庇	東	南に開口部	南東(上階)	西部	北東に開口部	南部
8	天神山文化プラザ	1962	文化施設地帯	コンクリート、石垣	坂道、ピロティ、階段	2階西、1階南	西に開口部	南西	北部	-	南部
9	林原美術館	1963	岡山城近く、文化施設地帯	赤茶タイル、石垣	階段アプローチ	東	南に開口部	-	北西部	南に開口部	南東部
10	学習院大学図書館	1964	大学キャンパス内	コンクリート	敷地内経由	西	西に開口部	南部	-	(屋上)	東部
11	世田谷郷土資料館	1964	住宅地、史跡隣接	コンクリート	正面	北西	天窓	天窓	全方位	-	南西部
12	弘前市民会館	1964	弘前城公園内	コンクリート	ピロティとアプローチ	南	北西に開口部	-	南東部	北東に開口部	西部
13	埼玉会館	1966	県庁近く、市街地	赤茶打ち込みタイル	段差有りエスプラナード	南	北に開口部	-	南東・北西	南に開口部	地下・西棟
14	埼玉県立博物館	1971	大宮公園内	赤茶打ち込みタイル	広場エスプラナード	南西	南東に開口部	-	北・東	南に開口部	北
15	東京都美術館	1975	上野公園内、文化施設地帯	赤茶打ち込みタイル	広場エスプラナード、半地下	南(地下)	南に開口部	東部	西部	南に開口部	北西
16	熊本県立美術館	1976	熊本城、二の丸公園隣接	赤茶打ち込みタイル	段差有りエスプラナード	南西	南東に開口部	-	北西及び地下	南東に開口部	北東
17	弘前市博物館	1976	弘前城公園内	赤茶打ち込みタイル	段差有りアプローチ	南	北に開口部	-	西	-	南東部
18	国立西洋美術館新館	1979	上野公園内、文化施設地帯	緑打ち込みタイル	旧館から直結	本館直結(南)	南に開口部	-	北東部	北に開口部(本館)	北西
19	福岡市美術館	1979	福岡城跡・大濠公園隣接	赤茶打ち込みタイル	段差有りエスプラナード	2階北/西(車用:1階南)	南・北に開口部	-	2階北東部	北西に開口部	1階北東部
20	弘前市緑の相談所	1980	弘前城公園内	赤茶打ち込みタイル	正面	南	南東に開口部	-	-	-	東部
21	学習院大学戸山図書館	1982	大学キャンパス内	打ち込みタイル	敷地内経由、段	北東	天窓、地下南に開口部	全方位	-	-	南東
22	熊本県立劇場	1982	繁華街から少し離れた市街地	コンクリート・打ち込みタイル	キャノピーとアプローチ	西（車用:東）	西に開口部	-	北・南	南西に開口部	北東
23	石垣市民会館	1986	市民公園・図書館隣接	コンクリート・赤茶打ち込みタイル	ピロティとアプローチ	北東（車用:西）	南に開口部	-	北部	南西に開口部	南東

	③空間構成要素の意匠（主要コモンスペース）				④竣工当時との比較	⑤前川建築に起因する活動等
	天井	床	壁	照明		
1	白	グレー絨毯	白、ホローブロック	蛍光灯	書架増加、新館接続、音楽堂改装中	リーフレット配布、図書館開放日
2	白	グレー絨毯	白	埋め込みスポット、蛍光灯	全面改装	-
3	コンクリート梁、白	赤絨毯、赤茶網代張り、石、リノリウム	白	スポット	昇降機設置	-
4	コンクリート梁、白	ベージュ、石畳円形、赤茶網代張り	白、オレンジ、ブルーグレー、赤茶タイル、赤	間接照明	内装全面改装	-
5	青、赤	白灰幾何学張り	陶レリーフ、コンクリート、赤、青、金	ランダム埋め込み、行灯	リハーサル棟(地下)増築	各種リーフレット配布
6	コンクリート梁格子	石畳円形	コンクリート、ブロック	蛍光灯、天窓	新棟接続他	-
7	直線	ベージュ	コンクリートブロック	埋め込みスポット	内装全面改装（科学館撤退につき）	-
8	青	赤茶網代張り、赤茶・オレンジリノリウム	コンクリート、白	ランダム埋め込み	図書館が展示室化、ピロティ黄色塗り	映像放映、イベント主催
9	白、黒	黒リノリウム	白、コンクリート、赤茶タイル	埋め込みスポット	ロビーが喫茶化	-
10	白	グレー	グレー、ベージュ	蛍光灯	ロビーが密化	-
11	白	木目	白	天窓、スポット	新館増設接続、入口移動、白塗り	-
12	コンクリート梁、青	白黒いも目張り、薄緑リノリウム	研りコンクリート、白、青、緑、赤、黒	ランダム埋め込み、シャンデリア	ロビー下部改装、間接照明、ステンドグラス	（弘前市全体での取組）
13	白アーチ	赤茶網代張り	石、木目・黄・赤・紫・緑	シャンデリア	地階に別出入口・事務局集約、ホワイエ白塗り	各種冊子・報告書・模型設置・イベント主催
14	コンクリート梁	赤茶網代張り	赤茶タイル	シリンダー照明	増改築など無し、一部体験工房化	-
15	赤茶アーチ	赤茶網代張り	赤茶タイル、青・赤・緑・黄、研りコンクリート	円状ペンダントライト	中央棟増築（売店、食堂、ラウンジ追加）	定期建築ツアー、各種リーフレット配布、模型設置
16	コンクリート格子、青	赤茶網代張り	オレンジ（ロビー）	シリンダー照明	渡り廊下増設	リーフレット配布
17	白	赤茶網代張り	研りコンクリート、赤茶タイル	ランダム埋め込み	-	（弘前市全体での取組）
18	丸マス目(天窓)	赤茶網代張り、木目	白	天窓	増改築など無し、テラス侵入不可	本館(コルビジェ)に関する説明
19	コンクリートアーチ	赤茶いも目張り	赤茶タイル、研りコンクリート	シリンダー照明	出入口新設、カフェ追加	リーフレット配布、パネル設置
20	木目	赤茶網代張り	研りコンクリート	蛍光灯	照明の蛍光灯化	（弘前市全体での取組）
21	マス目(天窓)、白	グレー絨毯	白	天窓、デスクライト	セキュリティゲート設置	リーフレットに言及
22	青、赤	白黒吉原繋ぎ張り	コンクリート網代張り、研りコンクリート、緑	シリンダー照明	-	パネル設置
23	青、ホローブロック	赤茶網代張り	赤茶タイル、黄緑、赤茶	直方体照明	外付け階段設置	用紙配布

表1. 調査結果（23ヶ所）

4. 結果分析②

本項では、前述の調査結果を踏まえ、テキスタイルデザインをはじめとした家具等において必要不可欠である色彩に関して、3.③をベースに天井・床・壁の各項目を各施設ごとに表 2 にまとめた。カラーは、実際に触れられる距離の場合は DIC カラーチャートを当てて近しいもの、触れられない場合は推測で記録した。上段より天井・壁・床とし、カラーの幅は多用されていたものほど広く表示した。また、3.において「素材感を強調させた意匠が外部との境界を曖昧に」「アクセントカラー」の結果が得られた為、外観の意匠と素材、椅子の張り生地等で使用されていたカラーをそれぞれ併記した。（いずれも調査時の状態であり、オリジナルでない場合がある）

＜天井＞天井のブルーは外観の変遷に関わらず、東京文化会館～最晩年まで出現している。東京文化会館、天神山文化プラザ、弘前市民会館においてはランダム埋め込み照明と併用することによって、夜空に見立てるような室内空間ならではの幻想的演出がされている。照明が窓ガラスに反射して倍増するだけでなく、屋外から認識できるほど煌びやかな装飾効果である。外部から見た際に、内部では別世界が営まれていることを誇示しており、コンサートホール・劇場に相応しいものであるが、他 2 施設に比べ天神山文化プラザがホール併設とはいえ県立図書館が主とした施設であったことを考慮すると、割に華やかな図書館エントランスであったことが想像できる。また西陽が当たるにも関わらず施しがないのは、この装飾効果を優先していたと考えることができるのではないか。これらのことから、天井の意匠というものが、両地点において別々の装飾的機能を担保しつつ、視覚的コミュニケーションにより内と外を繋ぐ媒介としての役割を担っていたのではないかと考えられる。

＜床・壁＞3.で述べたように、京都会館が後にメインストリームとなる打ち込みタイル使用の前兆であっただろう事実は、室内空間意匠からも見受けられる。床面において、天神山文化プラザ以前で屋外のアプローチ等で用いられていた網代張りは京都会館で使用され、埼玉会館では室内に侵入しているが、壁面においては先に京都会館で侵入している。後に殆どのケースにおいて室内の床面・壁面に外観素材の部分侵入が頻発しており、さらに斫りコンクリートも導入されていることから、天神山文化プラザをはじめプレキャストコンクリートが外観の場合は、素材によって外観とのつながりを演出していなかったと考えられる。

アクセントカラーに関しては、赤・黄・青(緑)の使用が顕著であった。東京文化会館や東京都美術館では階段部分において壁面から天井がひとつなぎに施されており、壁のみの場合であっても扉やトイレ、脇のスペース等の特有の性質・機能を持っている部分に施されている傾向があった。その他、より小さな部分として椅子の張り生地等で用いられていたカラーが共通している傾向が高いことも明らかとなった。

5. 結果分析③

本項では、3.④の竣工当時との比較において、天神山文化プラザの当時雑誌掲載情報を参照し、特に主題の第 3 展示室に関して天井、床・壁の意匠と趣旨を確認し、4.で判明した外・内の観点で着目した。

＜外から＞外壁のルーバーは夏至において閉館時の直射日光を遮ることを目的としており、(足立, 1962) 北側にはより間隔が狭いものが取り付けられ、外からの視界を遮る役目も果たしている。唯一内部が見られる場所というのが、現在樹木で生い茂っている石場であり、天井の蛍光灯が確認できる。当時はピロティと連動して子供達の遊び場となっていたようで、点灯する夜間は人気はなかったと考えられる。よって北側閲覧室（現・第 3 展示室）は、4.で判明した青天井と照明が施されたエントランスとは異なり、外界からの視点は最重要視されなかったということが判る。

＜内から＞北側に面する閲覧室（現・天神山文化プラザ第 3 展示室）には窓側に壁はなく、床から天井まで水平連続窓が空間を覆っており、読書のために十分な光を空間に導入していたと思われる。内側にはルーバーの物理的凹凸は及んでおらず、窓越しに樹木を眼下に街を一望でき開放感があり今でいうオープンプランのパブリックオフィスといえる。しかし当時の批評では、この吹抜け空間が読書という内面的な場所としては無機質（能, 1962）だと述べられている。規則正しく並ぶ閲覧席と窓以外は何もなく、リノリウムの床



表2. 調査結果（施設内部に使用されたカラーと外観）

に白い壁には書架も無かったようだ。実際に、開架はメザニン下部のみと十分ではなかったようで、後に現在の県立図書館が誕生した原因の一つであったと考えることができる。なお、掲載雑誌がモノクロであるためカラーについては判断することができないが、1 枚のカラーページからロビーの椅子を確認することができた。改装後の他施設で復元されたものと同様の赤と緑が一貫して用いられていたことが判った。

6. まとめ

3.-5. で得られた結果を本研究の展開を想定した着眼点で要約した。前川建築の意匠に関する全体的な傾向と、天神山文化プラザの特徴が必ずしも同じでは無いことが明らかとなった。

＜前川建築全般について＞

- 周囲環境と隔たれたコンクリートの外観
- 外部・内部の境界を曖昧にする素材づかい
- 特有の性質・機能を持っている部分と家具に施される共通のアクセントカラー
- 内部の営みを外部へ伝達する天井の意匠
- タイルのある広いアプローチ
- 打込みタイルの外観は埼玉会館以降で主流

＜天神山文化プラザに関して＞

- 非日常性の象徴：当時の周囲環境との対比
- 開口部の位置で異なる性質の空間を創出
- 水平連続窓使用による空間への自然光導*
- ルーバー*による外的要素(日光と視線)制御
- 窓越しの眺望：樹木を眼下に街を一望
- 経路の要：ピロティ*
- 中心機能：旧閲覧室（現・第 3 展示室）
- 良好な維持状態
- 無機質なオープンプランと吹き抜け*
- ロビーの華やかさ
- 他施設とも共通する使用カラーと家具等

*かつて公にされていた屋上を加えると、前川國男の師であるル・コルビジェが提唱した「近代建築 5 原則」が特徴の裏付けとして顕著に含まれている。

7. 今後への展開

これまでの内容を踏まえ、天神山文化プラザ第 3 展示室に関するテキスタイルデザインの可能性について、現在の状態/過去の状態それぞれの問題点から検討し、本研究の展望とする。

＜①自然光がある展示空間＞展示用に設置された不可動壁面が、当初設計の水平連続窓がもたらす室内空間への効果と意匠を無いものにしている。華やかなロビーと固定書架が無い空間は、図書館として恒久的に機能する予定ではなかったと予想でき、展示室への用途変更は合理的である一方、不可動壁面の必要性は問われる。Canadian Museum of Nature や Kolumba Museum 等、開口部の自然光を受け入れた展示空間は多数存在し、実際に UV を制御するガラスを使用すれば、作品へのダメージも軽減される。企画展示が主であれば、ホワイトボックスではない別の方法で空間を区切り、光を操作することで柔軟なギャラリースペースを構築できると考える。

＜②滞在する場所＞天神山文化プラザには、1 階ホール前以外には飲食・休憩スペースが無い。展示によっては椅子が設置されるが、じっくりと鑑賞したり、思考する機会が限られている。欧米はもとより、近年国内でも蔦屋書店等カフェ併設の書店、Wework 等のコワーキングスペースなど機能を共有する場所が注目されており、展示空間も例外ではないと考える。家でもオフィスでも商店でもない空間–いわば「広場」の役割を担うのが公共文化施設の原点であり、象徴的存在感をもつ天神山文化プラザの本質であると考える。”無機質”と評されたのは、プライバシーとコンフォートが欠如し人間的空間で無いことを示唆している。

①と②を主題とし、天神山文化プラザが前川建築であることを尊重して新たに構築できる空間に対して、テキスタイルデザインが役割を果たすことができると考える。

引用文献

岡山県総合文化センター，建築文化，彰国社，1962，8 月号，p. 64

岡山県総合文化センター，建築，中外出版，1962，8 月号，p. 17

教育効果のある木育玩具のデザイン指標づくりと研究開発

岡山県立大学　デザイン学部

林　秀紀

概要

日本は国土面積の約 7 割を森林が占めるものの、国産材の使用率は約 3 割程度に留まり利用促進の取組みが行われてきた。林野庁が推進する「木育」は木の文化や理解を深め国産材利用の意義を学ぶ教育活動である[注 1]。著者らは、予備研究において、「木育玩具による遊びの種類と教育効果との関係指標」をまとめ、消費者や生産者にとって利用価値のある資料の作成を目指した。本稿は、木の里工房木薫と岡山県立大学林研究室の産学プロジェクト活動の中で行われた未就学児を対象とした木育玩具のデザイン開発について報告する。開発プロセスは、予備研究の資料や保育園での観察調査で得られた知見より木育玩具のプロトタイプを制作し、保育園や地域の木育イベントでの実験検証を実施した。検証の結果、子どもの身体能力や知的能力の成長を促す効果が確認され、購入の際に指標を参考にすれば、玩具の選択が容易になる可能性が明らかになった。

１．はじめに

素材に木材を使い子どもの知育や成長を促す効果のある玩具を木育玩具と呼ぶこととする。林野庁では、2010 年から、東京おもちゃ美術館が厳選した木のおもちゃのセットを各地に運び、子どもたちが木のおもちゃに触れる機会を全国に広める「木育キャラバン巡回事業」や新生児に木製玩具をプレゼントするなどの取組「ウッド･スタート」等の開発を支援している[注２]。この状況にともない、国産材を使用した木育玩具が徐々に注目されるようになってきたが、保育士や幼児を持つ父母へのヒアリング調査（2017 年 9 月）によると、「木育玩具を購入する際に子どもの発達段階に合わせて玩具を選ぶための明確な指標がない。高価な木育玩具を購入しても直ぐに飽きてしまい楽しく学びながら遊んでもらえない場合がある」などと言った意見が寄せられた。そこで、単なる遊びのおもちゃというだけではなく、教育効果のある玩具として両親が安心して選び、購入できるガイドの必要性を感じた。それに加え、生産者側にとっても、子どもの発達段階の理解を踏まえた玩具の指標があれば、教育効果を考えながら的確に創作ができ、長く愛用してもらえるような玩具を製造できるのではないかと考えるに至った。こういった背景から、消費者や生産者が有効活用できる資料の必要性を感じ、著者らの「木育玩具の分類とその教育効果の調査分析」［注３］の予備研究の中で、木育玩具による遊びの種類と教育効果との関係指標をまとめた。本稿では、この指標と保育園での観察調査を踏まえて、未就学児を対象とした教育効果のある木育玩具のプロトタイプを制作し、保育園や地域の木育イベント（2017 年 12 月）において、デザイン指標の有効性について実証評価した結果について報告する。

なお、本活動は岡山県英田郡西粟倉村を活動フィールドとした。西粟倉村は 2009 年に百年の森林事業を開始して以来、県内で唯一ウッド・スタート宣言をした自治体である。木育玩具の研究制作活動を行うには大変都合が良く、西粟倉村役場の協力を得、木の里工房木薫と岡山県立大学林研究室の産学プロジェクトとして実施した。

２．予備研究について

本開発において参照した予備研究「木育玩具の分類とその教育効果の調査分析」は次のプロセスで進めた。

(1) はじめに、認定 NPO 法人日本グッド・トイ委員会が 2004 年～2017 年に選定した木育玩具 164 点のカタログ写真をもとに、KJ 法と数量化理論Ⅲ類、クラスター分析を用いて、遊びの種類ごとに新たな分類を行った。

(2) その分類された代表的なサンプル 58 点を用いて 5 段階評定尺度のアンケート調査を行い、その回答結果を用いて因子分析とクラスター分析、重回帰分析を計算して教育効果の分析を行った。

(3) さらに、5 段階評価の平均値の折れ線グラフを分析して、遊びの種類と教育効果との関係指標（表 1）をまとめた。

表 1　遊びの種類と教育効果の関係指標

積み木	限定した使い方よりは、組立てたものを「見立て」たり自由に遊べるものの方が創造力や考える力を伸ばす効果が期待できる。組立て方は凹凸やねじ式、穴にさす行為を入れると手先の発達に役立つ。他の玩具との組み合わせも効果的である。
ごっこ遊び	ごっこ遊びによる「見立て」や物語をつくる遊びは創造力や考える力を伸ばす効果がある。子ども同士や大人と一緒に遊ぶことができるような玩具はコミュニケーション力や社会性を養成できる、遊びが広がり楽しさを増幅させる効果がある。
くるま	くるまを押したり引いたりすることは手先や手首の発達に効果的である。くるまが転がる動きを目で追うことも視力の向上などに役立つと考えられる。他の遊び（積み木、ごっこ遊び、音で遊ぶ）と複合させるとさらに教育効果が発揮される。
ころがす遊び	他の遊び（積み木、ごっこ遊び、音で遊ぶ）と複合させるとさらに良い効果が生まれる。ボールを転がす遊びと同様に、コースをつくって転がしたり、回転する動きを加えると、創造力、考える力、空間認識力に対しても教育効果が発揮される。
ボール遊び	ものを口にいれて確かめる時期には誤飲の恐れがありボール遊びは注意する必要がある。積み木でコースを作ってボールを転がす遊びは創造力、考える力、空間認識などの教育効果が高まると予想される。
けん玉遊び	手先がある程度発達してくるとけん玉遊びは飽きずに集中力を養成するのに効果的である。けん玉を自分で工夫して組み立てるような遊びを提供すると、新たな楽しみや教育効果がプラスされる。
音で遊ぶ	手先の発達には効果が期待でき、玩具として遊びが分かりやすい半面、一人遊びになりやすいことが推察される。他人と一緒に遊べるような要素が加わると、マイナス面を改善できる。
バランス遊び	手先、集中力、パターン認識の発達に効果があると認められている。長期間遊べることに加え、他人とのコミュニケーションにも効果的な玩具である。モチーフを工夫すれば、どんな年齢層にも対応が可能である。
文字・お話あそび	昔話やおとぎ話を取り入れた玩具はごっこ遊びにも使用できるため、創造力、考える力の発達に役立つと考えられる。複数で遊べるような仕掛けを加えると、さらに遊びが広がりコミュニケーション力が養成される。
ゲーム	ゲームは遊び方が限定される傾向があるが、将棋や知恵の輪などの日本の伝統玩具は知育にも効果が高い。様々なデザインやルールのアレンジより、飽きずに長く遊べるような玩具を提案できる可能性がある。
コマ	紐をつかったり指で回したりすることで手先の発達に役立つ。回す行為に何か別の要素を加えると工夫があると新しさが表現できそうである。
パズル	手先の発達、創造力、集中力、パターン認識力、知育効果が高い遊びを提供できる。空間認識力を向上させるには立体的なパズルも有効であると考えられる
迷路	パズルと同様の効果が期待できる。他人と一緒に遊べるとさらに遊びが広がる効果が期待できる。

3．木育玩具デザイン開発のプロセス

3－1．保育園での観察調査

予備研究で得られた表 1 の指標の有効性について確認し、子どもへの教育効果を考える上で必要となる部分を補完する目的で保育園での観察調査を実施した。予備研究では木育玩具による遊びを 13 種類に分類したが、それに該当する代表的な木育玩具既存製品の 20 点を選定し、保育園に持ち込んで子どもが実際に遊んでいる様子を観察するとともに特徴的な行為について保育士へのインタビュー（2017 年 7 月）を行った。0 歳児クラス（10 名）、1 歳児クラス（17 名）、2 歳児クラス（17 名）、3 歳児以上のクラス（29 名）の 4 クラスで園児の遊ぶ様子を観察した結果分かったことは以下のような要点であった。

- 身体能力の発達度合いにより遊び方が大きく変化する。
- 1 歳前後で言葉を話し始めると見立てやままごと遊びが始まる。
- 3 歳児以上になると細かい手先の動きが可能になり創造力も備わるため、バランス、パズル、迷路、組立遊びが子どもの好奇心を刺激する。
- 乗り物のおもちゃは年齢問わず関心が高く子ども同士のコミュニケーションを促進させる。

予備研究により明示した指標では、子どもの成長段階で獲得できる能力と遊びの関係性については触れられていなかったが、保育園での観察調査により子どもの教育時期についてさらに詳しい情報が得られた。



図 2　保育園での観察調査（高島第一保育園）

3－2．要求仕様の整理とデザインの可視化

予備研究で得られた指標および子どもの遊び行為の観察調査（図 2）で得られた項目をプロジェクトメンバーとレビューした。具体的には、子どもが遊ぶ場面において他の子どもと関係しながら、どのように木育玩具を扱い遊びの体験をしているかについて、映像を確認しながら分析し、教育効果のある木育玩具の要求仕様を把握した。その後、各プロジェクトメンバーが仮説としてデザインコンセプトを考案し、複数案のアイデアスケッチから「積み木」「音で遊ぶ」「ままごと（ごっこ遊び）」「バランス遊び」「ゲーム」「くるま（乗り物）」の 6 種類に含まれる 9 点のデザイン案のプロトタイプを制作した。制作は産学プロジェクトの協力企業先である西粟倉村の木の里工房木薫で行い、材料は西粟倉村の山林から伐採されたスギ、ヒノキの間伐材である。これらの木材は比較的柔らかく温かみのある素材で香り高いことが特徴である。建材としても利用さ

れているため安全性に関して問題はない。

３－３. 保育園および木育イベントでのデザイン評価

制作したプロトタイプ 9 点について、評価のポイントは以下の通りである。

・安全性の確認、けがの恐れがないか
・想定した遊び方やデザインの意図が伝わっているか
・子どもへの教育効果が確認できるか
・子どもの関心度合いはどうか

これらの評価と指標の検証を行うため、再び保育園（図 3）や西粟倉村木育イベント（図 4）での実験を行いその結果を評価表にまとめた。（表 2）

３－４. デザインの改良

プロトタイプの評価から問題が指摘されたモデルについて原因と改良方法についてプロジェクトで議論した。特に遊び方が理解されなかったもの、想定通りの教育効果を期待できないもの、安全上の問題点を解決する必要があるものに関して、改良モデルを制作した。



図 3　保育園でのデザイン評価（高島第一保育園）



図 4　西粟倉村木育イベント

４．デザインプロトタイプについて

9 点のプロトタイプは、子どもへの教育効果を優先してデザインした。創造性を育むために基本造形で構成し、安全性を考え、大きなコーナーアールを採用した。各プロトタイプのデザインコンセプトを以下に述べる。

なお、教育効果の評価用語は、筆者らの予備研究で用いた 6 用語、「手先の発達に役立つ」「創造力がつく」「集中力がつく」「空間を認識する力がつく」「パターンを認識する力がつく」「考える力が付く」に、「コミュニケーション力がつく」を加えた 7 用語を用いた。

４－１. ままごとセット（ごっこ遊び）

子どもが興味を引く食べ物を抽象化した造形である。ハンバーガーの具が動いたり、フライパンを上下に振るとカタカタと音が鳴ったりする構造を加えて、見立てと音の遊びを複合させ子どもの創造力を高めるようにした（図 5・玩具 1）。

４－２. リンゴの木（ゲーム）

リンゴのシルエットボードに円形の窓を空け、その蓋をする扉を指で押すとマグネットにより開閉する仕組みである。反対側からはどこから指がでてくるのか分からず、モグラたたきゲームのような遊び方もできる。親と子どものコミュニケーション力を促進する効果を期待した。（図 5・玩具 2）

４－３. 立体パズル

7 種類の大きさの箱がすべて 1 つの箱に収納され入れ子構造になっている。箱の組み合わせ方が理解できるように色の変
化を付けた。パズルのように遊びながら立体的な空間認識力を育てる。（図 5・玩具 3）

４－４. 創造の木（バランス）

樹木の幹である本体部品と枝葉を抽象化した複数の円盤部品で構成される。円盤を部品の溝に差し込みながら様々な形に組み上げ 1 本の大きな木のようにもなる。バランス遊びやブロック遊びのように楽しむことのできる玩具である。創造力や手先の器用さが身につく効果を期待した。（図 5・玩具 4）

４－５. 魚釣りゲーム（ゲーム）

岩を模した穴の開いた積み木の下側に空間があり、積み木越しに釣り竿で魚を釣り上げるゲームである。


玩具１　ままごとセット


玩具２　リンゴの木


玩具３　立体パズル


玩具４　創造の木


玩具５　魚釣りゲーム


玩具６　回転パズル


玩具７　乗り物-1


玩具８　乗り物-2


玩具９　どうぶつ乗り物

魚はマグネットにより吸着する。魚と積み木をつかったごっこ遊びも可能であり、複数人で楽しく遊べる創造力とコミュニケーション力を養う玩具である。(図５・玩具５)

４－６. 回転パズル

虫食いのように穴の開いた大小の円柱を重ね合わせ中に小さなビー玉が入っている。円柱を回転させて穴の位置が一致すると中からビー玉が飛び出す仕組み。ガラガラのように音も楽しむことができる。集中力とパターン認識力を養う。(図５・玩具６)

４－７. 乗り物-1、乗り物-2（ごっこ遊び・くるま）

乗り物-1、乗り物-2 は、昆虫をイメージさせるような形の乗り物である。土台より上部が共用部品で脚部を差し替えれば、揺れる動きや走る遊びを体験できる。子ども同士で揺らしたり、引っ張ったりしながら手先の発達やコミュニケーション力を養う効果を期待した。(図５・玩具７、玩具８)

４－８. どうぶつ乗り物（ごっこ遊び・くるま）

動物の背中に乗るような感覚でまたがり、キャスターで前後左右に動かせて遊ぶ乗り物である。創造力と手先の発達、子ども同士のコミュニケーション力を養う効果を期待した。(図５・玩具９)

５．プロトタイプの評価と考察

以上の９点のプロトタイプを、保育園および西粟倉村木育イベントで実証評価（2017 年 12 月）し、各作品による個別評価について表２のようにまとめた。

各プロトタイプの考察を実証評価に立ち会った幼児教育の専門家である保育士の意見も一部反映し、以下に述べる。

５－１. ままごとセット

音を加えたことで適用年齢の広がりを見せ、言葉を話せない０歳児も遊べた。創造力がつく教育効果が見られたのは食物の模型であると理解ができる２歳以上の子どもであった。

５－２. リンゴの木

1～2 歳児で、友達同士でコミュニケーションを促進させる効果が見られた。遊び方が限定されているため、3 歳児以上は興味が少しずつ薄れていくように見られた。

５－３. 立体パズル

プロトタイプの大きさと重さの問題やパズルの理解の難しさのため２歳児未満は遊びが困難であった。

５－４. 創造の木

積み木とバランス遊びの複合により適用年齢が広がった。保育士からは、円盤を差し込んだり上に積んだりする行為により手先の器用さを発達させるには大変効果的と言う意見が寄せられた。大きな木をイメージしながらたくさんの円盤を積上げてゆく遊び方から、創造力の発達効果もある。2 歳～6 歳児に有効であると考えられる。

５－５. 魚釣りゲーム

手先の微妙な動きや集中力を養う効果が見られたが、プロトタイプの構造的な問題による遊びの難しさのため、各年齢共通で意図した教育効果の測定が不十分であった。

５－６. 回転パズル

意図した遊び方が理解されなかった。また、小さいボールを誤飲する危険性が判明し改良が必要とされた。

５－７. 乗り物-1、乗り物-2、どうぶつ乗り物

各年齢で共通して高い関心が見られ、1 人～2 人乗りしながら興奮して遊ぶ様子から子どもの好奇心への発見があった。保育士の意見によると、乗り物遊びは興味が長く続かず飽きられ易い傾向にあると示唆された。教育効果としては手先の発達や遊びを通じた他人とのコミュニケーションの促進効果が見られた。1～6 歳未満すべての子どもへ適用可能と思われた。なお、乗り物の安全性に関しては、大きな脚や４つキャスターにより安定し、転倒する危険性が少ないことや、２～３人で激しく動かしても部品の破損が見られなかったことから、確認ができた。

６．デザインの改良点

前節の保育園での観察評価で改良が必要とされた玩具は、４（５）釣りゲーム、４（６）回転パズルの２点であり、これらの改良制作を行った。なお、４（３）立体パズルの問題点はスケールと重さが原因とみられ、教育効果上の問題とは見なされなかったため改良制作は見送った。

６－１. 魚釣りゲーム（図 5）の改良

魚釣りゲームの問題点は、魚が横倒しの状態ではマグネットに吸着させることが困難であり、細かな手先の動きが未発達の子どもにはさらに難しく感じたようであった。魚が密集することも釣り上げを難くしていた。そのため改良案では、図 10 のように魚が密集しないように底面に仕切りの枠板を設け、バラバラに配置できるように改良を加えた。また、図 11 のように魚のサイズを小型化し、底面で倒れてもマグネットへ容易に吸着するように金属部品の配置とサイズを変更した。

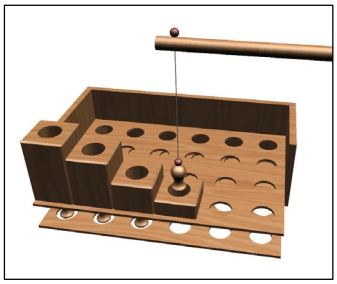


図６　魚釣りゲーム改良案-1

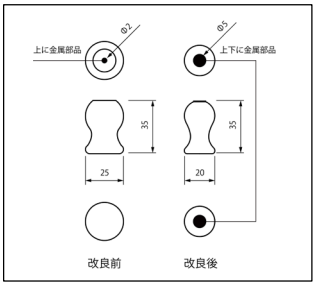


図７　魚釣りゲーム改良案-2

６－２. 回転パズル（図 5・玩具 6）の改良

回転パズルの問題点は筒状の円柱を回転させて内外の穴の重なりから玉が出る仕組みが理解されておらず、筒を外して中身の玉を口に含む行為をした子どもがいたため根本的な改良が必要とされた。主な改良点は以下の 3 点である。

(1)　玩具の構造を単純化し遊び方を分かりやすくする。
(2)　玉を誤飲しないよう取り出せないような構造とする。
(3)　子どもが片手で持てる小さなサイズに変更する。

改良案では、斜めに輪切りした円柱の内側に空洞を設け大小のビー玉を封入した。円柱の窓からは透明感のあるカラフルなビー玉が見えるが取り出すことはできない。内部の空洞はビー玉が動く空間を設け、振ると内部でコトコト音がなる仕組みになっている。上面が斜めになっており積み木として遊ぶことができる。教育効果は、指先の細やかな動きとバランスを養う感覚、創造力がつく効果を期待した。(図 8)



図８　コトコト積み木

表2　プロトタイプの評価表

教育効果 / プロトタイプと遊びの種類	手先の発達に役立つ	創造力がつく	集中力がつく	空間を認識する力がつく	パターンを認識する力がつく	考える力がつく	コミュニケーション力がつく
(1) ままごとセット(ごっこ遊び)	片手で持ったり音を立てて振る動作による手先の発達や握力をつけるのに効果がある	2歳児以上では具体的な食物に見立てたり料理をするふりをするなど、創造しながら遊んでいる	一人遊びが長く続かない	空間認識力には効果が見られない	食物の形状を認識できる。木の色であるため、リアルな印象は持たれない	具体的なデザインのため考える力つけるには効果的ではない	グループで会話をしながら遊んでいる。コミュニケーション力の促進効果がある
(2) リンゴの木(ごっこ遊び)	ふたの木をはめたり外したりして遊ぶことで、手先の器用さが養われる	窓から飛び出す指を虫に見立てたり、他のおもちゃと組合せたりして創造力を生かして遊んでいる	一人遊びが長く続かない	窓が開いた位置を確認することで空間認識力を養う	リンゴの形状や窓の大きさを認識できる	窓の数を数えたりしながら考える力がつく	友達同士や保護者と会話を楽しみながら遊ぶことができる
(3) 立体パズル(パズル)	箱を出したり入れたりしながら遊ぶが、2歳までは箱が重くて出し入れが難しい	箱の出し入れの遊びの単純さのため、創造性の発達には関係がない	一人遊びが長く続かない	立体的な感覚を養う効果はある	大小の箱の繰り返しのため多少のパターン認識ができる	考えながら遊ぶ玩具ではない	他人と一緒に遊ぶというよりも一人遊びで完結する玩具である
(4) 創造の木(積み木・バランス)	小さな円盤を差し込んだりバランスよく重ねたりする行為が手先の発達に役立つ	生茂った大木を育てるように創造性を生かして葉のような円盤を使って遊ぶことができる	一人でも複数でも長い時間遊びが継続する	3次元的に広がってゆく形状のため、空間認識力、立体感を養うことができる	形状の種類が少ない。パターン認識力のために、サイズのの大小や形状の種類を増やすと効果増	直観的な遊びのため、考える力にはあまり影響を与えない	複数人でバランスを考えながら大きな木を作っていた。どの年齢にも関心度が高い
(5) 魚釣りゲーム(ゲーム)	魚を釣上げる微妙なバランスや力加減で手先や手首の発達に役立つ	積み木を岩場に見立て魚釣りをするように創造性を生かした遊びができる	根気よく遊んでいる子供が多かった。集中力をつけるのには効果がある。2歳児以下には難しい	上下の奥行を利用して空間を意識しながら魚釣りをするため効果が大きい	魚の形状や穴の形状に変化をつけると多様なパターンが生まれる	どこに魚がいるか微妙な感触をたよりに考えながら遊ぶ様子が見られた	常に3～4人で遊ぶ様子が見られコミュニケーションを促進する効果がある
(6) 回転パズル(パズル)	音を立てて振る動作による手先の発達や握力をつけるのに効果がある	重なった穴から玉を取り出す単純さのため創造力をつける効果は少ない	遊び方が理解されなかった	空間認識力には効果が見られない	内外の円柱を回しながら形状を合わせる遊びが理解されなかった	具体的なデザインのため考える力には影響を与えない	他人と一緒に遊ぶというよりも一人遊びで完結する玩具である
(7) 乗り物-1・木馬(くるま)	体重をかけて前後に揺らすことで手や腕、足の筋力発達に効果があると思われる	具体的な玩具のため、創造力をつける効果は少ない	少し乗ったら飽きるように見られた	空間認識力にはあまり効果が見られない	パターン認識にはあまり効果は見られない	具体的なデザインのため考える力には影響を与えない	二人一組になって、揺らして楽しく遊んでいる様子が見られた
(8) 乗り物-2・キャスター(くるま)	押すことで手首の力がつくと思われるが手先の発達にはあまり影響はない	具体的な玩具のため、創造力をつける効果は少ない	一人で独占してずっと乗って遊んでいる子供がいた	空間認識力にはあまり効果が見られない	パターン認識にはあまり効果は見られない	具体的なデザインのため考える力には影響を与えない	二人一組になって、二人乗りしたり、押し合って楽しく遊んでいる様子が見られた
(9) 動物のりもの(くるま)	押すことで手首の力がつくと思われるが手先の発達にはあまり影響はない	動物の背中に乗って遊んでいるように感じられた	一人で独占してずっと乗って遊んでいる子供がいた	空間認識力にはあまり効果が見られない	パターン認識にはあまり効果は見られない	具体的なデザインのため考える力には影響を与えない	二人一組になって、二人乗りしたり、押し合って楽しく遊んでいる様子が見られた

7．まとめ

本開発では「木育玩具の分類と教育効果の調査分析」の予備研究において導出した木育玩具による遊びの種類と教育効果との関係指標および保育園での観察調査から、教育効果のある木育玩具の要求仕様を把握した。

これに基づき、仮説としてデザインコンセプトを考案し、複数案のアイデアスケッチから「積み木」「音で遊ぶ」「ままごと（ごっこ遊び)」「バランス遊び」「ゲーム」「くるま（乗り物)」の6種類の遊びに含まれる9点のデザイン案に集約し、プロトタイプを制作した。

プロトタイプは保育園、および西粟倉村木育イベントにおいて検証実験を行い「木育玩具による遊びの種類と教育効果の指標」およびデザイン実証評価を行った。評価結果からは、問題の改良が必要とされた2点の玩具（魚釣りゲーム、回転パズル）について更に改良制作を行った。

回転パズルはデザインが大きく変更され、パズルから積み木遊び(コトコト積み木)への変更となったが、0歳～6歳児の子どもによる実証評価を再度実施し、安全性と教育的な効果（手先の発達、バランス感覚、創造力）が確認された。積み木は、予備研究においても、その教育効果は十分に実証されている。本作品はそれに加え「音で遊ぶ」要素も合わさりデザインの新しさが備わった玩具である。

西粟倉村は、地域の新生児に木製玩具をプレゼントするなどの取組「ウッド・スタート」事業を推進している自治体である。「コトコト積み木」はウッド・スタートの品として選定されるよう現在西粟倉村役場協議を進めている段階である。

今後は本開発によるプロトタイプ検証で得られたデータを遊びの種類と教育効果の指標に反映するとともに、プロトタイプの改良を予定している。

以上のように、本開発プロセスは、既存製品や使用実態の調査分析より仮説を構築し、デザイン試作と検証評価を反復して行い、デザインをブラッシュアップしてきた。

従来市販されてきた木育玩具は、子どもの興味を引く遊び方に重点を置いて、設計・製造されてきたものが多くみられるが、本開発プロセスや「遊びの種類と教育効果の関係指標」が今後の開発の一助になると考えている。

注および参考文献

1)　林野庁 HP　：　(1)木材利用の意義と普及（「木づかい運動」を展開)（「木育（もくいく）の取組の広がり：http://www.rinya.maff.go.jp/j/kikaku/hakusyo/26hakusyo_h/all/a40.html,　(2017/12/14 閲覧)

2)　認定 NPO 法人日本グッド・トイ委員会　：　ウッドスタートガイドブック

3)　林秀紀、櫛勝彦、井上勝雄　：　木育玩具の分類とその教育的効果の調査分析，日本感性工学研究論文誌, 17，4，pp. 489-497

含ヘテロパイ電子系ユニットを有するプリンタブル太陽電池材料の開発

岡山理科大学・理学部化学科

岩永　哲夫

電子豊富な含ヘテロパイ電子系ユニットは，正孔輸送材料など有機機能性材料としての利用が期待されている．本研究では，含ヘテロパイ電子系ユニットのひとつであるカルバゾールユニットの 3,6 位を窒素で連結した大環状化合物を合成し，それらの物性から機能性材料としての有用性を検討したので以下に報告する．

これら標題化合物は，Buchwald-Hartwig カップリングを用いてそれぞれ中程度の収率で合成できた．環状 3 量体は DFT 計算による最適化構造から，3 つのカルバゾールユニットが窒素原子を介してねじれた配座で連結していることがわかった．これは酸化電位の値からも分子内のカルバゾールユニット同士の相互作用が小さいことが支持された．環状 4 量体は，分子全体が平面的になることにより窒素原子を介したパイ共役の拡張が影響することを明らかにした．これらの結果から，環状構造を変化させる分子設計によりパイ共役の拡張やユニット同士の相互作用をコントロールすることができ，多様な電子物性を発現させる指針が得られた．今後，合成した分子を正孔輸送層に用いた太陽電池素子を作製し，その有用性を明らかにしていく予定である．

１．はじめに

効率の高い光電変換素子の開発は，21 世紀の重要課題の一つである光エネルギー(太陽エネルギー)の有効利用と関連して，化石燃料使用による温暖化など，地球規模の環境問題に立ち向かう科学からの取り組みとして，極めて重要な研究課題である．しかし代表的な光電変換デバイスである有機薄膜太陽電池は，低コストかつ低環境負荷の次世代太陽電池として幅広い応用が期待されているが，これまでに達成されている光電変換効率は最大 15 %程度であり，新規材料の提案や方法論の開発は急務である. また，このような材料に用いられる芳香族炭化水素やポルフィリンなどのパイ電子系ユニットは，置換基を修飾することやユニット同士を連結することで光吸収や発光，酸化還元特性など分子の性質を自在に制御できる．パイ電子系ユニットの特性を理解し，電子状態などを自在に制御することは，新機能の発現には不可欠な要素である．

本研究では，汎用元素のひとつである窒素を含んだヘテロパイ電子系ユニットを組み込んだ大環状化合物を合成し，有機機能性材料として利用することを目的とする．大環状化することでパイ電子系ユニットを効率よく配置・集積化でき，高い正孔輸送性特性を発現するような準平面（一部だけ平面）に近い構造をとることが予想される．[1]　また大環状化合物の適切な位置に可溶性置換基を導入し，ドナー性の向上とラジカルカチオン種の安定性を向上させる．基板状での集積構造も明らかにし，次世代の有機―無機ハイブリッド型太陽電池として期待されているペロブスカイト型太陽電池の正孔輸送材料への利用を検討する．

含ヘテロパイ電子系ユニットとして，カルバゾール骨格を利用した．これらユニットへの置換基の導入は，通常はハロゲン化などの官能基導入を経由することで可能となる．官能基を導入することでパイ電子系ユニット同士を連結することも可能となる．今回，カルバゾールを基盤とした大環状化合物の合成とその分光学的性質および電気化学的性質を明らかにしたので，以下に報告する．

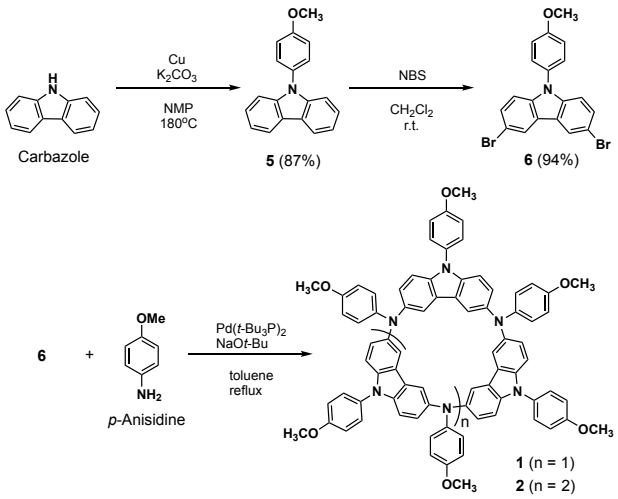
２．結果と考察

（１）合成

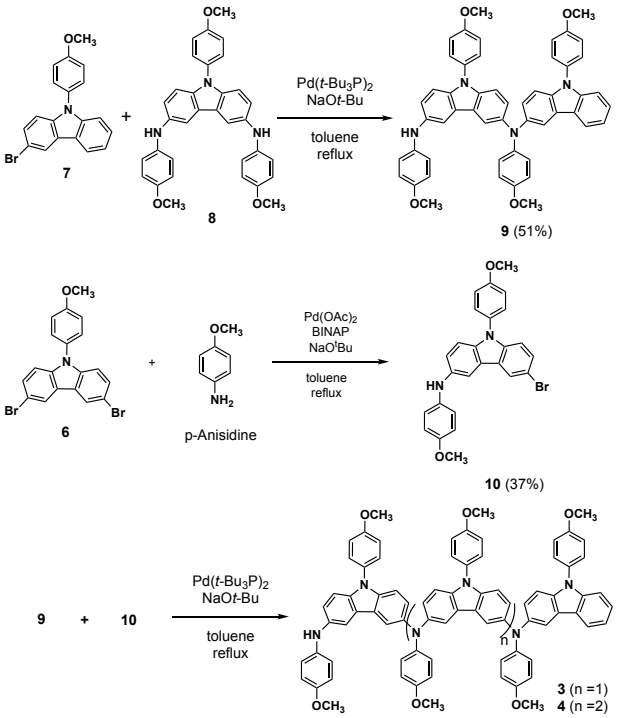
目的化合物であるカルバゾール基盤大環状化合物 3 量体 **1** と 4 量体 **2** の合成を示す（Scheme 1）．原料となるジブロモカルバゾール **6** は，市販のカルバゾールより２段階の反応で合成した．得られた 3,6-ジ

ブロモカルバゾール誘導体と *p*-アニシジンとの 1 段階の Buchwald-Hartwig カップリングにより環状 3 量体 **1** と環状 4 量体 **2** をそれぞれ収率 15%，12%で合成した. これらより環サイズの大きな誘導体として，環状 5〜8 量体の分子イオンピークを確認できたが，不安定であったため単離できなかった.

また環状構造をもつことの効果を調べるために，対照化合物である鎖状体 **3** と **4** も同様の方法で合成を試みたところ，合成のステップ数は増えたが中程度の収率で合成できた(Scheme 2).



Scheme 1. カルバゾール基盤大環状化合物の合成



Scheme 2. 対照化合物の合成

（2）構造

合成した化合物の X 線単結晶構造解析を試みたが，解析が可能な単結晶が得られなかった．そこで DFT 計算により環状 3 量体 **1** と環状 4 量体 **2** の構造最適化を行った．計算を容易にするためにメトキシ基を水素に置換した **1'** と **2'** を用いて計算した(Figure 1&2). 環状 3 量体 **1'**の最安定構造では，3 つのカルバゾールユニットが窒素原子を介して，ねじれた配座で固定されていた．カルバゾールユニットと向かいの窒素原子との距離は 7.1 Å であった．環状 4 量体 **2'**は 4 つのカルバゾールユニットが交互にねじれた 1,3-alternate 型に近い構造となっていた. カルバゾールユニット間の距離は最短で 6.1 Å であった.

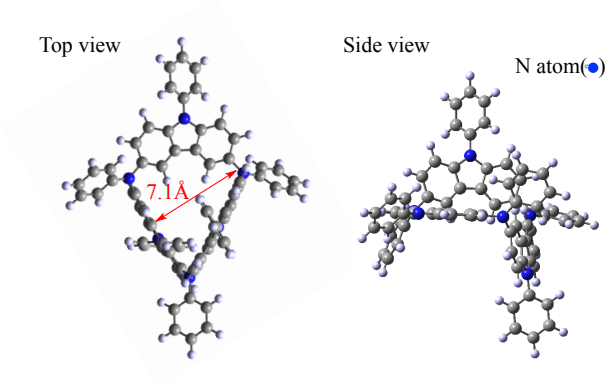


Figure 1. 環状 3 量体 **1'**の最適化構造

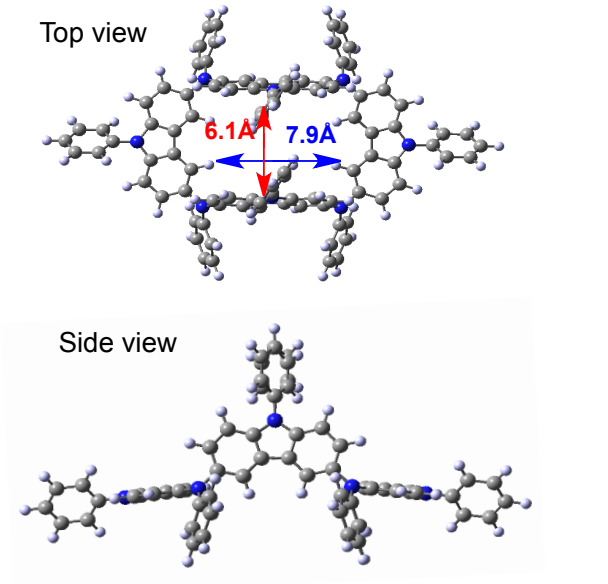


Figure 2. 環状 4 量体 **2'**の最適化構造

（3）電子スペクトル

紫外可視吸収スペクトルを CH_2Cl_2 中で測定したところ，環状 3 量体 **1** の最大吸収波長は 310 nm となり、環状 4 量体 **2** と比べて 8 nm 短波長にシフトしていた(Figure 3)．鎖状体でも同様傾向が観測されており，カルバゾールユニットの増加に伴う，パイ共役の拡張の大きさに起因するものと考えられる．また長波長側には幅広い吸収が 400-500 nm にかけて観察された．環状体と鎖状体を比較すると，最大吸収波長の変化は観測されなかった．各化合物の蛍光スペクトルでは蛍光波長が 470 nm 付近に観測され，大きな変化は観測されなかった．蛍光量子収率は環状 3 量体 **1** が 0.17 となり，他の化合物と比べて高い値を示した．このことは環状 3 量体 **1** が剛直な構造であるため，他の化合物と比べて，熱エネルギーとして失活されにくいためだと考えられる．

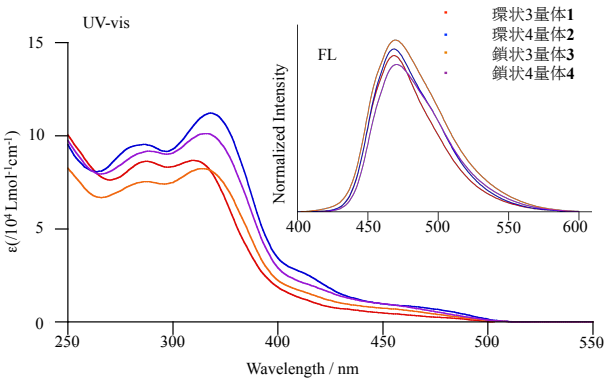


Figure 3．化合物の電子スペクトル（CH_2Cl_2 溶液）

（4）サイクリックボルタンメトリー

酸化還元電位を調べるために，サイクリックボルタンメトリーを測定した．環状 3 量体 **1** は 3 対の 3 電子酸化波，環状 4 量体 **2** は 4 対の 4 電子酸化波を観測した．鎖状体も同様に可逆な酸化還元波を観測できたことから，酸化種が安定に存在することが示唆された．環状 3 量体 **1** の酸化電位が，他の化合物と比べて高くなることが分かった．この結果からカルバゾールユニット同士の相互作用が小さく，3,6-ビス(ジフェニルアミノ)カルバゾールの酸化電位 (E_{ox}= −0.02 V) [2]に近い値になったと考えられる．環サイズが大きくなると，酸化電位が低電位シフトしドナー性が向上した．鎖状体の酸化電位は，環状体と比べてほとんど変化がなかった．

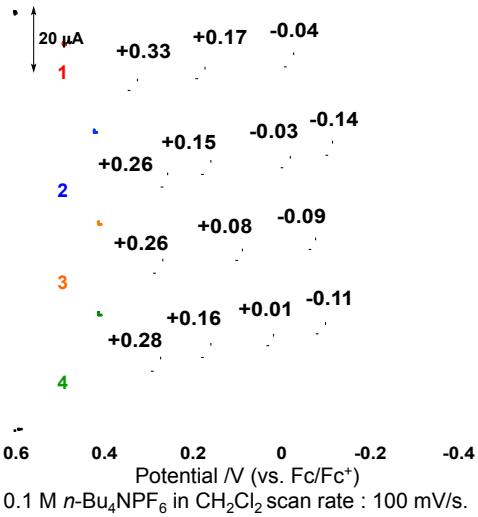


Figure 4．サイクリックボルタモグラム

（5）酸化種の電子スペクトル

酸化状態における分光学的性質を明らかにするため，酸化剤を加えて吸収スペクトルを測定した．

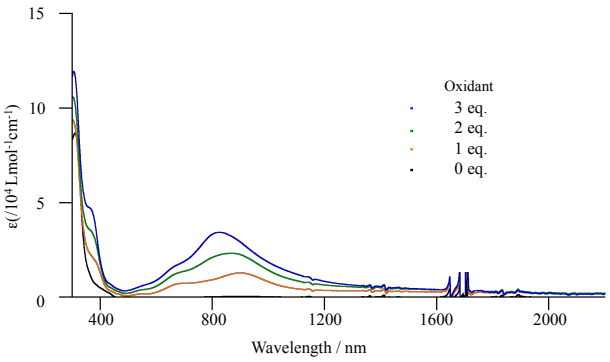


Figure 5．環状 3 量体 **1** の酸化種の吸収スペクトル (CH_2Cl_2 溶液)

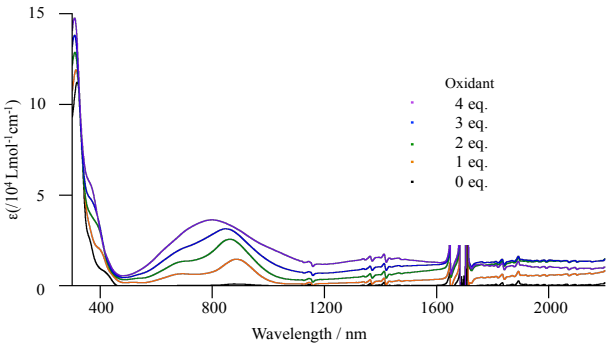


Figure 6．環状 4 量体 **2** の酸化種の吸収スペクトル (CH_2Cl_2 溶液)

環状 3 量体 **1** に対して酸化剤を 3 当量加えたところ，824 nm に新たな極大吸収波長が現れた(Figure 5). これは先にも述べたとおり，環状 3 量体 **1** の構造はカルバゾール同士がねじれた配座をとり，分子内のカルバゾール間で相互作用が小さくなるため，3,6-ビス(ジフェニルアミノ)カルバゾール誘導体のラジカルカチオン種の吸収に相当するものだと考えられる．一方，環状 4 量体 **2** に対して酸化剤を 4 当量加えた場合, 799 nm の極大吸収に加え, 1200 から 2500 nm 以上にも吸収が観測された(Figure 6). 鎖状体でも同様に 1200 から 2500 nm 以上にも吸収が観測された．これは DFT 計算の結果から，構造が平面性を有することで窒素原子を介したパイ電子系の拡張が影響することにより，ラジカルカチオン種同士が分子内で相互作用している結果と考えられる．

３．まとめ

今回，カルバゾールユニットを窒素原子で連結した大環状分子および鎖状分子の合成に成功した．電子スペクトルとサイクリックボルタモグラムより種々の物性を明らかにした．本研究で得られた分子は酸化還元電位が可逆に観測されたため，酸化種が安定であることが示唆された．また酸化剤を用いた吸収スペクトル測定により酸化状態における電子状態を明らかにすることができた．

今後，合成した化合物を正孔輸送層に利用した有機太陽電池を作製し，その有用性を立証する予定である．

４．謝辞

本研究は, 平成 30 年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団の学術研究費助成事業の助成を受けて実施したものである．また本研究の遂行にあたり，東京工業大学理学院・豊田真司教授，大阪大学大学院基礎工学研究科・鈴木修一准教授，岡山理科大学理学部化学科・山田晴夫教授，若松寛准教授に有益な助言を頂いた．ここに記して感謝申し上げます．

５．参考文献

[1] H. Nishimura, N. Ishida, A. Shimazaki, A. Wakamiya, A. Saeki, L. T. Scott, Y. Murata, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15656.

[2] B. Xu, E. Sheibani, P. Liu, J. Zhang, H. Tian, N. Vlachopoulos, G. Boschloo, L. Kloo, A. Hagfeldt, L. Sun, *Adv. Mater*. **2014**, *26*, 6629.

６．研究成果

(1) 「ユニークな電子構造を有する剛直な含窒素大環状化合物の合成と応用」，○岩永哲夫，日本化学会中国四国支部「固体物性化学の最前線」講演会，愛媛大学（松山市），2018 年 12 月（招待講演）

布賀鉱山産ホウ酸塩鉱物のホウ素同位体に関する基礎的研究

岡山理科大学　理学部　基礎理学科

小林　祥一

岡山県高梁市布賀鉱山は高温型スカルンを形成し，CaO-B_2O_3-H_2O 系ホウ酸塩鉱物が多数報告されている．そのうちスカルン化作用初期に生成したとされる初生鉱物は，無水のカルシウムホウ酸塩鉱物で，その後の熱水活動により種々の含水のホウ酸塩鉱物が生成したとされている．そこで今回これらホウ酸塩鉱物およびスカルン形成に関係した石灰岩，結晶質石灰岩，モンゾ閃緑岩，石英モンゾニ岩のホウ素同位体組成およびホウ素含有量を，溶融後 ICP-MS で，また研磨片を用いた LA-ICP-MS により分析した．分析の結果，初生鉱物の takedaite および shimazakiite の $\delta^{11}B$ 値は，-10‰前後で，これら鉱物が生成したスカルン化作用初期のモンゾ閃緑岩に伴う熱水のホウ素同位体組成と同様な値を示した．一方，初成鉱物である takedaite, shimazakiite の後期熱水作用により生成した uralborite, nifontovite, olshanskyite, frolovite, pentahydroborite の $\delta^{11}B$ 値は，鉱物の含水量の増加に伴って次第に減少し-35‰前後となり，これは石英モンゾニ岩に近い値を示すことがわかった．また，石灰岩と結晶質石灰岩中のホウ素含有量は，0.1~0.6ppm 程度含まれており，結晶質石灰岩の方が若干多く含まれている．

1. はじめに

布賀鉱山は世界的にも極めて希な高温型スカルンの産地であり，これまでに新鉱物および日本新産鉱物が多数報告されている．スカルンとは，石灰岩や苦灰岩のような炭酸塩岩に，花崗岩などの火成岩マグマが貫入した際に，炭酸塩岩と火成岩マグマの間で行われた交代作用によって生成した，Ca, Mg, Fe, Al などからなるケイ酸塩鉱物の集合体をさす．布賀では，石灰岩にモンゾ閃緑岩あるいは石英モンゾニ岩の貫入を受け，その接触部に gehlenite［$Ca_2Al(AlSi)O_7$］や spurrite［$Ca_5(SiO_4)_2(CO_3)$］などのスカルン鉱物が生成している．通常のスカルン鉱物である garnet や wollastonite は，一般に約 500℃で生成されるが，gehlenite や spurrite は，約 900℃で生成されるため高温型スカルンと呼ばれる．布賀鉱山坑内の数か所では，不規則な脈状ないしスポット状に，多種多様なホウ酸塩鉱物を産する．先行研究からスカルン化初期に生成したとされるいわゆる初生鉱物は，無水ホウ酸塩鉱物であり，その後の熱水活動により種々の含水ホウ酸塩鉱物に変質したとされている（草地，2013）．

一方，これらホウ酸塩鉱物のホウ素の起源については，例えば石灰岩が再結晶する際に，ホウ素が放出されたとする説（草地他，1999）があるが，ほとんど議論されていない．そこで今回，布賀鉱山で採取したスカルン化作用により生成した CaO-B_2O_3-H_2O 系鉱物，およびスカルン形成に関係した岩石のホウ素同位体組成（$\delta^{11}B$ 値）およびホウ素含有量の分析を，さらにスカルン化初期に生成したとされるいわゆる初生鉱物の無水ホウ酸塩鉱物と，高温スカルンを特徴付ける gehlenite および spurrite とのホウ素同位体組成を比較検討する．これらの基礎的データから布賀鉱山に産するホウ酸塩鉱物の生成過程と，ホウ素の起源を解明するための検討を行うことにした．なお，本研究は岡山理科大学大学院理学研究科西居俊基君との共同研究である．

2. 地質および試料の採集地点

布賀鉱山は岡山県高梁市備中町にあり，岡山市の西北西約 40km に位置する（Fig. 1）．布賀では，Mg をほとんど含まない石灰岩にモンゾニ岩質の火成岩が貫入し，スカルン化に伴うゾーニングを形成し，石灰岩側が spurrite 帯，貫入岩側が gehlenite 帯となっている．基盤をなす古生層は砂岩，頁岩の互層をなす冨家層と，その上に重なるペルム紀石灰岩を主とする中村石灰岩層よりなる（大前他，2002）．石灰

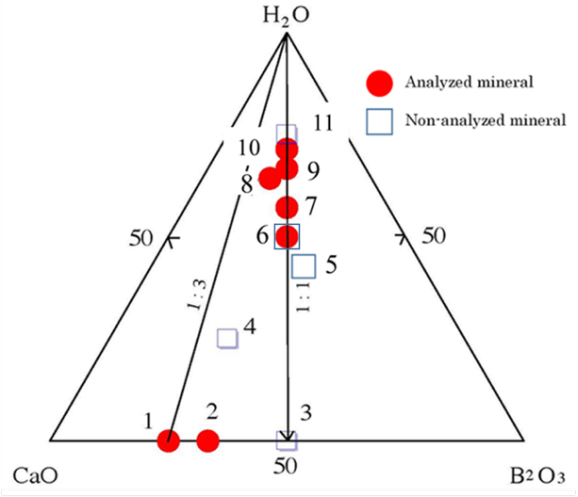
岩中にはモンゾ閃緑岩，石英モンゾニ岩，安山岩などの岩脈が見られる．これら貫入岩は，モンゾ閃緑岩が石英モンゾニ岩に切られる関係が見られることから，貫入時期が異なり，石英モンゾニ岩よりもモンゾ閃緑岩の方が先に貫入したことがわかる．布賀鉱山坑内の数か所では，結晶質石灰岩中に不規則な脈状ないしスポット状に，無水あるいは含水のホウ素を含む鉱物を産する．このうち，今回は布賀鉱山 4 番抗に見られる takedaite (Kusachi et al., 1995)および shimazakioite (Kusachi et al., 2013)を初成鉱物とする 2 露頭（前者を takedaite 露頭，後者を shimazakiite 露頭）を対象に検討することにした．



Fig. 1. Map showing the location of the Fuka mine.

Takedaite 露頭では，CaO-B_2O_3-H_2O 系鉱物は結晶質石灰岩とそれを貫く幅約 0.7~1.5m の石英モンゾニ岩との境界部付近に発達し，石英モンゾニ岩岩脈に沿って，やや延びた厚みのあるレンズ状に産する．後期熱水作用により takedaite の周辺部では，sibirskite, parasibirskite, frolovite, olshanskyite などの含水ホウ酸塩鉱物集合体をなしている．Shimazakiite 露頭では，幅約 3~4m のホウ酸塩鉱物集合体が見られ，その周囲は結晶質石灰岩によって囲まれている．このホウ酸塩鉱物集合体の中心部には，無水の shimazakiite が幅約 2m で産し，その周囲に shimazakiite の後期熱水作用により生成したとされる sibirskite, uralborite, nifontovite, pentahydroborite などの含水ホウ酸塩鉱物を産する．

ホウ素同位体組成を検討するための試料は，鉱物としては takedaite および shimazakiite 露頭に産する CaO-B_2O_3-H_2O 系鉱物の takedaite, shimazakiite, uralborite, nifontovite, olshanskyite, frolovite, pentahydroborite（Fig. 2）である．Fig. 2 にはこれら露頭に産する鉱物も併せて示した．また Table 1 には対象とした各鉱物の化学分析値と理想化学式を示した．



1．Takedaite：$Ca_3B_2O_6$，2．Shimazakiite：$Ca_2B_2O_5$，3．Calciborite：CaB_2O_4, 4. Sibirskite：$Ca_2B_2O_5 \cdot H_2O$, 5. Priceite：$Ca_2B_5O_7(OH)_5 \cdot H_2O$，6．Uralborite (○)&Vimsite (□)：$CaB_2O_2(OH)_4$，7．Nifontovite：$Ca_3B_6O_6(OH)_{12} \cdot 2H_2O$，8．Olshanskyite：$Ca_3B_4(OH)_{18}$，9．Frolovite：$Ca[B(OH)_4]_2$，10．Pentahydroborite：$CaB_2O(OH)_6 \cdot 2H_2O$, 11. Hexahydroborite：$Ca[B(OH)_4]_2 \cdot 2H_2O$

Fig. 2. Minerals in the system CaO-B_2O_3-H_2O from Fuka.

Table 1. Chemical compositions and ideal formulae of the borate minerals in this study

CaO-B_2O_3-H_2O系鉱物	化学組成	CaO (%)	B_2O_3 (%)	H_2O (%)
Takedaite	$Ca_3B_2O_6$	71.13	28.41	0.14
Shimazakiite	$Ca_2B_2O_5$	61.09	36.39	1.19
Uralborite	$CaB_2O_2(OH)_4$	34.87	43.42	22.42
Nifontovite	$Ca_3B_6O_6(OH)_{12} \cdot 2H_2O$	32.31	39.31	27.91
Olshanskyite	$Ca_3B_4(OH)_{18}$	34.50	29.64	35.75
Frolovite	$Ca[B(OH)_4]_2$	27.67	34.57	37.63
Pentahydroborite	$CaB_2O(OH)_6 \cdot 2H_2O$	25.71	32.09	41.60

Takedaite : Fuka Okayama Prefecture, Japan. Kusachi et al. (1995).
Shimazakiite : Fuka Okayama Prefecture, Japan. Kusachi et al. (2013).
Uralborite : Fuka Okayama Prefecture, Japan. Kusachi et al. (2000).
Nifontovite : Fuka Okayama Prefecture, Japan. Kusachi et al. (1994).
Olshanskyite : Fuka Okayama Prefecture, Japan. Kusachi et al. (1994).
Frolovite : Fuka Okayama Prefecture, Japan. Kusachi et al. (1995).
Pentahydroborite : Fuka Okayama Prefecture, Japan. Fuziwara et al. (1982).

スカルン形成に関係した岩石については, 石灰岩, 結晶質石灰岩，モンゾ閃緑岩，石英モンゾニ岩を，さらに高温スカルンを特徴付ける鉱物 gehlenite, spurrite を研究の対象とした.

3. ホウ素同位体

ホウ素には 2 つの安定同位体である ^{10}B と ^{11}B が存在する. ホウ素の原子量は 10.811 ± 0.005 と与えられており，これをホウ素同位体比（$^{11}B/^{10}B$）で表すと，$^{11}B/^{10}B = 4.02 \pm 0.12$ となる．すなわち，天然における ^{10}B と ^{11}B の存在比は約 1 : 4 である.

ホウ素同位体組成の変動を表すためには，同位体比ではなく，以下の式で表される標準物質からの千分率偏差（$\delta^{11}B$ 値）が用いられる.

$$\delta^{11}B\ (‰) = \{(^{11}B/^{10}B)_{sample} / (^{11}B/^{10}B)_{standard} - 1\} \times 1000$$

地球表層物質中のホウ素同位体組成は, 約 90‰の変動幅を示すことが報告されている．天然物中のホウ素同位体組成では, 海水が最も高く, +40‰とされている（大井，2001）.

4. 実験方法

ホウ素同位体組成およびホウ素含有量の分析は, ICP-MS を用いて，液体試料を分析する方法（溶融法）と固体試料を分析する方法（laser ablation 法）の 2 通りの方法で行った．前者の方法は岩石試料および均一な鉱物に，後者の方法は単一鉱物の分離が難しい鉱物試料に用いた．また，分析精度および再現性を見るために，takedaite，shimazakiite，石灰岩，結晶質石灰岩については, 両方の方法で行い確認した.

EPMA，XRD および XRF で試料の確認し，ホウ酸塩鉱物は約 1mg，スカルン形成に関係した岩石については約 10mg 量り，硝酸 6ml とともにテフロン製の密閉容器に入れ，マイクロウェーブ試料分解装置を用いて約 100℃で 1 時間溶融した．濾過した各試料を 100ml メスフラスコに入れ，milli-Q 水を加え 100ml にし，これを分析用液体試料とし，ICP-MS を用いて分析した． ICP-MS は SPQ 9700 Plasma Quadrupole Mass Analyzer（SII 製）を，マイクロウェーブ試料分解装置は Multiwave 3000（AntonPaar 製）を使用した．標準試料として，NIST の NBS951（$^{11}B/^{10}B$=4.044）を用いた.

Takadaite, shimazakiite, 石灰岩, 結晶質石灰岩を P-レジンを用いて包埋し研磨片を作製後，カナダの Actlabs 社に依頼し，アブレーションシステムを用いた LA-ICP-MS で固体試料を直接分析した．この実験で準備した takedaite の研磨片と組成像を Fig. 3 と 4 に示す.

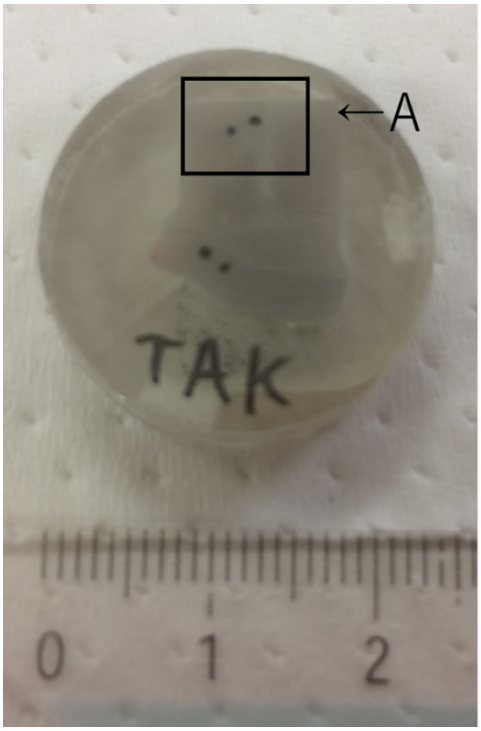


Fig. 3. Photograph of takedaite polished sample.



Fig. 4. Composition image. The same as A in Fig. 1. Tak= takedaite.

標準試料は一次標準試料として NIST の NBS610 を，二次標準試料として B4（高濃度試料の測定時）

および UWC-1（低濃度試料の測定時）を用いた．なお，一般的にホウ素同位体比の基準として用いられる NIST の NBS951 は，粉体試料もしくは溶液試料であるため，レーザーアブレーションによる固体分析での利用は困難である．このため均質性が保証されたガラス試料である NIST の NBS610 を用いた．装置は，ICP-MS は Neptune （Thermo Scientific 製）を，レーザー装置は RESOlution M-50-LR（Resonetics 製）である．レーザーの波長は 193nm, Integration time は 0.52 秒，ablation time は 24 秒前後の条件で測定した．

5．結果

5-1．スカルン化に関係した岩石鉱物のホウ素同位体組成

高温スカルンを特徴づける gehlenite および spurrite のホウ素同位体組成を，スカルン形成に関係した石灰岩，晶出石灰岩，モンゾ閃緑岩および石英モンゾニ岩と共に Fig. 5 に示す．

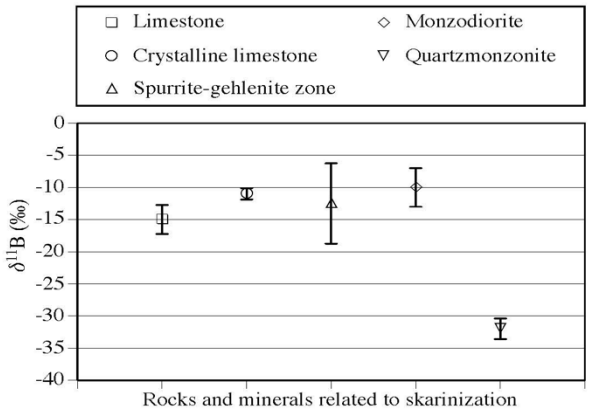


Fig. 5. Comparison of boron isotope compositions of rocks related to skarn formation, and of spurrite - gehlenite zone from Fuka.

Gehlenite および spurrite のスカルン鉱物を産するゾーンは，晶出石灰岩とモンゾ閃緑岩との間のゾーンに産することから，図ではこれら鉱物を両岩の間に示した．これら鉱物はばらつきが大きいもののモンゾ閃緑岩と同じ値を示し，モンゾ閃緑岩の貫入によってこれらスカルン鉱物が生成したことを示している．このばらつきは，両鉱物がホウ酸塩鉱物ではなくホウ素が微量成分のために誤差が生じたものと考えている．一方，石灰岩は再結晶によってモンゾ閃緑岩の値に近づくことが，また，後期貫入の石英モンゾニ岩の δ^{11}B はモンゾ閃緑岩に比べ 20‰程度低いことがわかった．

今回の主なテーマ，CaO-B_2O_3-H_2O 系鉱物の生成過程とホウ素の起源に関しては，考察が十分進んでいないが takadaite 露頭および shimazakiite 露頭それぞれについて概略を示し，以下に考察を述べる．

5-2．Takedaite 露頭

ホウ素同位体組成の検討は，CaO-B_2O_3-H_2O 系鉱物の takedaite, nifontovite, olshanskyite, frolovite，そしてスカルン化作用に関係した石灰岩，結晶質石灰岩，モンゾ閃緑岩を対象とした．

まず，ホウ素同位体組成は，2 通りの方法で分析したことから，それぞれの分析値を比較検討した．溶融法および Laser ablation 法による takedaite の δ^{11}B は, 前者は-19‰, 後者では-8‰で, shamazakiite では, それぞれ-9‰および-11‰であった. Shimazakiite の値はそれぞれ良く一致しているが，takedaite では 10‰程度の違いがある. この原因は Fig. 4 に示すように，組成像で明るい部分の takedaite は，含水のホウ酸塩鉱物（暗い部分）と密雑して産するためで，溶融法用の試料の分離が十分できてないためと考えた．含水のホウ酸塩鉱物は主に nifontovite で，溶融法による分析結果は nifontovite などとの混合物の値で，実際より低い値を示したことが推定される．また，frolovite の分離試料も XRD で確認したところ，複数の含水のホウ酸塩鉱物および未同定鉱物，さらには方解石，caspidine などが僅かに混入していたことから，この結果は参考試料とした．

以上を考慮した上で takedaite 露頭においてはホウ酸塩鉱物の含水量が増加するに従い，δ^{11}B 値は takedaite の-8‰から次第に減少し, nifontovite の-19‰, olshanskyite の-28‰と減少し, いくらか不純物を含む frolovite では-40‰と大きく減少した．また，スカルン形成に関係した岩石の δ^{11}B 値は，Fig. 5 に示したように，モンゾ閃緑岩の値は初生鉱物である takedaite の Laser ablation 法による値（-8‰）に近い値を示し, 含水のホウ酸塩鉱物の olshanskyite の δ^{11}B

値は，石英モンゾニ岩の値に近い傾向を示した．

5-3．Shimazakiite 露頭

本露頭のホウ素同位体組成の変化も，takedaite 露頭と同様，ホウ酸塩鉱物の含水量が増加するに従い，δ^{11}B 値は減少する傾向を示した．具体的には shimazakiite の-9～-11‰から，uralborite の-20‰，nifontovite の-20‰，そして pentahydroborite の-21‰を示した．また，スカルン形成に関係した石灰岩，結晶質石灰岩，モンゾ閃緑岩の δ^{11}B 値(Fig. 5)は，初生鉱物である shimazakiite の値に近い値を示し，そして含水ホウ酸塩鉱物の δ^{11}B 値は，含水量の増加に伴って次第に石英モンゾニ岩の値に近づく傾向を示した．

一方，takedaite および shimazakiite の δ^{11}B 値は，Fig. 5 に示すように gehlenite - spurrite ゾーンと同じ同位体組成を示すことから，これら鉱物もスカルン化初期のほぼ同時期に生成したことが推定される．

5-4．炭酸塩岩のホウ素含有量の比較

スカルン形成に関係した炭酸塩岩である石灰岩と結晶質石灰岩のそれぞれのホウ素含有量を Fig. 6 に示し比較した．前者は 100~400 ppb，後者は 150~600 ppb の範囲に分布した．ホウ素含有量の平均値は，結晶質石灰岩の方が若干多い値を示したが，その値はほとんど変わらない．

6．ホウ素の起源

上記の結果より，布賀鉱山に産する $CaO-B_2O_3-H_2O$ 系鉱物の生成過程およびホウ素の起源について検討した結果，ホウ酸塩鉱物は以下の 3 つのステージを経てホウ素が供給され，各種ホウ酸塩鉱物が生成したと考えた．

第 1 ステージ：モンゾ閃緑岩の貫入である．スカルン形成に関係した石灰岩，結晶質石灰岩，モンゾ閃緑岩の δ^{11}B 値と初生鉱物である takedaite および shimazakiite の値がほぼ同じ値を示している．従って，高温のモンゾ閃緑岩による石灰岩の再結晶作用および高温型スカルンの形成，さらにこのマグマ活動に伴ったホウ素に富み，δ^{11}B 値の高い熱水の貫入により，石灰岩中の Ca との反応で，初めに takedaite や shimazakiite のような無水ホウ酸塩鉱物が生成したと考えられる．ホウ素のイオン半径は小さいため，石灰岩中の深部まで移動し，結晶質石灰岩中にこれら初生鉱物が生成したと示唆される．

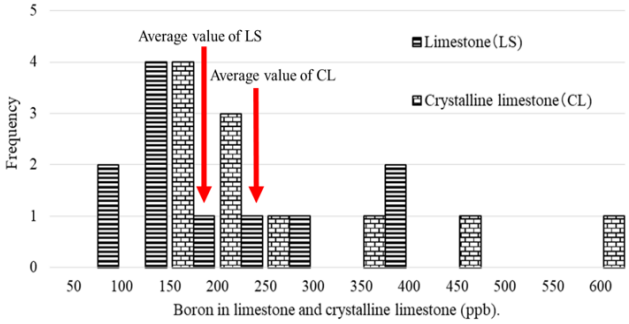


Fig. 6. Comparison of boron content between limestone and crystalline limestone.

第 2 ステージ：モンゾ閃緑岩より後期の石英モンゾニ岩の貫入である．この系の鉱物中の含水量の増加に伴いホウ酸塩鉱物は石英モンゾニ岩の δ^{11}B 値に近い値を示したことから，石英モンゾニ岩に伴う δ^{11}B 値の低い熱水によって，5-2 に示したように takedaite からは含水ホウ酸塩鉱物の nifontovite および olshanskyite に，また shimazakiite からは 5-3 に示したように uralborite，nifontovite および pentahydroborite が生成したことが考えられる．

第 3 ステージ：$CaO-B_2O_3-H_2O$ 系鉱物は低温で生成された鉱物ほど含水量は多いとされている (Hart and Brown., 1962)．研究対象としたホウ酸塩鉱物集合体を産する 2 露頭では，初生鉱物から隔たるほど，含水量の多いホウ酸塩鉱物が卓越して生成している．温度と δ^{11}B 値との関係についてはこれまで報告がないことから，低温になるにつれ同位体比が変化することの詳細はわからない．一方，石英モンゾニ岩の同位体組成は，布賀の各露頭でほぼ同じ値を示すことが Fig. 5 の誤差線からわかる．

含水ホウ酸塩鉱物に変化する過程で認められる δ^{11}B 値の減少は，^{11}B の相対的減少，^{10}B の相対的増加が生じたことに起因する．この原因の一つに同位体の質量の差異による拡散の違いが考えられる．すなわち，軽い同位体の方が重い同位体より拡散速度が速いため，含水ホウ酸塩鉱物に変化する過程で，

^{10}B の割合が相対的に増加したことが考えられ，石英モンゾニ岩に伴う熱水による含水化の際に，同位体交換反応によって δ^{10}B 値が次第に増加したことが推定される．

一方, 石灰岩が再結晶する際に放出されたホウ素が布賀のホウ酸塩鉱物生成に寄与したとする説（草地他，1999）は，Fig. 6 に示したように石灰岩と結晶質石灰岩との間でホウ素含有量にほとんど違いが見られず，しかも結晶質石灰岩の方が若干多いことからこの説では説明が難しいことがわかった．

以上から, 布賀鉱山ではモンゾ閃緑岩および石英モンゾニ岩のマグマ活動に伴った熱水によってホウ素が供給され, 石灰岩との反応によって CaO-B_2O_3-H_2O 系鉱物が生成したことが示唆された．

7. まとめ

同位体組成の研究から，布賀鉱山ではモンゾ閃緑岩および石英モンゾニ岩のマグマ活動に伴った熱水によってホウ素が供給され CaO-B_2O_3-H_2O 系鉱物が生成したことが示された．これら鉱物の生成過程は，以下の 3 ステージによって行われたと考えた．

第 1 ステージ: 高温のモンゾ閃緑岩の貫入とこれに伴う δ^{11}B 値の高い熱水と石灰岩との反応によって，初生鉱物である無水の takedaite や shimazakiite が生成した．これら鉱物は gehlenite および spurrite が生成したスカルン化初期にほぼ同時期に生成した．

第 2 ステージ: マグマ活動後期に貫入した石英モンゾニ岩と，これに伴ったより低温で δ^{11}B 値の低い熱水により，初成鉱物が含水ホウ酸塩鉱物に変化した．

第 3 ステージ: 石英モンゾニ岩に伴った熱水活動によるホウ素交換反応によって含水量の多い，δ^{11}B 値の低い種々のホウ酸塩鉱物が次第に生成した．

謝辞

本研究を実施するにあたって，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並びに財団関係者の各位に，またホウ素同位体およびホウ素含有量の分析を指導くださった岡山理科大学工学部猶原順教授に心より感謝申し上げます．

参考文献

藤原卓，高田雅介，益富寿之助，磯部敏雄，岡田久，中井泉，長島弘三 (1982) 岡山県布賀産五水灰ホウ石 pentahydroborite $CaB_2O_4 \cdot 5H_2O$．地学研究，33(1-3), 11-20.

Hart, P.B and Brown, C.S. (1962) The synthesis of new calcium borate compounds by hydrothermal methods. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 24, 1057-1065.

草地功 (2013) 高梁市備中町布賀地域から発見された多くの世界新種の鉱物について. 高梁川流域連盟機関誌「高梁川」掲載原稿，71，104-116.

Kusachi, I., Henmi, C. and Kobayashi, S. (1995) Takedaite, a new mineral from Fuka, Okayama Prefecture, Japan. Mineralogical Magazine, 59, 549-552.

草地功，小林祥一，逸見千代子，武智泰史 (1999) CaO-B_2O_3-H_2O 系のホウ酸塩鉱物：特に岡山県備中町布賀産の例について. 鉱物学雑誌, 28(2), 41-46.

Kusachi, I., Kobayashi, S., Takechi, Y., Nakamura, Y., Nagase, T., Yokoyama, K., Momma, K., Miyawaki, R., Shigeoka, M. and Matsubara, S. (2013) Shimazakiite-4M and shimazakiite-4O, $Ca_2B_2O_5$, two polytypes of a new mineral from Fuka, Okayama Prefecture, Japan. Mineralogical Magazine, 77, 93-105.

Kusachi, I, Shiraga, K., Kobayashi, S., Yamakawa, J. and Takechi, Y. (2000) Uralborite from Fuka, Okayama Prefecture, Japan. Journal of Mineralogical and Petrological Sciences, 95, 4-47.

Kusachi, I., Henmi, C. and Kobayashi, S. (1995) Frolovite from Fuka, Okayama Prefecture, Japan. Mineralogical Magazine, 17(7), 330-337.

Kusachi, I. and Henmi, C. (1994) Nifontovite and olshanskyite from Fuka, Okayama Prefecture, Japan. Mineralogical Magazine, 58, 279-284.

大井隆夫 (2001) ホウ素同位体地球化学．日本海水学会誌，55(1), 3-10.

大前暁政，草地功，小林祥一 (2002) 岡山県布賀に産する高温型スカルンを形成した火成岩類の岩石学的研究．岩石鉱物科学，31, 1-14.

高分子基複合材料の衝撃層間せん断特性評価法の確立

岡山理科大学　工学部　機械システム工学科

中　井　　賢　治

本研究の目的は，圧縮型ホプキンソン棒法を利用して，一方向強化カーボン／エポキシ複合材の衝撃層間せん断強度を決定することである．試験片形状としては，修正イオシペスクせん断（MIS）試験片を使用した．衝撃圧縮せん断荷重－変形関係の最大荷重から静的な評価式に基づいて，衝撃層間せん断強度を決定した．同一形状の MIS 試験片を使用して行なった静的圧縮せん断試験から得た層間せん断強度との比較により，変形速度の影響を明らかにした．その結果，層間せん断強度は，変形速度が上昇するにつれて約 1.5 m/s 以下の範囲では増加することがわかった．

１．緒　言

複合材料は金属材料と比較して比強度，比剛性が高く，疲労寿命や耐食性にも優れているため，近年航空機，自動車，スポーツ用具などの分野で広範に使用されている．しかし複合材料は積層構造を有するため，横荷重を受けたときに層間に剥離を生じ破壊し易い固有の弱点を有している．そのため，層間（面外）せん断強度は，複合材構造物の設計における重要な特性値であり，これを測定する 2 種類の試験法が，ASTM（アメリカ材料・試験学会）に規定されている．一つは短いはり状せん断（SBS）試験片による 3 点曲げ試験法 [1] であり，他の一つが 2 重切欠きせん断（DNS）試験片による引張り試験法 [2] である．しかし衝撃荷重下における層間せん断強度を測定する試験法は, 未だ規格化されていない．Harding と Li [3] は 2 重重合わせせん断試験片を使用して，引張り型ホプキンソン棒法により平織りガラス／エポキシ複合材と平織りカーボン／エポキシ複合材との組合せによる 3 種類の層間の衝撃せん断強度を測定している. Bouette ほか [4] は単純重合わせせん断試験片を使用して，引張り型ホプキンソン棒法により，一方向強化カーボン／エポキシ複合材の衝撃層間せん断特性を決定している．Dong と Harding [5] は, Bouette ほかと同様に単純重合わせせん断試験片を使用して，圧縮型ホプキンソン棒法により，カーボン／エポキシ複合材とカーボン／PEEK 複合材の層間せん断強度のひずみ速度依存性を明らかにしている. さらに, Harding と Dong [6] は 2 重重合わせせん断試験片によりカーボン／エポキシ複合材の衝撃層間せん断強度を同様な試験法により決定している．一方，Yokoyama ほか [7] は DNS 試験片を用いて，一方向強化カーボン／エポキシ複合材について，圧縮型ホプキンソン棒法により衝撃せん断強度を評価している．この DNS 試験片は機械加工が比較的簡単であるが，板厚が厚くなると切欠き底部の近傍での応力集中が大きくなり，せん断面での応力分布の一様性が低下することが，有限要素法による平面応力解析により判明した．

本研究の目的は，圧縮型ホプキンソン棒法 [8] を利用して，一方向強化カーボン／エポキシ複合材の衝撃層間せん断強度を測定することである．試験片形状としては, DNS 試験片よりも一層精密にせん断強度が測定できる修正イオシペスクせん断（MIS: Modified Iosipescu Shear）試験片 [9] を採用した．衝撃圧縮せん断荷重－変形関係の最大荷重から静的な評価式に基づいて, 衝撃層間せん断強度を決定した．同一形状の MIS 試験片を使用して行なった静的圧縮せん断試験から得た層間せん断強度との比較により，変形速度の影響を明らかにした．

２．供試材と試験片形状

試験に供した複合材料は，サカイ・コンポジット社製の厚さ 10.05 mm（42 プライ）の一方向強化カーボン／エポキシ複合材である．このカーボン／エ

ポキシ（T700/2592）複合材に使用した強化繊維，マトリックス樹脂の種類及び繊維体積含有率を，表 1 に示す．層間せん断強度試験に使用した厚さ h = 10.05 mm の MIS 試験片の形状寸法を，図 1 に示す．図中の座標軸 1, 2, 3 は直交異方性材料の主軸方向を表し，それぞれ繊維（縦）方向，面内横方向，板厚方向を示す．その試験片の諸寸法については，MSC Nastran 有限要素応力解析より決定し，長さ L = 23 mm，幅 b = 6.7 mm とし，2 つの切欠き底を結ぶせん断面の長さを l = 3 mm とした．この一方向強化カーボン／エポキシ複合材の基本的機械特性を測定するために，ASTM (D3039-76) に規定された帯板引張試験片（幅 25 mm, 長さ 250 mm, 厚さ h/10）を製作して，インストロン試験機によりクロスヘッド速度 2 mm/min で試験した．その測定した静的面内引張り特性値を，表 2 に示す．L は繊維方向を，T は繊維と垂直の方向を表す．表 2 より，一方向強化カーボン／エポキシ複合材の T 方向の引張特性は，L 方向のそれに比べて著しく低いことがわかる．即ち，繊維の配向$[0]_{42}$から予測されるように，一方向強化カーボン／エポキシ複合材は極めて強い異方性を示す．

表 1　本試験で使用した炭素繊維，マトリックス樹脂の種類及び繊維体積含有率

	Unidirectional carbon/epoxy
Fiber	T700 (Torayca)
Matrix resin	Epoxy #2592
Fiber volume ratio V_f	0.65

表 2　一方向強化カーボン／エポキシ複合材の静的面内引張り・物理的特性値

Tensile and Physical Properties	UD T700/2592	
	L (1-d)	T (2-d)
Young's modulus　E (GPa)	135	8.6
Tensile strength　σ_{TS} (MPa)	2016	37
Fracture strain　ε_f (%)	1.8	0.5
Wave velocity　c_o (m/s)	9273	2340
Mass density　ρ (kg/m^3)	1570	

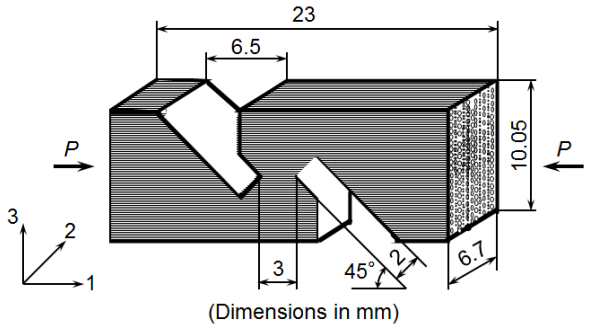


図 1　修正イオシペスクせん断（MIS）試験片の形状寸法

３．試験方法と測定原理

３・１　衝撃圧縮せん断試験方法

衝撃層間せん断強度を測定するために使用した圧縮型ホプキンソン棒装置の概略図を，図 2 に示す．弾性棒（入力棒と出力棒）は，直径 15 mm のマグネシウム合金（AZ80A–F）であり，入力棒と出力棒の長さはそれぞれ 2000 mm, 1000 mm である．打出し棒は直径 15 mm，長さ 350 mm のマグネシウム合金（AZ80A–F）である．試験手順を以下に説明する．まず曲げによる座屈を防止する治具（図 3 参照）を取付けた MIS 試験片を，入出力棒間に挟み込む（治具と試験片の上下面には，固体潤滑剤を塗布し，摩擦による変形拘束を低減している）．右端の支持ブロックと入力棒に取り付けた停止リング（PVC 製）を使用して MIS 試験片に予圧縮をかけ，入出力棒と MIS 試験片の両端面の接触面を密着させる．その後，圧縮空気により発射した打出し棒を，入力棒左端面に衝突させる．このとき，入力棒左端面にクッションとしてアルミニウム円板（直径 10 mm, 厚さ 0.2 mm）3 枚を，固体潤滑剤により貼付けている．これにより，入力棒内に立上がりのゆるやかな入射圧縮パルスを発生させ，MIS 試験片内に動的な力のつり合いが成立つ以前の破壊を防止している．入力棒内に発生したこの入射圧縮パルスは左から右へ伝ぱし MIS 試験片に達すると，機械的インピーダンスの違いによりその界面で一部は反射し，残りは MIS 試験片を透過して出力棒へ伝ぱする．この過程において MIS 試験片に作用する圧縮負荷パルスが限界値を越えると MIS 試験片は，切欠き部の底付近からき裂が

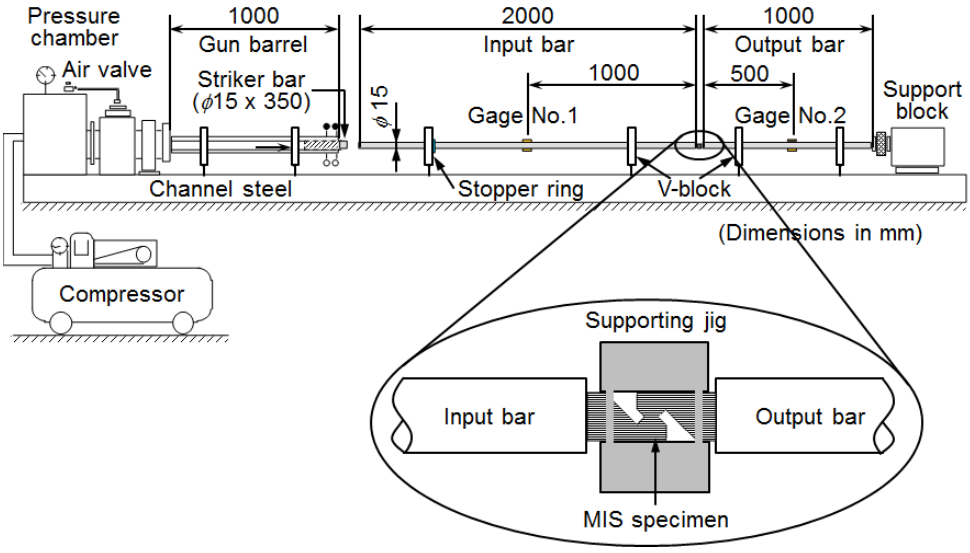


図２　圧縮型ホプキンソン棒法を使用した衝撃層間せん断試験装置の概略図

発生してせん断破壊を生じる．

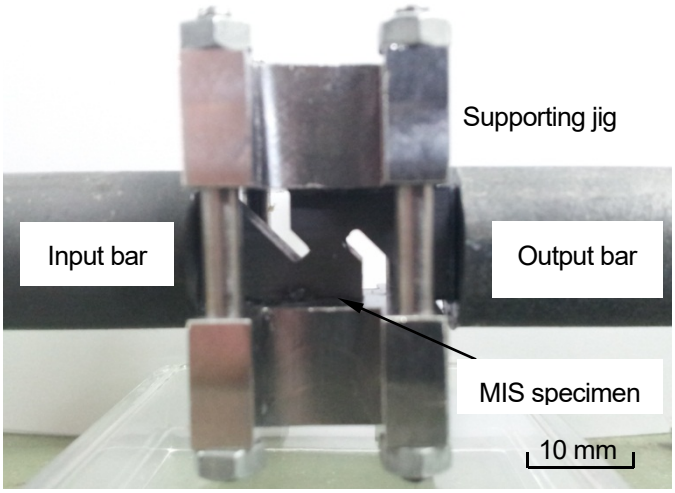


図３　ホプキンソン棒間に挟み込んだ座屈防止用治具付き MIS 試験片の写真

３・２　測定原理

MIS 試験片両端に作用する圧縮荷重と圧縮変位をそれぞれ P_1, P_2 と u_1, u_2 とすると，一次元弾性波伝ぱ理論に基づき，試験片の圧縮変形 $\delta(t)$，変形速度 $\dot{\delta}(t)$，圧縮荷重 $P(t)$ はそれぞれ次式より求めることができる[10].

$$\delta(t) = u_1(t) - u_2(t) = 2c_o \int_0^t \{\varepsilon_i(t') - \varepsilon_t(t')\}\,dt' \qquad (1)$$

$$\dot{\delta}(t) = \dot{u}_1(t) - \dot{u}_2(t) = 2c_o \{\varepsilon_i(t) - \varepsilon_t(t)\} \qquad (2)$$

$$P(t) = P_2(t) = AE\varepsilon_t(t) \qquad (3)$$

ここで，圧縮ひずみを正（＋）とする．A と E はそれぞれ弾性棒の断面積とヤング率（= 44.4 GPa），c_o は入出力棒内の縦波弾性波の伝ぱ速度（= 4953 m/s）を表す．但し，これらの式は試験片の両端での動的な力のつり合い $P_1(t) = P_2(t)$ 即ち，$\varepsilon_i(t) + \varepsilon_r(t) = \varepsilon_t(t)$ を仮定している．

４．試験結果および考察

４・１　静的圧縮せん断試験結果

静的層間せん断強度はインストロン試験機を使用して，MIS 試験片による圧縮せん断試験（クロスヘッド速度 V_c = 1, 50 mm/min）を行って測定した．治具を取付けた MIS 試験片の圧縮せん断試験より得られた圧縮荷重－変形関係の一例（V_c = 1 mm/min）を，図 4 に示す．試験片の変形は，試験片に圧縮負荷を加える上下のアンビル間に伸び計を取り付けて測定した．この図からわかるように，圧縮荷重－変形関係はほぼ線形関係を示し，約 0.14 mm の変形量で圧縮荷重が急激に 0 まで低下している．この結果から，圧縮荷重の最大値で切欠き底付近からせん断破壊したと考えられる．この最大圧縮荷重 P_{max} を以下の評価式 [2] に代入して，MIS 試験片の切欠き部間の平均層間せん断強度 を決定した．

$$\tau_{ILSS} = \frac{P_{max}}{A_s} \qquad (4)$$

P_{max}：最大圧縮荷重，A_s：せん断破壊面積

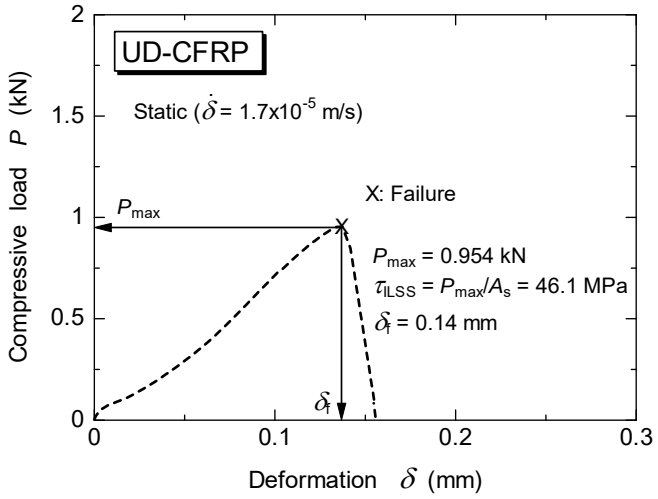
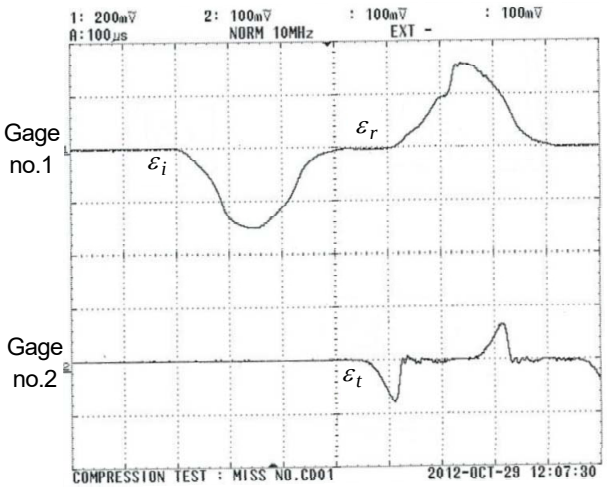


図4　MIS 試験片の静的層間せん断試験より得られた圧縮荷重－変形関係の一例

４・２　衝撃圧縮せん断試験結果

ホプキンソン棒試験より MIS 試験片を使用して得られたひずみゲージ出力の代表的なオシロスコープ記録を，図 5 に示す．この記録の横軸は時間，縦軸は出力電圧を表している．ひずみゲージ 1 より入射ひずみパルス $\varepsilon_i(t)$，反射ひずみパルス $\varepsilon_r(t)$ が，ひずみゲージ 2 より透過ひずみパルス $\varepsilon_t(t)$ が測定されている（注：それ以降に記録された反転ひずみパルスは，入出力棒の自由端からの反射波であって，試験結果には全く影響しない）．これらひずみパルスから MIS 試験片の両端に作用する圧縮荷重を決定すると，図 6 のようになる．これより両荷重はよく一致していることから，測定原理における仮定の妥当性が立証できた．つぎに MIS 試験片の圧縮荷重－変形速度－変形関係を，図 7 に示す．MIS 試験片は圧縮荷重の最大値 P_{max} で層間せん断破壊したと考えられるので，この P_{max} を式(4)に代入して衝撃層間せん断強度を評価した．図 7 から最大圧縮荷重 P_{max} で MIS 試験片がせん断破壊を開始すると圧縮荷重は急激に低下するが，それに対応して変形速度が急激に上昇することがわかる．その後，変形速度がさらに上昇し続けるのは，せん断破壊後も MIS 試験片の両端が初期負荷パルスの持続により圧縮変形を受けるためである．変形速度が層間せん断強度に及ぼす影響を調べるために，静的及び衝撃層間せん断強度を破壊時の変形速度（$\dot{\delta}_f = \delta_f / t_f$; t_f は破壊開始時刻）に対してプロットした結果を，図 8 に示す．この図より，層間せん断強度は，破壊時の変形速度が上昇するにつれて増加していることがわかる．これは，母材であるエポキシ樹脂自身が正のひずみ速度依存性を示すためである．



Sweep rate: 100μs/div
Vertical sensitivity:
Upper trace: 200mV/div (497με/div)
Lower trace: 100mV/div (250με/div)

図5　MIS 試験片の衝撃層間せん断試験より得られたオシロスコープ記録例

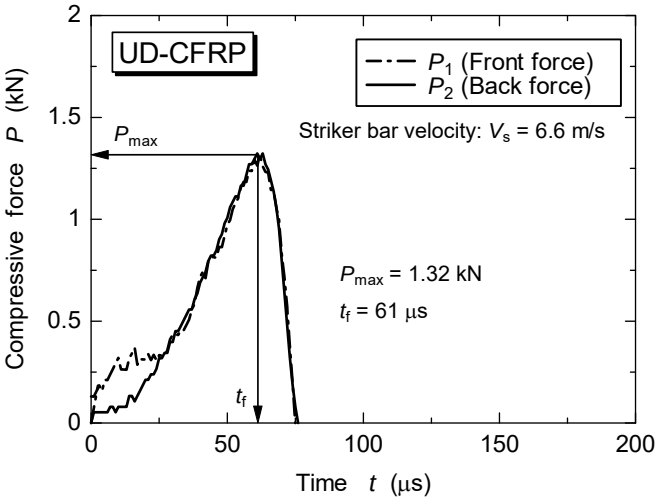


図6　MIS 試験片両端面に作用する衝撃圧縮荷重の時間的変化

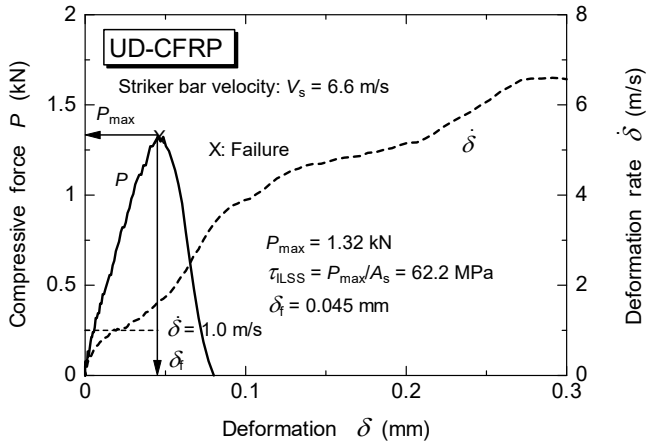


図 7　MIS 試験片の衝撃層間せん断試験より得られた圧縮荷重－変形速度－変形関係

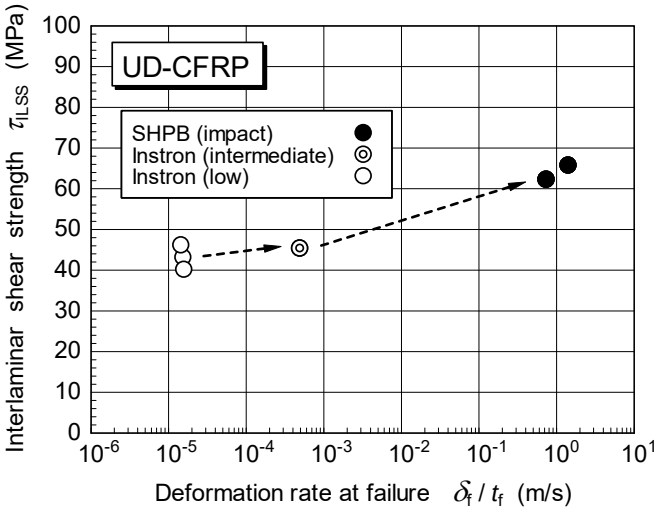


図 8　層間せん断強度に及ぼす破壊時の変形速度の影響

5．結　言

一方向強化カーボン／エポキシ複合材（T700/2592）の衝撃層間せん断強度を，MIS 試験片を使用して圧縮型ホプキンソン棒法により決定する方法を開発した．変形速度依存性を検討するために，インストロン試験機による圧縮せん断試験から決定した静的層間せん断強度と比較した．その結果，層間せん断強度は，変形速度が上昇するにつれて約 1.5 m/s 以下の範囲では増加することがわかった．現状の衝撃速度より大きくすると，MIS 試験片内に動的なつり合いが成立つ前にせん断破壊が生じるので，妥当な衝撃せん断強度が得られない．そのため，破壊時の変形速度は最大 1.5 m/s 程度に限定される．また，静的及び衝撃層間せん断強度に及ぼす負荷様式の影響も明らかにするため，今後 MIS 試験片を使用して引張り及びねじり試験を実施する予定である．

謝　辞

本研究の遂行にあたり，ご助成いただいた公益財団法人 ウエスコ学術振興財団に深く感謝致します．

参考文献

[1] ASTM D2344-84: ASTM Standards and Literature References for Composite Materials, 2nd Ed., American Society for Testing and Materials, Philadelphia (1990).

[2] ASTM D3846-79: ASTM Standards and Literature References for Composite Materials, 2nd Ed., American Society for Testing and Materials, Philadelphia (1990).

[3] J. Harding and Y.L. Li: *Composites Science and Technology*, **45** (1992), 161-171.

[4] B. Bouette, C. Cazeneuve and C. Oytana: *Composites Science and Technology*, **45** (1992), 313-321.

[5] L. Dong and J. Harding: *Composites*, **25** (1994), 129-138.

[6] J. Harding and L. Dong: *Composites Science and Technology*, **51** (1994), 347-358.

[7] 横山　隆，中井賢治：材料, **55** (2006), 831-836.

[8] H. Kolsky: *Proceedings of the Physical Society*, **B62** (1949), 676-700.

[9] 宮島達也：日本実験力学会 2004 年度年次講演会講演論文集, (2004), 141-145.

[10] U.S. Lindholm: *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, **12** (1964), 317-335.

防災気象情報基準を備えた雨量計システムの開発

岡山理科大学　生物地球学部　生物地球学科

佐藤丈晴

近年多発する局所的な集中豪雨によって、全国各地で土砂災害が発生している。雨の降り方が、局所的、集中的に発生することに対して、都道府県や自治体からの情報提供の側面からさまざまな課題が取り上げられている。その中でも避難情報の適切な伝達については、大きな課題となっている。情報提供は自治体の役目であるが人材不足等解決困難な問題が山積している。本研究は、このような公助に頼らず、自助・共助に視点を移し、自分たちの避難情報を確保するために簡易な警戒避難システムを構築する方針に基づき、極小かつ簡易な情報提供システムの開発を試みた。その結果、自治会単位での降雨量を的確に観測・評価し、住民の避難に寄与した。

１．はじめに

集中豪雨によって，要配慮者利用施設の被災事例が数多く報告されている。例えば，岩手県の要配慮者利用施設において，利用者９名全員が避難の遅れによって被災した[1)]。平成 21 年山口県防府市で発生した土石流災害では，要配慮者利用施設に土石流が直撃し大きな被害となった[2)]。このような状況を踏まえ，H29 に土砂災害防止法が改正され市町村地域防災計画に定められた要配慮者利用施設は，避難確保計画作成および避難訓練の実施が義務化された[3)]。

筆者は，要配慮者施設における避難計画作成等に関するモデル事業に参画し要配慮者施設の管理者及び自治体の方々とワークショップや現地調査に同行した。要配慮者利用施設には，移動そのものが大変となる方々もおり，避難訓練も相当な規模となる。避難確保計画の策定において，避難開始のタイミングは，自治体の避難勧告や避難準備・高齢者等避難開始，あるいは気象庁発表の大雨警報（土砂災害），土砂災害警戒情報が目安となる[4)]。しかし，ワークショップを行った施設の管理者は，役所からの情報を待つことなく，前兆現象を確認した際には，直ちに施設内避難を開始する方針とした。避難情報や防災気象情報は，ある一定の地域を考慮して発表されるものであり，当該施設を対象とするピンポイントの情報ではないという意見を踏まえてのものであった。この点の改善策の１つとして，各施設に雨量計を設置，避難情報を表示し，当該施設に応じた避難のタイミングを提供する方策が挙げられる。

佐藤（2018）[5)] は，防災気象情報発表に使用する解析雨量と地上雨量計の雨量値で回帰分析を実施し，地上雨量計による防災気象情報の基準値作成方法を提案した。その際に地上雨量計を設置した自治体では大雨注意報が 31 回発表された期間中に，地上雨量計の補正基準は４回しか超過しなかった。この結果は，対象となる市町村で防災気象情報が発表されたとしても，当該地域では防災気象情報発表に相当する降雨でなかったことを示している。この方法は地上雨量計に付与する基準設定を可能にし，基準超過を伝達する方法があれば，施設や自治会等に設置し，警戒避難に利用することができる。

地上雨量計を用いた警戒避難システムの開発事例としては，福岡他（2016）[6)] がある。福岡他のプロジェクトは，地域住民が理解しやすい降雨指標を提案し，web 配信システムを構築することで，いつでも降雨状況を確認でき，早めの警戒避難に結びつける取り組みである。県市町村などが自主避難に用いるツールとして大変有効なシステムである。しかしながら，通信コスト，専用サーバが必要となり，規模が大きくなることから，小さな施設や自治会が独自に運用することを目的としたシステムではない。

個々の施設および自治会が自助能力を発揮し，効果的な警戒避難に結びつけるためには，その施設周辺の気象情報を明確に捉え，かつ施設管理者に的確

に情報を伝達する必要がある。本研究は，防災気象情報に相当する基準値を付与した地上雨量計に基づき，誰もがわかりやすい情報伝達機能を備えた極めて小規模で簡易な警戒避難システムを開発し，実際に観測を行った事例を報告する。

２．システムの概要

2.1 開発仕様

提案する警戒避難システムは，対象とする施設や自治会等で降雨量観測を行い，その観測結果を演算してあらかじめ設定しておいた基準値と比較して超過した場合，警報を表示するシステムである。提案する警戒避難システムの概要を図－1 に示す。

2.1.1 リアルタイム方式

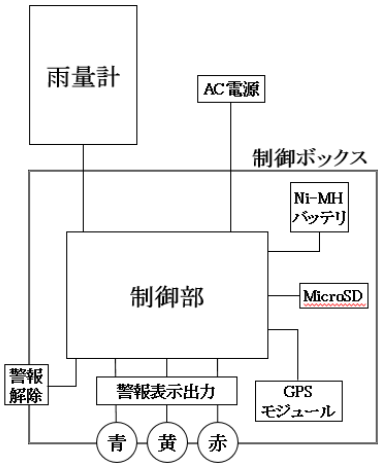
雨量計は 10 分単位で観測できる機器を使用し，10 分毎に得られた観測データを用いて演算し，リアルタイムに表示する。

2.1.2 単一センサー対応

提案する警戒避難システムには，当地の降雨量に基づいたリスク評価を目的としているため，一つの雨量計に一つの観測制御器を配置するシステムとした。データロガーを含む観測制御部分を極めてシンプルにし，最大限のコストダウンを図る。

2.1.3 拡張性

提案する警戒避難システムは，10 分毎に得られた観測データを用いて演算し表示するのみの最小限の機能しか有していない。しかし，必要に応じてメールなどで遠隔地への通信，あるいはサイレン，ブザー等情報伝達の機能拡張は，各種市販品の採用を可能にした。



図－1　システム概要図

2.1.4 電源

電源は AC100V を用いる。施設や自治会等で実施する目的のため，電源が近辺にあり常に利用できると考えた。また，提案する警戒避難システムは，降雨中はランプが点灯し続けるため，大量の電力を必要とする。事故や停電などに対応するため，観測制御器内に蓄電池を内蔵した。ランプが常時点灯した場合最大 24 時間までの容量を持つ。

2.1.5 時計（時刻補正）

時計は CPU に内蔵されている。クロック精度の高さのみで CPU を選択するとかなりオーバースペックとなるため，現状の内蔵＋GPS 補正という構成とし，コスト最適化を図った。毎日午前 2 時に時刻補正を行う。

2.1.6 コスト

自治会や個別の施設が利用するため，出来る限りのコストダウンを図り，独自に購入できる価格帯とした。そのため，雨量計，観測制御器のみの極めてシンプルな構成である。小さな施設が最も重視するランニングコストは，電源のみとした。基準値については，警戒避難システムが設置される場所に応じて初期設定時から付与されており，そのまま設置，運用できる状態とした。

2.2 基本構成

上記の仕様に基づき本研究で提案する警戒避難システムの基本構成を以下に示す。

2.2.1 観測機器（地上雨量計）

計測機器メーカーが販売している気象庁検定付きの地上雨量計を用いることができる。転倒マス方式の雨量計から信号パルスを受信し，読み取る設計としている。

2.2.2 観測制御器（写真－1）

本研究は，この観測制御器を開発したものである。観測制御器は，制御部，データロガー，電源，表示部から構成される。

制御部は，16bit のマイコン制御で雨量のカウン



写真－1　観測制御器



写真－2　現地観測状況

トは最大 1,200mm/10 分まで対応とした。データロガーは microSD（最大 32bit，FAT32）を用いた。電源は AC100V である。雨量計接続ケーブルの短絡や断線判定機能も搭載し，GPS モジュールによる時刻補正も行う。観測制御器は，野外に設置することもあり，豪雨時の水の影響を受ける。そのため，観測制御器の防塵防水性は，IP43 クラスの保護能力を備えた樹脂製ボックスに収納した。

また，基準超過などに関する情報をメールなどで遠隔地に発信する場合は，別途市販の通信システムを取り付けることを可能としている。

データロガーは，microSD に保存させる方式を採用した。観測値を 10 分間隔で microSD に csv 形式で保存する仕様である。観測値は 10 分毎に時刻と観測値が行方向に保存蓄積される。MicroSD には，10 分毎の観測値保存用の log ファイル，基準値データを含む param ファイル，システム動作確認用の syslog ファイルの 3 つのファイルが保存される。

電源は通常 AC100V を用いる。施設内外のコンセントから電源を引き観測制御器に接続する。この AC100V の他に事故および停電用にバッテリーを内蔵した。

表示部は，データロガー正面に 3 色（赤，黄，青）のランプを信号機の並びに取り付けた。これにより誰でも現在の危険度をイメージできるようにした。夜間の豪雨時でも，数十メートル先からランプははっきりと識別できた。

３．開発段階での検討課題と対応策

本システムは 2017 年 6 月に完成し，試行観測を実施している。試行前から懸念された課題とその対応について以下に示す。

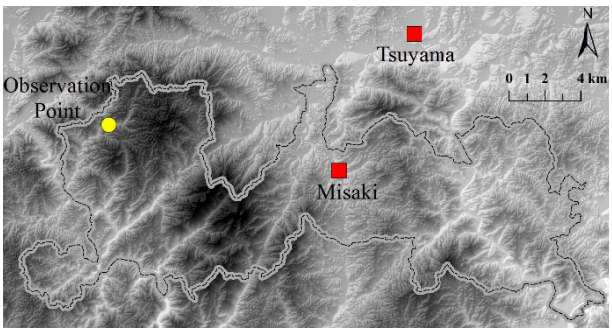
3.1 高温（熱）問題

季節を問わず安定的に常時観測を行うためには，高温・発熱問題を解決しなければならない。今回は防水規格を満たすために密閉性を重視した構造となっている。そこで，観測制御器はやや大きめの 250×400×160(mm)の樹脂製ボックスに格納した。また，通気性を考慮し，水を通さず，空気のみを通す構造のものを用いた。

発熱問題について対応策を施した観測制御器を用いて 2017 年 6 月から試行観測を行った。岡山理科大学 C2 号館屋上のほぼ日中日向の場所で，屋上コンクリートに直置きする悪条件にて観測を行い，9 月末まで実施した。最も近接した岡山地方気象台のアメダスデータ 7）では，7 月以降 30 度以上の夏日が 64 日，35 度以上の猛暑日が 9 日と，例年以上の猛暑となったが，特に異常は見られず正常に観測したデータを回収できた。

3.2 基準超過表示

降雨を観測し，解析した結果安全，注意，危険の三段階を表示することを考慮して三つのランプを並べることを考案した（写真－1）。しかし観測管理を行ううちに，降雨があることを認識しているか，あるいはある程度のまとまりのある降雨を認識しているかを確認したい意見があり，表示について工夫の必要性が生じた。そこで，赤，黄，青のイメージと合致するような基準を考慮し，基準超過と表示につ



図－2　観測箇所（岡山県美咲町）

いて，以下の 5 段階とした。

・Level1 青点滅：降雨検知（1㎜ 以上）

・Lebel2 青点灯：まとまった降雨（10㎜ 以上）

・Lebel3 黄点灯：注意（大雨注意報相当）

・Lebel4 赤点灯：危険（大雨警報相当）

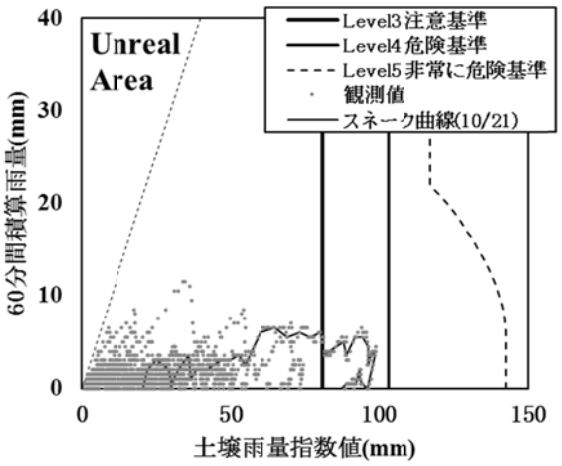
・Lebel5 赤点滅：非常に危険（土砂災害警戒情報相当）

降雨があるごとに青色の点滅によって，本システムが正常に動いていることを確認できる。一連降雨が 10㎜ 以上となったときに青色が点灯し，危険度を知ることができる。注意基準までは土砂災害の恐れが小さいと判断し安全をイメージできる青点灯でよいと判断した。本警戒避難システムで設定できるのは注意，危険，非常に危険の三段階の基準値とした。この基準値は，現行の気象予報で用いられている 60 分間積算雨量と土壌雨量指数値の二つの指標を用いて 1㎜ 単位で設定できる。この基準値を 10 分単位で確認表示することができる。

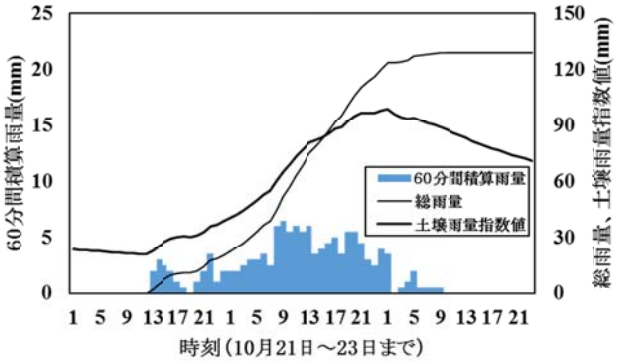
４．観測事例

岡山県美咲町において，本警戒避難システムを設置し観測を開始した（図－2）。当地は三郡変成岩類に覆われ，岡山県内でも土砂災害の多発地域として知られている。平成 27 年と平成 29 年には集中豪雨によって土砂災害が多発し，合わせて民家が 3 件被災した（佐藤，中島，2015）[8]。谷部に集落があり，土砂災害危険箇所が集中している地域である。

観測機器の設置状況を写真－2 に示した。本観測では，自治会の防災担当部長宅の庭に設置し，観測制御器は地上雨量計と同じ位置に設置した。雨量計



図－3　地上雨量計に付与した防災気象情報基準値

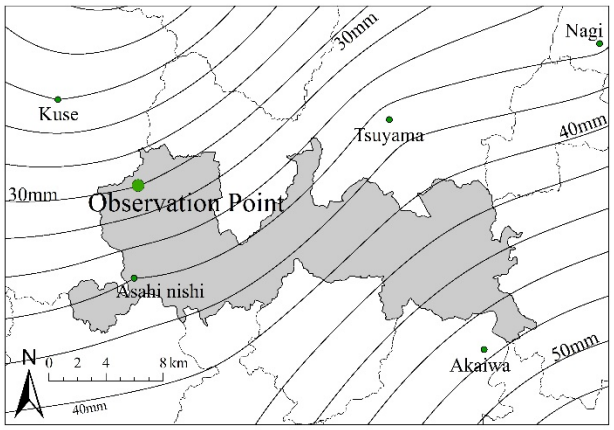


図－4　10 月 21 日～23 日の降雨と基準超過

及び観測制御器は，ケーブルで接続されていれば，任意に設置可能であり，雨量計のみを自宅の庭あるいは屋根に取り付け，観測制御器を室内に設置する案も考えられる。

観測開始時からの観測データを整理した。すべての観測において 10 分間雨量を回収した（充足率 100%）。基準値は，佐藤 (2018) の方法を基にして，当該地区の大雨注意報，大雨警報（土砂災害），土砂災害警戒情報に相当する地上雨量計の基準値を算定した。観測データと基準値との関係を図－3 に示した。基準値と観測データを確認すると一事例のみ大雨注意報を超過した。この事例のハイエトグラフを図－4 に示した。この降雨中に大雨注意報が発表されたのが，22 日の 5 時 53 分であった。観測データが大雨注意報基準値を超過した時刻は 22 日 14 時であり，約 8 時間の差を生じた。

22 日 6 時の美咲町周辺のアメダスデータを整理した（図－5）。このとき，美咲町の大半は，40～50㎜



図－5　10 月 22 日 6 時の等雨量線図

の降雨となっていたが，観測地点である美咲町の北西部はまだ 30㎜ 前後の降雨しかない。土壌雨量指数値も 52.9㎜ と大雨注意報基準の 81.2㎜ を大きく下回っていた。図－5 のように，当該地域のみ雨量値が少ない状況から防災気象情報より基準値超過時刻が遅れた。

この豪雨で，美咲町南部の栃原で道路災害が発生した（24 日 17 時報告）[9]が，観測箇所周辺での災害はなかった。美咲町では，10 時 20 分に大雨警報（土砂災害）が発表されたが，警戒避難システムは大雨警報（土砂災害）の基準値を超過することはなかった。

５．まとめと今後の課題

本研究は，防災気象情報に相当する基準値を付与した地上雨量計を配置し，誰もがわかりやすい情報伝達機能を備えた極めて小規模で簡易な防災気象システムを構築することを目的とした。写真－2 で示したとおり，極めて簡易で小規模な警戒避難システムであり，電源以外のランニングコストを必要としない。雨量データの観測およびデータ蓄積と観測値を用いて当該地区における防災気象情報基準との比較から，現時点の降雨状況を表示することができた。自治会の自主避難，要配慮者利用施設の避難確保計画，工事現場での豪雨状況表示等さまざまな現場で雨量状況を表示することができる。

課題は，基準値をあらかじめ付与する点である。任意の設置箇所に対して任意の基準値を解析して，あらかじめ基準値を付与しなければならない。現時点では，著者が対応しているが，今後の普及を考える上で改善する必要がある。

現在岡山県美咲町の他、奈良県、静岡県、広島県等の地域において本システムを設置、運用を開始しており、その効果を今後評価する予定である。

謝辞

本研究は，公益財団法人ウエスコ学術振興財団の学術研究費助成事業において研究助成を頂き実施しているものである。ここに記して感謝申し上げます。

参考文献

1) 国土交通省砂防部：平成 28 年の土砂災害，p. 39，http://www.mlit.go.jp/river/sabo/jirei/h28dosha/H28_dosyasaigai.pdf，参照 2018-05-01，2018
2) 古川浩平・海堀正博・久保田哲也・地頭園隆・権田豊・杉原成満・林真一郎・池田暁彦・荒木義則・柏原佳明：2009 年 7 月 21 日山口県防府市での土砂災害緊急調査報告，砂防学会誌，vol. 62，No. 3，p62-73，2009
3) 国土交通省砂防部：土砂災害警戒区域等における土砂災害防止対策の推進に関する法律（H29 改正後本文），p .14，http://www.mlit.go.jp/common/001195611.pdf，参照 2018-05-11，2018
4) 国土交通省水管理・国土保全局，砂防部砂防計画課：要配慮者利用施設管理者のための土砂災害避難確保計画作成の手引き，p. 24，2017. 6
5) 佐藤丈晴：地上雨量計観測値に基づいた防災気象情報基準の設定方法，土木学会論文集 B1（水工学），Vol. 74，No. 2，pp. 23-31，2018. 5
6) 福岡浩，井ノ口宗成，内山智文，堀松崇，小林雄三，木村浩和：裏山雨量計プロジェクトによるデータ配信と住民の防災意識の変化，平成 28 年度砂防学会研究発表会概要集，pp. B-180～B-181，2016

7)岡山地方気象台:岡山県の気象(2017年6月～2018年4月まで),
http://www.jma-net.go.jp/okayama/guide/geppou.html, 参照 2018-05-06, 2018
8)佐藤丈晴, 中島翔吾：大規模崩壊の兆候となる微地形の抽出手法　ー天川村における評価事例ー, 日本地すべり学会誌, Vol52, No.3, pp.29-33, 2015
9) 岡山県土木部道路整備課：岡山県道路規制情報, http://dosei.pref.okayama.jp/dourokisei/index.php, 参照 2018-05-06, 2018

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
～遺伝的な地理的境界線の成立要因の解明～

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りの良い海岸沿いの草地に生育している。継続的に行われている申請者らの研究から、日本産ヤリテンツキには遺伝的に大きく異なる 3 系統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、これらの遺伝的に異なる系統の境界と考えられる地域からヤリテンツキを収集し、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）異なる系統がどのような過程で生じてきたのかを明らかにすることを目的とした。その結果、本州（神奈川県、和歌山県、山口県）・九州（長崎県）・沖縄本島に広域分布する系統①と南西諸島・台湾に分布する南方系統③との境界は南西諸島にあり、特に系統③の分布の北限は種子島であることがわかった。また、長崎県と佐賀県に局所的に分布する系統②は、過去の気候変動に伴って九州西部のレフュジアに分断された結果、独自に遺伝的に分化した系統であることが考えられた。

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り、日当りの良い海岸沿いの草地に生育している（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）、南西諸島各島に分布している（初島 2004、山口県高等学校教育研究会ほか 2002、星野・正木 2011）。



図1. ヤリテンツキの花穂.

昨年度の本研究助成も含め継続的に行われている申請者らの研究から、日本産ヤリテンツキには遺伝的に大きく異なる次の 3 系統があることが分かってきた（Yano and Hoshino 2006、田村 他 2018、2019、矢野 2018）。系統①：本州と沖縄本島に分布するヤリテンツキ。系統②：長崎県に分布するヤリテンツキ。系統③：南西諸島に分布するヤリテンツキ。

しかしながら、これらのヤリテンツキの遺伝的に異なる系統の詳細な境界地域は未だに分かっておらず、また、昨年度に新たに検出された長崎県の系統②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。そこで本年度の研究助成では、遺伝的に異なる系統の境界と考えられる地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を、DNA と染色体解析データに基づいて明らかにすることを目的とした。

材料および方法

現在までに日本各地から合計 34 地点 201 個体のヤリテンツキ標本を収集しており、このうち、今年度の本研究助成によって 2018 年 9 月に長崎県（壱岐島）・佐賀県・鹿児島県（種子島）から 6 地点 55 個体を収集した。

収集した個体のうち、現在までに染色体解析には 16 個体、葉緑体 DNA 解析には 201 個体、核 DNA 解析には 184 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。

解析方法は、昨年度の報告書（矢野 2018）に基づいて、染色体解析と DNA 解析を行った。

結果および考察

1. 染色体解析

これまでに日本産ヤリテンツキの染色体数は 2n=20 が知られており（Yano and Hoshino 2006、田村 他 2018、矢野 2018）、今回、系統②の長崎県のヤリテンツキの染色体数を調べたところ、2n=20 であり、染色体の種内変異は見られなかった（田村 他 2019）。なお、申請者らによって、現在までに 13 地点 16 個体の日本産ヤリテンツキの染色体解析がされており、すべて 2n=20 であることがわかっている。

2. DNA 解析

葉緑体 DNA は 3 領域（*rpL*16 intron、*rps*16 intron、*trnL* intron & *trnL-F* IGS）約 2900bp を解析しており、日本産ヤリテンツキには、合計で 4 つ（a～d）のタイプ（ハプロタイプ）が認められた（図 2）。このうち、長崎県の集団にはハプロタイプ a と b が混在していた。佐賀県の集団にはハプロタイプ b であった。また、種子島の集団はハプロタイプ d であり、新たなタイプが検出された。また、ハプロタイプ間の系統関係を調べた結果、ハプロタイプ d は、これまでにわかっている系統③の南西諸島のタイプと最も近縁であることがわかった。

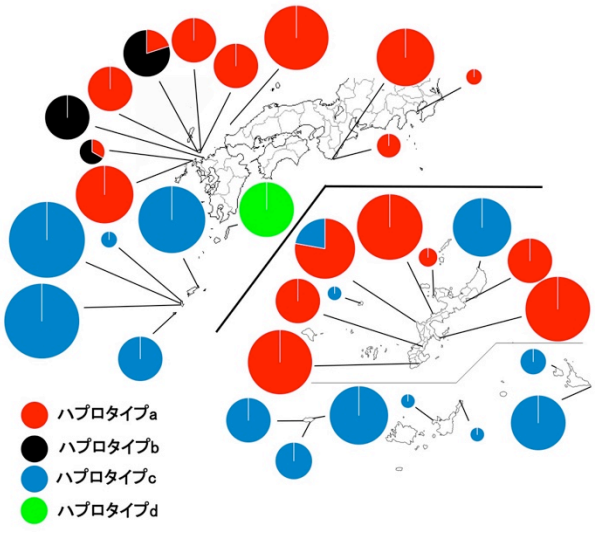


図 2. 葉緑体 DNA 領域のハプロタイプの地理的分布. 4 つのハプロタイプが認識された（a～d）. 各タイプの円の大きさはサンプル数を示す.

核 DNA は ITS 領域（610bp から 617bp）を解析し、合計で 19 つ（A～S）のタイプ（リボタイプ）が認められた（図 3）。このうち、長崎県の集団にはリボタイプ A と B の個体が混在していた。佐賀県の集団はすべてリボタイプ B であった。また、種子島の集団はすべてリボタイプ C であり、南西諸島南部や台湾で見られたタイプと同じであった。これらのリボタイプ A と C は遺伝的に大きく異なっていたが、リボタイプ A と B は最も近縁であった。そのほかのリボタイプ D～S は南西諸島中北部（宮古から奄美大島）で見られ、リボタイプ A と C の両方の塩基配列を共有していることがわかった。

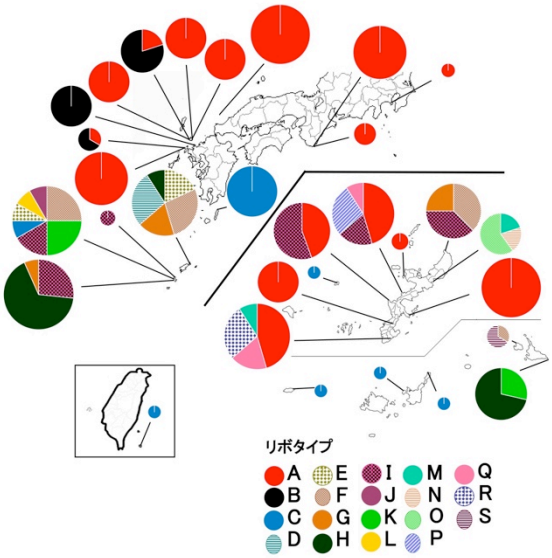


図 3. 核 DNA ITS 領域のリボタイプの地理的分布. 19 つのリボタイプが認識された（A～S）. 各タイプの円の大きさはサンプル数を示す.

今回の解析結果とこれまでの結果から、現存している日本産ヤリテンツキの葉緑体 DNA には遺伝的に大きく異なる 3 系統があり、その分布は次の通りである。系統①は本州（神奈川県、和歌山県、山口県）、九州（長崎県）、沖縄本島のヤリテンツキ。系統②は長崎県と佐賀県に局所的に分布するヤリテンツキ。系統③は種子島以南の南西諸島および台湾のヤリテンツキ（図 4）。したがって、系統①は比較的に広域分布する系統であり、系統③は南方系の系統であり、その境界は南西諸島になり、特に系統③の分布の北限は種子島であることが明らかとなった。さらに、核 DNA から、南西諸島中北部（宮古から奄美大島）において、系統①と系統③の交雑が起きていることが示唆された。

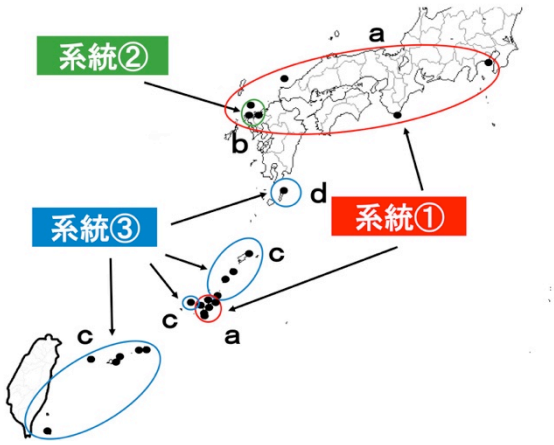


図 4. ヤリテンツキの 3 系統の地理的分布図.

また、系統②は九州西部の非常に狭い地域に特異的であることがわかった。日本列島の植物の遺伝的な分化は、第四紀の氷期・間氷期の繰り返しによる気候変動が大きな影響を与えているとされている(Yano et al. 2010)。特に、植物種は氷期・間氷期にそれぞれの生育適地（レフュジア）に分布を縮小させていたことが報告されており、この地理的に隔離・分断されたレフュジアにおいて、種の分布が縮小し、集団が細分化されることで、地域集団間の遺伝的分化が起こったと推定されている（池田・瀬戸口 2007)。中西（1996）によると、九州西部にも南方系の植物種のレフュジアがあったと考えられており、ヤリテンツキ系統②は九州西部のレフュジアで独自に遺伝的に分化した系統であると考えられる。

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）および矢野研究室の皆様に御世話になりました。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、平成 29 年度・30 年度に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.

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.

池田 啓・瀬戸口浩彰（2007）地球環境変動による植物の分布の変化と遺伝的構造. 清水健太郎・長谷部光泰監修 : 植物細胞工学シリーズ 23 植物の進化ー基本概念からモデル生物を活用した比較・進化ゲノム学まで. pp. 153-160. 秀潤社, 東京.

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 回大会実行員会.

田村優希・齊藤由紀子・池田 博・矢野興一（2019）日本産ヤリテンツキ（カヤツリグサ科）における遺伝的多型の地理的構造. 日本植物分類学会第 18 回大会研究発表要旨集. p. 54. 日本植物分類学会第 18 回大会実行員会.

中西弘樹（1996）九州西廻り分布植物：定義, 構成, 起源. 植物分類, 地理 47(1):113-124

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.

矢野興一（2018）日本産ヤリテンツキの（カヤツリグサ科植物）の系統分類学的研究. 平成 29 年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団 研究成果報告書集. pp. 70-71. 公益財団法人ウエスコ学術振興財団, 岡山.

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, Hoshino T (2010) Phylogeography of Japanese common sedge, *Carex conica* complex (Cyperaceae), based on chloroplast DNA sequence data, and chromosomal variation. Am J Bot 97: 1365-1376.

運動は炎症性腸疾患を予防するポジティブ・アクションとなりうるか？

倉敷芸術科学大学　生命科学部　健康科学科

椎葉　大輔

（概要）

本研究では，炎症性腸疾患モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎マウスを用いて，自発運動の実施が大腸炎症状に及ぼす効果について検討を行った。その結果，3 週間の自発運動の実施により，DSS 大腸炎症状である体重減少，疾患活動指数の上昇および大腸の短縮が抑制される傾向が観察された。一方で，この抑制効果は 1 週間の自発運動実施では観察されなかった。以上の結果は，マウスにおいて自発運動の実施により DSS 誘導性大腸炎を抑制できる可能性があり，その抑制効果には運動期間が影響することを示唆するものであった。

［緒言］

炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease；IBD)は，主にクローン病（Crohn Disease ； CD）と潰瘍性大腸炎（Ulcerative Colitis；UC）に大別される炎症性疾患であり，国の指定難病である。IBD の発症には，遺伝要因および環境要因が影響することが知られている。さらに近年では，前述の要因により影響を受けると考えられる腸内細菌の関与が知られており，その全容は未だ不明な点も多い。一方で，IBD の発症は青年期で観察されることが多く，環境要因の影響を長期間受けていることが推察されることから，環境要因により制御できる可能性も期待される。

運動が IBD，特に UC に対して抑制的に作用する可能性について，ヒトおよび実験動物を対象とした報告がなされている。Elsenbruch ら（Psychother Psychosom, 2005）は UC 患者を対象とした調査において，中等度の運動を含む 10 週間のプログラムを実施した結果，UC 患者の IBD 特異的 QOL 尺度が改善されたと報告している。また Cook ら（Brain Behav Immun, 2013）は UC モデルとして知られるデキストラン硫酸ナトリウム(Dextran Sulfate sodium:DSS)誘導性大腸炎を用いた報告から，自発的な運動により大腸炎症状が軽減されたことを報告している。一方でこれらの抑制／軽減メカニズムは明らかとはなっておらず，「UC に対する運動療法」を確立するためには，より一層の知見の蓄積が必要である。

そこで本研究では， DSS 誘導性大腸炎マウスを用いて，運動の実施が大腸炎に及ぼす影響とそのメカニズムについて明らかにすることを目的として検討を行った。

［方法］

実験動物:実験には 6 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本 SLC）を用いた。マウスは予備飼育ののち，安静群（SED 群），1 週間運動群（1WEX 群）および 3 週間運動群（3WEX 群）に振り分けた。その際，各グループ間で平均体重値および分散に差異が出ないように留意した。飼育条件は室温 21℃～24℃，湿度 40%～60%および 12 時間毎の明暗サイクル（明期 8:00～20:00，暗期 20:00～8:00）とし，全てのマウスは個別ケージにより飼育した。飼料および飲料水は自由摂取とした。実験は倉敷芸術科学大学動物委員会の承認を受けた上で，倉敷芸術科学大学の動物実験指針を遵守し行った。

実験プロトコール：

飼育は全てのグループで同時に開始した（図 1）。大腸炎誘導前の事前飼育期間は，予備飼育期間を 1 週間および運動実施期間を 3 週間とした。自発運動は飼育ケージ内にワイヤレス型ランニングホイール（ブレインサイエンス・イデア）を設置することで

実施させた。このシステムは，機器本体（レシーバー）に円形のランニングホイールを設置することで運動実施が可能となるとともに，その運動量についてホイールの回転数から定量できるものであった。運動実施期間中，3WEX 群には自発運動を 3 週間実施させた。1WEX 群は，運動実施期間の最初 2 週間はレシーバー部分のみ設置してホイール運動を実施できない形で飼育し，最後の一週間のみランニングホイールを設置して運動を実施させた。SED 群は運動期間中，レシーバーのみを設置し飼育した。

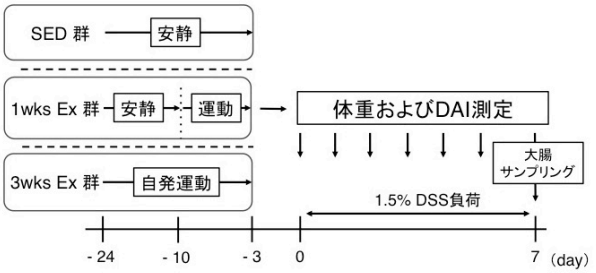


図1 実験プロトコール

DSS 大腸炎の誘導と評価

運動期間終了 72 時間後，DSS 大腸炎の誘導を開始した（図 1）。DSS 大腸炎は先行研究を参考に，DSS（MP バイオメディカル）を 1.5%濃度になるよう蒸留水で溶解した溶液（DSS 溶液）を，飲料水として自由摂取させることで誘導した。DSS 溶液の摂取期間は 7 日間とした。

DSS 大腸炎の重症度は，体重変化量の単独評価に加え，体重変化量，便性状および便への血液混入の有無をスコア化することで評価する疾患活動指数（Disease Activity Index ； DAI）と大腸長により評価した。上記 DAI 項目は DSS 溶液摂取期間中，毎日測定した。DSS 溶液摂取 7 日目の DAI 項目測定終了後，マウスより血液および大腸組織を採取した。血液は遠心分離を行い，血漿を回収した。大腸組織は，長さを測定したのち，組織標本作成および炎症関連因子測定に用いた。

統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。体重および DAI は，繰り返しのある二元配置分散分析を行い，ポストホックテストとしてボンフェローニテストを行った。また，大腸長は一元配置分散分析を行い，ポストホックテストとしてボンフェローニテストを行った。有意水準は 5%とし，以上の解析は GraphPad Prism 5 for Mac（GraphPad）にて行った。

［結果］

1. 自発運動が DSS 摂取による体重変化に及ぼす影響（図 2）

全ての群において，DSS 非摂取群（未発表データ）に比べ，DSS 摂取により体重の減少が観察された。自発運動の影響については，SED 群に比べ 3WEX 群において体重の減少が有意に抑制された。一方，1WEX 群においては，体重減少への抑制傾向は観察されなかった。

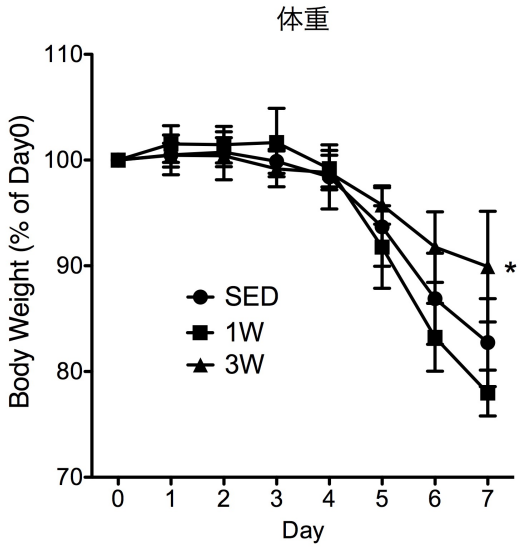


図2 自発運動がDSS摂取による体重減少に及ぼす影響

2. 自発運動が DSS 摂取による DAI に及ぼす影響（図 3）

全ての群において，DSS 摂取により DAI 値の上昇が観察された。自発運動の影響については，SED 群に比べ 3WEX 群において DAI 値の上昇が抑制される傾向を示し，7 日目において有意に低値を示した（$p<0.01$）。一方，1WEX 群においては，DAI 値上昇への抑制傾向は観察されなかった。

3. 自発運動が DSS 摂取による大腸長に及ぼす影響（図 4）

全ての群において，DSS 非摂取群（未発表データ）

に比べ，DSS 摂取により大腸の短縮が観察された。

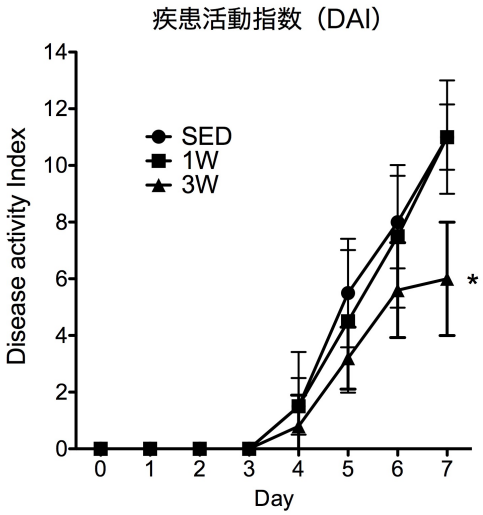


図3　自発運動がDSS摂取による
DAI上昇に及ぼす影響

自発運動の影響については，SED 群に比べ 3WEX 群において大腸の短縮が抑制される傾向が観察された。一方，1WEX 群においては，大腸短縮への抑制傾向は観察されなかった。

[考察]

UC の発症は遺伝要因および環境要因により引き起こされることが知られており，その発症機序は不明な点も多い。一方で，UC は青年期での発症が最も多く，幼児期での発症は少ないことが知られており，多くの場合に UC 発症までの環境要因の暴露期間が長い（～15 年以上）ことが推察される。このことは

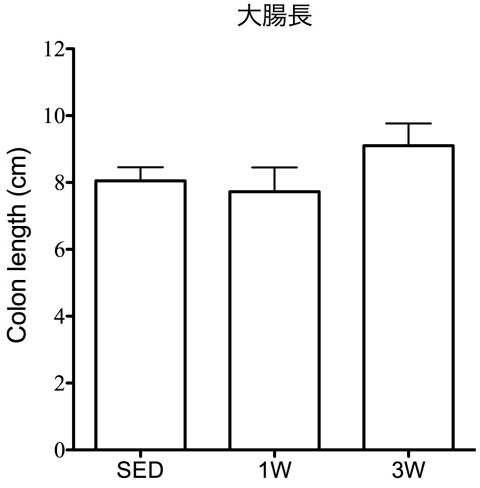


図4　自発運動がDSS摂取による
大腸短縮に及ぼす影響

UC が，より幼少期に発症する疾患に比べ，環境要因による制御を期待できる疾患である可能性を示唆するものである。

本研究で用いた DSS 大腸炎は短期間で再現性よく大腸炎を発症する実験モデルであり，UC モデルとして汎用されている。本研究の結果，DSS 摂取による体重減少が SED 群に比べ 3WEX 群において有意に抑制された（図 2，$p<0.01$）。一方で，1WEX 群では体重減少に対する抑制効果は観察されなかった。体重は DSS 大腸炎における典型的な変化項目の一つであり，大腸の組織の障害とともに摂食量および摂水量の減少により引き起こされることが知られている。本研究の結果は，自発運動により DSS 摂取による体重減少が抑制される可能性があること，またその効果は一定期間以上の運動実施により発現することを示唆するものであった。また，DSS 大腸炎指標に用いられる DAI も体重と同様に SED 群に比べ 3WEX 群において抑制される傾向が観察された。さらに大腸炎により引き起こされる大腸長の短縮も SED 群に比べ 3WEX 群において抑制される傾向が観察された。摂食量および摂水量も影響する指標である体重のみならず，大腸炎の直接的な指標である DAI および大腸長においても 3 週間の運動による大腸炎抑制効果が観察されたことは，運動の大腸炎抑制効果をより明確に示したものであると考えられる。以上の結果は，マウスにおいて一定期間以上の自発運動の実施により DSS により引き起こされる大腸炎が抑制される可能性を示唆するものであった。

本研究で観察された運動期間による抑制効果の違いは，運動による大腸炎抑制効果のメカニズムを明らかにする上で重要なヒントを有する可能性を示唆している。即ち，SED 群と 3WEX 群の比較のみならず，1WEX 群と 3WEX 群を比較することで，多岐にわたる運動実施による生体の変化のうち，より大腸炎抑制に重要な要因を明らかにすることができると期待できる。これらを明らかにする為，現在，血漿サンプルおよび大腸組織サンプルについて分子生物学的／組織学的に評価を行なっている。

今後は本研究で観察された結果および現在解析中のデータをもとに，抑制候補因子に対する阻害実

験を加え，その抑制機序について検討を進める予定である。

［謝辞］
　本研究を遂行するにあたり，助成課題として採択いただいたウエスコ学術振興財団　山地弘理事長をはじめ，選考委員の先生方および関係各位に心より深謝する。

筋音図・筋電図を用いた筋コンディションの定量評価法の開発

倉敷芸術科学大学

枝松千尋

（概要）一般的に、アスリートのパフォーマンスには不確定な部分が多く、大事な試合に向けてコンディションを整えることは必要不可欠だが難しい。また、高齢者に対するリハビリを含めたトレーニングの効果を判定する際には、実際の生活では効果を実感しているものの、筋力や体力測定等の結果に反映されないことも多い。そこで、本研究では筋コンディションの定量評価法の開発の一助として、筋音図と筋電図の同時測定によって、腓腹筋の筋コンディションを定量的に評価できるかを明らかにすることを目的とした。被験者は健康な成人男性５名、対象筋は右脚の腓腹筋内側頭とした。筋音図・筋電図の測定には、同時測定が可能な Measee システムを用いた。筋コンディションは、ウォーミングアップによって向上し、筋疲労によって低下し、マッサージによって回復すると仮説を立て、それぞれの条件で筋音図・筋電図を計測した。その結果、等尺性筋力発揮中の腓腹筋内側頭近位部の筋音図において、筋コンディションの評価ができる可能性が示された。しかしながら、今後更なる測定方法の改良を重ねる必要がある。

Ⅰ．緒言

一般的に、アスリートのパフォーマンスには不確定な部分が多く、大事な試合に向けてコンディションを整えることは必要不可欠だが難しい。また、高齢者に対するリハビリを含めたトレーニングの効果を判定する際には、実際の生活では効果を実感しているものの、筋力や体力測定等の結果に反映されないことも多い。その課題の解決策として、本研究は生理学的指標を用いて筋コンディションを評価する方法を検討する。

筋機能の生理学的指標として、筋音図と筋電図がある。現在、筋疾患の臨床診断においては、筋電図が用いられることが多い[1,2,3]。筋電図は、運動単位活動電位の伝播による電気的活動を記録する。一方、筋音図は生体表面に振動（加速度）センサーや変位レーザーセンサーを貼付し、骨格筋収縮に起因する微細な振動や表面変位を記録する。筋音図は筋の機械的な機能を反映し、筋電図とは異なる特性を備えているため、筋疾患や筋疲労を診断する独自の検査法として、岡らのグループによって研究がなされている[1,2,3,4,5]。

筋音図には、加速度型、変位型といった２種類がある。変位型は、レーザー光で対象筋との距離を測る方法である[3,5]。ノイズが入りにくく、強縮に見られるような筋の持続的な拡大変形を観察でき、筋の収縮特性を調べるのに有益とされる[5]。一方、加速度型は皮膚表面上で筋線維の膨張方向の振動を測定するが、筋収縮に伴う四肢の動きによってノイズが入り易く定量的な評価が難しい[5]。そのため加速度型は、測定部位（筋）をしっかりと固定しなければならない[5]。本研究では、運動中でも測定可能な変位型を用いて実験を行うこととする。本研究では筋音図と筋電図の同時測定が可能な Measee システムを用いた。Measee システムの筋音図・筋電図センサーの被験筋への標準的な取り付け方法は専用のバンドを使用した固定である。しかし、この方法では他の筋の収縮による周囲径変化の影響を受ける可能性があるため、別の方法によるセンサーの取り付け法を検討する必要がある。

一方、腓腹筋は下腿後面の浅層に位置するパワフルな筋肉である。その働きは、走・跳などのスポーツ動作や日常動作で非常に重要な役割を果たす[8]。本研究では、アスリートや高齢者の筋コンディションへの応用を想定していることから、被験筋を腓腹筋とする。

以上のことから、本研究は筋音図と筋電図の同時計測によって、腓腹筋の筋コンディションを評価できるかを検討することを目的とする。

Ⅱ. 方法

1. 被験者

被験者は健康な成人男性５名(年齢 21.2±1.6 歳、身長 171.8±4.6cm、体重 60±5.9 kg）とした。

2. 測定方法

被験者の右脚の腓腹筋内側頭（MG）に、十分な皮膚処理の後に筋音図・筋電図センサー（Measee システム）を貼付した。筋音図・筋電図センサーは、MG の近位・遠位の２カ所に医療用両面テープを用いて貼り付けて固定した。センサーを貼る位置は、膝裏を 0%、MG からアキレス腱への筋腱移行部を 100%とし、30%と 70%の位置に一直線になるように固定した[8]。

静的な筋力発揮時と動的な筋力発揮時の筋電図・筋音図の測定を行った。静的な筋力発揮は右足関節底屈の等尺性最大筋力発揮（MVC）とし、動的な筋力発揮はカーフレイズとした。MVC は、等速性筋力測定装置（KINCOM-500H）を用いて、被験者を伏臥位にて右脚の膝関節角度 180° 及び足関節角度底屈位 10° で固定し測定した。その際に１秒間の最大努力の底屈､1秒間の弛緩を５回連続で行わせ測定した。カーフレイズは、立位にて 30bpm で 10 回行わせた。

最初にウォーミングアップ・ストレッチ等を行わない状態で pre 条件を測定した。同一日にウォーミングアップを行い、ウォーミングアップ条件（WUP 条件）の測定を行った。次に１週間のトレーニングにより筋疲労を起こさせ１週間後に疲労条件(FT 条件)の測定を行った。さらに、FT 条件と同一日にマッサージ条件（MS 条件）の測定を行った。筋コンディションを変化させるためのウォーミングアップの内容は、200ｍジョグ、ラダー10 往復、ホッピング 20 回とした。筋疲労は、毎日 200 回のカーフレイズを１週間行わせた。マッサージはストレッチポールを用いた筋膜リリースマッサージとし、腓腹筋を対象として５分間のセルフマッサージをさせた。

自覚的コンディションとして、各条件測定後に 5 回程度のホッピングを行った際の筋コンディションを 10 段階で評価させ、聞き取りによって調査した。

なお、本研究は倉敷芸術科学大学倫理委員会の承認を得て行われた。

3. 解析

解析方法として LabChart を使用した。筋電図については、全波整流した後に積分値にて筋放電量を求めた。筋音図についてはカットオフ周波数 10Hz にてデジタル・ローパスフィルターをかけた後に、筋音振れ幅（最大値と最小値の振幅）を求めた。さらに筋音図を微分し筋音速度の立ち上がり速度と立ち下がり速度を求めた。測定値としては、５回の最大底屈のうち２～５回目の平均値を用いた。

統計処理は対応のある一元配置分散分析を行った。有意水準は 5%とした。

Ⅲ. 結果

1. 自覚的コンディション

図 1 に自覚的コンディションの結果を示す。Pre 条件に対して WUP 条件で有意に向上した。WUP 条件に対して FT 条件で有意に低下した。

2. MVC 時の最大底屈力および力の立ち上がり・立ち下がり速度

図２に力の等尺性最大筋力の結果を示す。有意な差はなかったものの、ウォーミングアップを行うことにより５名中４名の被験者の力の最大値は大きくなった。FT 条件および MS 条件には、各被験者に共通する変化はみられなかった。

図３に力の立ち上がり速度の結果を示す。力の立ち上がり速度はWUP条件に対してMS条件が有意に低下した。FT 条件に対して MS 条件で５名中４名の被験者の力の立ち上がり速度が低下した。力の立ち下がり速度には各被験者に共通する変化はなかった。

3. MVC 時の MG 近位部の筋電図・筋音図

図４に MVC 時の MG 近位部の筋電図･筋音図変化を示す。筋音図変化は筋力発揮時にセンサー部から皮膚までの距離が、通常は短縮する(0mm に近づく)。しかし、今回の実験では筋力発揮時にセンサー部から皮膚までの距離が増大する被験者もいた。

図５に MG 近位部の筋音振れ幅を示す。筋音振れ幅は、有意な差はなかったものの、pre 条件に対して WUP 条件で５名中４名の被験者の筋音振れ幅が大きくなった。他の条件間には各被験者に共通する変化

はみられなかった。筋放電量では、pre 条件に対して WUP 条件で放電量が大きくなることはなかった。

筋音の立ち上がり速度は、条件間に有意な差はなく各被験者に共通する変化もなかった。図 6 に筋音の力の立ち下がり速度の結果を示す。筋音の力の立ち下がり速度は、有意な差はなかったものの、pre 条件に対して WUP 条件で 5 名中 4 名の被験者の力の立ち下がり速度が速くなった。

4. MVC 時の MG 遠位部の筋電図・筋音図

筋放電量、筋音の振れ幅・立ち上がり速度・立ち下がり速度の条件間に有意な差はなかった。各被験者に共通する変化もなかった。

5. カーフレイズ時の筋電図・筋音図（近位部・遠位部）

筋放電量、筋音の振れ幅・立ち上がり速度・立ち下がり速度の条件間に有意な差はなかった。各被験者に共通する変化もなかった。

Ⅳ. 考察

本研究では、MG の筋コンディションの状態はウォーミングアップによって向上し、疲労によって低下し、マッサージによって回復するのではないかと仮説を立てて、その変化を筋電図・筋音図で評価できるかを検討した。

その結果、各個人の自覚的コンディションは、おおよそ仮説の通りであった。しかし、最大筋力は、仮説の通りにはならなかった。ウォーミングアップを行うことにより力の最大値は大きくなる傾向であったが、FT 条件と MS 条件には被験者に共通する変化はみられなかった。このことから、FT 条件の設定において 200 回/日のカーフレイズの実施では筋を疲労状態にできなかった可能性が考えられた。また、MS 条件については、先行研究の越智らの結果では、1 分×2 回の最大静的ストレッチによって最大筋力が低下していた[6]。しかしながら、本研究の MS 条件において、力の立ち上がり速度には低下傾向がみられたものの、最大筋力の低下はみられなかった。これは本研究で用いた筋膜リリースマッサージの時間および強度が足りなかった可能性が考えられた。

筋音図について、MG 近位部の筋音振れ幅は、最大筋力と同様に pre 条件に対して WUP 条件で大きくなる傾向であった。筋放電量には変化がみられないことから、筋放電よりも筋音振れ幅の方が筋力発揮の状況を反映している可能性が考えられた。また、筋音の立ち下がり速度は pre 条件に対して WUP 条件で速くなる傾向であった。これはウォーミングアップによって筋コンディションが向上し、筋の粘性低下[7]によって素早く脱力できるようになったことをあらわしている可能性がある。

MG 遠位部の筋音・筋電図については MG 近位部における WUP 条件と同様の変化はみられなかった。MG 遠位部は羽状角が小さいため筋線維が発揮する筋力・筋線維長変化の余弦成分が大きく、そのためカーフレイズにおいて筋活動が高まる[8]。しかしながら、変位式筋音図変化を考えた場合、羽状角の大きい MG 近位部は正弦成分が大きく筋の横断方向(深さ方向）の変化が大きい可能性がある。Bolsterlee et al. は腓腹筋内側頭の受動的な長さ変化と筋形状の変化の関係について調査し、30%付近（近位）の深さ方向の変化（筋厚変化）が大きく、70%付近（遠位）の筋厚変化はほとんど無いこと報告した[9]。このことから、本研究において、遠位部ではなく近位部の筋音図に、条件による差異がみられたのではないかと考えられた。つまり、MG の筋コンディションを評価する場合は、近位部の筋音をターゲットとすればよい可能性が考えられた。ただし、筋収縮中の筋音図変化について、基本的には筋収縮によって筋厚が増しセンサーとの距離が減少するが、被験者によってはセンサーとの距離が増大する被験者もいた。これについては、腓腹筋は羽状筋であるために紡錘筋のように筋収縮の際に一様に膨張方向へ変形するのではなく、部位によっては筋厚が大きく増す部位と、そうではない部位が存在する可能性があり、このために Measee 電極の台座部分の筋収縮による隆起が大きく、それに対してセンサー部の隆起が小さければ、まるで筋収縮によって筋厚が減少するようにみえるのではないかと考えられた。つまり、バンドによる電極の固定ではなく、今回のような両面テープによる電極の貼付固定の場合においては、羽状筋の筋音図計測は難しいのかもしれない。このことにつ

いては、今後、対象とする筋の選定および測定方法についてさらに改良を重ねる必要がある。さらに、今回の方法ではカーフレイズを用いた筋コンディションの評価の実現可能性はなかった。フィールドで筋コンディションを評価する場合、カーフレイズのような器具を用いない単純な動作で行うことができれば、大変有用である。今後は、このことについても測定方法の改良を重ねる必要がある。

Ⅴ．結論

本研究では、筋コンディションの定量評価法の開発の一助として、筋音図と筋電図の同時測定によって、腓腹筋の筋コンディションを評価できるかどうかを明らかにすることを目的とした。その結果、等尺性筋力発揮中の近位部の筋音図において、筋コンディションの評価ができる可能性が示された。しかしながら、今後更なる測定方法の改良を重ねる必要がある。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究課題として採択いただいた（財）ウエスコ+振興財団　山地弘理事長をはじめ、選考委員の先生方および関係各位に心より深謝いたします。

【参考文献】

1) 渡辺彰吾, 北脇知己, 岡久雄：筋内圧力測定による筋音図発生メカニズムに関する考察, 電子情報通信学会技術研究報告, 104(756), 17-20, 2005
2) 渡辺彰吾, 北脇知己, 岡久雄：筋音と筋張力を用いた筋線維別収縮および疲労特性の評価, 電子情報通信学会技術研究報告, 105(221), 27-30, 2005
3) 渡辺彰吾, 北脇知己, 岡久雄：筋内圧力および生体表面の変位に着目した筋音図発生メカニズムの検討, バイオメカニズム, 18(0), 209-218, 2006
4) 渡辺彰吾, 北脇知己, 岡久雄：変位筋音図のFusion index 曲線と筋線維構成比との関係, バイオメカニズム, 20(0), 207-216, 2010
5) 岡 久雄, 栗山 雄樹, 渡辺 彰吾, 北脇 知己, 岡本 基：フォトリフレクタを用いた変位MMG センサの開発, 電子情報通信学会技術研究報告 , 107(541), 77-80, 2008
6) 越智亮, 中村雅俊, 梅垣雄心, 小林拓也, 西下智, 梅原潤, 田中浩基, 岡久雄, 市橋則明：スタティックストレッチング後の腓腹筋最大随意収縮時の筋音図変化, 理学療法学 Supplement, 2014(0), 1367, 2015
7) 公益財団法人 日本体育協会：公認アスレティックトレーナー専門科目テキスト 第6巻 予防とコンディショニング
8) 枝松千尋, 飯田智行：運動様式が腓腹筋内側頭の筋活動部位に及ぼす影, 第21回日本バイオメカニクス学会大会論集, 2010
9) Bolsterlee B, D'Souza A, Gandevia SC, Herbert RD: How does passive lengthening change the architecture of the human medial gastrocnemius muscle?, J Appl Physiol, 122(4), 727-738, 2017

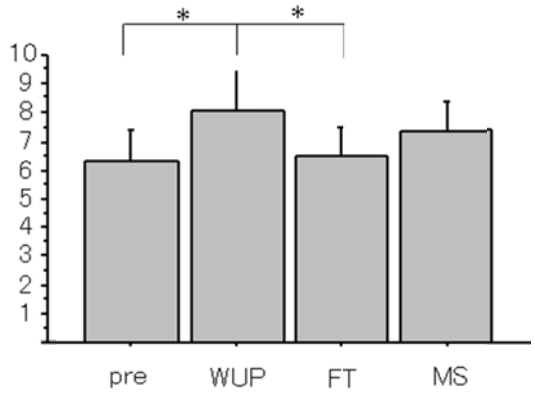


図1　自覚的コンディション

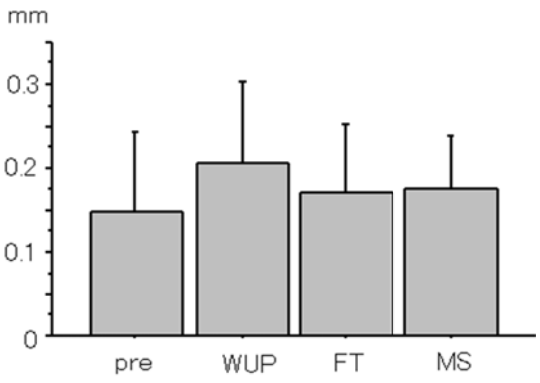


図5　近位部の筋音振れ幅

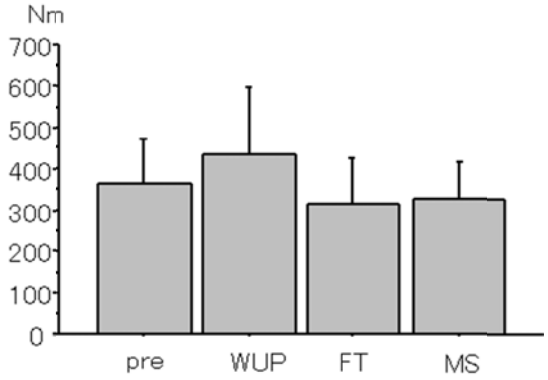


図2　力の最大値

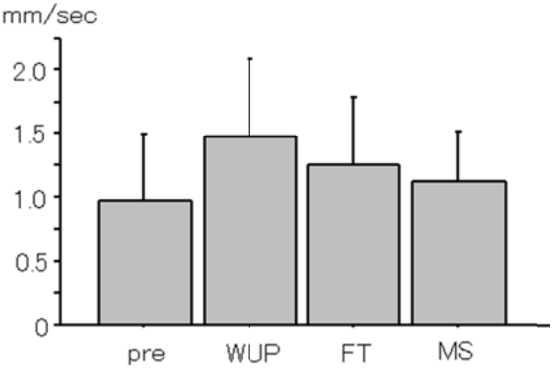


図6　近位部の筋音の立ち下がり速度

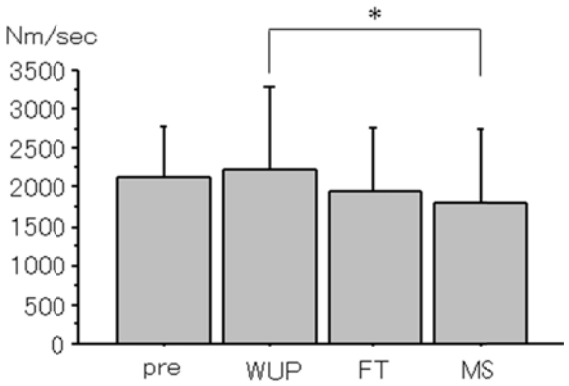


図3　力の立ち上がり速度

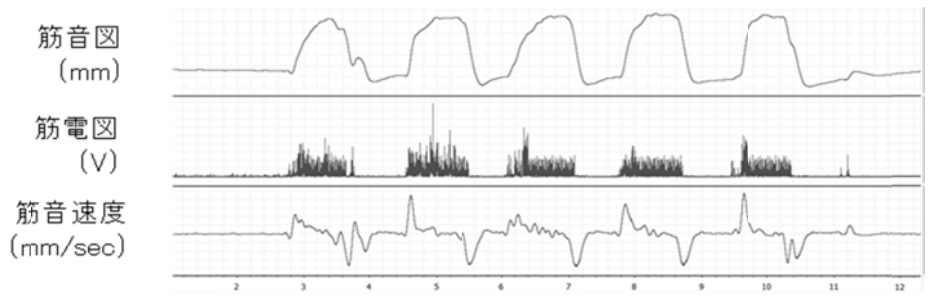


図4　筋電図・筋音図波形

内向き整流性 K^+チャネル遮断ペプチドの探索と作用の解明

倉敷芸術科学大学生命科学部

岡田誠剛

内向き整流性 K^+チャネルは多くのサブタイプがあり、様々な細胞で多様な生理的役割を果たしている。同チャネルファミリーの一つである ROMK(Kir1.1, KCNJ1)は腎で K^+分泌に貢献するだけでなく、脳にも発現しているが、その役割は未解明である。本研究で我々は、ROMK 遮断作用を持つハチ毒由来のペプチド Tertiapin をマウス脳室内に投与し、うつ様行動、不安様行動を検討した結果、抗うつ作用と不安誘発作用があることを見出した。Tertiapin のアミノ酸に変異を導入し、ROMK 遮断の構造活性相関を明らかにした。これまで、うつ、不安障害治療の標的にとして考えられていなかった内向き整流性 K^+チャネルの標的としての有望性を示している。

「緒言」

内向き整流性 K^+チャネルは 15 のサブタイプからなり、様々な組織に発現し、多様な生理的役割を果たしていると考えられるが、各サブタイプが各々の臓器で果たす役割は未解明の点が多く残されている。内向き整流性 K^+チャネルファミリーの一員である ROMK(Kir1.1, KCNJ1)は腎臓ヘンレループ上向脚、遠位尿細管、集合管に発現し、Na^+吸収と共役した K^+分泌への関与がよく知られており、その阻害薬は降圧薬としての開発が試みられている(Tang et al., 2016)。ROMK は腎だけでなく、中枢神経系に発現しているがそこでの役割は未解明である。近年、ROMK と精神疾患との関連が示唆されている。例えば、うつ患者脳では ROMK 発現が 2.5 倍に増加している(Smolin et al., 2012)、開放的な性格は ROMK 遺伝子と連鎖している(Amin et al., 2013)などが報告されている。

Tertiapin はヨーロッパミツバチ毒液から単離された 21 アミノ酸のペプチドであり、分子内に 2 つの SS 結合をもつ環状の構造している(図１)。Tertiapin は ROMK と GIRK(Kir3.1/2, kcnj3/6)遮断活性があることが報告されているが、Kir2.1(IRK, kcnj2)は遮断しない。Hilder らは ROMK 遮断薬の Tertiapin の Ile-8 を Arg (TPN-RQ) に置換すると、Kir2.1 も遮断する可能性があることをコンピューターでシュミレーションした(Hilder and Chung, 2013)。

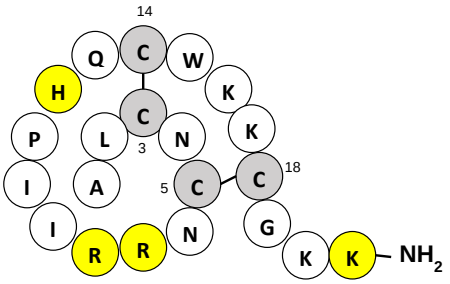


図 1.　Tertiapin の環状構造とアミノ酸配列

本研究は、1)Tertiapin の脳室内投与によって ROMK の中枢作用を検討する。2) TPN-RQ の Kir2.1 の遮断活性を検討する。3)アミノ酸変異を導入した Tertiapin を合成し、ROMK 遮断に必要な構造を解明することを目的として研究を行った。

「結果」

１） Tertiapin の抗うつ作用と不安誘発作用

ICR マウス(6 週齢)に TPN-RQ と遮断活性がほとんどない Tertiapin-Cys3Ser (C3S) (後述)を脳室内投与し、尾懸垂試験で抗うつ活性を検討した。TPN-RQ の用量依存的な無動時間の減少が認められ、Tertiapin-RQ の抗うつ活性が示唆された (図２左)。C3S も同じ傾向を示したが有意差はなかった。強制水泳試験でも TPN-RQ 投与で無動時間の短縮が認められ、抗うつ作用が確認できた。

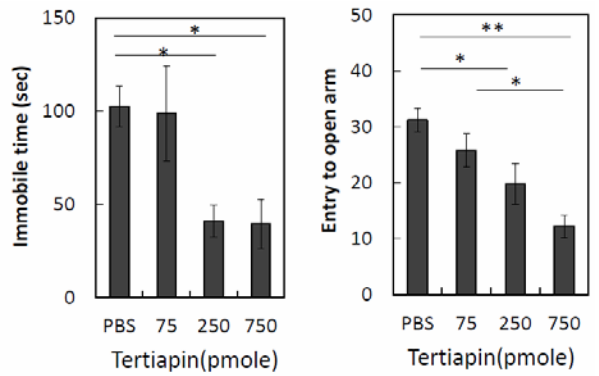


図２. Tertiapin の尾懸垂試験による抗うつ作用（左）と、高架式十字迷路における不安誘発作用（右）

次に、マウスの不安様行動への作用を高架式受持迷路で検討すると、Tertiapin-RQ 投与で open arm entry と滞在時間の減少が見られ、不安感、恐怖心を強くしていることが示唆された(図２右)。この不安促進作用は、オープンフィールド試験でも認められ、TPN-RQ 投与で運動量と central entry の減少が見られ、不安感、恐怖心を強くしていることが示唆された。さらに、明暗箱試験でも TPN-RQ 投与で、Light box 滞在時間と Light/Dark の移行回数の減少が認められ、本化合物の不安誘発作用が確かめられた。

２） Tertiapin-RQ は Kir2.1 を遮断しなかった

Hilder らのシミュレーションは、Tertiapin の I8R 変異体(TPN-RQ)は ROMK だけでなく Kir2.1 も阻害する可能性を示した。そこで、我々の同チャネルを発現する細胞株を樹立しパッチクランプ(全細胞記録)によって遮断活性を検討したが、Kir2.1 チャネル遮断活性は認められなかった（図３）。

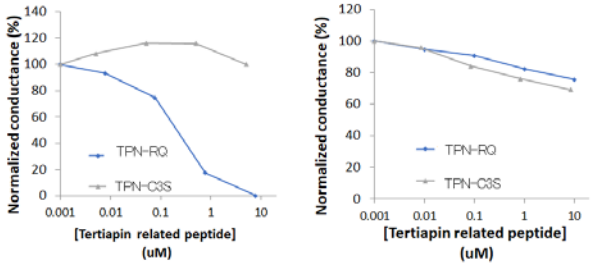


図３. ROMK チャネルは Tertiapin-RQ で遮断されるが、C3S に遮断活性はない(左)。Kir2.1 は TPN-RQ でも遮断されない（右)。

3)アミノ酸変異を導入した Tertiapin の ROMK 遮断、並びにマウス行動への作用

次に、Tertiapin のアミノ酸配列に変異を導入し、ROMK 遮断に必要な Tertiapin の構造を検討した。まず、全長ではなく各部分８アミノ酸の断片を合成したが、いずれにも活性は認められなかった(表)。次に環を形成する 2 つの SS 結合を 1 つに減らした変異体にも活性は認められなかった。同様に SS 結合関与する 4 つの Cys を順に Ser に置換したところ（C3S、C5S、C14S、C18S)、いずれにも活性が認められず、環を形成する SS 結合の重要性が示唆された。次に Tertiapin の環内 Ile、Arg のアミノ酸を欠失させて環を小さくしても活性は減弱した。逆に環内に Ile の数を増やしても活性は消失した。したがって、Tertiapin の ROMK の結合には 2 つの SS 結合によって形成される環状構造が必須であり、その環の大きさも重要であることが示唆された(表)。

次にアミノ酸を 1 つずつ Ala に変異させると、6、7、20、21 番目の塩基性のアミノ酸が遮断活性に必要であることが示唆された（表)。

Tertiapin は、ROMK だけでなく、GIRK1/2 チャネルも遮断することが知られている。そのため、上記の抗うつ作用、不安誘発作用が ROMK の遮断によるかは区別できない。そこで Tertiapin の His-12 を Leu への変異を入れると(TPN-QL)、ROMK の遮断活性を残したままで、GIRK 遮断活性が大幅に減弱した。

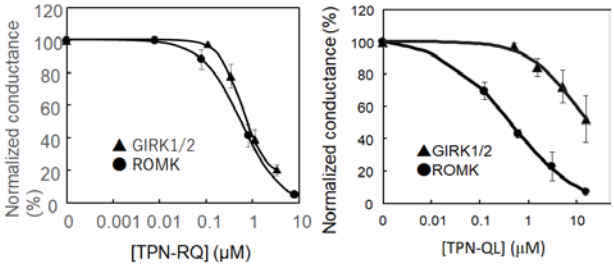


図 4. TPN-RQ は ROMK と GIRK1/2 を同程度に遮断するが（左)、TPN-QL は ROMK 選択的に遮断する。

この TPN-QL を用いて、抗うつ作用を尾懸垂試験で、不安誘発作用を高架式十字迷路で検討すると、両方とも TPN-RQ と同等の作用が認められた。したがっ

て、Tertiapin の抗うつ作用は ROMK の遮断を介したものであることが示唆された。

1	RRIIPHQK		Partial TPN 8 amino acids	-
2	ARIIPHQK			-
3	RAIIPHQK			-
4	RRAIPHQK			-
5	RRIAPHQK			-
6	RRIIAHQK			-
7	RRIIPAQK			-
8	RRIIPHAK			-
9	RRIIPHQA			-
10	RIIIPHQK			-
11	RIIIPHQC			-
12	RIIIPHMC			-
13	RRIIPHQC			-
14	RRIIPHMC			-
15	ALCNCNRI			-
16	LCNCNRII			-
17	CNCNRIII			-
18	NCNRIIIP			-
19	CNRIIIPH			-
20	NRIIIPHM			-
21	IIIPHMCW			-
22	IIPHMCWK			-
23	IPHMCWKK			-
24	PHMCWKKC			-
25	HMCWKKCG			-
26	MCWKKCGK			-
27	CWKKCGKK			-
28	AAAAAAAA			-
29	CNRRIIPHQC		Circular TPN with Single S-S bond	-
30	CNRRIIPKQC			-
31	CNRRIPHQC			-
32	CNRRIPKQC			-
33	CNRRIIPHQCWKK			-
34	CNRRIIPKQCWKK			-
35	NCNRRIIPHQCWKK			-
36	NCNRRIIPKQCWKK			-
37	CNSNRRIIPHQCWK			-
38	CNSNRRIIPKQCWK			-
39	QCNSNRRIIPHQCWK			-
40	QCNSNRRIIPKQCWK			-
41	ALCNCNRIIIPHQCWKKCGKK	TPN-Q	TPN-Q	++++
42	ALCNCNRRIIPHQCWKKCGKK	TPN-RQ	TPN-RQ	++++
43	ALSNCNRIIIPHQSWKKCGKK	TPN-Q-C3S	TPN with Three Cys	-
44	ALSNCNRRIIPHQSWKKCGKK	TPN-RQ-C3S		-
45	ALCNSNRRIIPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-C5S		-
46	ALCNCNRRIIPHQSWKKCGKK	TPN-RQ-C14S		-
47	ALCNCNRRIIPHQCWKKSGKK	TPN-RQ-C18S		-
48	ALCNCNRIIIPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-Δ8R	TPN smaller Ring	++
49	ALCNCNRIPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-Δ8R-Δ9I		-
50	ALCNCNRRPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-Δ9I-Δ10I		-
51	ALCNCNRRIIIPHQCWKKCGK	TPN-RQ-ins9I	TPN larger Ring	-
52	CNCNRRIIPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-Δ1A-Δ2L	TPN-RQ-ΔN-terminal	+++
53	ALCNCNRRIIPHQCWKKCG	TPN-RQ-Δ20K-Δ21K	TPN-RQ-ΔC-terminal	+
58	ALCNCNRIIIPLQCWKKCGKK	TPN-Q-H12L	TPN-L	+++
59	AACNCNRRIIPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-L2A	TPN-RQ-L2A	+++
60	ALCACNRRIIPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-N4A	TPN-RQ-N4A	+++
61	ALCNCARRIIPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-N6A	TPN-RQ-N6A	+++
56	ALCNCNAAIIPHQCWKKCGKK	TPN-R7A-R8A	TPN-R7A-R8A	-
62	ALCNCNRRAIPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-I8A	TPN-RQ-I8A	+++
63	ALCNCNRRIAPHQCWKKCGKK	TPN-RQ-I9A	TPN-RQ-I9A	++
55	ALCNCNRRIIAHQCWKKCGKK	TPN-RQ-P11A	TPN-RQ-P11A	++++
57	ALCNCNRRIIPAQCWKKCGKK	TPN-RQ-H12A	RPN-RQ-H12A	++
64	ALCNCNRRIIPHACWKKCGKK	TPN-RQ-Q13A	TPN-RQ-Q13A	+
65	ALCNCNRRIIPHQCAKKCGKK	TPN-RQ-W15A	TPN-RQ-W15A	+

表. Tertiapin のアミノ酸配列に変異を入れると、大半は活性をなくす。＋は遮断活性の強さをしめす。

「結論」

本研究によって、ROMK は中枢神経系において、うつ、不安様行動に関与することが明らかとなった。これは、これまでうつ、不安障害治療薬の標的になっていない K^+チャネルがその標的になることを示している。しかし、ROMK がどの神経核にどのように作用して、これらの作用を発揮したかは今後の問題として残されている。また、Tertiapin にアミノ酸変異を入れると活性がなくなるものがほとんどであり、Tertiapin の ROMK への特異性の高さが示された。

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。これまでに、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。本研究では、RNAとの二重染色を見据えて*in situ* hybridization法の条件下でのDrpiwi-1タンパク質の検出を試みた所、高温下でのホルミアミド処理にて抗原が失活することが示唆された。よって次に、新規に作成したDr-SLC38A9 抗体を用いて抗体同士の二重染色を目指すことにした。今回、Dr-SLC38A9 抗体によるWhole-mount免疫染色法を無性個体で実施した所、*in situ* hybridization法で得られたような*Dr-SLC38A9*遺伝子の卵巣原基での強い発現が検出できなかった。今後さらなる検討を重ねたい。

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、その決定機構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。

扁形動物プラナリアでは、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する（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詳しく分かっていない。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は、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）。これらのことは、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目指した。これまでに、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ている（図 1）。

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。実験には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 分間撹拌した。 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時間置いた後、再びメタノールで置換して-30℃で保存した。

2-3. Whole mount *in situ* hybridization 法の条件における免疫染色法（蛍光ラベル）

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、マレイン酸バッファーもしくは TNT バッファーにて洗浄した。PBT（0.1%Tween20 を含む生理食塩水 PBS）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、フルオロキーバー（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顕微鏡 FV10i（オリンパス社）を用いて行った。

2-4. 免疫染色法（発色法）

固定したプラナリアを PBT 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℃、20 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% 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、マウスを用いて作成した抗体）の原液もしく 1/500 に希釈した抗 Dr-SLC38A9 抗体（未発表、Dr-SLC38A9 の N 末端領域を抗原としてウサギを用いて作成したポリクローナル抗体）を 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、1/5000 に希釈した抗 Mouse IgG（Alkaline phosphatase）抗体もしくは抗 Rabbit IgG（Alkaline phosphatase）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、TMN（Tris-$MgCl_2$-NaCl）溶液中にてニトロブルーテトラゾリウム（NBT）、ブロモクロロインドリルりん酸（BCIP）を用いて発色した。

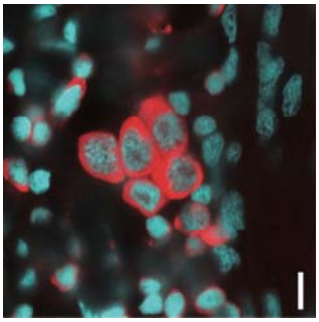


図 1. 抗 Drpiwi-1 抗体による免疫染色

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 μm。

3. 結果

3-1. Whole mount *in situ* hybridization 法の条件下での抗 Drpiwi-1 抗体による免疫染色法の検討

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）。これまでに、Drpiwi-1 タンパク質に対するモノクローナル抗体によって無性個体の卵巣原基における Drpiwi-1 タンパク質の検出に成功している（図１）。今回、RNA との二重染色を見据えて *in situ* hybridization 法の条件下での Drpiwi-1 タンパク質の検出を試みた。*in situ* hybridization 法では、50%ホルムアミド中で 56℃で 16 時間処理を行うため、抗原を変性させてしまう恐れがある。実際に、この処理の後に、免疫染色を行った所、シグナルが検出されなかった。抗 Drpiwi-1 抗体はモノクローナル抗

体であり、抗原中の１つのエピトープのみを認識するため、そのエピトープがこの処理で変性されたと示唆される。

3-2. 抗 Dr-SLC38A9 抗体による免疫染色法の検討

次に、新規に作成した Dr-SLC38A9 抗体を用いて Drpiwi-1 抗体との二重染色を目指すことにした。Dr-SLC38A9 抗体は Dr-SLC38A9 タンパク質の N 末端領域の約 100 アミノ酸を抗原としてウサギを用いて作製したポリクローナル抗体である（未発表）。アフィニティー精製前の抗血清の段階で、有性個体の卵巣および間柔織で特異的な発現を確認している。本研究では、無性個体の全身での発現を確認するため、Dr-SLC38A9 抗体による Whole-mount 免疫染色法を無性個体で実施した（図 2）。シグナルは感度の良いアルカリフォスファターゼを用いた発色法で検出したが、2 次抗体の濃度を薄くすることで Control でのバックグラウンドを抑えることに成功した（図 2A）。抗 Drpiwi-1 抗体では、卵巣原基に強いシグナルが検出された（図 2C）。一方で、抗 Dr-SLC38A9 抗体では、卵巣原基において顕著なシグナルは検出されなかった（図 2B）。

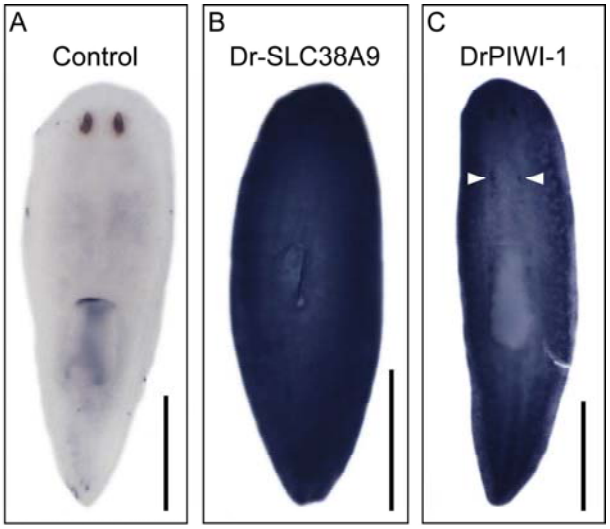


図 2. 抗 Dr-SLC38A9 抗体による Whole-mount 免疫染色
無性個体における Whole-mount 免疫染色（腹側）。（A）一次抗体無しで二次抗体は抗 rabbit-AP 抗体を用いた。（B）抗 Dr-SLC38A9 抗体および抗 rabbit-AP 抗体を用いた。（C）抗 DrPIWI-1 抗体および抗 mouse-AP 抗体を用いた。矢尻：卵巣原基でのシグナルを示す。スケールバー：1 mm。

4. 考察

今回、抗 Drpiwi-1 抗体は *in situ* hybridization 条件下では使用できないことが分かった。また、抗 Dr-SLC38A9 抗体による免疫染色法の検討を行ったが期待されるような卵巣原基のシグナルは得られなかった。*in situ* hybridization 法では *Dr-SLC38A9* RNA の卵巣原基での強い発現が検出されていることから（Maezawa et al. in preparation）、Dr-SLC38A9 抗体に関しては、今後、バックグラウンドシグナルを減少させる検討を行いたい。また、*Drpiwi-1* や *Dr-nanos*（文献 5）などの２種の RNA を用いた *in situ* hybridization 法による二重染色も検討したい。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.

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，パプリカの赤色成分など外観色の赤色成分が農作物における重要な指標となっている．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Ｒａや特別演色評価数Ｒ９）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，昨年度，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，ＬＥＤ光源の演色性を改善できる可能性を報告した．本年度は，白色ＬＥＤ，緑色，赤色ＬＥＤによる簡単な構成で高いＲ９を得るために，各種ＬＥＤ素子を実装できる基板を設計，作製した．さらに，作製したＬＥＤ光源を用いて，実際の農作物を撮影して，農作物の外観色を比較評価し，高演色ＬＥＤ光源が優れている事を確認できた．

１．はじめに

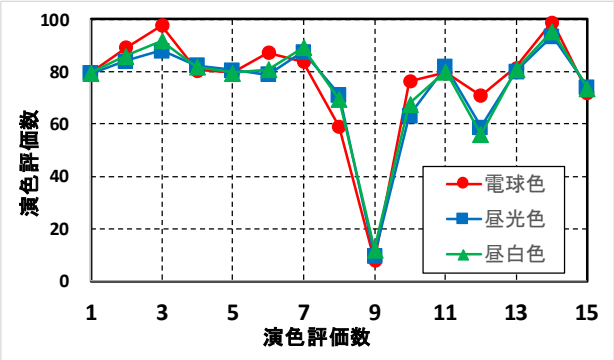
農作物などの出荷や品質検査は、人間によって良否を決める官能検査で行われている．この外観検査は，照明光源が重要である．農作物の外観色の色彩としては，赤色が重要視される．赤色を重要視される農作物は，イチゴ，トマト，リンゴ，桃や，食肉などがある．このように赤色成分を高感度に検査するには，演色性が重要とされている[1，2]．この光源の演色性を評価する指標に平均演色評価数（Ｒａ）や赤色の特別演色評価数（Ｒ９）があり，高い指数ほど赤色を評価する照明光源を良いとされる．第１図に，平均演色評価数が 80 と 90 の光源で，トマトを撮影した写真を示す．



第１図　Ｒａの違う光源によるトマトの撮影写真

Ｒａ=80 の写真（左）の赤色は，少しどす黒さがあり，右のＲａ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，光源は電球や蛍光ランプから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，蛍光ランプの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Ｒ９の高いものがなかった．第２図に３光色（電球色，昼白色，昼光色）の市販のＬＥＤ光源の演色評価数を示す．見てわかるように，演色評価数 No.1～8 までの平均演色評価数が 80 を越えるのに対して，特別演色評価数Ｒ９は 10 程度と極端に低い．第１表に電球，蛍光ランプ，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．また，赤色，緑色，青色の単色ＬＥＤで構成したＬＥＤ光源（ＲＧＢ三原色ＬＥＤ）のＲａ，Ｒ９も示す．ＲａやＲ９の値は



第２図　市販品　３光色ＬＥＤ光源の演色評価数

第１表　各種光源（電球，蛍光灯，Ｒａの違う既存白色ＬＥＤ，ＲＧＢ三原色ＬＥＤ）のＲａ，Ｒ９

	Ra	R9（赤）
蛍光灯	86.5	40.1
LED光源（Ra80）	82.2	8.0
LED光源（Ra90）	94.6	72.6
電球	97.4	93.9
RGB三原色LED	10.9	−179.1

基準光による試験色の見えを 100 としているので，電球のＲａ，Ｒ９は共に高い値であり，蛍光灯のＲａ，Ｒ９は 86.5，40.1 であり，Ｒａは高いがＲ９は低い．ＬＥＤ光源の場合，Ｒａは 80，90 と高いが，Ｒ９は 8.0，72.6 と低い．さらに，赤色，緑色，青色の単色ＬＥＤで構成したＬＥＤ光源（ＲＧＢ三原色ＬＥＤ）のＲａ，Ｒ９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（５Ｇ）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[3]．また，高演色光源は，遠隔手術や機械学習作業でキーデバイスとして期待される．

本年度の研究では，昨年度作製した赤色を鮮やかに見えるプロトタイプのＬＥＤ光源の構成を基に，多数個のＬＥＤで構成される高光束光源下で実際の農作物における演色性の違いを実証することを目的とする．

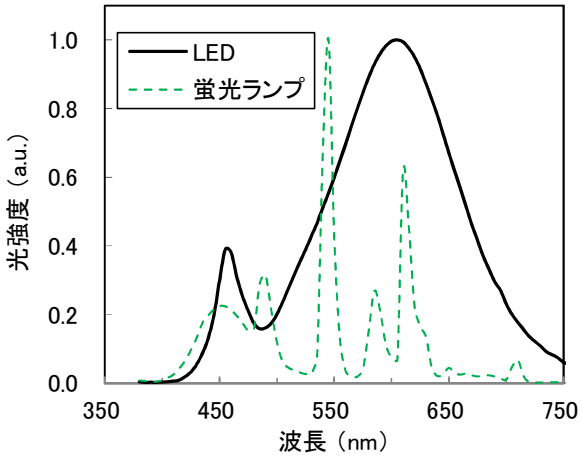
２．光源の演色性の改善

2.1　光源の演色性

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の規格では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 の試験色を追加している．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[4]．

$$R_i = 100 - 4.6\Delta E_i \qquad (式1)$$

ここで，ΔＥｉ（ｉ＝1～15）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．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．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光源の演色性は重要と判る．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３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，管内で発生する紫外線によって，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３図　ＬＥＤ，蛍光ランプの発光スペクトル

2.2　加法混色法による発光スペクトルの制御

本研究では白色ＬＥＤ，赤色ＬＥＤ，緑色ＬＥＤの３つの発光スペクトルを混合する加法混色法を用いてＬＥＤ光源の演色性を改善できることを示す．

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) との関係は以下のようになる[4]．

$$x_i = \frac{X_i}{X_i + Y_i + Z_i}, y_i = \frac{Y_i}{X_i + Y_i + Z_i} \quad (i = w, g, r) \qquad (式2)$$

白色ＬＥＤ，緑色ＬＥＤ，赤色ＬＥＤの光強度を変えても，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，

$$x = \frac{\sum_{i=w,g,r} a_i X_i}{\sum_{i=w,g,r} a_i (X_i + Y_i + Z_i)}, \quad y = \frac{\sum_{i=w,g,r} a_i Y_i}{\sum_{i=w,g,r} a_i (X_i + Y_i + Z_i)} \qquad (式3)$$

となる[4]．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）とする．ここで a_w=1 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，

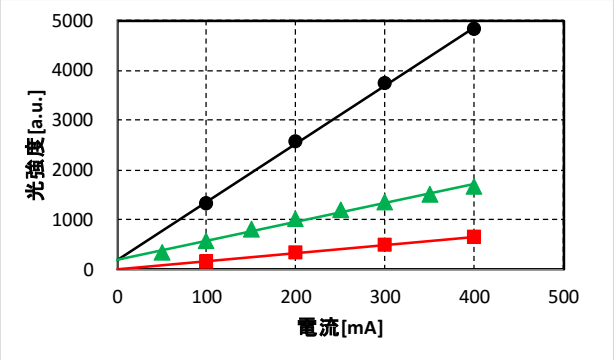
$$x=\frac{X_W+a_G X_G+a_R X_R}{X_W+Y_w+Z_w+a_G\left(X_G+Y_G+Z_G\right)+a_R\left(X_R+Y_R+Z_R\right)}$$

（式４）

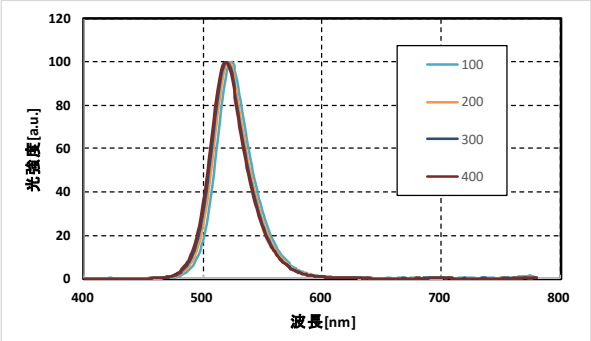
$$y=\frac{Y_W+a_G Y_G+a_R Y_R}{X_W+Y_w+Z_w+a_G\left(X_G+Y_G+Z_G\right)+a_R\left(X_R+Y_R+Z_R\right)}$$

（式５）

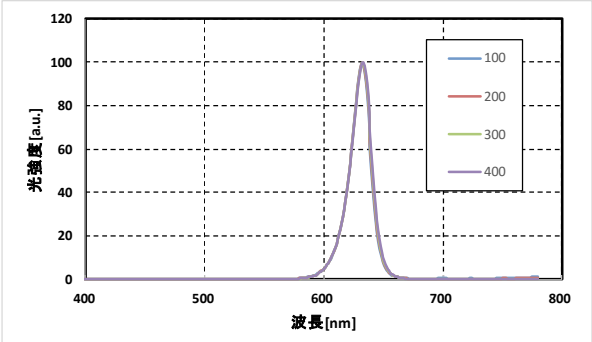
となり，緑色，赤色ＬＥＤの光強度係数ａ$_i$が求めることができる．白色，赤色，緑色ＬＥＤの発光スペクトル特性について述べる．第４図に白色ＬＥＤ，赤色ＬＥＤ，緑色ＬＥＤの光強度の電流依存性を示す． 使用した各ＬＥＤの 400ｍＡまで増加させた．この電流範囲で，３つのＬＥＤは電流値に対して線形性がある．第５図，第６図に，赤色，緑色ＬＥＤにおける電流値ごとの光強度の最大値で規格化した発光スペクトルを示す．



第４図　白色，赤色，緑色ＬＥＤの光強度の電流依存性



第５図　緑色ＬＥＤの発光スペクトルの電流値依存

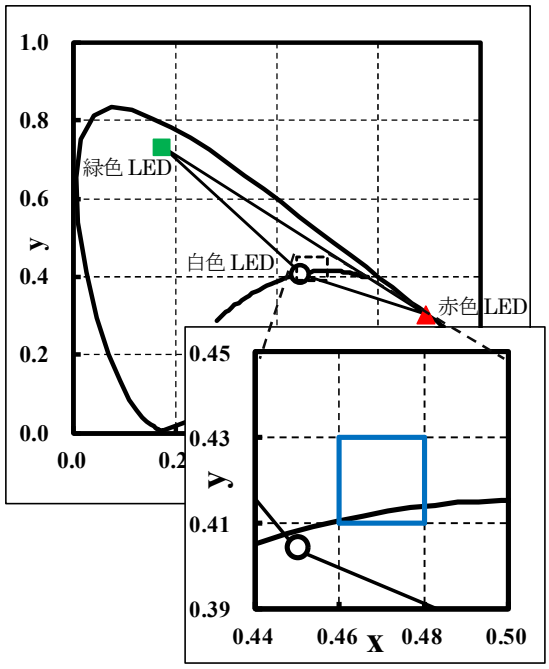


第６図　赤色ＬＥＤの発光スペクトルの電流依存

緑色ＬＥＤの発光スペクトルの場合，100～400ｍＡの電流値で 535 nm 付近に最大となり，各電流値の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った．赤色ＬＥＤの発光スペクトルの場合でも 100～400ｍＡの電流値で 630 nm 付近に最大となり，各電流値の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った．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．

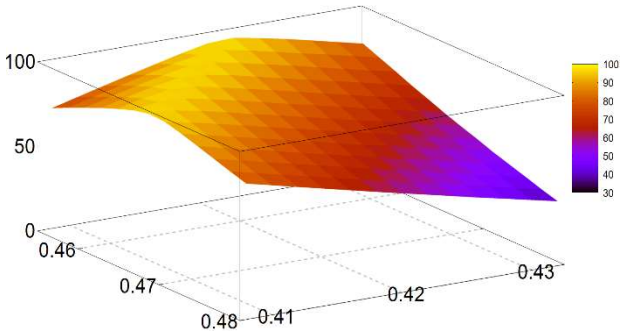
2.3　計算結果

前節の式１～４を用いて，演色性を予測する．演色性を求める色度範囲として， ｘ座標を 0.46～0.48，ｙ座標を 0.41～0.43 であり，その範囲を第 7 図に示す．



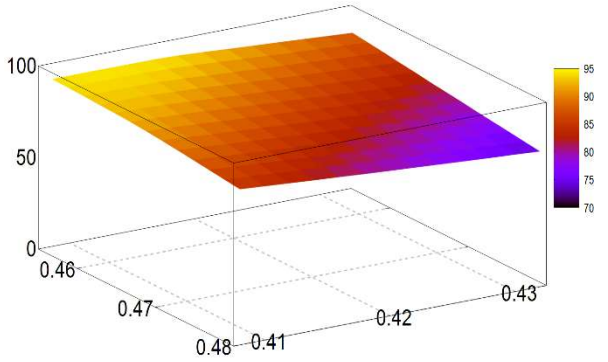
第７図　計算する色度座標(x, y)の範囲

色度座標(x, y)をパラメータとして，第７図に示した色度座標範囲で，式（３）～（５）を用い各ＬＥＤの光強度係数ａ$_i$が求め，色度座標(x, y)ごとに，発光スペクトルを合成し，平均演色評価数と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）を使った．白色，緑色，赤色ＬＥＤの電流値として 200mA，200mA，400mA 印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Ｒａ，特別演色評価指数Ｒ９の実測値は，94.5，58.5 であった．第８図に色度座標(x, y)の色度座標範囲（第７図）における特殊演色評価数Ｒ９（赤色）の計算結果を示し，第９図に平均演色評価数Ｒａを示す．赤色の特別演色評価指数（Ｒ９）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 58.5 以上であり，最大値は 93 に達した．この結果から R9 は大幅に改善された．一方，平均演色評価数Ｒａの値は，



第８図　計算結果　特別演色評価指数　Ｒ９

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．第４表に，計算結果においてＲ９が最大になった時の演色評価数の値を示す．



第９図　計算結果　平均演色評価数Ｒａ

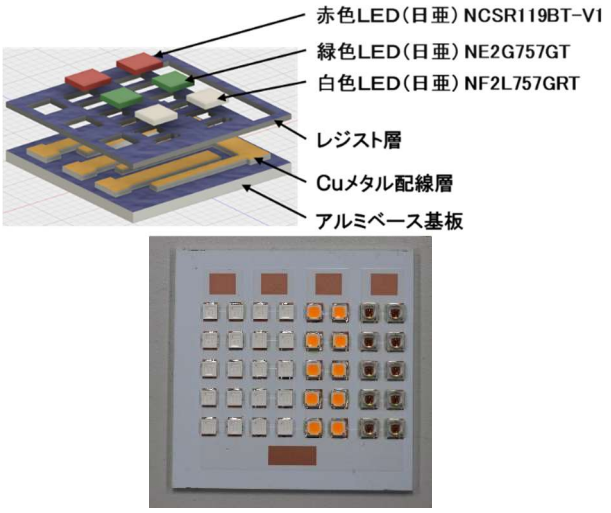
第２表　市販品と計算結果の演色性の比較

	Ra	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15
市販品	82	8	76	80	71	82	99	72
本研究	93	95	93	74	91	90	95	96

特別演色評価数　Ｒ９は 93 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十分満たしている[3]．

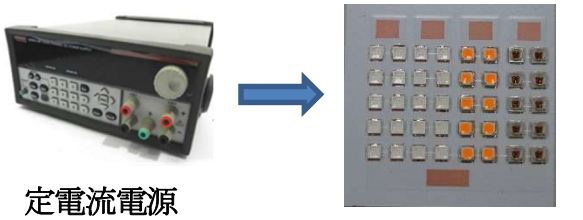
３．高光束高演性ＬＥＤ光源の作製

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ＬＥＤ２０個，緑色ＬＥＤ１６個，赤色８個を用いて高演性ＬＥＤ光源を作製した．第１０図に，アルミニウム基ＬＥＤ実装基板の構成図と各ＬＥＤを実装した写真を示す．実装基板の構成は，アルミニウム基板上に絶縁性薄膜，その上に銅箔のＣｕメタル配線層，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である．各ＬＥＤは，各ＬＥＤの配線パッドと銅箔とを半田を介して接続して，高演色性ＬＥＤ光源を作製した．第１１図に実験方法を示す．高演色性ＬＥＤ



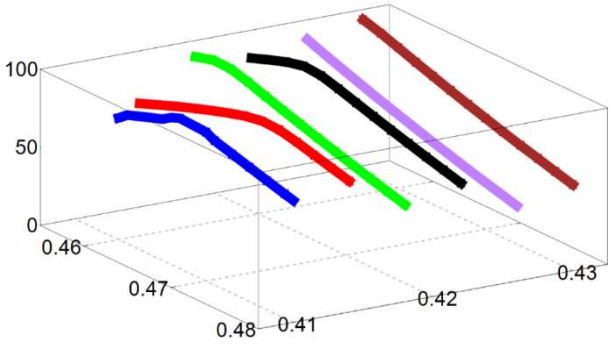
第１０図　高演色性ＬＥＤ光源
（上図：構成図，下図：実装した写真）

光源の各ＬＥＤは三元の定電流電源で駆動させた．高演色性ＬＥＤ光源に，第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．

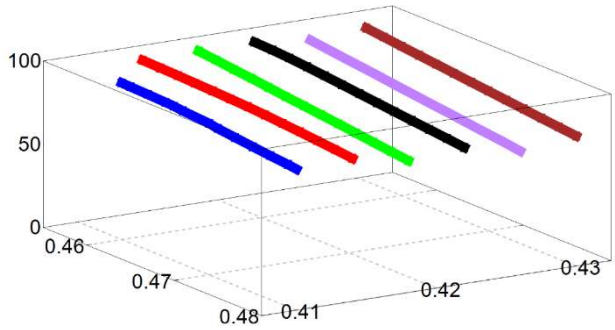


第１１図　実験方法の説明

第１２図，第１３図に，赤色の特殊演色評価数（Ｒ９）平均演色評価数（Ｒａ）の測定値を示す．ｙ座標を一定して，ｘ座標を変化させて，Ｒａ，Ｒ９を求めた．Ｒａは，計算結果の結果とよく一致し，80 以上であった．赤色の特殊演色評価数（Ｒ９）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Ｒ９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[1，2]．



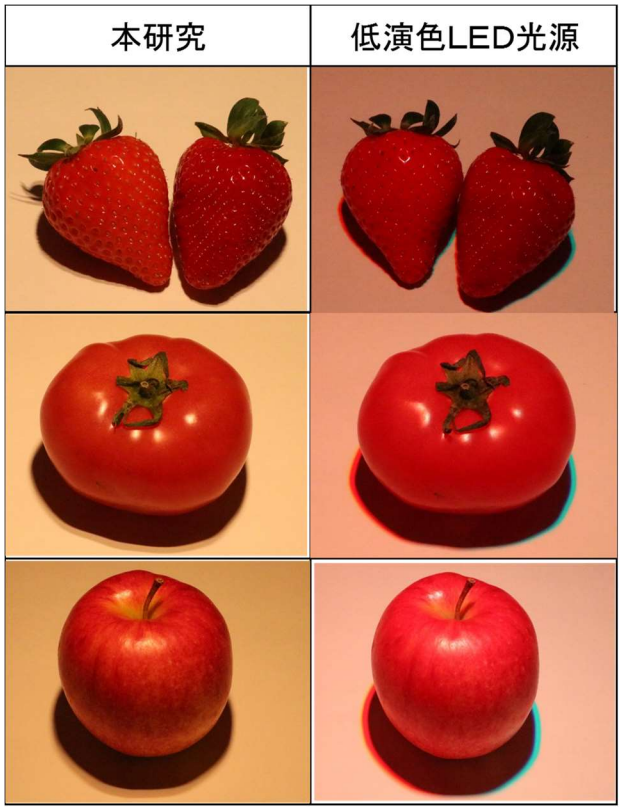
第１２図　測定結果　赤色の特殊演色評価数（Ｒ９）



第１３図　測定結果　平均演色評価数

本研究と低演色ＬＥＤ光源で，農作物（イチゴ，トマト，リンゴ）を照らしたときの写真を，第３表に示す．本研究（R9：93）のＬＥＤ光源の場合，どの農作物も，赤色の色再現があった．一方，低演色ＬＥＤ光源（R9：8）の場合，どの農作物も赤色が一様で赤色の鮮やかさがなく，色再現されてないことが分かる．

第３表　各ＬＥＤ光源による，農作物の撮影結果
光源：本研究（R9:93），低演色ＬＥＤ光源（R9：8）
農作物：イチゴ，トマト，リンゴ，



本研究のＬＥＤ光源と市販品の光源における演色性を第４表に纏める．見てわかるように，本研究で得られたＬＥＤ光源の演色性は，市販品に比べて，大きくＲ９が改善されただけでなく，Ｒａや他の特殊演色評価数も改善できたとわかる．

第４表　本研究ＬＥＤ光源と市販品との演色性

	Ra	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15
市販品	82	8	76	80	71	82	99	72
本研究	93	93	91	73	90	90	97	97

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Ｒ９(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，加法混色法を用いてＬＥＤ光源の演色性の改善し，高いＲ９を有する高い光束のＬＥＤ光源を開発した．既存ＬＥＤ光源のＲ９が 61.8 である光源を，本提案の構成でＲ９が 90 を超えることができた．また，加法混色法を用いた計算結果は，白色ＬＥＤに，赤色，緑色ＬＥＤの構成による試作品の演色性の値と一致した．アルミニウム基板による実装基板上に各ＬＥＤを配置した高演色ＬＥＤ光源を作製した．高演色ＬＥＤ光源を用いて，現実の農作物を照らすと，低演色ＬＥＤ光源に比べて，赤色の色再現があることが分かった．

今後，高演色ＬＥＤ光源の実用化に向けた先行的技術が確立できたと考えられる．

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) 熊﨑竣二 et. al, 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) 熊﨑竣二 et. al, 2018 年度 照明学会第 51 回全国大会①-P-02(2018).
3) 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.
4) 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、 in vivo の幹細胞が自己複製と細胞分化のスイッチングをどのように調節しているのか、特に幹細胞自身の分子機構に着目して、プラナリアを対象に研究を行なった。プラナリアは成体であっても身体中に分化全能性の幹細胞である新生細胞を数多く維持している。我々哺乳類では、全能性の細胞は発生過程のごく初期のみ見られ、また成体の組織幹細胞はその数が非常に少なく、in vivo での幹細胞研究にはプラナリアが良いモデル生物となる。

我々はこれまで、プラナリアの新生細胞で特異的に発現する遺伝子群を同定し、機能解析を行ってきた。その中でPlac8相同遺伝子の機能阻害によって細胞周期が促進され、分化細胞の供給が増進される結果、無性生殖を行う個体が増加することを明らかにした。そこで、Plac8遺伝子が新生細胞の自己複製/分化のスイッチングに関与しているのではないかと考え、解析を行った結果、細胞周期に関する遺伝子の発現と転写因子の発現の両方にPkac8が関与している可能性を示唆した。

1. はじめに

動物の成体を維持するためには、多くの組織で分化細胞を更新する恒常性が重要な役割を果たしている。例えば脊椎動物では、血球は日々骨髄にある造血幹細胞から供給され、血球ごとに新しい細胞に置き換えられている。消化管でも上皮細胞は日々、幹細胞から供給される新たな上皮細胞に置きかわり続けている。つまり幹細胞が自身を維持しつつ分化細胞を供給するという、相反する働きを行うことによって成体は維持されているのである。哺乳類の発生過程の初期にのみ現れる胚盤胞の内部細胞塊に由来する ES 細胞や同等の能力を持つ iPS 細胞といったin vitroの幹細胞は大量に培養することができ、かつ、何にでもなれるという魅力的な能力から、その維持機構や分化誘導に関する多くの研究がなされている。哺乳類の in vivo における組織幹細胞研究も盛んに行われているが、in vivo での組織幹細胞数の少なさが、その遂行の困難さの一つの原因となっている。

一方、無脊椎動物に目を向けると、成体であっても分化全能性の幹細胞を維持し、組織の恒常性のみならず、個体の一部から新たに完全な個体を再生産する無性生殖を行う種が数多く存在する。扁形動物門に属する非寄生性の淡水性プラナリアであるナミウズムシも、その内の一種である。ナミウズムシ（*Dugesia japonica*）は、日本中の比較的水質の良い、緩やかな流れの河川や池などに生息している。体長は約１cmほどで、外部形態としては頭部に一対



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。

の目がある単純な形態をしている（(図１)。しかしながら、内部には脳をはじめとする神経系や、体全体に発達する消化管、体の中央部には口と肛門の両方の機能を持つ咽頭を有するなど、良く組織化された体制を持っている。これらの組織を維持しているのが、分化全能性の幹細胞である新生細胞である(図２)。新生細胞は身体中の間充織空間に広く存在している（図２参照)。新生細胞は常に細胞分裂を行い、自身の数を維持しながら神経細胞や表皮細胞などの

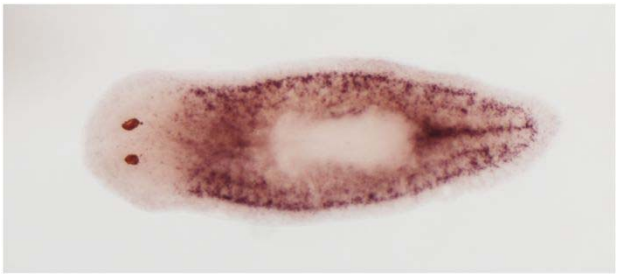


図２　ナミウズムシにおける新生細胞の分布。新生細胞特異的遺伝子の mcm2 の発現によって新生細胞を視覚化した。

分化細胞を供給し組織恒常性に寄与している。新生細胞は細胞系譜に運命付けられたものを含めると、プラナリアを構成する全細胞の約 30%を占めることが知られている（文献１）。ナミウズムシは、この数多く存在する分化全能性の新生細胞を厳格に制御することで、体の一部を使った個体の再生産、つまり無性生殖（個体再生）を可能にしている。渡辺憲二博士によって 19991 年に国内で樹立されたナミウズムシの GI 系統は 28 年間、新生細胞が枯渇することなく無性生殖だけで繁殖、維持されている。プラナリアはいかにして新生細胞を失うことなく、長期間にわたり組織恒常性や無性生殖を行っているかを解明することは、ヒトの組織恒常性や疾患の原因などを理解する上でも重要である。我々は、成体幹細胞研究にとって優れたモデル生物となるプラナリア、ナミウズムシを用いて、新生細胞がどのような分子メカニズムで自己複製（維持）と細胞分化をスイッチングしているかについて明らかにすることを目的とした。具体的には、細胞分裂を調節する JNK シグナルと、哺乳類の Plac8 のプラナリア相同遺伝子である DjPlac8A 遺伝子とが、どのような分子メカニズムで自己複製と細胞分化を調節しているのか、を RNA-seq から明らかにする。

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、室温 24 度で飼育し、餌としてウシのレバーを 1～2 週に 1 回与えた。少なくとも 1 週間、絶食させたプラナリアを実験に用いた。再生（無性生殖）をおこさすために、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（dsRNA）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 処理によって鋳型 DNA を除去し、フェノール/クロロホルム処理によってタンパク質を除去した 2 重鎖 RNA を 2 μg/μl の濃度になるよう水に溶かした。

（3）RNA 干渉法（RNAi 法）

コントロール用の gfp（green fluorescent protein）または Djplac8 遺伝子の dsRNA 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 RNAi 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、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 によりシークエンス解析を行った。

3. 結果と考察

これまでの解析から新生細胞で特異的に発現している DjPlac8A 遺伝子が自己増殖と分化のスイッチングに関係しているのではないか、ということを示唆してきた。プラナリア（ナミウズムシ）を切断すると、切断面付近に存在している新生細胞で Plac8A 遺伝子の発現が見られなくなる。切断面付近の新生細胞では一過的に JNK シグナルが上昇し、細胞分裂が促進されることが報告されている（文献２）。そこで DjPlacA 遺伝子の発現の消失が新生細胞の細胞周期を促進している可能性、さらに DjPlac8A の発現を JNK シグナルが調節している可能性を確認した。週一回、dsRNA を含むレバー抽出液を与える RNAi によって DjPlacA 遺伝子の機能阻害個体を作成したところ、個体の成長によって起きる自切（横分裂：プラナリアの無性生殖の方式）を起こす個体の数がコントロール群と比べて 3 倍程度増加した。これは以前に報告した P2X-A 遺伝子の機能阻害個体と同じ表現系であり、P2X-A 遺伝子の機能阻害個体では新生細胞の細胞増殖が促進されていた（文献３）。そこで Djplac8A 遺伝子の RNAi 個体において新生細胞の細胞分裂を観察してみると、切断後に起こる一過的な細胞増殖の促進状態が P2X-A 遺伝子の機能阻害個体と同様に持続していることがわかった。

一方、JNK シグナルを特異的阻害剤によって阻害すると、切断面付近の DjPlac8A 遺伝子の発現が維持され、さらに再生が阻害された。JNK シグナル阻害個体において DjPlac8A 遺伝子を RNAi してみると、新生細胞の分裂が促進され、再生不全がレスキューされた。これらの結果は、JNK シグナルと DjPlac8A 遺伝子が個体の切断後に起こる細胞分化を伴う新生細胞の一過的な増殖の促進、つまり細胞分化に必要な細胞増殖を制御している可能性を強く示唆している。

本研究では JNK シグナルに依存して DjPlac8A の上流、または下流で新生細胞の維持/分化のスイッチングに寄与する遺伝子セットを明らかにすることを目的としている。そこで、無切断個体、切断後 24 時間の個体で、それぞれ JNK シグナルを阻害したもの、しなかったもの、の間でトランスクリプトーム解析を行った（図３）。まず、JNK シグナルが切断面付近

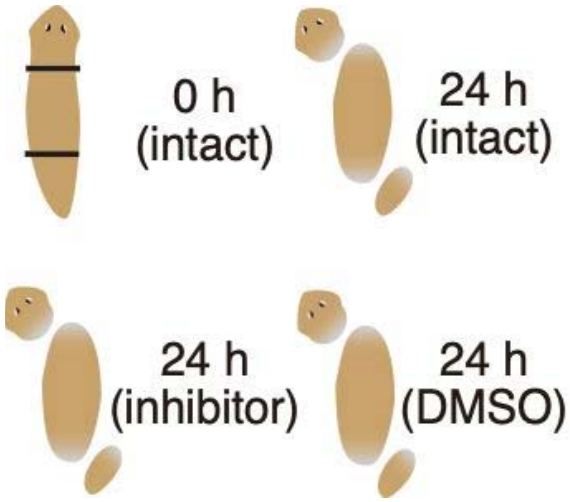


図３　トランスクリプトーム解析による新生細胞の維持/分化に関与する遺伝子の探索を行った。図は用いた実験群を示している。

で活性化する切断後 24 時間と、切断後 0 時間での RNA-seq を行い、JNK シグナルの活性化と共に発現量の変化する 5293 遺伝子を同定した。さらに JNK シグナルによってのみ変動する遺伝子を絞り込むため、切断直後から JNK シグナルの阻害剤で処理した、切断後 24 時間の JNK シグナル阻害個体、さらに JNK シグナル阻害剤を溶解させるために用いた DMSO 処理個体と遺伝子発現を比較し、最終的に 3019 遺伝子を JNK によって発現が変動する遺伝子群として同定した。JNK シグナルは新生細胞とともに既存の分化細胞でも活性化される。DjPlac8A 遺伝子は新生細胞での JNK シグナルの活性化によって発現が負に制御されるため、上記 3019 遺伝子のうち、新生細胞特定に発現しているものを明らかにするため、X 線照射によって新生細胞のみを除去した個体と比較することで、最終的に 46 遺伝子を JNK シグナルによって発現変動する新生細胞特異的遺伝子候補群として絞りこんだ。この 46 遺伝子のうち、Blast 解析によって 23 遺伝子をリスト化した（表１）。

これらのうち、10 遺伝子は細胞周期に関係する遺伝子であった（表１）。JNK シグナルを阻害すると細胞周期が G2 期で停止することから、JNK シグナルが細胞周期に関係していることが示唆されていた（文献２）。我々の結果は、やｈり JNK シグナルが細胞周期に関係していることを強く示唆した（表１）。

cell cycle regulatory genes

c26776_g1_i1_1_1359	sp|P24860|CCNB1_MOUSE_G2/mitotic-specific_cyclin-B1_OS=Mus_musculus_GN=Ccnb1_PE=2_SV=3
c29766_g1_i3_1_897	sp|Q90459|CCND1_DANRE_G1/S-specific_cyclin-D1_OS=Danio_rerio_GN=ccnd1_PE=2_SV=1
c32755_g1_i1_1_975	sp|P57761|PCNA_CRIGR_Proliferating_cell_nuclear_antigen_OS=Cricetulus_griseus_GN=PCNA_PE=1_SV=1
c36335_g1_i1_1_1046	sp|P24033|CDK1B_XENLA_Cyclin-dependent_kinase_1-B_OS=Xenopus_laevis_GN=cdk1-b_PE=1_SV=2
c40203_g1_i3_1_1126	sp|P49642|PRI1_HUMAN_DNA_primase_small_subunit_OS=Homo_sapiens_GN=PRIM1_PE=1_SV=1
c41758_g1_i1_1_1401	sp|P33610|PRI2_MOUSE_DNA_primase_large_subunit_OS=Mus_musculus_GN=Prim2_PE=1_SV=1
c42450_g1_i1_1_2243	sp|Q3ZBH9|MCM7_BOVIN_DNA_replication_licensing_factor_MCM7_OS=Bos_taurus_GN=MCM7_PE=2_SV=1
c42640_g1_i1_1_2439	sp|P25206|MCM3_MOUSE_DNA_replication_licensing_factor_MCM3_OS=Mus_musculus_GN=Mcm3_PE=1_SV=2
c42869_g1_i1_1_987	sp|A2AU37|RD21L_MOUSE_Double-strand-break_repair_protein_rad21-like_protein_1_OS=Mus_musculus_GN=Rad21l1_PE=1_SV=2
c45098_g1_i2_1_3824	sp|P52701|MSH6_HUMAN_DNA_mismatch_repair_protein_Msh6_OS=Homo_sapiens_GN=MSH6_PE=1_SV=2

non-cell cycle regulatory genes

c23267_g1_i1_1_354	sp|P09642|TBA3_CHICK_Tubulin_alpha-3_chain_(Fragment)_OS=Gallus_gallus_PE=3_SV=1
c27681_g1_i1_1_448	sp|Q8WQ47|TBA_LEPDS_Tubulin_alpha_chain_OS=Lepidoglyphus_destructor_PE=1_SV=2
c33362_g1_i1_1_865	sp|A4IH24|TPX2_XENTR_Targeting_protein_for_Xklp2_OS=Xenopus_tropicalis_GN=tpx2_PE=2_SV=1
c3533_g1_i1_1_1007	sp|Q9VAN6|SLBP_DROME_Histone_RNA_hairpin-binding_protein_OS=Drosophila_melanogaster_GN=Slbp_PE=1_SV=1
c35765_g1_i1_3_1638	sp|P47792|SX19A_DANRE_Transcription_factor_Sox-19a_OS=Danio_rerio_GN=sox19a_PE=1_SV=2
c36050_g1_i2_1_713	sp|Q9CWH4|R114L_MOUSE_Meiotic_recombination_protein_REC114-like_OS=Mus_musculus_PE=1_SV=1
c36316_g1_i1_1_1187	sp|Q5M7K4|RBBP4_XENTR_Histone-binding_protein_RBBP4_OS=Xenopus_tropicalis_GN=rbbp4_PE=2_SV=3
c36701_g1_i2_1_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_1_1086	sp|Q5ZMQ0|ARMC1_CHICK_Armadillo_repeat-containing_protein_1_OS=Gallus_gallus_GN=ARMC1_PE=2_SV=1
c43584_g1_i1_1_1620	sp|P52171|IMA1_XENLA_Importin_subunit_alpha-1_OS=Xenopus_laevis_GN=kpna2_PE=1_SV=2
c44437_g2_i2_19_2213	sp|Q9NXL6|SIDT1_HUMAN_SID1_transmembrane_family_member_1_OS=Homo_sapiens_GN=SIDT1_PE=2_SV=2
c44627_g1_i2_1_2909	sp|Q8BVE8|NSD2_MOUSE_Histone-lysine_N-methyltransferase_NSD2_OS=Mus_musculus_GN=Whsc1_PE=1_SV=2
c45718_g1_i7_1_3648	sp|O13046|WDHD1_XENLA_WD_repeat_and_HMG-box_DNA-binding_protein_1_OS=Xenopus_laevis_GN=wdhd1_PE=1_SV=1

表１　トランスクリプトーム解析の結果。」細胞周期に関係する遺伝子群と、細胞周期と関係のない遺伝子群とに分類でした。ほとんどの遺伝子群はJNKシグナルによって発現量が上昇したが、1つだけ発現量の減少する遺伝子（表中の赤いセル）が認められた。

さらに細胞周期以外の遺伝子群にはヒストンの翻訳や、修飾に関係する遺伝子が見られたことから、DjPlac8A遺伝子の上流、または下流でヒストン関連遺伝子が働き、エピジェネティックに細胞分化のスイッチングを行なっている可能性が示唆された。さらにSox19aの相同遺伝子も見られることから、一連の転写因子が細胞分化への運命決定を行なっていると考えられる。

今回、JNKシグナル、およびDjPlac8A遺伝子は切断シグナルを受けると、新生細胞の細胞周期を促進しながら、転写因子、ヒストン修飾を含むグローバルな遺伝子発現の変化によって新生細胞の自己複製/分化のスイッチングを行なっていることを示唆することができた。今後は、これらの上流、または下流の遺伝子がDjPlac8Aによってどのような分子機構によって制御されているのかを明らかにすることで、自己複製/分化のスイッチングの普遍性に迫りたい。

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) Hayashi, T. et al. 2010. Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its “index sorting” function for stem cell research. Development Growth and Differentiation, 52(1), pp. 131-144.

2) Tasaki, J. et al. 2011. Role of c-Jun N-terminal kinase activation in blastema formation during planarian regeneration. Dev. Growth Differ. 53, 389-400.

3) Sakurai, T. et al. 2012. The planarian P2X homolog in the regulation of asexual reproduction. Int. J. Dev. Biol. 56, 173-182.

濡れ性向上効果を有する銅温間酸化被膜の構造と伝熱性評価

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．本研究室ではこれまでに，簡便な表面処理方法である 200～500ºC の温度域で熱交換器用材料である銅を温間酸化させた場合，材料表面の濡れ性が向上することを報告した．材料表面の濡れ性と伝熱性能は相関性が深いことが示されてり，温間酸化処理が及ぼす濡れ性向上効果により伝熱性が向上できることを示唆した [1]．

本報告では温間酸化により生成した酸化物層を詳細観察及び分析することにより，材料表面の濡れ性向上効果を検討した．材料表面を SEM により微視組織観察を行った．温間酸化無処理の条件で材料表面は試験片作製時に生成した加工痕が確認された．温間酸化初期で，材料表面に微細な酸化物粒子が確認された．この微細酸化物粒子は温間酸化の進行に伴い，成長すると共に増殖していた．また，生成した温間酸化被膜を XRD 分析した結果，Cu_2O を主成分とする銅酸化物であることがわかった．表面状態が濡れ性の高い Cu_2O に置き換わったことにより濡れ性向上効果が得られたと考えられる．

1. 緒　言

近年の省資源化や機械構造の小型化に伴い，熱交換器や冷却器も小型化が求められるようになっている．他方、電子機器技術の発展に伴い，熱発生量も増加しているため，更なる熱輸送性能・冷却性能の向上も求められている．これらの産業界の需要に対して熱交換器や冷却器の高性能化を目指した新技術の研究開発が盛んに進められている．

性能向上方法としては，クーラントの性能向上と熱交換器及び冷却器の性能向上という二種類に大別される．クーラントの性能向上方法として，ナノ流体に代替する方法が報告されている [2]．また，熱交換器及び冷却器の性能向上方法としては，構成材料を伝熱性の高いものに代替する方法や伝熱面を改質する方法が報告されている．特に表面改質ではナノ粒子バイポーラス構造にする手法が注目されている [3]．ナノ粒子バイポーラス構造はナノ粒体を塗布した材料を沸騰蒸着させることにより付与され，微視的なポーラス構造を有する．微視的なポーラス構造は伝熱面積を増加させる等，伝熱性能を向上させる効果が報告されている．

材料表面の濡れ性は，材料表面上の液体との接触角と表面エネルギーの関係より式 1 に示す Young-Dupre の式の関係を有する [4]．

$$\gamma_L \cos\theta = \gamma_S - \gamma_{SL} \quad \cdots \text{式 1}$$

ここで，γ_{SL} は固液界面エネルギー，γ_L は気液界面エネルギー，γ_S は気固界面エネルギー，θは材料と液体の接触角を示している．材料表面の液滴接触角を評価することにより温間酸化処理面の伝熱性能向上の可能性を評価することが報告されている [5]．本研究でも同様な手法を用いて，温間酸化により生成した銅酸化物層が濡れ性を向上させる効果について報告を行ってきた [1]．**Fig. 1** にこれまでに報告した温間酸化処理による銅材料の濡れ性向上結果を示す．縦軸が温間酸化した銅試験片と純水との接触角度，横軸が温間酸化時間を示している．全ての温間酸化温度において，温間酸化処理により接触角が著しく小さくなった．これは試験片表面が親水性となったことを示している．つまり，温間酸化により生成した温間酸化物が銅材料の表面濡れ性を大きく改善することを明らかにした．しかし，温間酸化物相の分析等，濡れ性向上効果に及ぼす因子の検討には至っていない．そこで，本研究ではこれまでに確認された温間酸化処理による銅材料の濡れ性向上効果を明らかにすることを目的に行った．

2. 実験方法

本研究の供試材には無酸素銅を供した. 板厚 3mm の無酸素銅板より走査型電子顕微鏡（以下，SEM と略称）観察用 $3^{W}\times15^{L}$mm の試験片を切り出した. 切り出した試験片は表面粗度を定型化する目的で表面研磨を行った. 研磨は#500 のエメリー紙を用いて

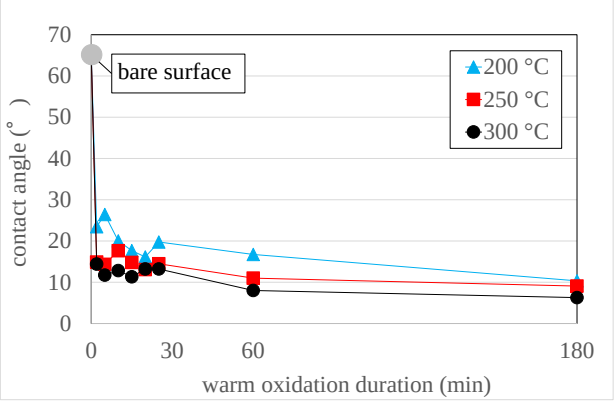


Fig. 1　Results showing the contact angles of the water droplets on the warm oxidized copper specimens.

一方向 30 往復の乾式研磨を行った. これにより表面粗度は算術平均粗さ約 0.2μm に定型化した．乾式研磨後，エタノールにより表面洗浄を行った後，乾燥を行った.

作製した試験片に対して温間酸化処理を施した. **Fig. 2** 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にて行った．温間酸化処理温度は 200，300°とした．また，温間酸化時間は 30，60，180min 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．空冷後，SEM により試験片表面に生成した温間酸化物構造を微視観察した．また，試験片上に生成した温間酸化物を同定する目的で厚さ 20μm の無酸素銅箔より $10^{W}\times10^{L}$mm の試験片を切り出した. 濡れ性試験及び SEM 観察と同様な温間酸化処理を施した後, XRD により温間酸化物の同定を行った．比較材として，温間酸化無処理材に対しても同様な観察と分析を行った.

3. 実験結果

Fig. 3 に温間酸化無処理の試験片表面の SEM 観察結果を示す．試験片表面には，表面粗度を一定とするため温間酸化処理前に行った乾式研磨による一方向に伸張した加工痕が確認された.

Fig. 4 に温間酸化した試験片表面の SEM 観察結果を示す．200ºC で温間酸化した場合，温間酸化時間 30min で材料表面に酸化核になったと考えられる微粒子のような酸化物が確認された．温間酸化 60min の場合，酸化が進行したため微粒子が成長し，

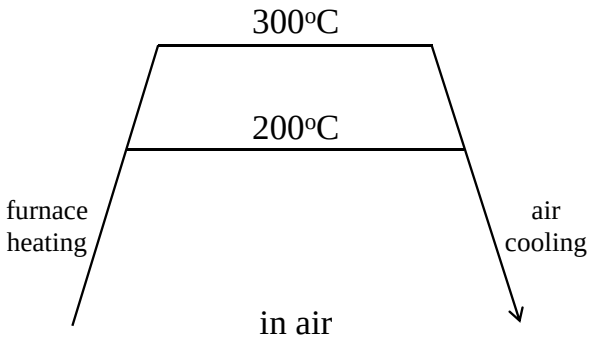


Fig. 2　Thermal history of warm oxidation treatment.

増殖していた．さらに，温間酸化 180min で温間酸化物粒子がわずかに成長していた．300ºC で温間酸化させた場合，温間酸化時間 30min で，材料表面が成長した等軸形状の温間酸化物粒子に覆われていることがわかった．温間酸化 60 分で，これらの温間酸化物粒子は更に成長し，増殖していた．こられの酸化物粒子は積層するように増殖していた．温間酸化 180min で材料表面は温間酸化物粒子の成長と積層により温間酸化物層を形成していた．さらに，温間酸化させることで，表面構造は局所的なポーラス構造及び酸化物の生成によるナノレベルの粗面化が発生していることがわかった.

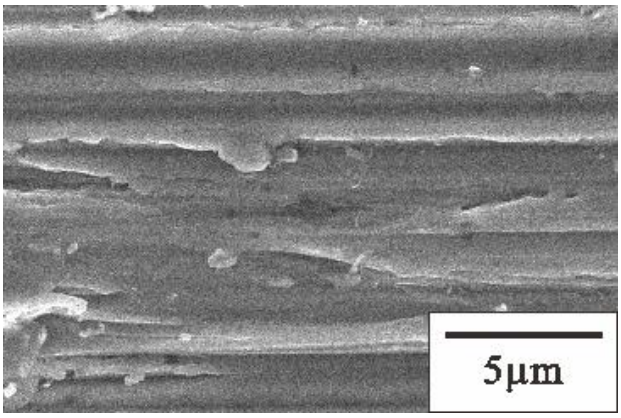


Fig. 3　SEM observation results of bare surface.

Fig.5 に温間酸化無処理面の XRD 分析結果を示す．**Fig. 6** に 300ºC で温間酸化を行った試験片の XRD 分析結果を示す．各 XRD 分析結果は回折角度

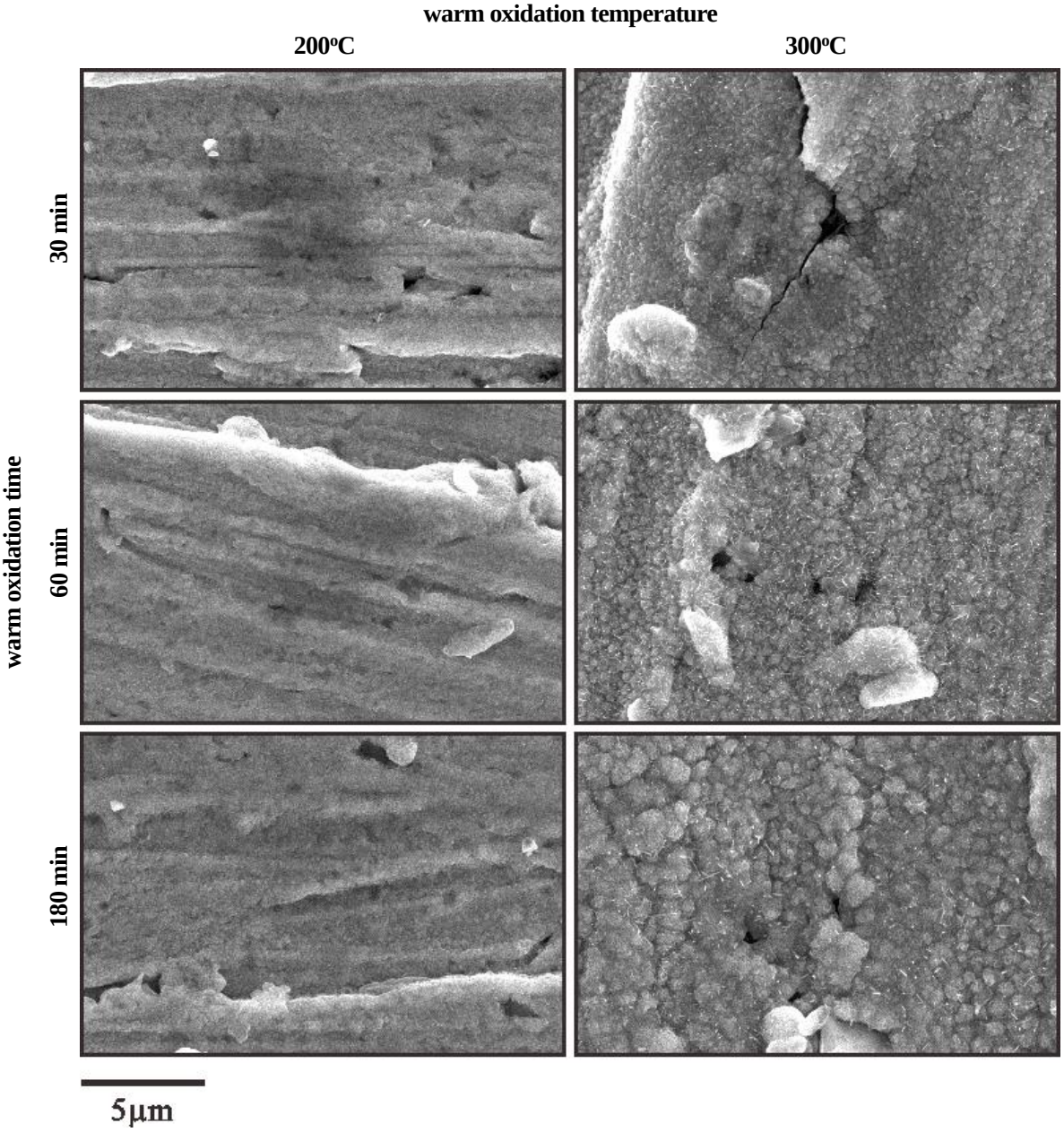


Fig. 4 SEM observation results of warm oxidized surfaces.

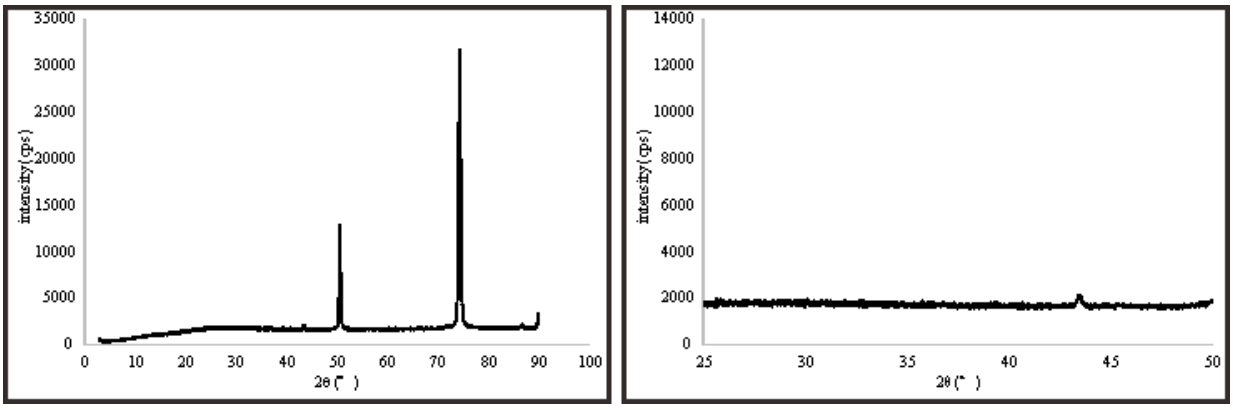


Fig. 5 XRD analysis results of bare surface specimen.

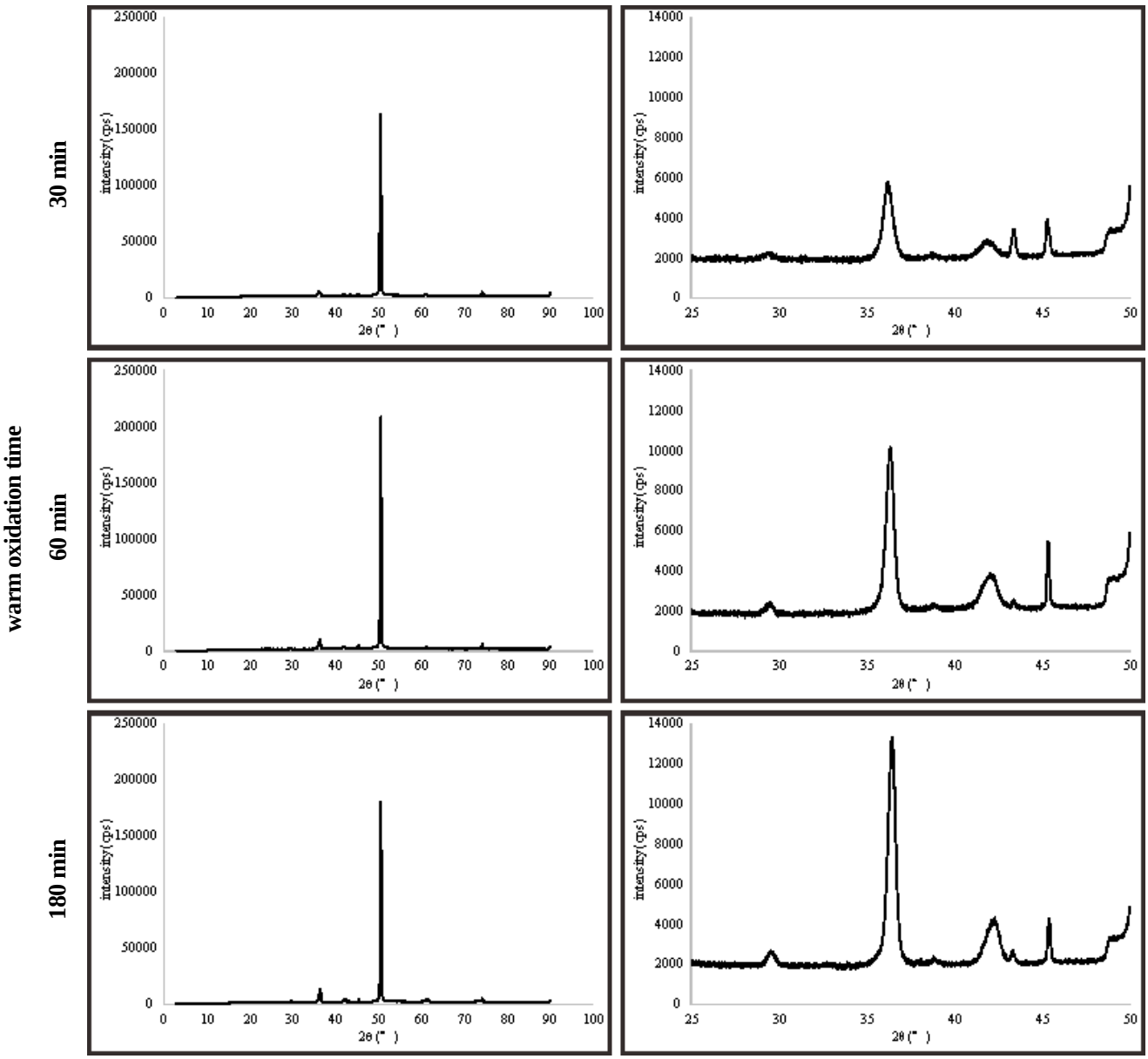


Fig. 6　XRD analysis results of specimens oxidized at 300°C.

0°～90°の測定結果と，25°～50°の回折角度範囲を拡大したものを示している．温間酸化無処理面では回折角度 50.5°と 74°に Cu を示す回折ピークが確認された．25°～50°の回折角度範囲では回折ピークは確認されなかった．Cu を示す 50.5°と 74°の回折ピークは 300°C で温間酸化を行った試験片でも同様に確認された．300°C で温間酸化を行った試験片では，全ての温間酸化時間で 25°～50°の回折角度範囲でいくつかの回折ピークが確認された．回折角度 37°と 42.5°において Cu_2O を示す回折ピークが確認された．また，回折角度 45.5°において CuO を示す回折ピークが確認された．特に 37°における回折ピークは温間酸化時間が長くなるのに伴い，回折強度が高くなっていた．つまり，温間酸化相は主に Cu_2O であることがわかった．

4. 考　察

濡れ性試験結果より，温間酸化によって銅材料の濡れ性が向上することがわかった．これは温間酸化された銅材料の伝熱性能向上効果を示唆している．

XRD 分析結果より，温間酸化相は主に Cu_2O であることがわかった．本研究に於ける温間酸化による濡れ性向上効果は Cu_2O の生成によると考えた．Cu_2O が生成することで固液界面に作用する分子間力が変化し，固液界面エネルギーが変化したことが考えられる．分子間力を考慮した場合の固液界面エネルギーは式 2 で示される [4]．

$$\gamma_{SL} = \gamma_L + \gamma_S - V_{SL} \quad \cdots \text{式 2}$$

ここで，V_{SL} は分子間力を示している．さらに，分子間力 V_{SL} は式 3 で表される [4].

$$V_{SL} = \kappa\alpha_S\alpha_L \quad \cdots \text{式 3}$$

ここで，κはボルツマン定数，α_S は固体の分極率，α_L は液体の分極率を示している．つまり，固液界面エネルギーは分子間力が増加した場合，減少する．つまり，式 1 より固液界面エネルギーが減少することで接触角が小さくなり，濡れ性が向上する．Lorentz-Lorenz の式より分極率は式 4 で示される．

$$\alpha = \frac{3M(n^2-1)}{4\pi\rho N(n^2+2)} \quad \cdots \text{式 4}$$

ここで，M は分子量，ρは密度，n は反射率を示している．**Table 1** に本研究に用いた液滴である純水と Cu 及び Cu_2O の反射率を示す. Table 1 及び式 4 より，Cu よりも Cu_2O の方が分子間力は大きくなる．つまり，温間酸化により Cu_2O が生成することにより表面状態及び分子間力が変化することで濡れ性が向上したと考えられる．

Table 1　Reflective indexes of H_2O, Cu and Cu_2O.

n_{Cu}	n_{Cu2O}	n_{H2O}
0.62	2.85	1.33

また，SEM 観察結果より温間酸化層表面は局所的なポーラス構造やナノレベルの粗面化等，表面構造が変化していた．先述したナノ粒子バイポーラス構造のような表面改質による濡れ性向上効果は毛細管現象によると考えられている [3]．温間酸化により生成した局所的なポーラス構造も擬似的な毛細管現象により濡れ性向上効果を有すると考えられる．さらに，Wenzel の式より材料表面が親水性の場合，粗面化によって濡れ性が促進されることが提唱されている [4]．ナノサイズの温間酸化被膜の生成によって材料表面がナノレベルで粗面化したことで濡れ性向上効果が得られたことが考えられる．

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，濡れ性向上効果が得られた．この濡れ性向上効果の要因を調査検討する目的で研究を行った．得られた結果を以下に示す．

1. 温間酸化処理により，材料表面に温間酸化層が生成し，濡れ性が向上した．

2. SEM 観察より，生成した温間酸化層は酸化物粒子の積層と成長により構成されていたことがわかった．さらに，生成した酸化物層は局所的なポーラス構造を有していた．温間酸化層がナノサイズの温間酸化物粒子により構成されることで，材料表面がナノレベルで粗面化した．

3. XRD 分析結果より，生成した温間酸化相は主に Cu_2O であることがわかった．

4. 生成した温間酸化相が Cu_2O であったことより液滴との接触面の分子間力が大きくなることで濡れ性が向上すると考えた．

5. 温間酸化による表面構造の変化も材料表面の濡れ性向上効果を有していると考えられる．

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いたします。

参考文献

[1] A. Takemura, K. Yuki and A. Sadayuki, “Influence of Warm Oxide Layer on Wettability and Contact Angle for Heat Transport Devices”, Journal of Mechanics and Automation Engineeringp, Vol.7, 11(2017), 341-347.

[2] H. B. Ma, C. Wilson, B. Borgmeyer, K. Park, Q. Yu, S. U. S. Choi, and Mu, “Effect of nanofluid on the heat transportcapability in an oscillating heat pipe”, APPLIED PHYSICS LETTERS 88, 143116 (2006).

[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] Pierre-Gilles de Gennes, Francoise Brochard-Wyart, David Quere. Capillarity and Wetting Phenomena*: Drops, Bubbles, Pearls, Waves*. Springer-Verlag New York., 2004, p17-19, p92-93, p215-216.

[5] C.Hsu and P.Chen, “Surface wettability effects on

critical heat flux of boiling heat transfer using nanoparticle coatings", International Journal of Heat and Mass Transfer , 55 (2012), 3713–3719.

本研究助成により公表した研究成果

本助成により，下記に示す研究報告を行った.

国際会議 Proceeding 査読付，2 件

[1] ○A.Takemura and K.Yuki," Influence of Formation of Warm Oxide Phase on Hydrophilicity", International Conference on Machining, Materials and Mechanical Technologies 2018 (IC3MT 2018), September 20, REX Hotel, Ho Chi Minh City, Vietnam.

[2] ○A.Takemura, K.Yuki and A.Sadayuki, " Influence of Warm Oxide Layer on Wettability and Contact Angle for Heat Transport Devices", The 9th International Conference on Leading Edge Manufacturing in 21st Century (LEM21), November 15, International Conference Center Hiroshima (ICCH), Hiroshima City, Japan..

論文査読付，1 件

[1] A.Takemura, K.Yuki and A.Sadayuki, " Influence of Warm Oxide Layer on Wettability and Contact Angle for Heat Transport Devices", Journal of Mechanics Engineering and Automation Vol.7, Number 7, 2017 of JMEA, 341-347.

国内学会発表，2 件

[1] ○定行明則，竹村明洋，結城和久，"濡れ性向上効果に及ぼす酸化被膜の影響", 日本金属学会日本鉄鋼協会軽金属学会中国四国支部第 38 回若手フォーラム.

[2] ○定行明則，竹村明洋，結城和久，"濡れ性向上効果に及ぼす酸化被膜の影響"，金属第 57 回・鉄鋼第 60 回中国四国支部講演大会，努力賞.

環境負荷の小さい硫化スズ薄膜太陽電池の禁制帯不連続の制御による高効率化に関する研究

津山工業高等専門学校　総合理工学科

中村　重之

太陽電池は環境問題の解決手法の一つとして注目されているが，今後さらに導入するには高品質シリコンの不足の懸念があり，材料が少なくて済む薄膜太陽電池が注目されてきている．現在，実用化している薄膜太陽電池は有害元素や希少金属を含む．そのため，そのような元素を含まない薄膜太陽電池の開発が急がれている．硫化スズ（SnS）は，地殻に豊富に存在し比較的毒性の少ない元素から構成されており，太陽電池にふさわしい禁制帯幅（1.3 eV）と高い光吸収係数（波長 500nm で 10^4 cm^{-1}以上）を持ち，新たな薄膜太陽電池の光吸収層材料として期待されている．本研究では，SnS 薄膜太陽電池のための透明電極としてガリウムを添加した酸化亜鉛（ZnO:Ga，GZO）の薄膜を対向ターゲット式スパッタ法で製膜することを目的とした．

１．はじめに

2050年に日本では300GW規模の太陽光発電装置の生産量を予想している．その達成の問題点の一つとして高品質シリコンの生産量が挙げられる．そこで必要な原料の使用量が少なくて済む薄膜太陽電池に期待が寄せられている．しかし，現在主流の$CuIn_{1-x}Ga_xSe_2$(CIGS)薄膜太陽電池では,希少金属のインジウムやガリウム，有毒元素のセレンを使うといった問題点がある．そのため，将来的に導入量が増加すれば原料が不足することも予想される.そこで,希少元素を含まない，汎用原料だけで構成できる太陽電池に着目し，スズと硫黄が主原料の硫化スズ（SnS)半導体薄膜を光吸収層として用いた薄膜太陽電池の研究開発を世界に先駆けて行ってきた[1-2]．SnS の構成元素は地殻中に豊富に存在し(Sn:2.2 ppm, S:260 ppm)，毒性が低い特徴を持っている．SnS 薄膜太陽電池は，図 1 に示すように①上部電極(アルミ:Al)，②透明電極(不純物添加酸化亜鉛:n-ZnO)，③バッファ層(硫化カドミウム:CdS)，④光吸収層(硫化スズ：SnS)および⑤下部電極(モリブデン：Mo)から構成され，厚さはすべて合わせて３～４μm程度である．これまでに得られている SnS 薄膜太陽電池の最高変換効率は4%台[3]で,CIGS 太陽電池の22%に比べ大きく劣っている．その原因の一つに禁制帯の不連続が考えられる．薄膜太陽電池では，禁制帯幅の異なる異種の半導体を組み合わせてｐｎ接合を形成させるが，その際，ｐ型半導体とｎ型半導体の禁制帯に不連続ができるとキャリアの流れを阻害したり，ｐｎ界面での再結合電流が流れたりして変換効率の低下を招く．さらに薄膜太陽電池で一般的に行われているバッファ層（ｐ型半導体とｎ型半導体の間に薄い高抵抗の半導体膜を挟む）には硫化カドミウム(CdS)が用いられているが,これは有毒である．

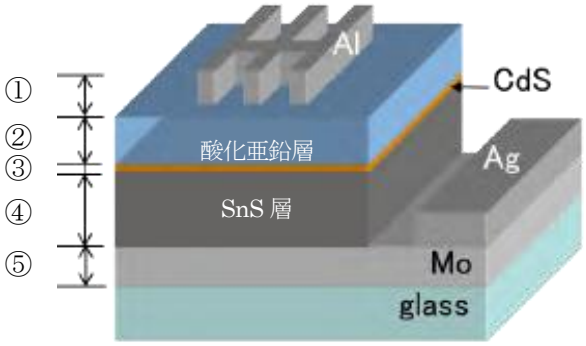


図１　一般的なSnS薄膜太陽電池の断面構造の模式図．①上部アルミ櫛形電極　②酸化亜鉛上部透明電極　③硫化カドミウムバッファ層　④硫化スズ（SnS）光吸収層　⑤モリブデン下部電極

そこで，CdS バッファ層を省くことで禁制帯の不連続を軽減することを提案する．SnS 薄膜上に直接,アルミニウムを添加した酸化亜鉛薄膜を堆積することで，図２に示すように硫化カドミウムバッファ層の際のクリフ型不連続からスパイク型不連続となり変換効率の向上が期待できる[4].ただしｐ型半導体

であり光吸収層である SnS 膜の上に直接，ｎ型層であり透明電極を兼ねる酸化亜鉛層をスパッタ法で形成すると SnS 膜がダメージを受ける．そのため，本研究ではダメージの少ないスパッタ製膜法として対向ターゲット式スパッタ法での酸化亜鉛層の成膜を採用する．図３に対向ターゲット式スパッタ装置の概念図を示す．これらの装置は真空容器に入れられている．まず，真空容器を 10^{-4} Ｐａ程度の真空にし，アルゴンガスを圧力が１Ｐａ程度になるように導入する．⊕と記されたターゲットフォルダーと⊖と記されたターゲット裏板に高電圧を掛けることでアルゴンガスを電離させプラズマ状態にする．するとアルゴンイオンがターゲットに衝突し，その衝撃で弾き飛ばされたターゲット成分が基板に付着し堆積される．基板がプラズマの外に置くことができるのでダメージの少ない製膜が可能となる．希少金属や有害元素を含まない薄膜太陽電池においてダメージの少ない製膜法でｎ型酸化亜鉛透明電極層を製膜することが本研究の目的ある．酸化亜鉛は不純物をドープしないと電気抵抗率が高く電極には不向きである．そのため一般にアルミニウムの添加が行われてきたが，近年はより高性能を目指してガリウムを添加するようになってきている．そこで，本研究でも，ドーパントとしてガリウムを選択することにした．

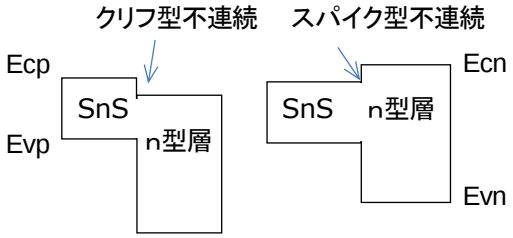


図 2.　SnS 太陽電池での禁制帯不連続の概念図

２．実験

まず，近接昇華法により SnS 薄膜を堆積した．近接昇華法とは，堆積するため原料と基板を距離１ｍｍ程度で対向させ原料を基板より高温にして堆積させる薄膜作製法である．近接昇華法を使用するのは，SnS は蒸気圧が高く，通常の真空蒸着装置のような広い空間で成膜すると基板からの再蒸発が起こり上手く堆積できないからである．図４に近接昇華法に用いるサセプターの断面図を示す．基板と SnS 原料パウダーの間の距離は１ミリメートルである．このサセプターをガラス管に入れる．ガラス管は筒状のヒーターに挿入されているので，外部から加熱することができる．成膜手順は以下のとおりである．サセプターに基板と SnS パウダーをセットし，ガラス管に導入したのち，まず，サセプター下部のヒーターを通電し 200 ℃程度まで温度を上げておく．次に，ガラス管の外部ヒーターに通電し 500℃程度に加熱する．そのことによってサセプターの上部と下部に下部のほうが上部より温度が高くなるように温度差をつけることができる．図５に，典型的な温度プロファイルを示す．

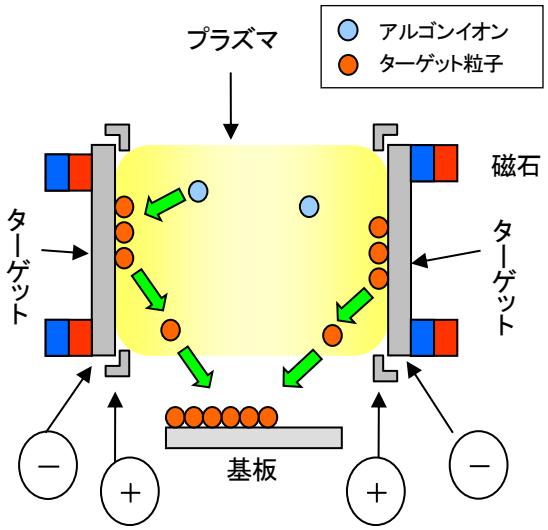


図3.　対向ターゲット式スパッタ法の概念図.
これらは真空容器に入れられている.

次に，酸化亜鉛薄膜の作製手順について述べる．上の方法で作製した SnS 薄膜の上にガリウムをドープした酸化亜鉛（ZnO:Ga 略してＧＺＯ）を堆積する．堆積に際して変更できるパラメータは，スパッタ電流，スパッタ圧力，スパッタ時間である．今回は，初めての実験であったので，スパッタ電流を設定可能な最低値（0.07 A）に，スパッタ圧力をやや高めの 1.5 Ｐａに固定し，スパッタ時間を２時間，20 時間，100 時間と変化させて製膜を行った．20 時間の成膜でもＸ線回折や定量分析ができるほどの膜厚

を持った薄膜ができなかったので，最終的に 100 時間の成膜を行うことにした．ここでは 20 時間と 100 時間の薄膜の比較を行う．以下，20 時間堆積させた薄膜を 20 時間膜，100 時間のそれを 100 時間膜と呼ぶ．

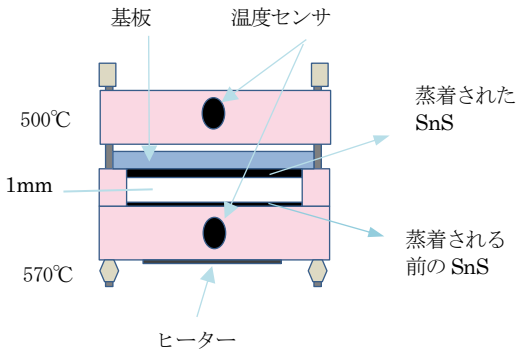


図４．　近接昇華法のサセプターの断面図．これらはガラス管容器に入れられている．また，容器全体を外部ヒーターで加熱することができる．

３．結果と考察

図１にＧＺＯ薄膜のＸＲＤパターンを示す．35 ° 付近に強い反射が見られる．酸化亜鉛はＪＣＰＤＳカードと照合すると（００２）面からの反射と分かる．酸化亜鉛のＪＣＰＤＳカードはいくつかあるが，（００２）面の反射は 34.4 ° 付近である．一方，図１の測定結果ではピークの角度は 34.24 ° であり，約 0.15 ° の誤差がある．この誤差はかなり大きく，このピークが酸化亜鉛の（００２）面からの反射であるとは言い切れないが，他に考えられないので，(００２)面のピークであると結論付けた．

酸化亜鉛のＪＣＰＤＳカード（例えば＃０１－０７９－０206）には，（００２）面以外にも，（１００）面（２θ＝31.768 ° ，強度比＝57.8 %），（１０１）面 (36.253 ° ，100%)，47.539 ° ，21.4 %），（１１０）面（56.594 ° ，30.3 %），（１０３）面（62.858 ° ，26.5 %）などが載っている．しかし，これらのピークは観察されず，得られた薄膜は（００２）面に極端に配向していることが分かる．20 時間膜と 100 時間膜を比べると 100 時間膜から得られたＸ線のピーク強度が 20 時間のそれに比べて５倍ほどあり，後で示すように薄膜の厚さを反映しているものと推測される．

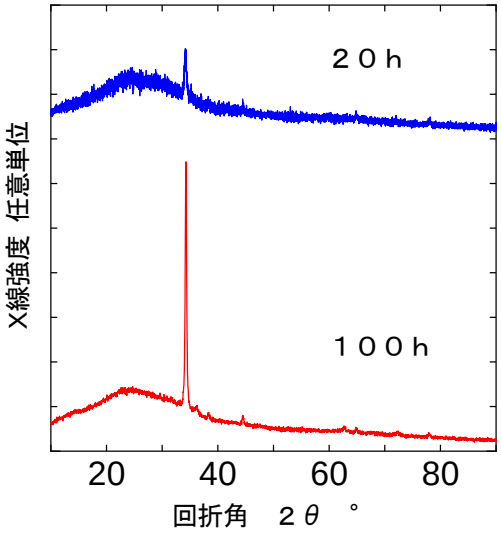


図１　GZO 薄膜の XRD パターン

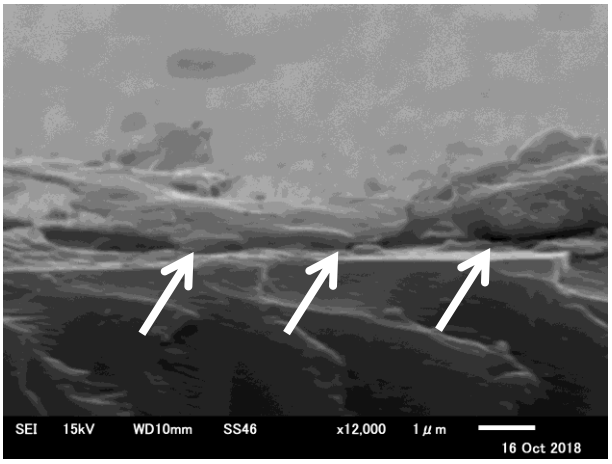


図2　20時間膜の走査電子顕微鏡写真．矢印の先がガラス基板と酸化亜鉛の境界

図２に 20 時間膜の走査型電子顕微鏡の鳥瞰図を，図３に 100 時間膜の表面および断面の走査電子顕微鏡写真を示す．図２から 20 時間の成膜では膜厚が大変薄いことが分かる．本校の電子顕微鏡の能力では膜厚を正確に測ることができなかった．次に 100 時間膜では図３(ａ)の断面写真から比較的平坦で一定の厚さの薄膜が得られており，膜厚が約 0.2 μm であることが分かる．100 時間の成膜なので，製膜

速度はわずか２ｎｍ／ｈであることが分かる．図３（ｂ）の表面写真からは比較的粒径が小さいがところどころに大きな塊があることが分かり，その部分は結晶の成長が促されたものと考えられる．

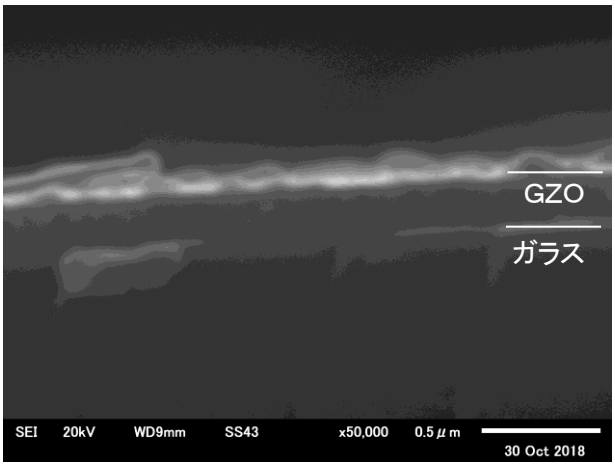
表１に，エネルギー分散型Ｘ線分析装置で測定した，各薄膜の元素定量分析結果を示す．薄膜の材料である亜鉛と酸素以外にも珪素，ナトリウム，カルシウムなどが検出された．これはガラスの主成分であり，電子線が酸化亜鉛薄膜を通り抜けて基板まで達し，そこから放射されたガラス基板を構成する元素からの特性Ｘを検出したものと考えられる．ガラスの主成分であるこれらの元素がその酸化数に応じた酸素と結合している（SiO_2, Na_2O, CaO, MgO）と仮定すると 20 時間膜では，これらと結合している酸素がと 67.01 %必要になると推定できる．これは分析で得られた酸素のパーセンテージより大きくなってしまうが，100 時間膜では 59.34 %の酸素の内，34.99 %がこれらの元素と結合していると推測され，したがって亜鉛と結合している酸素は２４．３５％と計算される．これは測定された亜鉛の組成とほぼ一致し，化学式がＺｎＯで表される所望の酸化亜鉛が得られていることが示唆される．

表１　エネルギー分散型Ｘ線分析による定量分析の結果

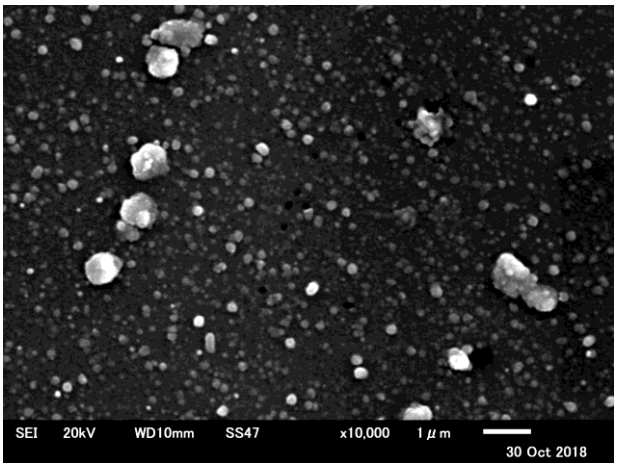
元素	20 時間膜	100 時間膜
亜鉛	3.15 %	22.07 %
酸素	60.19 %	59.34 %
珪素	24.38 %	16.42 %
ナトリウム	8.08 %	未検出
カルシウム	2.60 %	2.15 %
マグネシウム	1.61 %	未検出

図４に 100 時間膜の光透過率と光反射率のスペクトルを示す．これらを足すと 100%になるはずであるが，実際には 100%を超えてしまっている．波長 300 nm から急速に透過率が上昇し，波長 400 nm で 90 %を超える．酸化亜鉛の禁制帯幅は 3.4 eV と報告されており波長に直すと約 360 nm である．したがって，図４の透過率は酸化亜鉛の物性を反映したものと言える．

図５に，SnS 上にＣＢＤ法で ZnS を堆積させ，その上に対向ターゲット式スパッタ法で作製したＧＺＯを堆積させ，更にアルミ上部電極を堆積させた太陽電池セルの写真を示す．くし型の電極が上部電極で大きさは 25 mm×7 mm である．この中に３個のセルがある．100 mW/cm², AM1.5 の疑似太陽光をこのセルに当てて電流－電圧特性を測定したが，残念ながら発電しなかった．原因は，特定できていないが SnS, ZnS の品質に問題が有るのではないかと考えている．



（a） 断面SEM写真



（b） 表面SEM写真

図3　100 時間膜の走査電子顕微鏡写真

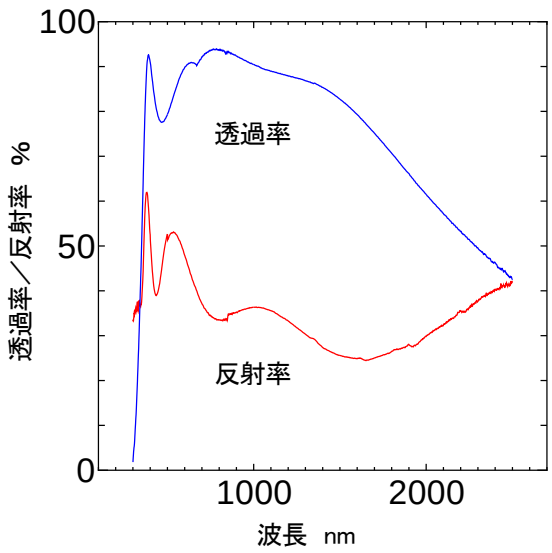


図4　100時間膜の光透過率と光反射率のスペクトル

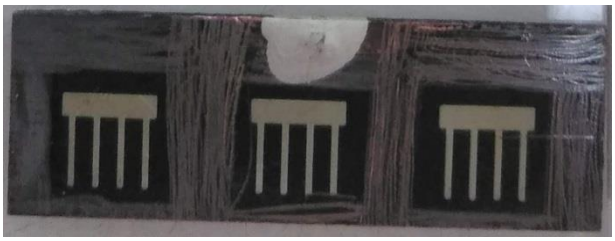


図5　作製した SnS 薄膜太陽電池の外観

４．まとめ

硫化スズ薄膜太陽電池の表面透明電極の作製のため対向ターゲット式スパッタ法を用いてガリウム添加酸化亜鉛薄膜の作製を行った．はっきりしたX線回折ピークが１本しか得られなかったが，定性分析では亜鉛が堆積されていることを確認したので，(００２)面に配向した酸化亜鉛のピークと結論付けた．100 時間の堆積でも膜厚 200 ナノメートルの薄膜しか得ることができず，極端に製膜速度が遅いことが分かった．今後は，製膜速度の向上を目指してスパッタ電流を上げて実験していく予定である．

謝辞

本研究の遂行に当たり，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申し上げます．

参考文献

［１］ A. Yago, S. Sasagawa, Y. Akaki, S. Nakamura, H. Oomae, H. Katagiri, and H. Araki, "Comparison of buffer layers on SnS thin-film solar cells prepared by co-evaporation", Phys. Status Solidi C 14, 1600194 (2017).

［２］ Aimi Yago, Takashi Kibishi, Yoji Akaki, Shigeyuki Nakamura, Hiroto Oomae, Hironori Katagiri, and Hideaki Araki, "Influence of SnS composition ratio on SnS thin-film solar cells produced via co-evaporation method", Japanese Journal of Applied Physics 57, 02CE08 (2018)

［３］P. Sinsermsuksakul, L. Sun, S. W. Lee, H. H. Park, S. B. Kim, C. Yang, and R. G. Gordon, "Overcoming Efficiency Limitations of SnS - Based Solar Cells", Adv. Energy Mater. 4, 1400496 (2014).

［４］Hiroki Sumi, Keisuke Asaka, Atsushi Okubo, Ishwor Khatri and Mutsumi Sugiyama, "Band Alignment of n-type Semiconductor/p-type SnS Heterojunction for Earth-Abundant SnS Solar Cells" The 26th International Photovoltaic Science and Engineering Conference (PVSEC-26), Marina Bay Sands Sands Expo and Convention Centre, Singapore, Oct. 24-28 (2016) (poster). 3_4-0019

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）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で、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（TGase）を発現させ、基質認識に関わる部位の探索を目的に、市販酵素である *S. mobaraensis* 由来 TGase と *S. cinnamoneus* 由来 TGase との遺伝子間で、キメラ酵素を作成し、親酵素・キメラ酵素との性状比較を行った。さらに、カゼインのトリプシン消化物に含まれる放線菌由来トランスグルタミナーゼの好適基質（アシルドナー）配列の探索を行い、β-カゼイン由来のペプチド 2 種（VLPVPQK および AVPYPQR）を同定した。さらに、これら 2 種のペプチドに対して、親酵素・キメラ酵素の反応性の比較についても報告する。

１．はじめに

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、すでにナガセケムテックス株式会社の 2 種の放線菌酵素生産に利用されている[3)]。これら酵素は、セルフクロー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。

そこで本研究では、この発現系を応用して、放線菌由来トランスグルタミナーゼ（TGase）の基質認識に関わる部位を探索する。TGase は、タンパク質中のグルタミンとリジンの側鎖間でペプチド結合を作り、タンパク質同士を架橋させる接着剤として広く使われている食品加工用酵素である。TGase の酵素反応では、アスパラギン酸残基がアシル基受容体リジンのアミノ基を活性化し、活性中心システインにトラップされたアシル基供与体グルタミンの側鎖とペプチド結合を形成する。しかしながら、TGase の天然物由来のペプチドに対する詳細な活性の違いは未解明のままであり、さらに基質認識部位については明らかにされていない。

本報告では、市販酵素である *S. mobaraensis* 由来 TGase（SMTG）と *S. cinnamoneus* 由来 TGase（SCTG）2 種の遺伝子間で、キメラ酵素を作成し、基質認識を担う部位を探索するとともに、TGase の好適基質配列の探索を行った結果についても記載する。

２．実験方法

（１）SMTG 遺伝子のユニークサイトである制限酵素 *Cpo*I 切断部位を利用して、SCTG 遺伝子とのキメラ酵素 2 種（N 末端 SMTG/C 末端 SCTG＝MC および N 末端 SCTG/C 末端 SMTG＝CM）を作成した。これらを改良型 scmp プロモーター（論文作成中）の下流に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 で種培養を行った後、本培養をバッフルフラスコ

で、2%グリセロール, 0.8%K_2HPO_4, 0.05%$MgSO_4$・$7H_2O$, 0.5%ポリペプトン, 0.5%酵母エキスを含む培地で、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。

（2）酵素簡易精製法

培養上清を 70%飽和硫安で処理し、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）HPLC による 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10%アセトニトリルを用いて、溶出した。254nm の波長で分析することにより、生成物を検出し活性測定した（図１）。

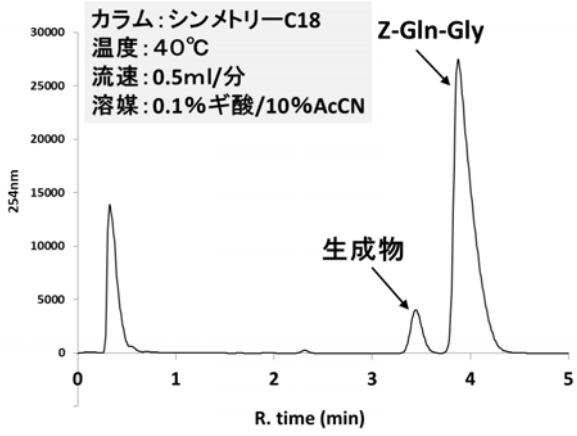


図１　HPLC による基質および生成物の検出

また、酵素反応による生成物は、別途 LC-MS を用いて、当該ピークの質量分析を行い、生成物であることを確認した。

（4）カゼイントリプシン消化物の基質探索

ウシ由来カゼインを市販トリプシンで消化したものをアシルドナーに、アシルアクセプターとして、L-Lys（終濃度：10mM）を用いて、TGase による反応を行った後、逆相カラムを装着したイオントラップ型 LC-MS により、反応によって消失し、なおかつ、リジン付加物に相当するピーク（2 価イオンとして、分子質量が 64 増加するピーク）が出現した組み合わせを指標に基質の探索を行った。最終的な同定は、別途同定配列を合成したものと比較することによって確認した。また、酵素反応の経時変化を追う場合は、LC-MS 分析時に、内部標準として、0.02 mM 4-methoxybenzamide を加えることによって、値を標準化した。

３．結果と考察

（1）酵素の発現

キメラ酵素のうち、MC（＝N 末端 SMTG/C 末端 SCTG）は活性体が得られなかったため、SMTG、CM（＝N 端 SCTG/C 末端 SMTG）、SCTG の 3 種の精製酵素での比較検討を行った。

（2）カイネティックス・パラメーターの比較

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、L-Lys および D-Lys を用い、3 種の酵素について、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 (mM)	V_{max} (μmol/min/mg)	V_{max}/K_m
SCTG	ヒドロキシルアミン	68.5 for Z-Gln-Gly	24.4	0.36
	L-Lys	2.9 for L-Lys	2.3	1.26
	D-Lys	6.4 for D-Lys	4.0	0.63
CM	ヒドロキシルアミン	30.9 for Z-Gln-Gly	20.0	0.65
	L-Lys	4.4 for L-Lys	4.0	0.91
	D-Lys	9.8 for D-Lys	7.1	0.72
SMTG	ヒドロキシルアミン	11.0 for Z-Gln-Gly	17.5	1.59
	L-Lys	6.5 for L-Lys	5.9	0.91
	D-Lys	16.1 for D-Lys	15.4	0.96

一般的に、キメラ酵素は、親酵素よりも、低い活性・安定性を示す場合が多いが、全ての基質（Z-Gln-Gly、ヒドロキシルアミン、L-Lys および D-Lys）に対するパラメーターにおいて、キメラ酵素 CM は、SMTG と SCTG との中間的な値を示した（表１）。また、いずれの酵素も、リジン以外のアミノ酸

を、アシルアクセプターとして認識することは出来なかった。

（3）熱安定性および至適温度

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て、3 種の酵素について比較を行った。

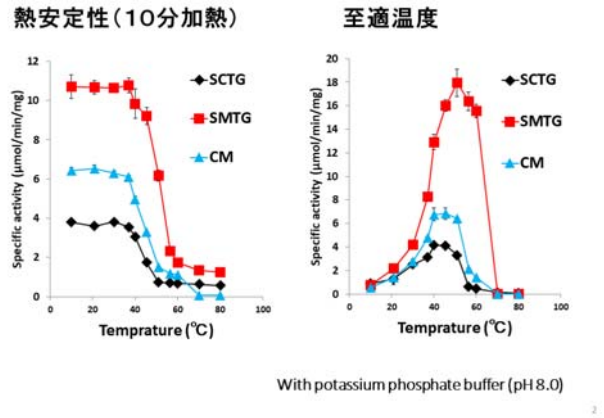


図２　熱安定性および至適温度

熱安定性および至適温度についても、カイネティックス･パラメーターと同様に、キメラ酵素 CM は、SMTG と SCTG との中間的な挙動を示した。

（3）pH 安定性および至適 pH

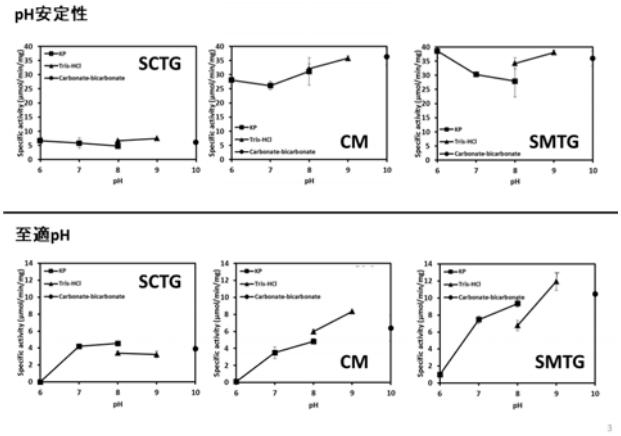


図３　pH 安定性および至適 pH

示すように、pH に対する挙動は、これまでと異なり、キメラ酵素 CM は、SMTG に類似した性状をもつことが明らかとなった（図３）。

（4）カゼインペプチドを基質とした反応

反応によって消失し、なおかつ、リジン付加物に相当するピークが出現した組み合わせから、β-カゼイン由来の VLPVPQK および同じくβ-カゼイン由来の AVPYPQR を、放線菌由来 TGase のアシルドナーとして見出した。前者の VLPVPQK については、我々の既報論文[5]で存在を明らかにしていたが、AVPYPQR については、別途ペプチドを合成し、その配列を同定した。

ついで、3 種の酵素について、これらのペプチドに対する経時変化を追った（図４）。

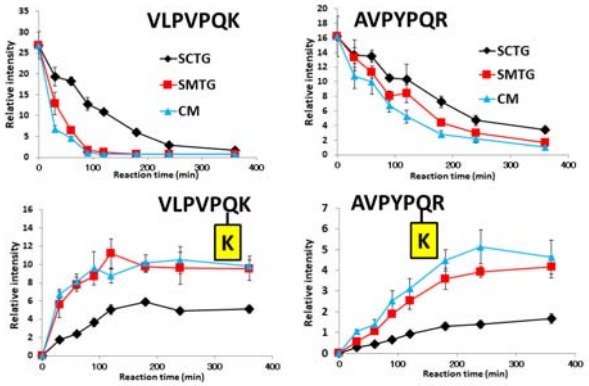


図４　カゼインペプチドを基質とした反応経時変化
上段：基質の消長、下段：生成物の生成

示すように、カゼインのトリプシン消化物に含まれる VLPVPQK および AVPYPQR に対する反応性について、キメラ酵素 CM は、SMTG と同様な挙動を示した。また、SCTG による反応においては、6 時間後には、両基質とも消失したが、そのリジン付加物の強度は、SMTG、CM の半分程度しか示さなかった。これは、VLPVPQK および AVPYPQR と、カゼインのトリプシン消化物に含まれる別のペプチドとの結合によるものと示唆されたが、生成ペプチドの同定には至らなかった。

４．まとめ

カイネティックス・パラメーター、熱安定性および至適温度において、キメラ酵素 CM は、SMTG と SCTG との中間的な挙動を示した。また、pH 安定性および至適 pH においては、キメラ酵素 CM は、SMTG に類似した性状を示した。さらに、SMTG、CM および SCTG の 3 種の酵素の、アシルドナーとして新たに見出した 2 種のカゼインペプチド（VLPVPQK および AVPYPQR）に対する反応性（図

４）およびカイネティックス・パラメーターの比較（表１）から、基質認識に関わる部位は、図５の赤色で示すC末端部分に含まれることが推測された。

今後、よりきめ細かなキメラ酵素を作成し、放線菌由来TGaseにおけるアシルドナーの認識配列を明らかにすることを計画している。

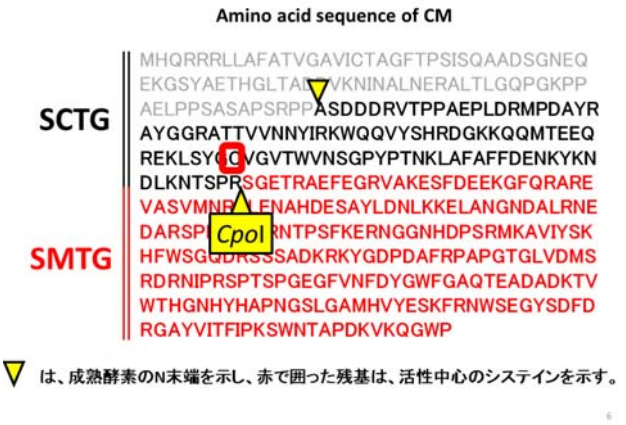


図５　キメラ酵素CMのアミノ酸配列

５．参考文献

1) Anné J. *et al.*, Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biopys. 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. Norwitch: The John Innes Foundation, (1985)

5) Wan K. *et al.*, Enzymatic degradation of allergen peptides from bovine casein by a combination of *Streptomyces* aminopeptidases. *Appl. Biochem. Biotech.* First Online: 16 July (2018)
https://doi.org/10.1007/s12010-018-2839-7

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。

病害抵抗性植物の効率的選抜を可能にする免疫応答可視化ツールの開発

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

中野真人

青枯病菌（*Ralstonia solanacearum*）はナス科作物を中心に様々な植物に病気を引き起こす土壌伝染性の植物病原細菌である。本菌は宿主への感染を成立させるために、エフェクターと呼ばれる分泌タンパク質を植物細胞内に注入し、免疫応答を攪乱する。病害抵抗性を有する植物では、細胞内に存在する抵抗性遺伝子産物がレセプターとして機能し、病原菌のエフェクターを異物として認識する。エフェクターを認識した植物細胞内では、活性酸素種の生成をはじめとする様々な免疫応答が誘導されるため、これらの応答を特異的に検出することができれば抵抗性を有する植物個体を効率的に選抜できると考えられる。本研究では、免疫応答のひとつである活性酸素種の生成を可視化する実験手法を構築し、これを用いて青枯病菌の認識に関わる抵抗性遺伝子を特定した。

1. はじめに

青枯病菌（*Ralstonia solanacearum*）は、ナス科作物を中心に200種類以上の植物を加害する植物病原細菌である[1)]。本菌は土壌深部や水中で生存しており、根の自然開口部や傷口から植物内に侵入すると維管束内で増殖しながら全身に広がり、最終的に多糖類を大量に分泌することで導管閉塞を引き起こし、植物を枯死させる。青枯病の防除においては農薬を用いた化学的防除や輪作による耕種的防除の効果が限定的であることから、病害抵抗性品種が農業現場で広く利用されてきた。ところが、青枯病菌は病原性や宿主域が変異しやすく、遺伝的に同一な抵抗性品種の連続使用により、新たな病原性を獲得した菌株が出現し、甚大な被害を引き起こしている。

病原菌は宿主の防御反応を乗り越えて感染を成立させるために、特殊な分泌装置により自身のタンパク質を宿主の細胞内に注入する。このような分泌タンパク質はエフェクターと総称されており、病原細菌の主要な病原性因子として機能する。日本で分離された青枯病菌RS1000株は約70種類のエフェクターを植物細胞内に注入することが報告されている[2)]。青枯病菌エフェクターはRip（*Ralstonia*-injected protein）と呼ばれており、様々な方法で植物の免疫応答を攪乱することが近年の分子生物学的解析によって明らかになってきた。

エフェクターは宿主植物において病原菌の病原性因子として機能するだけでなく、非宿主植物では非病原力因子（Avr）としても機能する。非宿主植物は病害抵抗性タンパク質と呼ばれる細胞内受容体によりAvrエフェクターを感知し、非常に強い免疫応答を誘導する[3)]。この反応は抵抗性遺伝子の存在を示す指標となるため、Avr エフェクターを利用して抵抗性育種選抜を実施できると考えられる。これまでに、ナス科植物が認識するAvrエフェクターとして、RipAA、RipP1、およびRipAX2エフェクターが同定されている[4,5)]。しかしながら、これらのAvrエフェクターを認識する抵抗性タンパク質は特定されておらず、Avr エフェクターの認識に関わる分子機構は依然として未解明である。そこで本研究では、青枯病菌に対する植物の免疫機構を明らかにするために、ナス科のモデル植物であるベンサミアナタバコ（*Nicotiana benthamiana*）を用いて、青枯病菌の新規Avrエフェクターの探索を行うとともに、このエフェクターを認識する抵抗性遺伝子を同定することを目的とした。

2. 結果と考察

免疫応答を指標としたAvrエフェクターの探索

エフェクターが認識されると過敏感細胞死の形成に先立ち、NADPHオキシダーゼを介してROSの生成

が誘導される[6]。この様な ROS の生成は、青枯病菌だけでなく糸状菌やウイルスなど、様々な病原体由来の Avr エフェクターを認識した植物で観察されている。そこで、青枯病菌の新規 Avr エフェクターを同定するために、ROS の生成を指標とした Avr エフェクターのスクリーニングを行った。アグロバクテリウム法により青枯病菌 RS1000 株のエフェクターをベンサミアナタバコ葉で一過的に発現させ、ROS の化学発光プローブ L-012 を用いて ROS の生成が誘導されるかどうかを調べた。青枯病菌 RS1000 株が有する約 70 種類のエフェクターについて調べたところ、ROS の生成を顕著に誘導するエフェクターとして Roi1（ROS inducer 1）を見出した。ROS の生成は Roi1 エフェクターの発現により誘導され、その生成量はポジティブコントロールとして用いた既知の Avr エフェクターRipP1 と比較して約 2 倍増加した（図 1）。

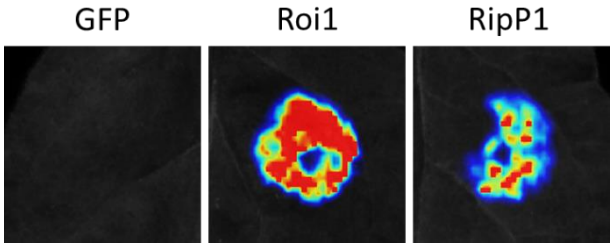


図 1. エフェクター発現による ROS の生成
アグロバクテリウム法により GFP、RipP1、および Roi1 をベンサミアナタバコ葉で一過的に発現させ、ROS の生成を検出した。

次に、アグロバクテリウムを介して Roi1 エフェクターを一過的に発現させたベンサミアナタバコ葉から mRNA を単離し、リアルタイム PCR により防御関連遺伝子の発現を解析した。Roi1 エフェクターの発現は、サリチル酸情報伝達経路のマーカー遺伝子 *NbPR1* および過敏感反応のマーカー遺伝子 *NbHIN1* と *Nb203J* の発現量を顕著に誘導した（図 2）。これらの結果から、Avr エフェクターの候補として同定した Roi1 エフェクターは、ベンサミアナタバコにおいて ROS の生成や防御関連遺伝子の発現といった免疫応答を誘導することが明らかになった。

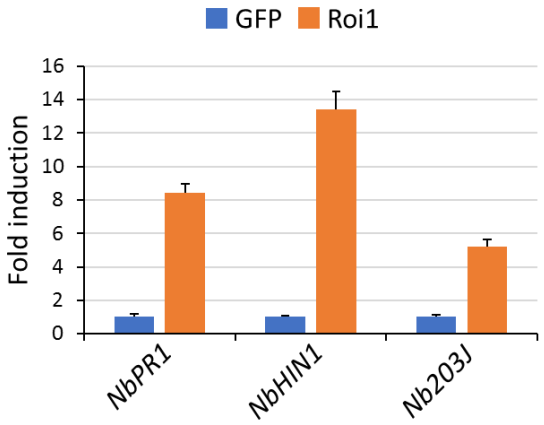


図 2. Roi1 による防御関連遺伝子の発現誘導
アグロバクテリウム法により Roi1 と GFP をベンサミアナタバコ葉で一過的に発現させ、防御関連遺伝子の発現量を測定した。

新規 Avr エフェクターの機能解析

Roi1 エフェクターがベンサミアナタバコに認識される Avr エフェクターかどうかを明らかにするために、青枯病菌 RS1000 株の *roi1* 遺伝子を欠損させた Δ*roi1* 変異株を作出し、ベンサミアナタバコにおける表現型を観察した。野生株（WT）を接種したベンサミアナタバコは接種 21 日後まで健全に生育し、萎凋症状は認められなかった（図 3）。一方、Δ*roi1* 変異株を接種したベンサミアナタバコは接種 10 日後から萎凋症状が認められ、接種 21 日後に全ての接種個体が枯死した。なお、既知の Avr エフェクターである *ripAA* と *ripP1* を欠損させた Δ*ripAA* Δ*ripP1* 変異株を作出し、ベンサミアナタバコに接種したが、萎凋症状は認められなかった。これらの結果から、青枯病菌 RS1000 株の Avr エフェクターは Roi1 であり、RipAA と RipP1 ではないことが明らかになった。



図 3. 変異株接種植物における萎凋症状
青枯病菌野生株（WT）、*ripAA ripP1* 変異株（Δ*ripAA* Δ*ripP1*）、および *roi1* 変異株（Δ*roi1*）をベンサミアナタバコに接種した。接種 21 日後に写真を撮影した。

3. まとめ

本研究では、ナス科のモデル植物であるベンサミアナタバコにおいて、青枯病菌の Avr エフェクターの探索とその認識機構の解析を行った。ベンサミアナタバコを含むニコチアナ属植物は、青枯病菌の RipAA と RipP1 を Avr エフェクターとして認識すると従来考えられてきた。しかしながら、青枯病菌 RS1000 株の Δ*ripAA* Δ*ripP1* 変異株はベンサミアナタバコに対して病原性を示さなかったことから、未知の Avr エフェクターの存在が示唆された。そこで、植物免疫応答を指標とした Avr エフェクターの網羅的スクリーニングを実施し、免疫応答を顕著に誘導する新規 Avr エフェクターとして Roi1 を見出した。本エフェクターは、RipAA や RipP1 よりも強く植物に認識されることが明らかとなり、この発見は従来の定説に対して再考を促す新知見といえる。さらに、抵抗性遺伝子群のノックダウン植物を用いた解析から、当該エフェクターを特異的に認識する青枯病抵抗性遺伝子を特定した（データ不掲載）。ナス科植物の青枯病抵抗性遺伝子は、有史以来多くの研究者が特定を目指してきたが、今日まで単離・同定されていなかった。従って本研究は、ナス科植物の青枯病抵抗性遺伝子を単離・同定した世界で初めての成功例といえる。今後は、本抵抗性遺伝子が病害防除上有用かどうかを検証するとともに、本抵抗性遺伝子を活用した防除方法を構築する予定である。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人ウエスコ学術振興財団の支援を賜った。ここに記して感謝の意を表する。

5. 参考文献

1) Hayward (1991) Annu Rev Phytopathol. 29:65-87.
2) Mukaihara *et al.*(2010) Mol Plant Microbe Interact. 23(3):251-262.
3) Cui *et al.*(2015) Annu Rev Plant Biol. 66:487-511.
4) Poueymiro *et al.*(2009) Mol Plant Microbe Interact. 22(5):538-550.
5) Nahar *et al.*(2014) Mol Plant Pathol. 15(3):297-303.
6) Nakano *et al.* (2015) J Plant Physiol. 184:15-19.

栽培化により失われたトマトの短日性を支配する鍵遺伝子の解明

岡山県農林水産総合センター　生物科学研究所

後藤　弘爾

（概要）植物は、光や温度などの環境要因および、植物ホルモン、栄養状態、成長年数などの生理的要因が刺激となって、茎頂から花芽を発生させる(このことを花成と呼ぶ)。日長は季節により正確に変化するので、植物は日長の変化に鋭敏に反応し、花成を誘導する(日長応答的花成)。植物は日長応答の様式により、明期が長いと花成が起きる長日植物と暗期が長いと花成が起きる短日植物とに分類されるが、日長感受性を示さない中性植物も存在する。花成ホルモンとも呼ばれるフロリゲンは、日長に応答して葉で生産され、長距離シグナル伝達によって、茎頂から発生する器官を葉から花に転換させるホルモン様の物質として定義された。近年の研究により、フロリゲンの分子実体は、*FT*遺伝子がコードするタンパク質であることが明らかとなった。

トマトは典型的な中性直物とされているが、トマトの近縁野生種の多くが短日植物であることから、人類が栽培化の過程で中性化した変異体を品種として固定した可能性が高い。本研究では、トマトが栽培化の過程で失った日長応答的花成の鍵となる遺伝子の特定を目指している。また、日長応答的花成を農業形質として利用し、人為的に花成制御可能なトマトを育種するための遺伝学的基盤も構築する。

1．はじめに

現在農作物として栽培されている植物の多くは、栽培化の過程で野生種(原種)の中から四季咲き性、多収性、早生性などの農業上の有用形質を持つものを人為的に選抜し、遺伝的に固定したもの(栽培品種)である。

トマトも例外ではなく、南米アンデス地方に起源を持ち、中南米で栽培されていた祖先種が 16 世紀にヨーロッパにもたらされ、18 世紀に一般的な食用作物となるまでの約 200 年に渡る品種改良がなされた。その後も、栽培上および食用上有用な形質に関して人為的な選抜が行われた結果、現在みられる様な、四季咲き性で大きな赤い果実をつけるトマト品種になったと考えられている。日長感受性を示す(短日性や長日性)原種から、栽培化の過程で日長非感受性になった変異体が選択され、現在は中性植物(四季咲き性)であるとされている栽培植物は少なくない。

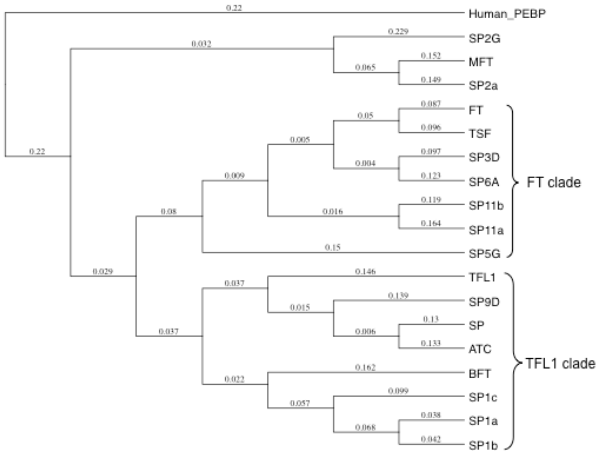
植物の日長応答的花成に関する研究は、国内外で 100 年以上に渡って続けられてきた。近年、モデル植物のシロイヌナズナを用いた研究により、花成経路の遺伝学的枠組みと花成ホルモン(フロリゲン)の分子的実体が FT というタンパク質であることが解明された。また、*FT*遺伝子は被子植物に広く保存されていることも明らかになった。フロリゲンは、元々日長応答的花成を制御する長距離シグナル伝達物質として定義されたものであるが、*FT*遺伝子のホモログは中性植物にも保存されている。このことからフロリゲンは、一般的な花成応答に関与していると考えられるようになった。また、*FT*遺伝子は、日長応答的花成経路だけではなく、温度および植物ホルモンなどの生理的要因による花成経路の遺伝子群の働きにより発現制御されている。従って、*FT*遺伝子の機能と発現とを解析することは、その植物の花成制御を理解する上での第一歩となる。

2．結果と考察

2-1. トマトゲノム上に存在する *FT* 遺伝子群

トマトの全ゲノム解読[1]により、トマトのゲノム上には、14 個の *FT* ホモログ遺伝子が存在することが予想された。これらの中から発現している遺伝子を全てクローニングすることにした。フロリゲン遺伝子 *FT* は、主として葉で発現していることから、トマトの成熟葉を材料とし、そこから調整した cDNA を鋳型に、ゲノム情報に基づいてプライマーを設計し、PCR 法による遺伝子増幅を行った。

その結果、12 個の *FT* ホモログ遺伝子のクローニングに成功した。残りの 2 個の遺伝子については、発現遺伝子では無いか、遺伝子アノテーションに誤



【図 1】トマト *FT* ホモログ遺伝子の分子系統樹。各遺伝子のコード領域から予測されるアミノ酸配列を近隣結合法(Neighbor-Joining 法)により分子系統樹を作製した。SP__はトマトの遺伝子で、MFT、FT、TSF、BFT、ATC と TFL1 はシロイヌナズナの遺伝子である。Human_PEBP は root を計算するためのヒトのホモログ遺伝子。

りがある可能性が示唆された。クローニングに成功した 12 個の *FT* ホモログ遺伝子について、塩基配列を決定し、コードするアミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作製した(図 1)。FT clade は、フロリゲン FT に近いアミノ酸配列を持つタンパク質群である。また、TFL1 は、シロイヌナズナでの研究の結果、花成を抑制する機能を持ち [2]、アンチフロリゲンと呼ぶことのできるタンパク質である。従って、TFL1 clade のタンパク質は、その配列が FT と相同性を持っているのにもかかわらず、花成に対しては抑制的に作用すると考えられている。

2-2. トマト近縁野生種の日長応答性

現存するトマトの栽培品種は、全て日長感受性を示さない中性植物である。実際に日本で栽培されている品種とヨーロッパ系と呼ばれる品種の内、いくつかについて調べたところ、全て中性植物であった。そこで、中南米の自生地から採取されたトマト近縁野生種の日長応答性を調べた。トマト遺伝資源ストックセンター(Tomato Genetics Resource Center、U. C. Davis)が所有しているトマト近縁野生種について、日長応答性を調べた結果を表 1 に示す。この様に過半数の種が短日性を示す結果となった。

S. galapagense	短日性
S. pennellii	短日性
S. pimpinellifolium	中性
S. cheesmaniae	短日性
S. lycopersicum var. cerasiforme	短日性
S. peruvianum	中性
S. corneliomulleri	中性
S. neorickii	短日性
S. chilense	中性
S. huaylasense	短日性
S. arcanum	中性
S. chmielewskii	中性
S. chilense	中性
S. chmielewskii	短日性
S. habrochaites	短日性

【表 1】トマト近縁野生種の日長応答性

2-3. トマト *FT* ホモログの遺伝子構造

トマト栽培品種からクローニンした *FT* ホモログの遺伝子と、表 1 のトマト近縁野生種からクローニングした *FT* ホモログの遺伝子との塩基配列とを比較した結果、多くの一塩基多型(SNP)が観察された。それらの中にはアミノ酸配列に影響を及ぼすものも存在した。

アミノ酸置換に伴う遺伝子機能への影響は、今後の機能解析によって明らかにしていきたいと考えている。さらに、本解析による重要な知見として、FT clade に属する 2 つの遺伝子において、栽培品種から得られた遺伝子に、ナンセンス突然変異とフレームシフト突然変異が見つかった。対応する近縁野生種の遺伝子は完全長のタンパク質をコードしており、これらの突然変異により、栽培品種では遺伝子機能が失われている可能性が極めて高いと考えられる。

2-4. トマト *FT* ホモログ遺伝子の組織特異的発現

これまでの研究から、フロリゲン遺伝子は葉で発

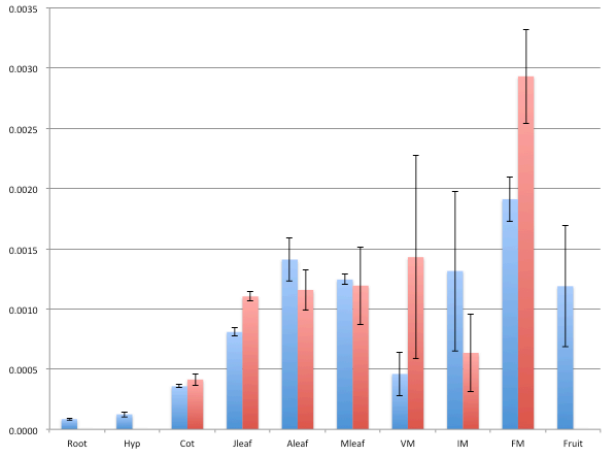
現することが知られている。一方、*FT* ホモログ遺伝子群の中でもアンチフロリゲンとして働く *TFL1* 遺伝子は、シロイヌナズナでは茎頂で発現することが知られている。トマト *FT* ホモログ遺伝子には、FT clade と TFL1 clade の両方の遺伝子群が存在している。そこで、本研究によってクローニングした 12 遺伝子について、栽培トマトにおける組織特異的発現を調べた(図 2)。図に示した遺伝子は、葉と茎頂の両方で発現がみられた。残りの遺伝子の内、4 個の遺伝子については主として葉で発現が観察され、3 遺伝子については主に茎頂で発現がみられた。最後の 3 遺伝子については、発現量がどの組織においても低く、かつ組織特異的な発現は観察されなかった。また、長日条件と短日条件とで遺伝子発現の違いを調べたところ、長日条件特異的な発現を示した遺伝子が 1 個、短日条件特異的な発現を示した遺伝子が 3 個あり、残りは日長条件特異性を示さなかった。

以上の発現パターンから、トマト *FT* ホモログ遺伝子の中に、日長に応答して葉で発現するという、典型的なフロリゲン遺伝子と同じ発現パターンを示すものが見つかった。一方、図 2 に示したように、葉と茎頂の両方で発現しているという、これまでの考え方では説明できない発現パターンを示す遺伝子も存在することが明らかとなった。

トマト *FT* ホモログ遺伝子は、12 個存在しており、被子植物の中では、比較的遺伝子メンバーの数が多い。従って、遺伝子メンバーの中にはフロリゲンの機能から機能分化したものや他の機能を持つようにリクルートされたものが存在する可能性が考えられる。今後行う予定の機能解析と合わせ、それらの遺伝子の働きを解明していきたい。

3. まとめと展望

本年度の研究によって、トマトの持つ *FT* ホモログ遺伝子を全てクローニングすることに成功した。これらの遺伝子構造解析により、２つの遺伝子においてトマト栽培種で機能欠失をもたらすような変異が生じていることが明らかとなった。これらに対応する遺伝子は、トマト近縁野生種では変異が起きておらず、これらの遺伝子変異がトマトの日長応答的花成の性質の変化に関与している可能性が示唆された。



【図 2】トマト *FT* ホモログ遺伝子の組織特異的発現。蓄積している RNA 量を定量的逆転写リアルタイム PCR 法により測定した。縦軸はハウスキーピング遺伝子に対する相対的な発現量。青は長日条件、赤は短日条件での値。Root:根、Hyp:下胚軸、Cot:子葉、Jleaf:幼若葉、Aleaf:成熟葉、Mleaf:第一花房後の葉、VM:栄養茎頂メリステム、IM:花序茎頂メリステム、FM:花メリステム、Fruit:果実。

次年度の研究においては、クローニングしたトマト *FT* ホモログ遺伝子の機能解析を進める計画である。これにより、栽培化の過程で失われた遺伝子機能を明らかにし、それがどの様なメカニズムでトマトの日長応答的花成の変化に関与しているのかについて解明して行きたいと考えている。

謝辞

本研究を実施するにあたりご支援を戴きました公益(財)ウエスコ学術振興財団に感謝致します。

引用文献

1 The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**, 635-641, (2012).

2 Hanano, S. & Goto, K. Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell* **23**, 3172-3184, (2011).

新たに見出されたモモ不稔現象の詳細解析

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（*Prunus persica*（L.）Batsch）の中には花粉形成能力を失った雄性不稔品種が存在する。このような品種は人工授粉が必要となるため、モモの新品種育成に際しては、不稔形質を排除することが育種目標の一つになっている。DNA マーカーは不良個体を定植前に排除できるため、栽培に手間のかかるモモ育種では稔性を識別する DNA マーカーの開発に期待が寄せられている。このため、日本の栽培品種に広まっている不稔遺伝子を同定し、簡便に稔性を識別できる DNA マーカーを開発した。しかし、このマーカーでは検出できない不稔交配樹が存在することが明らかとなり、本研究では、このような新しいタイプの不稔現象について解析を行った。その結果、新しいタイプの不稔品種が少なくとも中国品種には複数存在することが確認され、ごく一部の個体のみが有する特別の形質ではないことが明らかになった。さらに、不稔個体の花粉発達を観察したところ、これまでに見出した不稔変異以外に、モモには少なくとも 2 つの遺伝変異が存在すると推察された。

１．はじめに

日本の栽培モモの中には、‘白桃’・‘大和白桃’・‘川中島白桃’・‘浅間白桃’・‘おかやま夢白桃’等のように単独で受精できない不稔品種が存在する。不稔品種を確実に着果させるため、農業現場では可稔品種から花粉を採取し、満開時に人工授粉を行っている。栽培の手間を減らすため、モモの新品種育成に際しては、花粉稔性を持つ品種を開発することが求められる。モモの不稔現象は、詳細な観察研究が古くに行われたが、不稔の原因遺伝子やそのメカニズムは長らく不明であった。そこで、昨年度、（公財）ウエスコ学術振興財団の支援の下、モモの不稔形質の分子遺伝学的解析を行い、輸送タンパク質をコードする遺伝子の 1 塩基変異が花粉の形成不全を引き起こすことを明らかにした。さらに、この 1 塩基多型（SNP）を簡便かつ安価に検出するマーカーを開発し、稔性の有無を開花する前に予測することを可能にした。この手法は、岡山県農林水産総合センター農業研究所におけるモモ育種に利用され、育種の効率化に貢献している。

作成したマーカーは日本の栽培品種の稔性形質を正確に識別できた。しかしながら、同農業研究所において過去に作られた交配樹の中には、可稔とのマーカーの判定に関わらず、不稔の形質示すと記録された交配樹が、少数ながら見つかった（表 1）。これらの交配樹は、数百通りの交配組み合わせのうち、

表 1. 県農業研究所が作成した過去の交配樹に見出された新しいタイプの不稔個体

組合せ番号	種子親	花粉親	系統番号	マーカー	予測形質	観察結果
#10-14	岡山モモ 2 号	福州	#10-14-06	T/C	可稔	不稔
			#10-14-15	T/C	可稔	不稔
#11-5	岡山 PEH8 号	（自然交雑）	#11-5-03	T/C	可稔	不稔
			#11-5-08	T/C	可稔	不稔
			#11-5-15	T/T	可稔	不稔
			#11-5-16	T/C	可稔	不稔
			#11-5-22	T/C	可稔	不稔

マーカーの T/T は正常型の輸送タンパク質遺伝子をホモに持つことを表し、T/C は正常型と変異型の両方の遺伝子を持つことを表す。いずれも花粉が正常に発達できると予測される。

表 2. 県ジーンバンクの不稔品種の稔性マーカー解析結果

品種	稔性形質	マーカー	予想形質	品種	稔性形質	マーカー	予想形質
森上白桃	不稔	C/C	不稔	美晴白桃	不稔	C/C	不稔
中津白桃	不稔	C/C	不稔	紅錦香	不稔	C/C	不稔
池田中生	不稔	C/C	不稔	陳圃蟠桃	不稔	C/C	不稔
あきぞら	不稔	C/C	不稔	未央 2 号	不稔	C/C	不稔
明鳳	不稔	C/C	不稔	早花露	不稔	C/C	不稔
神玉	不稔	C/C	不稔	芝罘	不稔	C/C	不稔
かなめ	不稔	C/C	不稔	深州白雪	不稔	T/T	可稔
夢しずく	不稔	C/C	不稔	円桃	不稔	T/T	可稔
西王母	不稔	C/C	不稔	温州水蜜	不稔	T/T	可稔
一宮水蜜	不稔	C/C	不稔				

マーカーの C/C は変異型の輸送タンパク質遺伝子をホモに持つことを表す。この場合、花粉が正常に発達できないと予測される。

わずか 2 通りの交配組み合わせ（岡山モモ 2 号 x ‘福州’、および‘岡山 PEH8 号’の自然交雑）に由来していた。これらの交配樹の多くはすでに伐採されていたが、唯一残っていた樹（#11-5-16）を改めて調べたところ、マーカー判定とは異なり、確かに花粉を失っていた。これまでと異なる新しいタイプの不稔交配樹の存在は、輸送タンパク質遺伝子以外に不稔を引き起こす遺伝子が存在することを示唆している。存在が示唆された新しい不稔遺伝子は育種親である岡山モモ 2 号（‘砂子早生’の自然交配で作られた中間母本）、‘福州’、‘岡山 PEH8 号’に由来するのではないかと推察される。県農業研究所での育種では、これらの品種・系統を育種母本として広く利用している。このため、現在および将来に作られる交配樹には、輸送タンパク質遺伝子のマーカーでは可稔と予測されたにもかかわらず、実際には不稔の形質を示す個体がしばしば生まれてくる恐れがある。そこで、本研究では、輸送タンパク質遺伝子マーカーでは判別できない、この新たな不稔現象について、詳細な解析を試みた。

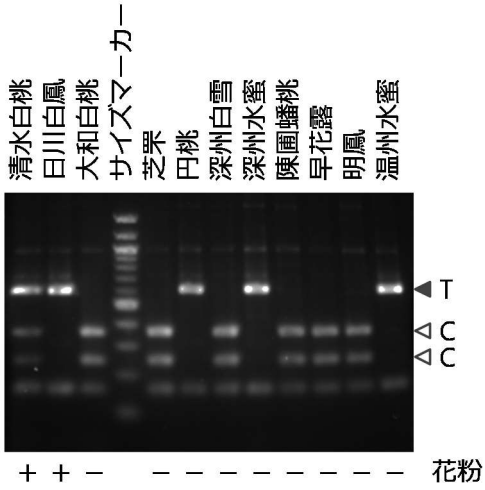


図 1. 県ジーンバンクの不稔品種の稔性マーカーによる判定

T 印のバンドが検出される場合、正常型の輸送タンパク質遺伝子を有すると考えられ、C 印の 2 本のバンドが検出される場合、変異型の輸送タンパク質遺伝子を有すると判断される。

2．研究内容

① 新しい不稔形質を示す品種・交配樹の探索

交配樹#11-5-16 に見いだされた、‘白桃’等とは異なる不稔が、#11-5-16 に特異的現象であるのか、他の品種にも広く見られる現象なのかを明らかにするため、県農業研究所が保有するジーンバンクで栽培されている多様な品種の中で花粉ができない 19 品種に着目し、昨年度作成した稔性識別マーカーによる判定を行った。その結果を表 2 に示す。19 品種中 16 品種はマーカーが C 型（輸送タンパク質遺伝子が変異型）ホモであり、‘白桃’等と同様に輸送タン

表 3. 県 2015 年交配樹に見出された新しいタイプの不稔個体

組合せ番号	種子親	花粉親	系統番号	マーカー	予測形質	観察結果
#15-2	#10-14-4	(自殖)	#15-2-28	T/T	可稔	不稔
			#15-2-36	T/C	可稔	不稔
#15-7	#10-14-10	(自殖)	#15-7-52	T/T	可稔	不稔
			#15-7-57	T/T	可稔	不稔
			#15-7-66	T/T	可稔	不稔
			#15-7-70	T/C	可稔	不稔
			#15-7-85	T/C	可稔	不稔

パク質の機能欠損が原因で花粉が形成できないのであろうと考えられた。しかし、残りの 3 品種(‘円桃’、‘深州水蜜’、‘温州水蜜’)については、マーカーが T 型(輸送タンパク質遺伝子が正常型)ホモであった(図 1)。これら 3 品種はいずれも中国の品種であるが、#11-5-16 同様、輸送タンパク質遺伝子の変異とは異なる別の原因により花粉形成能を欠失していると推察された。以上のように、交配樹#11-5-16 で観察された不稔現象は#11-5-16 に特異的ではなく、中国品種の中に広く認められることが明らかとなった。

県農業研究所が 2015 年に行った交配では、新しタイプの不稔個体とされた#10-14-8 および#10-14-15 の兄弟個体(#10-14-4、#10-14-10)を育種親とした交配を行っていた。これらの交配樹が 2018 年に初開花することから、花粉の観察を行い、稔性マーカーによる判定と一致するかを調査した。その結果、稔性マーカーでは可稔と判定されたにも関わらず、不稔形質を示す個体が 7 個体見いだされた(表 3)。これらは、#15-2(#10-14-4 の自殖由来)および#15-7(#10-14-10 の自殖由来)の 2 通りの交配組み合わせに由来していた。以上のように、岡山モモ 2 号と‘福州’の子である#10-14-8 と#10-14-15 はマーカー判定では可稔とされたにも関わらず不稔であったが、孫世代に当たる#15-2-28、#15-2-36、#15-7-52、#15-7-57、#15-7-66、#15-7-70、#15-7-85 も同様の性質を有することが明らかになった。一方、同じ 2015 年に作られた、他の 34 通りの交配組み合わせ由来の交配樹にそのような性質を持つ個体は見当たらなかった。このことから、新しい不稔形質は遺伝的に支配されたものであると考えられる。

② 不稔個体の花粉観察

‘上海水蜜桃’の子どもである‘白桃’は不稔品種である。花粉の発達は、減数分裂による四分子形成やその後の小胞子形成までは正常であるものの、続く液胞期には異常を示し、やがて花粉が消失してしまうことが知られている(石田ら、1974)。交配樹

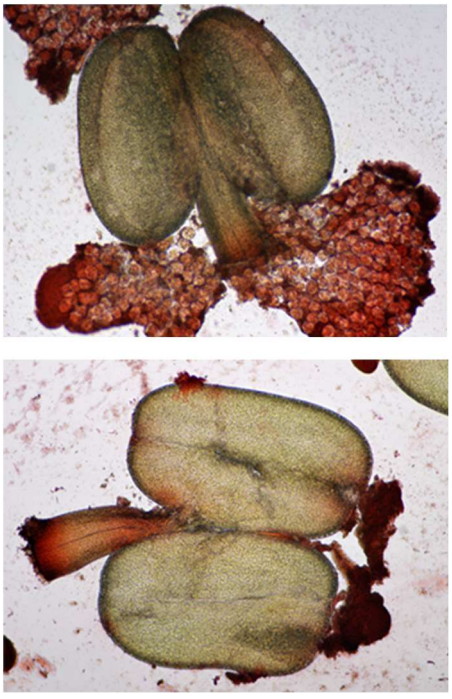


図 2. 四分子期頃の花粉の様子
可稔品種の‘白鳳’(上)、不稔の交配樹#11-5-16(下)。‘白鳳’の花粉は四分子期を迎えている。同じ頃には、#11-5-16 は葯から花粉が消失した。

#11-5-16 等に見いだされた新しい不稔現象が‘上海水蜜桃’や‘白桃’と異なる原因で生じる場合、花粉に生じる異常が‘白桃’で観察される異常と異なる可能性がある。そこで、#11-5-16 等の花粉の発達の様子を光学顕微鏡で観察した。鉢植えされた #11-5-16 複製樹の花芽を 1 月末頃から 2 月末頃まで連続的に採取した。スライドガラス上で葯から花粉を押し出し、酢酸カーミンで染色後、光学顕微鏡で観察した。この手法では初期の頃の花粉の様子は観察しにくかったが、2 月上旬には可稔品種の‘白鳳’の花粉は四分子期にまで達した。これに対し、#11-5-16 の花粉を観察すると、四分子期に達することなく消失することが明らかとなった（図 2）。このことから、#11-5-16 は四分子期に入る以前の段階である減数分裂期頃に発達異常が起こるのであろうと推察された。これは、‘白桃’に見られる花粉の発達異常とは明らかに異なっており、#11-5-16 は‘白桃’とは異なる原因により不稔形質を示すものと考えられる。今後は、#11-5-16 の葯の切片を作成し、花粉の発達に変異が生じる時期を明確にしたいと考えている。

中国品種‘円桃’、‘深州水蜜’、‘温州水蜜’も新しいタイプの不稔品種であるが、これらの花粉も稔性品種の花粉が四分子期を迎える頃にはすでに消失しており、#11-5-16 と類似の花粉異常を示すのではないかと考えられた。

一方、2015 年交配樹に新たに見出された不稔個体のうち#15-7-52 の花粉を観察したところ、興味深いことに、#15-7-52 の花粉は四分子期に続く小胞子期の花粉が観察され、#11-5-16 とは明らかに異なる変異形質を示した（図 3）。このことから、#15-7-52 の不稔は#11-5-16 と異なり原因遺伝子により引き起こされると考えられ、モモには不稔を引き起こす変異が少なくとも 3 種類ある可能性がある。

#15-7-52 の花粉消失時期は、‘白桃’の時期と類似していた。#15-7-52 の不稔の原因は、‘白桃’の不稔の原因である輸送タンパク質遺伝子と同時期に働く別の遺伝子の変異か、輸送タンパク質遺伝子の別アリルの変異が原因であろうと思われる。

今後、#11-5-18 および#15-7-52 の花粉異常を引き起こす遺伝子変異を同定し、稔性の予測をこれまで以上に正確に実施できるようにしたいと考えている。

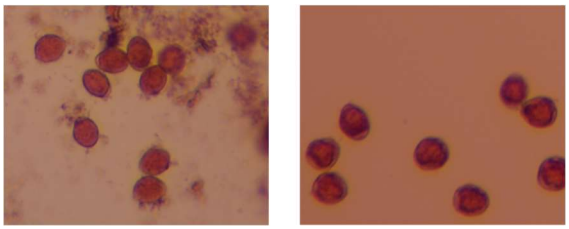


図 3. 小胞子期頃の花粉の様子
可稔品種の‘白鳳’（左）、不稔の交配樹 #15-7-52（右）。いずれの品種も小胞子期までは花粉が正常に発達した。#15-7-52 はそれ以降、花粉は発達せずに消失した。

３．謝辞

本研究は、（公財）ウエスコ学術振興財団の支援の下に行われました。研究に用いたモモは、岡山県農林水産総合センター農業研究所果樹研究室より分与いただきました。厚くお礼申し上げます。

４．参考文献

石田ら（1974）京都府大學術報告 21-26

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

我々は，睡眠ホルモンであるメラトニンを作り出す酵素 serotonin-*N*-acetyltransferase (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．そこで，今回我々は，発酵乳ホエーのグルタチオン上昇作用を明らかにするため, アセトアミノフェン肝障害への影響について検討した. その結果，アセトアモノフェン肝障害の原因となる肝臓中のグルタチオンの減少が抑制され，肝障害の抑制効果がみられた．これらの結果により，in vivo においても発酵乳ホエー成分により細胞内グルタチオンレベルが上昇することが明らかとなった.

1.　はじめに

発酵乳ホエーとその生理機能について

発酵乳とは, 乳酸菌により乳を発酵させた物, 例えばヨーグルトやチーズなどの総称であり，その上清部分を乳清または，ホエーと呼ぶ．19 世紀末，微生物学者 Metchnikoff が，発酵乳を伝統食とする特定の地域に高齢者が多いことに着目し，発酵乳の寿命延長効果を紹介して以来，発酵乳の生理機能に関する研究は数多くなされてきた [1)]．これまでに生理機能への有効性が確認されている乳酸菌の代表的なものでは，*Lactobacillus casei*，*Bifidobacterium*，*Lactobacillus helveticus* などが知られており，整腸作用・抗アレルギー作用・抗腫瘍効果などが明らかとなっている [2) 3)].

発酵乳の生理機能への効果は作用機構の観点から大きく 2 つに分けられる．1 つ目は微生物自身による効果で，プロバイオティクスと呼ばれる微生物の腸内増殖によってもたらされる効果と菌体成分が直接あるいは腸内菌叢を介して作用する機構で，２つ目は微生物の働きにより生成された生理活性物質による作用機構であり，これはバイオジェニックスという名前が提唱されている [4) 5)]．バイオジェニックスは「腸内フローラを介することなく，直接，血圧降下作用, 免疫抑制作用, コレステロール低下作用, 整腸作用, 抗腫瘍作用などの生体調節・疾病予防・老化制御などに働く食品成分」のことを指し, 広義には, 生理活性ペプチド, 植物性ポリフェノール, カロチノイド, DHA, ビタミンなどもこれに該当する [2) 6)]. 今回用いた *L. helveticus* CM4 発酵乳（以下発酵乳ホエーとする）より見出されたバイオジェニックス効果として，Ile-Pro-Pro (IPP) や Val-Pro-Pro (VPP) などのラクトトリペプチドによる血圧降下作用が明らかとなっている [7) 8)]．また，我々のグループでは，発酵乳ホエーの生理機能として，serotonin-*N*-acetyltransferase (NAT) の活性化による松果体内メラトニン合成量の増加作用を明らかにしている [9)].

メラトニンは時間情報ホルモンとして睡眠・覚醒・代謝など様々な活動の概日リズムを制御しており，NAT はメラトニン合成の律速酵素として働いている. 我々は，以前，NAT の活性制御機構として，グルタ

チオンを介したNATの構造自体の変化，つまり，還元型（活性型）及び酸化型（不活性型）の２つの形をとることで活性が調節されていることを明らかにした[10]．そして，発酵乳ホエー投与によるNAT活性化は，このレドックス制御によるものだということを見出した[9]．

グルタチオンとは，グルタミン酸，システイン，グリシンから構成されるトリペプチドで，細胞内のチオール環境の維持やグルタチオン抱合による有害物質の代謝排泄に重要な物質である[11]．グルタチオンは，γ-glutamylcysteine synthetase（γ-GCS）と，glutathione synthetase の二つによって段階的に合成される[12) 13)]．このうちγ-GCSはグルタチオン合成の律速酵素であることが知られている[14]．グルタチオンは還元型GSH (glutathione, reduced form)と酸化型 GSSG (glutathione, oxidized form)が存在しており，酸化型は二分子の還元型GSHがジスルフィド結合によってつながった分子である．細胞内のグルタチオンは，通常，90%以上が還元型であり，この状態はグルタチオン還元酵素によって維持されている．グルタチオンは細胞内で発生した活性酸素種や過酸化物と反応して還元し，消去することで，細胞内のチオール環境を維持している[15]．発酵乳ホエーはグルタチオンを介して生体内抗酸化作用を向上させ，メラトニン合成の上昇の他にも様々な生理機能へ影響すると推測できる．

アセトアミノフェン肝障害について

アセトアミノフェン（APAP）は，非ピリン系の解熱鎮痛剤であり，消化器障害や腎障害などの毒性が低いため広く利用されている．しかし，APAPの過量投与，または，アルコールやCYP誘導薬物との相互作用によって肝障害が引き起こされ，劇症肝炎の原因となることも報告されている[16]．通常，APAPは80%以上がグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受け排泄される．その他はcytochrome P-450によって代謝され，活性代謝産物である *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) が生産される[17]．NAPQIはグルタチオン抱合を受け，メルカプツール酸やシステイン抱合体となり排泄されるが，過剰生産により肝臓中グルタチオンが枯渇すると，親電子性化合物であるNAPQIにより，蛋白質のチオール基の修飾が起きる[18]．つまり，グルタチオン枯渇によって代謝経路が滞り，処理しきれないラジカル体によって，細胞膜及び蛋白質等が攻撃され，肝障害が引き起こされる（参考図 1）．このことは，グルタチオンの前駆体である *N*-acetylcysteine (NAC) の投与によって肝障害が抑制されることからも明らかであり[19]，APAP肝障害の治療薬として添付文書に記載されている．さらに，グルタチオン合成の律速酵素であるγ-GCSをノックダウンさせたラットにおいて，APAP肝障害が比較的低用量でも引き起こされるという報告がある[20]．

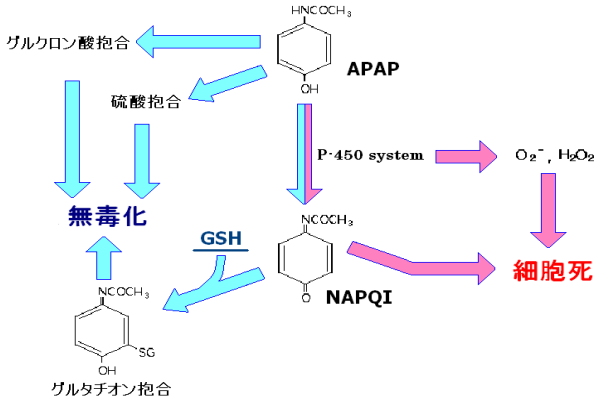


図１　アセトアミノフェンの代謝経路

本研究の目的

我々は，以前，発酵乳ホエー投与によるNAT活性上昇作用に関する研究において，その活性制御にグルタチオンを介したレドックス制御が関与していることを見出した．発酵乳ホエー投与によってグルタチオン量が増加し，生体内の抗酸化作用の向上によってメラトニン合成が促進されたと考えられる．同様に発酵乳ホエー投与により肝臓内グルタチオン量の増加が導かれれば，APAPによる肝障害が抑制さ

れると予想される. そこで, 肝障害の指標として血清中 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 及び glutamic pyruvic transaminase (GPT) を測定し, マウスへの発酵乳ホエー投与による APAP 急性肝障害への抑制効果について検討した. 同時に, 乳を発酵させずに遠心分離により上清に分けたものを未発酵乳ホエーとして比較実験を行った.

2. 方法

動物飼育条件

ICR 系マウス (雄) 3 週齢を用い, a.m. 8:00 – p.m. 8:00 明期, その後暗期のサイクルで, 発酵乳ホエー群, 未発酵乳ホエー群及び対照群を飼育した. 発酵乳ホエー群には 10%発酵乳ホエー水溶液, 未発酵乳ホエー群には 10%未発酵乳ホエー水溶液, 及び対照群には水を自由摂取させた. また, 飼料として, オリエンタルＭＦ飼料を自由摂取させた. 約一ヶ月飼育した後, 絶食させ, 40℃に加温した APAP 水溶液 (700 mg/kg) を腹腔内投与し, 2 及び 4 時間後に血液, 肝臓を採取した.

肝機能測定

2 及び 4 時間後の血清中 GOT 及び GPT 活性を測定し肝障害の程度を測定した. 血清中 GOT 及び GPT 活性の測定は, トランスアミナーゼ CII テストワコー (和光純薬工業) を用いて行った.

肝臓中グルタチオンの測定

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 方を用いてグルタチオン量を測定した.

蛋白質の定量

BSA を標準とし, Bio-Rad protein assay (Bradford 法) を用いて測定した.

3. 結果

肝障害指標 GOT 及び GPT の変動

対照群に APAP を投与した場合, 血清中 GOT は APAP を投与しない群と比較して, 2 時間後に約 3 倍, 4 時間後に約 4 倍となった (図 2 A, B). また, 血清中 GPT においては 2 時間後に約 11 倍, 4 時間後に約 22 倍と上昇し (図 2 C, D), APAP 投与により肝障害が起こっていることが確認された. この実験条件下において, 発酵乳ホエー群では, 2 時間後,

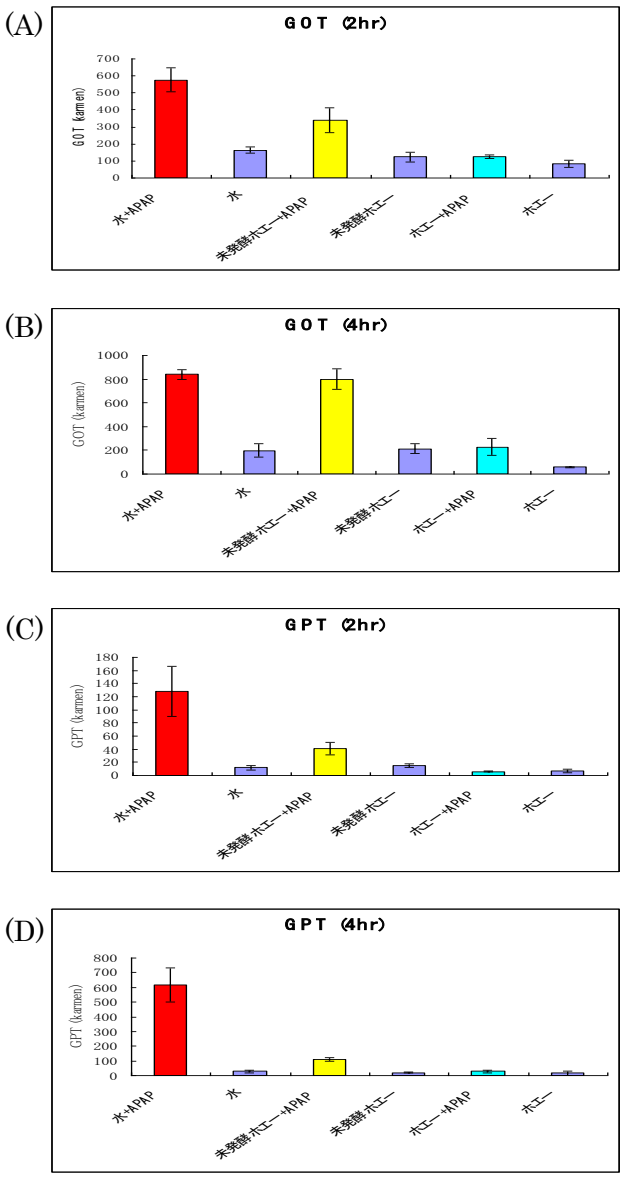


図 2　2 時間及び 4 時間後の血清中 GOT･GTP 活性
(A)　APAP 投与 2 時間後の GOT 活性
(B)　APAP 投与 4 時間後の GOT 活性
(C)　APAP 投与 2 時間後の GPT 活性
(D)　APAP 投与 4 時間後の GPT 活性

4 時間後ともに血清中 GOT の APAP 投与による上昇がほぼコントロール値まで抑えられた（図 2 A, B). 未発酵乳ホエー群においても，発酵乳ホエーほどではないが，抑制が見られた．また，血清中 GPT については，2 時間後及び 4 時間後に，発酵乳ホエー群，未発酵乳ホエー群ともに有意な抑制が見られた（図 2 C，D).

これらの結果より，APAP 投与によって引き起こされる肝障害が発酵乳ホエー投与により抑制されることが明らかになった.

肝臓中グルタチオン量の変動

発酵乳ホエーの APAP 肝障害抑制作用は，発酵乳ホエー投与によるグルタチオンを介する抗酸化力向上によるものだと考え，肝臓中の還元型グルタチオン（GSH）及び酸化型グルタチオン（GSSG）量を測定した.

対照群に APAP を投与した場合，肝臓中 GSH は APAP を投与しない群と比較して，2 時間後，4 時間後に約 5%まで減少した（図 3 A，C，図 4). GSSG においては，2 時間後に約 20%，4 時間後に約 30%まで減少し（図 3 B，D)，APAP 投与により肝臓中グルタチオンの著しい減少が起こっていることが確認された．しかし，発酵乳ホエー群では，APAP 投与 4 時間後の GSH の減少がコントロールに対して約 75%まで維持されていた．また，GSSG についてもほぼコントロールの値まで抑えられていた．このような結果は未発酵乳ホエーについては見られなかった.

これらのことから，発酵乳ホエー投与によって APAP 投与によるグルタチオン量の減少後の回復が早まることが明らかになった. また，発酵乳ホエーのグルタチオン合成系への影響が示唆された.

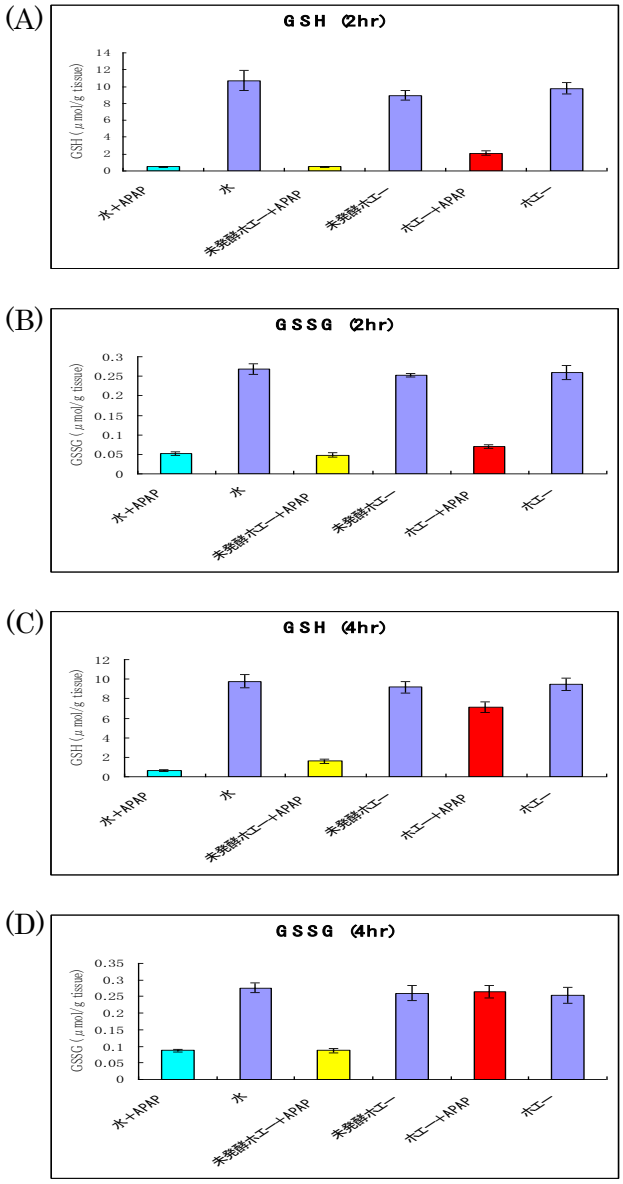


図 2　発酵乳ホエー投与による肝臓中グルタチオン量の変動
(A)　APAP 投与 2 時間後の肝臓中 GSH 量
(B)　APAP 投与 4 時間後の肝臓中 GSH 量
(C)　APAP 投与 2 時間後の肝臓中 GSSG 量
(D)　APAP 投与 4 時間後の肝臓中 GSSG 量

4.　考察

グルタチオンは自身を還元させることで細胞内のチオール環境を維持する重要な役割を持つ [11]．グルタチオンはグルタミン酸・システイン・グリシンから構成されており，γ-GCS（律速酵素）と glutathione

synthetase の二つによって合成される[12) 13)].

以前我々は，発酵乳ホエー投与によるメラトニン量とその合成酵素 NAT 活性上昇に関する研究において，その活性制御機構がグルタチオンを介したレドックス制御によるものであることを見出し，発酵乳ホエー投与による生体内グルタチオン量の増加，つまり，生体内抗酸化作用の向上効果を明らかにしている[9) 10)]．この研究を進めてきた中で著者は発酵乳ホエー投与による生体内グルタチオン量の増加に着目し，発酵乳ホエーのグルタチオン枯渇を起因とする APAP 肝障害に対する抑制効果について検討を行った．

APAP は過量投与されると，代謝経路中のグルタチオンが枯渇し，処理しきれないラジカル体によって肝障害が引き起こされる[17) 18)]．つまり，APAP による肝障害に対してはグルタチオン量の維持が重要であるといえる．このことは，APAP 肝障害において，グルタチオンの前駆体である NAC の投与によって障害が抑制されることからも明らかである[19)]．さらに，グルタチオン合成酵素の阻害薬である L-buthionine (S,R)-sulfoximine (BSO) の投与によって生体内グルタチオン量が減少し，APAP 肝障害が比較的低用量でも引き起こされるという報告もある[22)]．

本研究では，*in vivo* において発酵乳ホエーの APAP 肝障害への抑制効果を明らかにした．この抑制効果は，以前我々が研究していた発酵乳ホエー投与による生体内グルタチオンへの影響によるものだと推測できる．そこで，APAP 肝障害時のグルタチオン変動について検討をしたところ，APAP 肝障害時のグルタチオン減少は発酵乳ホエー投与によって有意に抑えられ，グルタチオン減少の早い回復が見られた．一方，未発酵乳ホエーにおいてこれらの抑制効果はあまり見られなかったことから，生理活性ペプチドやアミノ酸など，発酵によって生じた物質がグルタチオン量維持機構に関与していると考えられる．

APAP は標準的な服用法では非常に安全な薬物であるが，その広い薬効のため服用量が過剰となる事が少なくない．本実験で明らかとなった発酵乳ホエー投与による APAP 肝障害への抑制効果から，抑制機構の詳細な解明さらに発酵乳ホエー中の有効成分の探索を進めることで，肝障害予防・改善法への新たな道が開けると考えている．

5. 引用文献

1) Metchnikoff, E. (1908) The prolongation of life. C. P. Putnam's Sons, New York.
2) 光岡知足（1976）乳酸菌の分類と発酵乳の効用の諸問題，*J. Dairy Sci.* **25**, A170-176
3) 原宏佳（1993）ビフィズス. **6**, 169
4) Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* **66**, 365-378
5) Mituoka, T. (2000) Significance of dietary modification of intestinal flora and intestinal environment. *Bioscience Microflra* **19**, 15-25
6) 光岡知足（1998）機能性食品－プロバイオティクス，プレバイオティクス，バイオジェニックス，腸内フローラとプロバイオティクス，光岡知足編，学会出版センター，1-13
7) Nakamura, Y., *et al.* (1995) Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy. Sci.* **78**, 777-783
8) Nakamura, Y., *et al.* (1996) Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding Sour Milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 488-489
9) 平成 18 年度 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 三宅教子修士 修論

10) Tsuboi, S., *et al.* (2002) An intramolecular disulfide bridge as a catalytic switch for serotonin *N*-acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 44229-44235

11) Hopkins, F.G. (1925) Glutathione: Its influence in the oxidation of fats and proteins. *J. Biol. Chem.* **19**, 787-819

12) McCaul, T.F., *et al.* (1986) Fulminant hepatitis. An ultrastructural study. *J.Hepatol.* **2**, 276-290

13) Potter, D.W. and Hinson, J.A. (1974) Mechanisms of acetaminophen oxidation to *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine by horseradish peroxidase and cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139

14) Richman, P. and Meister, A. (1975) Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* **250**, 1422-1426

15) Kidd, P.M. (1997) Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern. Med. Rev.* **2**, 155-176

16) Mitchell, J.R., *et al.* (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**, 185–194

17) Corcoran, G.B. and Wong, B.K. (1986) Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by *N*-acetyl-L-cysteine in prevention of *N*-acetyl-D-cysteine in mice. *J. Pharmacol. Exp.* Ther. **238**, 54-61

18) Akai, S., *et al.* (2007) Knock down of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat causes acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* **282**, 23996-24003

19) Wu, G., *et al.* (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* **134**, 489–492

20) Meister, A. and Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711–760

21) Koivusalo, M., *et al.* (1974) Enzymic method for the quantitative determination of reduced glutathione. *Anal. Biochem.* **59**, 34-45

22) Watanabe, T., *et al.* (2003) A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J. Toxicol. Sci.* **28**, 455-469

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、最終年度である本年度は、前年度に引き続きCYP2Cサブファミリーである CYP2C9及びCYP2C19の酵素活性を測定した。今年度はテストステロン及びコルチゾールを基質として、CYP2C9では遺伝子多型の影響も検討した。また、文献値も含めて、種々の化合物の酵素反応速度論的パラメータ（Michaelis定数、K_m）を分類した。CYP2C9及びCYP2C19によるテストステロン及びコルチゾール6β水酸化活性はCYP3A4に比べ非常に低く、CYP2C9、CYP2C19間に大きな差は無かった。文献値も含めたK_m値では、①CYP2C9活性を示さない、②CYP2C9の方がCYP2C19より高いK_m値、③CYP2C9とCYP2C19で同程度のK_m値、④CYP2C9の方が低いK_m値の群に分類された。この基質親和性の差の原因は化合物の分子量によるものでないことは示されたが、CYP2Cサブファミリー間での三次元構造と触媒機能の関連をさらに検討して必要がある。

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（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、そのアミノ酸配列（1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[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CYPで遺伝子多型があることが知られている[1,2]。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[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てきた。最終年度である本年度は、前年度に引き続き、種々の化合物を用いた代謝実験の一環として、テストステロン及びコルチゾール6β水酸化活性を測定した。この中で、代表的な変異体であるCYP2C9.2(Arg144Cys)及びCYP2C9.3(Ile359Leu)[3]というCYP2C9の１アミノ酸変異体を用い、CYP2C9の遺伝子多型の影響も検討した。また、今までに報告された種々の代謝反応に対するCYP2C9及びCYP2C19のMichaelis定数（K_m）及び最大速度（V_{max}）を用いて、CYP2Cサブファミリー間の活性の相違を考察した。

２．方法

1. 材料

大腸菌に発現したCYP2C8、CYP2C9.1、CYP2C9.2、CYP2C9.3、CYP2C19及びCYP3A4（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

テストステロン及びコルチゾール6β水酸化活性は既報[4]のHPLC法で測定し、CYP2C9と変異体、CYP2C19及びCYP3A4における酵素活性を算出した。

また、昨年度までに算出したCYP2C9及びCYP2C19のトルブタミド水酸化活性及びアミノピリン*N*-脱メチル化活性のK_m及びV_{max}値並びに種々の化合物の文献値[3]を用いて、CYP2Cサブファミリー間の活性の相違を考察した。

３．結果

CYP2C9 と変異体（CYP2C9.2 及び CYP2C9.3）及び CYP2C19 のテストステロン 6β水酸化活性を、基質濃度を 100 μM と 500 μM の 2 種類で検討したが、CYP2C9、CYP2C19 共に CYP3A4 の 5.3%以下の低い活性であった（図 1）。また、コルチゾール 6β水酸化活性も、基質濃度を 100 μM と 500 μM の 2 種類で比較したが、基質濃度 100 μM では CYP3A4 以外の CYP では酵素活性が検出されず、基質濃度 500 μM では CYP2C9、CYP2C19 共に CYP3A4 の 5.5%以下の低い活性であった（図 2）。

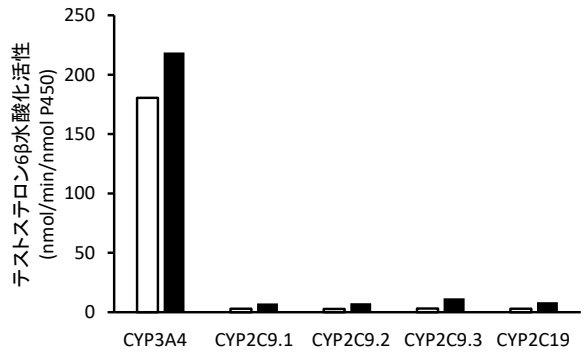


図１．CYP3A4、CYP2C9 変異体及び CYP2C19 によるテストステロン 6β水酸化活性
テストステロン濃度　□：100 μM、■：500 μM

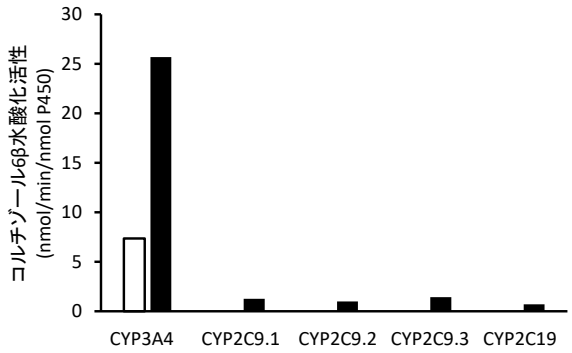


図 2．CYP3A4、CYP2C9 変異体及び CYP2C19 によるコルチゾール 6β水酸化活性
コルチゾール濃度　□：100 μM、■：500 μM

前年度、CYP2C19 におけるトルブタミド水酸化活性の K_m、V_{max} 及び V_{max}/K_m 値は CYP2C9 より大きいこと及び CYP2C8 では CYP2C9 及び CYP2C19 の活性値に比べ非常に低い値であったことを報告した。また、CYP2C8 は CYP2C サブファミリーの中でマイナーであり、CYP2C9 及び CYP2C19 での代謝活性を比較している報告が多いため、CYP2C9 及び CYP2C19 の K_m 値の相違を検討した（表 1）。

表 1．CYP2C9 及び CYP2C19 の各種薬物代謝活性における K_m 値の比較

薬物	反応	CYP2C19／CYP2C9	分子量
① CYP2C9 の代謝活性未検出			
ジクロフェナク	5-水酸化	－	296.1
ピオグリタゾン	C-水酸化	－	356.4
ｸﾛﾋﾟﾄﾞｸﾞﾚﾙ	2-oxo 体	－	321.8
② CYP2C19／CYP2C9 比：0.5 倍以下			
マグノリン	M2 生成	0.50	416.5
マグノリン	M1 生成	0.32	416.5
モルヒネ	*N*-脱メチル化	0.25	285.3
アミノピリン	*N*-脱メチル化	0.12	231.3
5-ﾒﾄｷｼ-*N,N*-ｼﾞｲｿﾌﾟﾛﾋﾟﾙﾄﾘﾌﾟﾀﾐﾝ	*N*-脱イソプロピル化	0.02	274.4
③ CYP2C19／CYP2C9 比：約 1 倍			
セラトロダスト	4'-水酸化	1.21	354.5
④ CYP2C19／CYP2C9 比：3～4 倍			
セラトロダスト	5-水酸化	3.86	354.5
トルブタミド	水酸化	3.53	270.3
⑤ CYP2C19／CYP2C9 比：9 倍以上			
(*S*)-ﾌｪﾝﾌﾟﾛｸﾓﾝ	4'-水酸化	127.9	280.3
(*R*)-ﾌｪﾝﾌﾟﾛｸﾓﾝ	4'-水酸化	68.0	280.3
(*S*)-ﾌｪﾝﾌﾟﾛｸﾓﾝ	6-水酸化	37.9	280.3
(*R*)-ﾌｪﾝﾌﾟﾛｸﾓﾝ	6-水酸化	9.54	280.3
ジクロフェナク	4'-水酸化	29.3	296.1

Niwa らの総説[3]で調査した報告値も含めて算出した。

ジクロフェナク 5-水酸化、ピオグリタゾン C-水酸化及びクロピドグレル 2-oxo 体生成反応では CYP2C9 は活性を示さず、マグノリン *O*-脱メチル化、モルヒネ *N*-脱メチル化、アミノピリン *N*-脱メチル化及び 5-メトキシ-*N,N*-ジイソプロピルトリプタミン *N*-脱イソプロピル化では CYP2C9 の方が CYP2C19 より高い K_m 値が報告されている。一方、セラトロダスト 5-水酸化、トルブタミド水酸化、フェンプロク

モン水酸化及びジクロフェナク 4'-水酸化では CYP2C9 の方が低い K_m 値が報告されている。*N*-脱アルキル化反応では、CYP2C9 の方が CYP2C19 より高い K_m 値が報告されていた。調査した化合物の分子量は 231～416 とほぼ同程度であり、CYP2C9 及び CYP2C19 の基質親和性の相違の原因は、基質の分子量ではないことが示された。

４．考察

昨年度、テストステロンは CYP2C19 によるトルブタミド水酸化活性に対して 100 μM までほとんど影響しないが、CYP2C9 に対しては 100 μM で約 1/2 に活性が低下するのに対し、コルチゾールは CYP2C9、CYP2C19 のいずれに対しても阻害しないことを示した。また、CYP3A4 はテストステロン及びコルチゾールの 6β位水酸化反応を示すことが報告されている[2]。そこで、CYP2C9 と変異体(CYP2C9.2 及び CYP2C9.3)及び CYP2C19 のテストステロン及びコルチゾールの 6β水酸化活性を比較したが、CYP2C9、CYP2C19 共に CYP3A4 の 5%以下の低い活性であり、CYP2C サブファミリーへの阻害活性とこれらのステロイドの代謝活性には相関性が認められなかった。

CYP3A4 は、ヒトの肝臓の総 CYP 含量の約 30%を占め、約 50%の医薬品の代謝に関与するが[5,6]、ヒト肝臓には CYP3A5 も存在し，その基質特異性は多くの場合 CYP3A4 と類似しているものの、CYP3A4 の基質特異性と異なることがあると報告されている[7,8]。我々は、以前に CYP3A4、CYP3A5 間の三次元構造と触媒機能の関連を明らかにする研究（Docking Simulation）を実施してきたが、その指標となる *U* 値は K_m 値と若干の相関傾向を示すが、V_{max} とは相関しないことを報告した[9]。本研究においても、CYP2C サブファミリー間での三次元構造と触媒機能の関連を検討することを目標にしていたが、三次元構造が良好に構築できていない。また、セラトロダスト 4'-水酸化では CYP2C9 と CYP2C19 で K_m 値が同程度であるのに対し、5-水酸化では CYP2C19 の方が大きいというように、同一の基質でも反応部位によって基質親和性が異なることが示された。CYP3A サブファミリー間でも若干 K_m 値と相関するという程度で、良好な予測ができていない状況であるので、今後、CYP3A サブファミリーでの進展も参考にして、CYP2C サブファミリーでも良好に予測できる技法を開発する必要があると考えられる。

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) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. J Pharmacol Exp Ther, 270: 414-423 (1994).

6) Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a

pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCi/AUC) ratios. Drug Metab Dispos, 32: 1201-1208 (2004).
7) Niwa T, Murayama N, Emoto C, Yamazaki H. Comparison of kinetic parameters for drug oxidation rates and substrate inhibition potential mediated by cytochrome P450 3A4 and 3A5. Curr Drug Metab. 9: 20-33 (2008).
8) Niwa T, Murayama N, Yamazaki H. Comparison of the contributions of cytochromes P450 3A4 and 3A5 in drug oxidation rates and substrate inhibition. J Health Sci, 56: 239-256 (2010).
9) 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).

鳥類アデノ随伴ウイルス（AAAV）受容体の機能解析

就実大学 薬学部 薬学科

工藤 季之

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、安全性が高く、広範な細胞種に効率良く遺伝導入が可能なベクターとして、哺乳類でよく利用されている。鳥類アデノ随伴ウイルス（AAAV）のベクターとしての利用は、2003 年に最初の報告がある（I. Bossis & A.J. Chiorini）が、これ以降は数えるほどしか利用例が報告されていない。これらの報告では、ごく一部の細胞種への遺伝子導入しか確認されておらず、AAAV の感染特性に関する研究も十分に行われていない。一方、哺乳類アデノ随伴ウイルス（AAV）の研究では、細胞種やウイルスの血清型（セロタイプ）の違いにより、複数の受容体がその感染に関与していることが示され、2016 年に必須の AAV 受容体として KIAA0319L 遺伝子が同定された（S. Pillay et al.）。そこで本研究では、ニワトリの KIAA0319L 遺伝子のクローニングを行い、その機能解析を行うことで、AAAV ベクターの感染特性の解析を試みた。その結果、ニワトリの KIAA0319L が組換え AAAV の結合と感染に関与することが示されたものの、より重要な他の受容体が存在する可能性も示唆された。

１．はじめに

ニワトリは発生学研究における優れたモデル動物でありながら、研究手法上の欠点がある。1 つは、簡便に遺伝子を導入する方法が確立されていない点であり、もう 1 つは、簡便に遺伝子を破壊する方法が確立されていない点である。哺乳類では、マイクロインジェクション法により、高い効率でトランスジェニックマウスを作製することが可能であり、胚幹（ES）細胞を利用したノックアウトマウスの作製法は、研究における必須実験となっている。

アデノ随伴ウイルス(AAV)を利用したベクターは、高効率で簡便な遺伝子導入系として知られる。鳥類アデノ随伴ウイルス（AAAV）のベクターとしての利用は、2003 年に最初の報告がある（I. Bossis & A.J. Chiorini）[1]。これ以降は、ニワトリをいわゆる動物工場として利用するための遺伝子導入の事例が、いくつか報告されているが、いずれも卵管細胞への遺伝子導入による遺伝子組換えタンパク質の生産が目的である。また、基礎的な研究への利用という点では、2012 年にニワトリ脳の神経細胞への遺伝子導入が報告されている（R. Matsui et al.）[2]。これらの報告では、ごく一部の細胞種への遺伝子導入しか確認されておらず、AAAV の感染特性に関する研究は十分に行われていない。私たちも、鳥類アデノ随伴ウイルス（AAAV）ベクターの構築を行ったが、ごく一部の細胞でしか遺伝子導入が認められず、期待された高効率な遺伝子導入は見られなかった。一方、哺乳類アデノ随伴ウイルス（AAV）の研究では、細胞種やウイルスの血清型（セロタイプ）の違いにより、複数の受容体がその感染に関与していることが示されている。さらに、2016 年に AAV 受容体として KIAA0319L 遺伝子が同定され、AAV の血清型に関わらない必須な受容体として極めて重要であることが示された（S. Pillay et al.）[3]。鳥類においては、その感染に関わる受容体の解析は全く行われておらず、感染機構も十分に解明されていない。この鳥類アデノ随伴ウイルス（AAAV）受容体を詳細に解析することで、より高い遺伝子導入効率の鳥類アデノ随伴ウイルス（AAAV）ベクターの開発が可能となることが期待される。

そこで本研究では、ニワトリの KIAA0319L 遺伝子のクローニングを行い、その機能解析を行うことで、AAAV ベクターの感染特性の解析を試みた。

２．材料と方法

（１）細胞の培養

ニワトリ胚線維芽細胞（chicken embryonic fibroblast, CEF）およびヒト胎児腎細胞由来細胞株 AAVpro293T は、ダルベッコによる改変培地（DMEM,

表 1 リアルタイム PCR に使用したプライマー

name	sequence
chRPL5_1F	TATGCCCATGAGCTGCCAAA
chRPL5_1R	TATTCAGAAGCCTGCGTGCC
GAPDH003(F)	TGCTAAGGCTGTGGGGAAA
GAPDH004(R)	GGCAGGTCAGGTCAACAACA
chKIAA0319L_2F	TGGAAGGGAAACACTCCCAG
chKIAA0319L_2R	CGATTCACTCGAGGCTTTGG
chKIAA0319_5F	ATATCAGTGGGCCAAGCTAC
chKIAA0319_5R	TGAAGACCAGACACAGTCGC
chITGAV_2F	TCTCTCAATTTTCAAGTGGAGCTG
chITGAV_2R	TGGAGTGGCTAGGCTGTTTG
chITGB5_2F	GCCTACAACAGCATTCGGTC
chITGB5_2R	TCTGAGCCCAGGATAGGACA
chFGFR1_6F	GTCTCAGACGCACTCCCTTC
chFGFR1_6R	TATCCGCCTCCTTCTCCTCC
chMet_5F	AGATGTGTGGTCCTTCGGTG
chMet_5R	CATACAGTGGGTCAGGGCAG
chPDGFRA_7F	CGCGTTATAAAGGAGGAGCTGT
chPDGFRA_7R	GTGTTAGGAGCGGTCCTGTG
chPDGFRB_3F	CTCGCTATGAGATCCGCTGG
chPDGFRB_3R	GAGCCAAGAGTGCGTCCTAA
chEGFR_1F	CACCCTGTGAGGGAAGACAG
chEGFR_1R	ACATACTCTGGAGCAGGCAG
chLamR_6F	TGACCGAGGCTTCTTACGTC
chLamR_6R	CCACTGAATGTGCTCCCTTG

Sigma)に非働化したウシ胎児血清(FBS, Hyclone) 10%および抗生物質（最終濃度：50 units/mL ペニシリン，50 μg/mL ストレプトマイシン，Nacalai Tesque）を添加したものを用い、37℃、5%CO_2 下で培養した。また、培養にはブタ腱由来タイプⅠコラーゲンでコートされたプラスチックディッシュ(AGC Techno Glass）等を使用した。CEF は Accutase（Innovative Cell Technologies)、AAVpro293T は 0.05%トリプシン/0.53mM EDTA (Nacalai Tesque) により培養容器の底面から剥がしたのちに植え継いだ。

（２）RNA の定量

RNA の定量は、リアルタイム PCR 法により行った。培養細胞からの RNA の調製は、RNA 調製キット（NucleoSpin RNA II、Macherey-Nagel）を使用し、プロトコルに従って行った。成体組織からの RNA の調製には ISOGEN（Nippon Gene）を使用した。cDNA の合成は、PrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio) を使用した。各プライマーはデータベースの塩基配列をもとに、Primer-BLAST（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ tools/primer-blast/）によりデザインした(表 1)。リアルタイム PCR は、TB Green Premix *ExTaq* II（Takara Bio）を使用し、プロトコルに従って行った。反応および解析には、QunatStudio 3（Applied Biosystems）を使用した。

（３）ヒトおよびニワトリの KIAA0319LcDNA のクローニング

ヒトおよびニワトリの KIAA0319LcDNA は、PCR により増幅した後、動物細胞発現ベクターpTriEx-4 に導入した。cDNA の合成は、AAVpro293T、CEF およびニワトリ精巣由来の RNA を鋳型とし、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis kit（Takara Bio）を用いて行った。PCR にはそれぞれ、hKIAA0319L-Met2: AGGAGATATACCATGGAGAAGAGGCTGGGAGTCAA、hKIAA0319L-Stop2: TGCACGTGTATACAGCAGGATCTCCTCCCGCGGGC、chKIAA0319L-Met2: AGGAGATATACCATGGAGAAGAGGTTGGAAGCCAA、chKIAA0319L-Stop2: TGCACGTGTATACAGTAGGATCTCCTCCCTCTGGC をプライマーとして用い、PrimeSTAR Max DNA polymerase (Takara Bio) を使用し、プロトコルに従って行った。増幅した cDNA 断片は、アガロースゲル電気泳動により分離した後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up(Macherey-Nagel)で精製した。この cDNA 断片と、制限酵素 Nco Ⅰおよび Pvu II で切断した pTriEx-4 を、In-Fusion HD Cloning kit (Takara Bio) で結合させた後、E. coli HST08 Premium Competent Cells (Takara Bio) に導入した。複数クローンの塩基配列を確認した後、データベースの塩基配列と同等のものを真正のクローンとした。

（４）細胞への遺伝子導入

AAVpro293T は、遺伝子導入の前日に植え継ぎ、遺伝子導入時にプレート表面を 70%程度おおうように調整した。遺伝子の導入には、遺伝子導入試薬（PEImax、Polysciences、1 mg/mL、pH7.0）を使用した。6 well プレートの場合、1 well あたりプラスミド DNA は 4 μg、PEImax は 4 μL を使用した。培養液に試薬で処理した DNA を添加した後、そのまま約 48 時間培養し、遺伝子の発現を確認した。

プラスミド DNA は、プラスミド DNA 精製キット（NucleoBond Xtra Midi、Macherey-Nagel）を使用して調製した。

（５）免疫ブロッティング

細胞を細胞溶解液（CelLytic-M、Sigma）で処理して得られた試料は、5 分の 1 量の 6×サンプリングバッファーと混合した。これを 100℃2 分間熱処理した後、各試料 15μL を SDS ポリアクリルアミド電気泳動（Mini-PROTEAN TGX Any kD 15 wells、Bio-Rad）に供した。泳動後は、タンパク質を PVDF メンブレンに転写した（Trans-Blot Turbo、Bio-Rad）。ブロッキングには PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal（TOYOBO）を、一次抗体および二次抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution（TOYOBO）を使用した。一次抗体は、抗 6xHis 抗体（Wako）を 5,000 倍希釈で、二次抗体は、HRP 標識抗マウス IgG 抗体（GE Healthcare）を 10,000 倍希釈で使用した。検出には、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent（GE Healthcare）を使用し、ルミノ・イメージアナライザー（Amersham Imager 600、GE Healthcare）により解析を行った。

（６）遺伝子組換えウイルスの調製

AAVpro293T への遺伝子導入は、前述と同様に行った。10cm ディッシュの場合、使用するプラスミド DNA（ウイルスベクター pA3V-GFPd4、カプシド発現ベクター pCA3V-RC、ヘルパーベクター pSR449B）は各 10μg、PEImax は 30μL とした。培養液に試薬で処理した DNA を添加した後、そのまま約 72 時間培養を続け、遺伝子組換えウイルスの調製を行った。培養液約 10 mL に、0.5M EDTA を 125μL 加えることで、細胞をディッシュ底面からはがして回収した。ウイルス調製は、ウイルス抽出試薬（AAVpro Extraction Solution、Takara Bio）を使用し、プロトコルに従って行った。ウイルス液は、使用時まで 4℃で保存した。

（７）遺伝子組換えウイルスの定量

遺伝子組換えウイルスの定量は、リアルタイム PCR 法により行った。ウイルス DNA の調製は、ウイルス液を RQ1 RNase-Free DNase（Promega）で 37℃ 30 分間処理した後、MightyPrep reagent for DNA（Takara Bio）を使用し、プロトコルに従って行った。PCR は、CMV プライマー（CMV_F; 5’-CATGGTGATGCGGTTTTGG-3’、CMV_R; 5’-CAATGGGGTGGAGACTTGGA-3’）を用い、 TB Green Premix *ExTaq* II（Takara Bio）を使用し、プロトコルに従って行った。反応および解析には、QunatStudio 3（Applied Biosystems）を使用した。定量は、pA3V-GFP を鋳型として検量線を作成し、ウイルスゲノム（vg）の絶対量を算出した。

（９）ルシフェラーゼアッセイ

AAVpro293T への遺伝子導入は、前述と同様に行った。12 well プレートの場合、1 well あたりプラスミド DNA は 2μg、PEImax は 2μL を使用した。CEF への遺伝子導入には、Avalanche-everyday（EZ Biosystems）を使用した。培養液に試薬で処理した DNA を添加した後、そのまま約 4 時間培養した。培養液を交換した後、遺伝子組換えウイルスを添加し、48 時間培養した。細胞は-PBS で洗浄した後、Passive Lysis buffer（Promega）250 μL で溶解し、ルシフェラーゼアッセイに供した。ルシフェラーゼアッセイの基質には PicaGene Luminescence Kit（TOYO B-Net）を用い、Sirius Luminometer（Berthord）により活性を測定した。タンパク質の定量は、Protein Assay（Promega）を用いて行った。

（１０）ウイルス結合アッセイ

細胞への遺伝子導入は、ルシフェラーゼアッセイと同様に行った。培養液に試薬で処理した DNA を添加した後、そのまま約 48 時間培養した。培養液に遺伝子組換えウイルスを添加した後、4℃1 時間静置し、培養液を取り除いて、-PBS で細胞を洗浄した。ここにウイルス抽出試薬（AAVpro Extraction Solution、Takara Bio）を添加し、プロトコルに従って処理することで、細胞に結合したウイルスを回収した。回収したウイルスの定量は前述の通り行った。

３．結果

（１）受容体遺伝子の発現

CEF では継代を重ねるにつれて AAAV の感染効率の低下が認められる。そこで、哺乳類においてアデノ随伴ウイルス（AAV）の受容体として知られる遺伝子の CEF における発現を、リアルタイム PCR にて確認した（図 1）。AAV 受容体とされる KIAA0319L のニワトリオルソログおよびそのパラログである

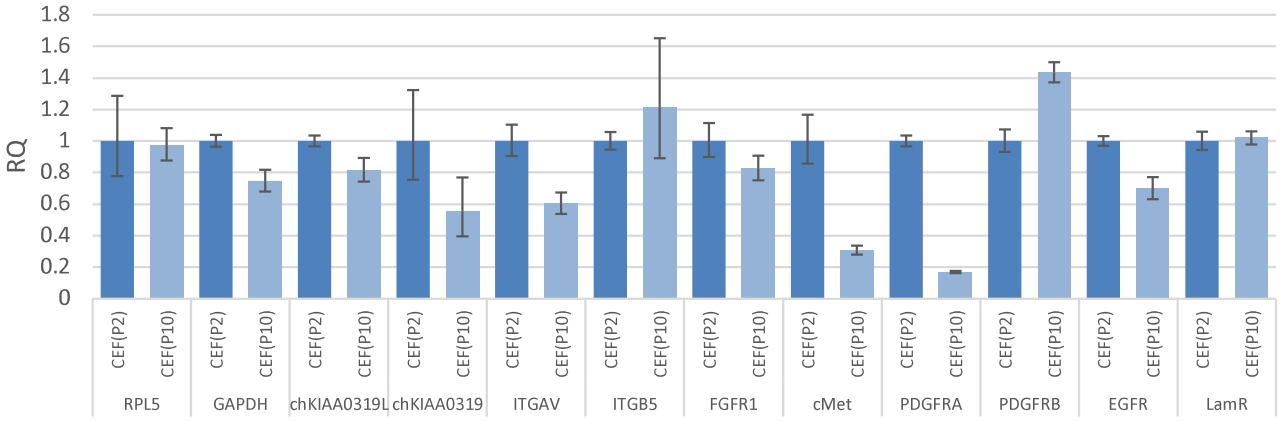


図1　CEFにおける受容体遺伝子の発現

KIAA0319、共受容体として知られるインテグリンαV、FGF受容体1、EGF受容体のオルソログはいずれもわずかな発現の低下が認められた。c-Met（HGF受容体）およびPDGF受容体αのオルソログは、それらより顕著な低下が認められた一方、インテグリンβ5およびPDGF受容体βのオルソログはわずかながら増加が認められた。さらに、KIAA0319L およびKIAA0319の各種臓器での発現を確認したところ、前者は精巣で強い発現が、肝臓でやや強い発現が認められた。後者についてはいずれの臓器においても、弱い発現しか認められなかった（データ示さず）。

（２）KIAA0319LcDNA のクローニングと組換えタンパク質の発現

データベースの塩基配列をもとにヒトおよびニワトリの KIAA0319LcDNA のクローニングを行った。得られた複数のクローンの塩基配列を確認したところ、ヒトのcDNA はデータベースの塩基配列と完全に一致するクローンが得られた。一方、ニワトリについては、データベースの塩基配列と完全に一致するクローンは得られなかったものの、SNP とみられる複数の同義置換が認められるクローンが得られた。

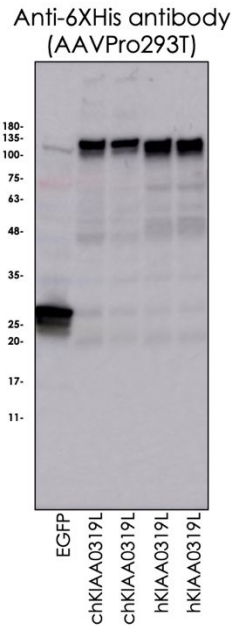


図２　組換えKIAA0319Lタンパク質の発現

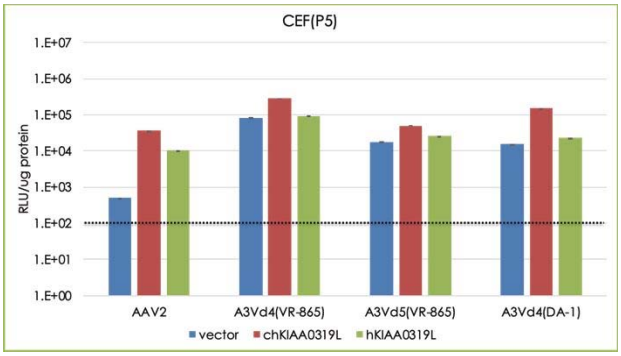
これらについて、AAVpro293T での一過性発現により組換えタンパク質の発現を確認した。組換えタンパク質のC末端には、HSV タグおよび8×His タグが挿入されているため、これを免疫ブロッティングにより確認したところ、いずれのクローンも予想される分子量で組換えタンパク質の発現を検出することができた（図2）。

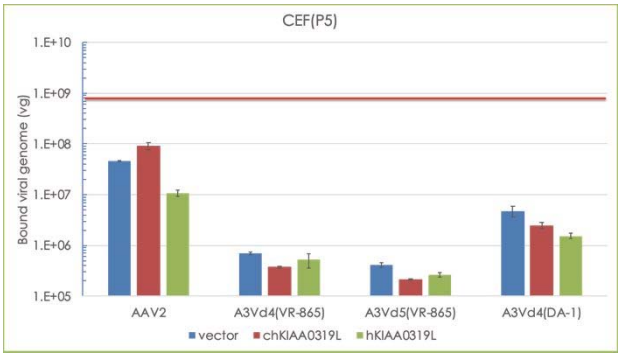
（３）KIAA0319L 遺伝子の発現とウイルス感染

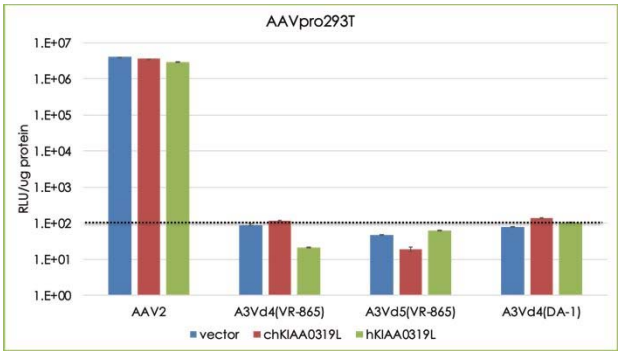
KIAA0319L が鳥類アデノ随伴ウイルス（AAAV）の受容体として機能するかどうかを確認するため、CEF および AAVpro293T での一過性発現によるウイルス感染への影響を検討した（図3）。CEF にニワトリの KIAA0319L（chKIAA0319L）発現させた場合は、3種の組換え AAAV はいずれも感染効率が上昇し、ヒトの KIAA0319L（hKIAA0319L）発現させた場合でも、感染効率の上昇が認められた。ところが、本来感染しない組換え AAV2 においても同様に、著しい感染効率の上昇が認められた。一方、AAVpro293T にニワトリの KIAA0319L（chKIAA0319L）発現させた場合は、3種の組換え AAAV はいずれも感染効率の上昇は、認められなかった。さらに、本来感染する組換え AAV2 においては、若干の感染効率の低下が認められた。

（４）KIAA0319L 遺伝子の発現とウイルス結合

KIAA0319L が細胞表面において鳥類アデノ随伴ウイルス（AAAV）として結合するかどうかを確認するため、CEF および AAVpro293T での一過性発現によるウイルス結合への影響を検討した（図4）。CEF にニワトリの KIAA0319L（chKIAA0319L）発現させた場合は、3 種の組換え AAAV はいずれも結合が減少し、ヒトの KIAA0319L（hKIAA0319L）発現させた場合で







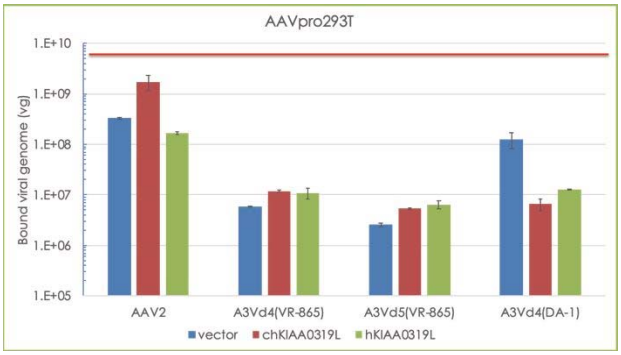


図３　KIAA0319L 遺伝子の発現とウイルス感染

図４　KIAA0319L 遺伝子の発現とウイルス結合

も、結合の減少が認められた。ところが、本来感染しない組換え AAV2 においては、組換え AAAV よりも高い結合が認められ、chKIAA0319L を発現させた場合にはその増加が、hKIAA0319L を発現させた場合はその減少が認められた。一方、AAVpro293T にニワトリの KIAA0319L（chKIAA0319L）発現させた場合は、3 種の組換え AAAV は異なった挙動を示した。VR-865 カプシドは結合がわずかに増加し、DA-1 カプシドは結合の減少が認められた [4]。いずれも感染効率の上昇は、認められなかった。さらに、本来感染する組換え AAV2 においては、CEF の場合と同様の傾向が認められた。

４．考察

2003 年の Bossis と Chiorini の報告では、組換え AAAV（VR-865）は CEF に効率良く感染するとされている。ところが、彼らから入手した同じセロタイプの組換え AAAV の感染を CEF で確認したところ、期待されるような感染は認められず、さらに CEF の継代（Passage）を重ねるにつれ、感染効率の著しい低下が認められた。そこで、これまで知られているアデノ随伴ウイルス（AAV）の受容体遺伝子の発現を、CEF（P2）と CEF（P10）で比較検討した。今回解析した受容体遺伝子のうち、いくつかでは発現の低下が認められたが、逆に発現が上昇しているものもあった。もともと CEF は線維芽細胞を主とする不均一な細胞集団である。これが継代を重ねるごとに選別され、より均一な細胞集団に変化していくが、受容体遺伝子の発現の変化はこれを反映しているものと考えられる。そこで、2016 年に AAV の必須受容体として哺乳類で同定された KIAA0319L 遺伝子について、AAAV の感染に与える影響を検討した。ヒトおよびニワトリの KIAA0319LcDNA をクローニングし、ヒト細胞（AAVpro293T）およびニワトリ細胞（CEF）に強制発現させ、機能解析を行った。その結果、chKIAA0319L はニワトリ細胞において、組換え AAAV の感染を促進するものの、細胞表面への結合阻害が認められた。これは、ニワトリ細胞に組換え AAAV の結合には関与するが感染には至らない別の分子が存在している可能性を示唆している。一方、ヒト細胞では、細胞表面への結合はやや促進されるものの、感染にはほとんど影響を与えなかった。これは、結合した後の感染過程がヒト細胞内ではうまく進まなかったためと考えられる。別のセロタイプである組換え AAAV（DA-1）は若干異なる挙動を示すが、ニワトリ細胞およびヒト細胞でもともと細胞表面に結合しやすいようである。また、哺乳類に感染する AAV2 がよく結

合することが判明したが、ヒト細胞においては感染を阻害し、ニワトリ細胞においては感染を促進した。ヒト細胞においては、本来存在しているAAV受容体を競合的に阻害し、ニワトリ細胞においては、競合する内在性の受容体が存在しないためと考えられる。

本研究により、ニワトリのKIAA0319Lが、哺乳類と同様にAAAVの受容体として機能することが示唆された。しかしながらその機能は限定的であり、今回の結果はむしろより重要な他の受容体が存在する可能性をも示唆した。哺乳類においても、AAV4ではKIAA0319Lが受容体としては機能していないことが示されており、セロタイプにより必須受容体とは言えないことが知られている[5]。また、KIAA0319Lにはパラログとして KIAA0319が存在し、その構造および機能も非常に類似しているが、AAV2およびAAV5の受容体としては働かないことが示されている[6]。しかしながら、他のセロタイプについては検討されておらず、KIAA0319が受容体として機能する可能性も否定できない。今後は、さらに他の受容体の可能性を解析することにより、より感染効率の高いAAAVベクターの構築の基礎を築くことが可能になると考える。

謝辞

本研究にあたり、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。また、本研究を行うにあたりご協力頂きました齊田真子氏、須山寧々氏、豊川優紀氏に、心から感謝いたします。

引用文献

1) Bossis I, Chiorini JA. Cloning of an avian adeno-associated virus (AAAV) and generation of recombinant AAAV particles. J Virol. 2003 Jun;77(12):6799-6810.

2) Matsui R, Tanabe Y, Watanabe D. Avian adeno-associated virus vector efficiently transduces neurons in the embryonic and post-embryonic chicken brain. PLoS One. 2012;7(11):e48730.

3) Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, Jae LT, Wosen JE, Nagamine CM, Chapman MS, Carette JE. An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature. 2016 Feb 4;530(7588):108-112.

4) Estevez C, Villegas P. Sequence analysis, viral rescue from infectious clones and generation of recombinant virions of the avian adeno-associated virus. Virus Res. 2004 Oct;105(2):195-208.

5) Dudek AM, Pillay S, Puschnik AS, Nagamine CM, Cheng F, Qiu J, Carette JE, Vandenberghe LH. An Alternate Route for Adeno-associated Virus (AAV) Entry Independent of AAV Receptor. J Virol. 2018 Apr 1; 92(7): e02213-17.

6) Pillay S, Zou W, Cheng F, Puschnik AS, Meyer NL, Ganaie SS, Deng X, Wosen JE, Davulcu O, Yan Z, Engelhardt JF, Brown KE, Chapman MS, Qiu J, Carette JE. Adeno-associated Virus (AAV) serotypes have distinctive interactions with domains of the cellular receptor. J Virol. 2017 Sep 15; 91(18): e00391-17.

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

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．これまでに我々は，AGEs が他の分子と複合体を形成して RAGE に作用する可能性を見出している．この知見は，AGEs-RAGE 系の活性化メカニズムの解明につながる手がかりとなる可能性がある．本研究では，この可能性について新たな知見を得ることを目的として，独自に見出した AGEs 結合分子 AGEs-BP-L の作用と，AGEs の共存がこの分子の作用に与える影響を検討した．AGEs 受容体欠損細胞等を用いた解析の結果，AGEs-BP-L は自然免疫系の活性化に寄与しており，AGEs の共存はこの分子の機能を阻害することが示唆された．

1. 背景と目的

本邦における老齢人口の増大に伴う諸問題を解決するために，健康寿命を延伸することが強く求められている．このためには，メタボリックシンドロームなどの生活習慣や加齢に伴って進行する疾患の発症機序を解明し，新規治療戦略を確立することが必要である．最近の研究により，これらの疾患の発症機序に非感染性の炎症の遷延（慢性炎症）が関与している可能性が示唆されている．我々は，この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終末糖化産物（Advanced glycation endproducts, AGEs）に注目している [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と考えられている．したがって，生体内に蓄積した AGEs が，持続的に AGEs-RAGE 系を活性化することにより，慢性炎症が生じる可能性が考えられる [3].

一方で，AGEs-RAGE 系の活性化に関わるメカニズムは完全に明らかになっていない．そのため，AGEs-RAGE 系を標的とした慢性炎症病態の治療戦略は確立されていない．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．これらの分子のひとつである Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis（TWEAK）ついて解析を進めたところ，AGEs はこの分子と結合することにより分子の作用を変化させる可能性が示唆された [4, 5]．これまでに，AGEs と他の生体分子が相互作用することが生理機能の変化に寄与する現象は，ほとんど報告されていない．この研究により得られた知見は，AGEs が他の生体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．

そこで前年度に我々は，この可能性を検証することを目的とした評価系として，受容体欠損細胞の作製を試みた．基盤となる細胞として，AGEs の作用解析に汎用されている免疫担当細胞モデルである RAW264.7 を用いた．この細胞において，RAGE や 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（TLRs）を欠損させた細胞を作製した．これらの細胞を用いることで，AGEs 複合体の作用をより詳細に検討することが可能となる．

本研究では，TWEAK とは別種の過去に AGEs と複合体を形成する可能性を見出した生体分子 AGEs-BP-L（仮称）について，受容体欠損細胞を用いることにより複合体形成による作用の変化を検討した．

2. 方法

AGEs との複合体形成による AGEs-BP-L の作用の変化の評価

AGEs は，過去に報告した方法に従って

glyceraldehyde（Sigma）と BSA（ナカライテスク）から調製した [1]. AGEs-BP-L は，市販の標品を購入して使用した．これらの分子を培地（10%FBS（Gibco）を添加した DMEM（Sigma））に混合し，野生型 RAW264.7 細胞および受容体欠損細胞に与えた．1 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 ；TNFα，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，Dunnett の検定，もしくは Student の t 検定により行った. 有意水準は 5%, 1%および 0.1%とした．全てのデータは平均値 ± 標準誤差にて表記した.

3. 結果と考察

AGEs-BP-L の作用の検討

本研究では，AGEs と複合体を形成する可能性を見出している新規分子 AGEs-BP-L について, 複合体形成による作用変化を検討した．はじめに，AGEs-BP-L の作用について検討を行った．AGEs-BP-L を免疫担当細胞モデルである RAW264.7 細胞に与えたところ，炎症性サイトカインの一種である TNFαの発現を促進することが示された（図 1A）．この結果は，AGEs-BP-L は AGEs と同様に免疫担当細胞を刺激して炎症反応を促進する分子であることを示唆している.

そこで次に, この AGEs-BP-L の作用に AGEs の共存が与える影響を検討した．単独で作用しない量の AGEs を共存させた場合，AGEs-BP-L の作用に変化は生じないことが示された（図 1A）．また，単独で作用する量の AGEs を共存させた場合，AGEs と AGEs-BP-L による TNFαの発現の促進が生じた（図 1B）. このときに生じる TNFαの発現の促進は, AGEs と AGEs-BP-L をそれぞれ単独で作用させた場合の作用を単純に合算した結果とはなっていない．このことは，AGEs と AGEs-BP-L の間に何らかの相互作用が生じている可能性を示唆していると考えられた.

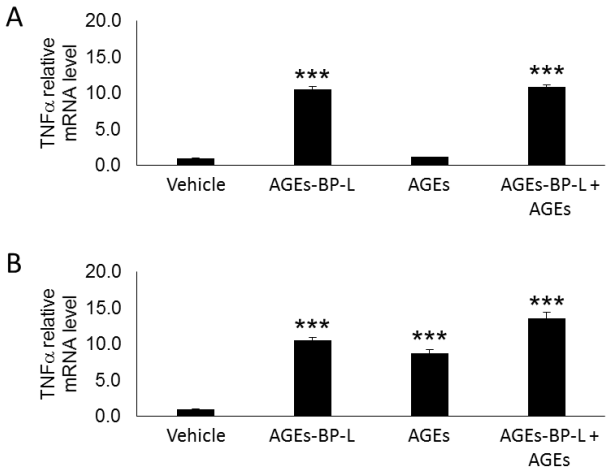


図 1．AGEs-BP-L の作用　野生型 RAW264.7 細胞に，（A）10 μg/mL の AGEs-BP-L もしくは 10 μg/mL の AGEs，（B）10 μg/mL の AGEs-BP-L もしくは 1,000 μg/mL の AGEs を与え，1 時間培養後に total RNA を精製し，real time RT-PCR により TNFαの mRNA レベルを相対定量した．* , $p < 0.001$ *vs.* vehicle (n = 3).**

受容体欠損細胞における AGEs-BP-L の作用の検討

ここまでの検討により AGEs-BP-L は，AGEs と同様に免疫担当細胞を刺激して炎症性サイトカインの発現を促進することが示された．そのため，AGEs と AGEs-BP-L の間に生じる可能性を見出した相互作用について検討するためには，AGEs が作用しない評価系を用いる必要があると考えられた．そのため，さらに検討を進めるために，既知の AGEs 受容体である RAGE，TLR2，および TLR4 を欠損させた受容体細胞を評価系として用いることとした．これに先だって，受容体欠損細胞における AGEs-BP-L の作用を検討した.

この受容体欠損細胞では，野生型細胞において TNFαの発現を促進する量の AGEs を与えたとき，

TNFαの発現は促進されない（図 2A, B）. すなわち, AGEs 単独の刺激には応答しない. 同様に, この受容体欠損細胞に, 野生型細胞において TNFαの発現を促進する量の AGEs-BP-L を与えたところ, TNFαの発現が促進されることが示された. なお, このときの, TNFαの発現レベルは, 野生型細胞と比較して低下していることが示唆された（図 2C, D）. これらの結果は, AGEs-BP-L は, AGEs の受容体である RAGE と TLRs に加えて, これら以外の受容体を介して, もしくは別種類の機序により RAW264.7 細胞を刺激し, TNFαの発現を促進することを示唆していると考えられた.

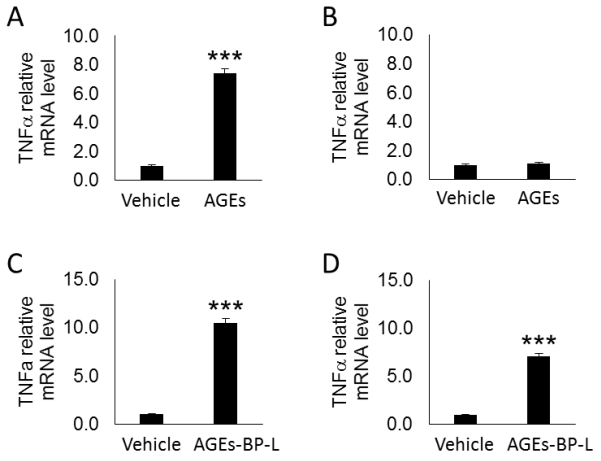


図 2. 受容体欠損細胞における AGEs-BP-L の作用
野生型 RAW264.7 細胞に,（A）500 μg/mL の AGEs,（C）10 μg/mL の AGEs-BP-L, 受容体欠損細胞に,（B）500 μg/mL の AGEs,（D）10 μg/mL の AGEs-BP-L を与え, 1 時間培養後に total RNA を精製し, real time RT-PCR により TNFαの mRNA レベルを相対定量した. ***, p < 0.001 *vs.* Vehicle (n = 3).

受容体欠損細胞における AGEs 共存が AGEs-BP-L の作用に与える変化の検討

ここまでの検討により, AGEs と AGEs-BP-L はそれぞれ単独で作用させた場合, RAGE および TLRs を介して TNFαの発現を促進することが示された. これに加えて AGEs-BP-L は, AGEs の作用機序以外のメカニズムによって TNFαの発現を促進することが強く示唆された. そこで, AGEs が作用せず, AGEs-BP-L のみが作用を発現する評価系となる受容体欠損細胞を用いて, これらの分子の複合体形成が AGEs-BP-L の作用に与える影響を検討した.

先の検討と同様に, 受容体欠損細胞にそれぞれ単独で作用する量の AGEs と AGEs-BP-L を与え, TNFαの発現変化を検討した. その結果, 共存する AGEs の濃度依存的に AGEs-BP-L による TNFαの発現促進が抑制されることが示された. この結果は, AGEs は複合体形成を介して AGEs-BP-L の作用のうち AGEs の受容体を介さない部分の作用を阻害することを示唆していると考えられた. 一方で, AGEs の受容体を介した作用における複合体形成の影響を解析するためには, AGEs-BP-L に特有の作用メカニズムが存在しない評価系, もしくはメカニズムを破壊した評価系を用いる必要がある. 現時点において, AGEs-BP-L に特有の作用メカニズムの詳細が不明であるため, この点において解析を進めるためには, AGEs-BP-L の作用メカニズム自体を解明する必要がある.

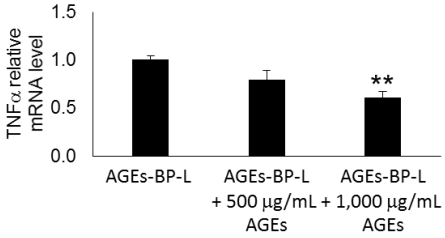


図 3. 受容体欠損細胞における AGEs 共存が AGEs-BP-L の作用に与える変化の検討　受容体欠損細胞に, 10 μg/mL の AGEs-BP-L と 500 μg/mL の AGEs, もしくは 1,000 μg/mL の AGEs を同時に与え, 1 時間培養後に total RNA を精製し, real time RT-PCR により TNFαの mRNA レベルを相対定量した. **, p < 0.01 *vs.* AGEs-BP-L (n = 3).

本研究の初期段階において, AGEs-BP-L は, AGEs と同様に免疫担当細胞における炎症反応を促進する分子であることが示された. このことから, AGEs-BP-L は AGEs と複合体を形成し, 炎症反応の増悪化に寄与する可能性を想定していた. しかしながら, 両分子を同時に作用させた場合, 顕著な炎症

反応の増悪化はもとより相加的な作用増加も見出されなかった．この結果は，これらの分子の相互作用は少なくとも部分的に分子単独で生じる作用を阻害する可能性を示唆していると考えられた．そこで，前年度の検討により作製した AGEs 受容体を欠損させた細胞を用いた検討を行ったところ，① AGEs-BP-L は AGEs よりも多彩なメカニズムを介して炎症反応の活性化を誘導すること，および ② AGEs の共存は，AGEs-BP-L に特異的な炎症反応の活性化メカニズムを阻害することが示唆された．

以上の本研究において見出した知見の生理的な意義について考察すると，以下の可能性が考えられる．先行研究により，AGEs-BP-L は自然免疫に関与する分子であることが示唆されている．本研究での検討結果は，生体内への病原菌等の侵入に応じて AGEs-BP-L が免疫担当細胞を活性化するメカニズムが機能している可能性を示唆していると考えられる．これに対して AGEs は，加齢や生体内のエネルギー需給等によって蓄積量が変化するものの，その変化は比較的長いスパンで生じる．従って，AGEs の存在は感染の有無にかかわらず，免疫担当細胞を活性化しており周囲の細胞や組織を障害していると考えられる．この状態で感染が生じた場合，AGEs は AGEs-BP-L が免疫担当細胞を活性化するメカニズムを抑制し，自然免疫系の正常な機能を阻害する可能性が考えられる．

今後，さらに詳細な解析を行い，本研究により見出した複合体形成を介した AGEs の疾患形成メカニズムを明らかにしていきたい．

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. 参考文献

[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.

[5] Watanabe, M., Toyomura, T., Wake, H., Liu, K., Teshigawara, K., Takahashi, H., Nishibori, M., Mori, S., 2019. The C-terminal region of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is required for interaction with advanced glycation end products. Biotechnol Appl Biochem 66, 254–260

脳内液体循環システムを利用した経鼻薬物送達法による新規な認知症治療法の開発

就実大学　薬学部　薬物動態学研究室

井上　大輔

本研究では、認知症治療法の新規確立を目指し、直接的に脳内へ薬物送達が可能な経鼻投与経路を利用した薬物送達法の可能性を探るべく、経鼻投与された薬物の脳移行特性に関する薬物動態学研究を試みた。基礎的知見を得るため caffeine の経鼻投与後の脳移行動態を解析した結果、経鼻投与後の caffeine は鼻粘膜から血中に吸収され脳へと取込まれる経路と直接移行経路の両経路により脳内送達されることが示された。経鼻投与後の脳移行では、覚醒下では血中を介した経路が優位であった一方で、麻酔下では直接移行経路の寄与が増大することが明らかとなった。麻酔下では脳内液体循環が活性化することが知られており、経鼻投与後の caffeine は鼻粘膜から嗅神経周辺部に存在する脳脊髄液へと移行した後、脳脊髄液とともに脳内循環し、脳実質まで送達される可能性が示唆された。従って、脳内液体循環を活性化させることで経鼻投与後の薬物脳移行が促進されたことから、中枢疾患治療薬の効率的な脳内送達法として経鼻投与が有用であることが示された。今後は caffeine を含む認知症治療薬の経鼻投与による実際の治療効果の検証を進める予定である。

現在、日本を筆頭に世界規模で超高齢化社会を迎え、加齢に伴う様々な精神神経疾患が社会問題化している。認知症は、日本国内において現在 500 万人いるとされており、今後、増加の一途を辿り、2025 年には 700 万人（65 歳以上高齢者の 5 人に 1 人）に達すると推測されている（厚生労働省 2017 年発表 [1]）。また、世界では、2010 年に 3560 万人、2030 年に 570 万人、2050 年には 1 億人を超えると予想されており [2]、認知症は世界中で急増している疾患である。しかしながら、いまだ神経変性疾患に対する優れた根治的治療効果を示す薬物や有効な治療戦略がなく、認知症をはじめとする神経変性疾患はメディカルニーズが極めて高い疾患分野となっており、早急な治療薬の開発および根治的治療が可能な新規治療戦略の確立が喫緊の課題となっており、活発な研究が進められている。これら中枢系疾患に対する病態メカニズムの解明や新しい創薬研究・開発が急速に進められている現在にあって、有効な薬理効果を示す薬物が見出されても、一般的な注射剤や経口製剤では、全身性の副作用が問題となることも多い。中枢神経疾患の薬物療法では、脳組織や神経組織内へ有効量の薬物を送達する必要があるが、全身循環血と脳組織を隔てる生理的バリアである血液脳関門（BBB）の存在により、薬物を含むすべての物質の脳への移行は厳格に制限されている [3]。従って、治療効果が得られる有効濃度域に達する高い脳内薬物濃度を維持するためには、高用量での適用となり、その結果、全身性の副作用が発現することが懸念される。あるいは、副作用を回避するために有効量を投与できず、治療薬として成立しないケースもある [4]。即ち、有効な中枢神経系疾患の薬物治療法としては、薬物の全身組織への移行を抑え、脳への選択的送達が可能であることが理想であり、効率的な脳内薬物送達法の確立が重要な戦略的アプローチとなる。そこで、薬物の低い脳内送達率を克服するための有用な手段として、近年、「経鼻投与経路」による薬物投与法が注目されており、脳組織への選択的な薬物送達法として経鼻投与の適用が多数報告されている [5]。

においを感知する嗅神経が脳内から鼻腔上部へと伸びており、鼻腔内投与された薬物はこの嗅神経領域（Olfactory region）を介して脳内へと直接的に移行することが知られている [6]。（**図 1**）この「鼻腔ー脳直接移行経路」を利用することで、全身循環血を介さず、直接的に薬物を脳内に送達できるため、脳移行における最大のバリアである BBB を回避でき、かつ脳組織へと選択的に薬物を送達できる可能性が

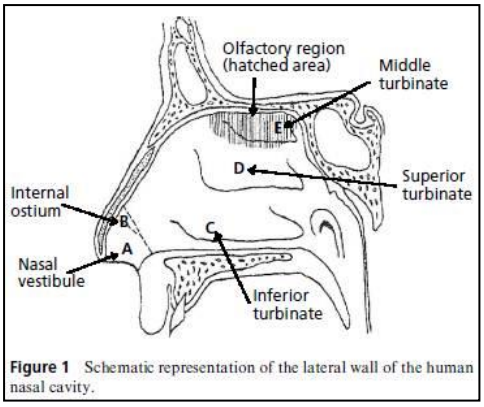


Figure 1 Schematic representation of the lateral wall of the human nasal cavity.

図 1　ヒトの鼻腔の組織学的構造（Illum L[7] より）
鼻腔から脳への直接移行では、嗅神経領域（olfactory region）を介して薬物は脳へと送達されると考えられている.

ある。従って、「鼻腔－脳直接移行経路」を利用した薬物送達法は、全身性副作用の軽減と、高い脳内薬物送達を可能にし、中枢神経疾患治療薬の有望な送達法となり得る。実際、経鼻投与経路を利用した動物及びヒトでの検討が報告され、注射剤や経口投与に比べ、投与薬物の脳移行性および治療効果が高いことが認められた研究も多数報告されている [5]。そこで本研究では、有効な認知症に対する薬物治療法の新規開発を最終目標として、BBB を回避でき、直接的に脳内へ薬物送達が可能な「経鼻経路」を利用した薬物送達法の可能性を探るべく、中枢系疾患治療モデル薬物を経鼻投与した後の詳細な脳移行特性を解明するため薬物動態学的解析を試みた。

さらに、近年、脳内では脳脊髄液（CSF）と細胞間液（ISF）との交換およびこれら体液の脳内循環が活発に行われており、この脳内体液循環システム（the glymphatic system）がβ-アミロイドなどの脳活動に伴い蓄積する脳内老廃物の脳外排泄機能を担っていることが報告された [8]。また、この脳内体液循環システムは、睡眠時や麻酔下で活性化されることが報告され [9]、脳内老廃物を排除するという睡眠の新たな生理機能とし提唱された。従って、CSF は脳内を循環することから、この glymphatic system の活性変動が経鼻投与後の脳実質内薬物送達性に影響する可能性が考えられるため、本研究では、脳内体液循環の活性化が投与薬物の脳移行性に及ぼす影響を評価することとした。

方法

Caffeine の脳移行性評価

本検討では、薬物の体内動態及び脳移行特性を評価するため caffeine をモデル薬物として選択した。本研究では、経鼻投与（IN）と静脈内投与（IV）における脳移行性の詳細を解析するため、両投与後の脳内薬物動態を比較検討した。IV 群では、ラットの左大腿静脈より caffeine 溶液（0.4 mg/mL, 0.2 mL）を静脈内投与した。また、IN 群では、urethane 麻酔下ラットに caffeine 溶液（2.0 mg/mL）を片鼻腔に 20 μL、左右両鼻腔で計 40 μL 点鼻投与した。投与後一定時間経過した後（5, 15, 30, 60, 120, 240 min）、ラットより脳脊髄液（CSF）を採取した。その後、氷冷したリン酸緩衝液を経心的灌流することで全身脱血処置を施した後、脳組織を採取した。脳組織は、海馬（HI）、嗅球（OB）、大脳（CR）、小脳（CL）に分割した。

血中濃度推移の評価

Caffeine の血中薬物動態を得るために、caffeine 溶液（1.0 mg/mL, 1.0 mL/kg rat weight）をラットの左大腿静脈より注射投与した。右大腿動脈に挿入した採血用カニューレより経時的に血液を約 200 μL ずつ採取し、血漿中 caffeine 濃度を測定し、caffeine の血中濃度時間推移を観察した。

麻酔／覚醒下による脳移行性の変動評価

生理状態の変化が caffeine の脳移行性に及ぼす影響を評価するため、麻酔下群と覚醒群における caffeine 投与後の体内動態を比較した。麻酔群では、urethane（1.2 g/kg, i.p.）麻酔を施した後、麻酔状態を維持した。覚醒群では、isoflurane による一時的な麻酔下、IV では投与用カニューレを左大腿静脈に挿入した後に覚醒させ caffeine 溶液を静脈内投与した。一方、IN では覚醒直後に caffeine 溶液を点鼻投与した。麻酔／覚醒両群で、投与後の経時的な血中濃度推移および脳内濃度推移から脳移行性を比較評価した。

脳中 caffeine 濃度の測定

各脳組織（OB, HI, CR, CL）は、リン酸緩衝液中でホモジナイズし、遠心分離後、得られた上清に

methanol を加えて攪拌した。さらに遠心分離して得られた上清を蒸発乾固し、残留物に水／アセトニトリル混合液に加え溶解後、LC/MS/MS により caffeine 濃度を定量した。CSF 中の caffeine 濃度は、CSF を遠心分離して得られた上清を LC/MS/MS にて定量することで測定した。血液サンプルは、遠心分離により血漿を採取し、methanol による除タンパク質処理後、蒸発乾固して得られた残留物を水／アセトニトリル混合液に溶解して、caffeine 濃度を定量した。

脳部位別 caffeine 移行性の薬物動態学的解析

経時的な caffeine 濃度推移から、各種薬物動態学的パラメータを算出し、脳移行特性の指標として以下のパラメータを解析した。脳移行量は脳移行量血中濃度－時間曲線下面積（*AUC*）、脳移行性は血中に対する脳中 *AUC* の比（$AUC_{tissue/plasma}$）、覚醒群に対する麻酔下群の $AUC_{tissue/plasma}$ 比（Ratio of $AUC_{tissue/plasma}$）を指標として用いた。また、IV 群に対する IN 群の優位性の指標として *DTI*（drug targeting index）を算出し、さらに、経鼻投与後に鼻腔から脳へ直接移行経路により脳へ移行した割合（*DTP*; direct transport percentage to the brain, %）を算出した。

$$DTI = \frac{\left(AUC_{tissue} / AUC_{plasma}\right)_{IN}}{\left(AUC_{tissue} / AUC_{plasma}\right)_{IV}} \qquad \text{式（1）}$$

$$DTP\ (\%) = \frac{(AUC_{tissue})_{IN} - (AUC_{tissue})_{x}}{(AUC_{tissue})_{IN}} \qquad \text{式（2）}$$

$$\frac{(AUC_{tissue})_{IV}}{(AUC_{plasma})_{IV}} = \frac{(AUC_{tissue})_{x}}{(AUC_{plasma})_{IN}} \qquad \text{式（3）}$$

ここで、AUC_{tissue} は各脳組織における *AUC* 値、AUC_{plasma} は血漿における *AUC* 値、IN は経鼻投与におけるパラメータ、IV は静脈内投与におけるパラメータである。経鼻投与後、caffeine は鼻粘膜から血中に吸収されて血中から BBB を通過して脳へ移行する経路（経 BBB 経路）と、鼻腔から脳へと直接移行する経路（直接移行経路）のいずれかで脳へ移行すると仮定した場合、経鼻投与後、直接移行経路により脳へ移行した割合 *DTP* は上記の**式（2）**で表現できる。ここで、$(AUC_{tissue})x$ は経鼻投与後に経 BBB 経路により脳へ移行した caffeine 量であり、**式（3）**の通り、静脈内投与後の血中に対する脳中 *AUC* 比と経鼻投与後の血中 AUC 値から算出が可能である。

結果と考察

各脳組織における caffeine の脳移行動態

麻酔下および覚醒状態における IV および IN 後の各脳組織中 caffeine 濃度推移を**図 2** に示した。IV では投与後 5 分から caffeine 濃度が観察され、caffeine は血中からも脳移行し、脳移行性は比較的良好であることが示された（**図 2a, 2b**）。麻酔下群では、投与後 120 分以降の脳内濃度が高く維持されており、caffeine の血中から脳への移行は麻酔の影響を受ける可能性が示唆された。そこで、IV 後の血漿中濃度推移を観察すると、麻酔群では caffeine の消失が遅延することが明らかとなった（**図 3**）。Caffeine は主に肝代謝により体内から消失するため、麻酔による血流の低下が caffeine の消失を遅延させた結果、脳内濃度が維持される現象が観察されたものと思われた。IN では、投与後 5 分から高い脳内濃度が観察され、経鼻投与後、caffeine は速やかに脳移行した（**図 2c, d**）。IV と比較して、IN では麻酔下および覚醒両群において、投与初期からより高い脳内 caffeine 濃度が得られており、IN ではより速やかかつ良好に脳内送達される可能性が示された（**図 2**）。

Caffeine 脳移行性に関する薬物動態学的解析

Caffeine の脳内および血中濃度推移から、薬物動態学的パラメータを算出し、経鼻投与後の各脳部位別の薬物移行特性について詳細な薬物動態学的解析を行った。各種薬物動態学的パラメータは**表 1** にまとめた。*AUC* は、両投与経路とも麻酔下群で高値を示し、麻酔による caffeine 消失遅延の影響を反映した結果が得られた。

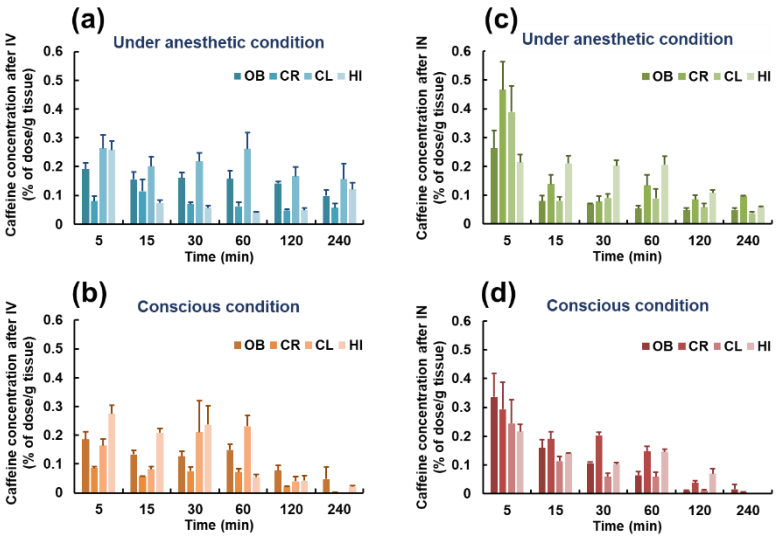


図 2　静脈内投与（IV）および経鼻投与（IN）後の caffeine 脳内濃度推移
麻酔下で静脈内投与 (a)、覚醒下で静脈内投与 (b)、麻酔下で経鼻投与 (c)、覚醒下で経鼻投与 (d) した後の各脳組織中 caffeine 濃度の時間的推移．OB：嗅球、CR：大脳、CL：小脳、HI：海馬．データは平均値±標準誤差（n=3-9）．

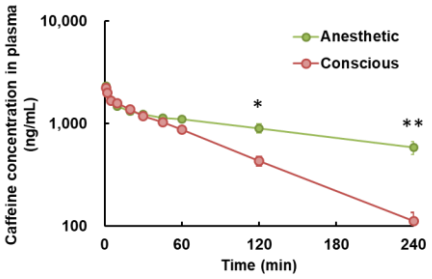


図 3　静脈内投与（IV）後の caffeine 血中濃度推移
静脈内投与後の caffeine 血漿中濃度推移．Anesthetic：麻酔下群、Conscious：覚醒群．データは平均値±標準誤差（n=3-9）で示し、両群間の統計学的有意差を*p<0.05、**p<0.01 で表記．

表 1　脳移行性に関する各種薬物動態学的パラメータ

$AUC_{tissue(0-240)}$	IV		IN	
	Anesthetic	Conscious	Anesthetic	Conscious
(% of dose･min/g tissue)				
OB	32.7	22.4	14.2	11.5
CR	14.1	8.24	26.3	19.5
CL	45.5	21.0	17.3	8.26
HI	17.5	17.5	31.2	18.4
Whole brain	19.5	11.3	24.8	17.5
(% of dose･min/mL)				
CSF	74.8	57.9	53.6	35.8
Plasma	291.3 ± 60.5	111.3 ± 34.1	58.83 ± 2.03	52.47 ± 2.35

$AUC_{tissue/plasma}$	IV			IN		
	Anesthetic	Conscious	Ratio	Anesthetic	Conscious	Ratio
OB	0.11	0.20	0.56	0.24	0.22	1.10
CR	0.05	0.07	0.66	0.45	0.37	1.20
CL	0.16	0.19	0.83	0.29	0.16	1.87
HI	0.06	0.16	0.39	0.53	0.35	1.51
Whole brain	0.07	0.10	0.66	0.42	0.33	1.27
CSF	0.26	0.51	0.50	0.91	0.68	1.33

表 2　経鼻投与後の脳移行効率に関するパラメータ

	DTI		DTP (%)	
	Anesthetic	Conscious	Anesthetic	Conscious
Brain	6.29	3.28	84.1	69.5
CSF	3.55	1.31	71.8	23.8

*AUC*tissue/plasma は、IV では覚醒群で、IN 群では麻酔下群で高値であった。また、麻酔／覚醒両群間 *AUC*tissue/plasma 比（Ratio of *AUC*tissue/plasma）は、IV では 1 より低く、IN では 1 より高い値であった（IV：脳; 0.39-0.83、CSF; 0.50、IN：脳; 1.10-1.87、CSF; 1.33）。これらの結果から、IV では麻酔下で脳移行性が低下する一方で、IN では麻酔により脳移行性が向上することが明示された。

次に、経鼻投与後の脳移行効率を評価するため、*DTI* および *DTP* を算出した（**表 2**）。*DTI* は両群で脳、CSF ともに 1 より高い値が得られたことから、IV と比較して IN の優位性が示された（*DTI*; 1.31-6.29）。さらに、経鼻投与後に鼻腔から脳へ直接移行した割合 *DTP* から、経鼻投与後の脳移行経路に関する定量解析を試みた。覚醒時と比較して、麻酔下では脳、CSF ともに *DTP* が高値となった。従って、IN では、麻酔により直接移行経路を介した caffeine の脳移行が促進されることが明らかとなった。

近年に報告された脳内体液循環システム glymphatic system により脳内の物質はダイナミックに脳内循環することが明らかとなり、脳実質と CSF など脳内体液との間で物質交換が頻繁に行われていることが知られるようになった [8]。さらに、この glymphatic system は麻酔下や睡眠時に活性化されることが報告され [9]、生理機能の変動が物質の脳内循環に影響を与えることが考えられた。本研究では、麻酔下で、経鼻投与後の脳移行性が改善することが明らかとなり、さらに、直接移行経路を介した脳内送達が促進されることが明示された。本結果から、経鼻投与後、caffeine は嗅神経周辺部 CSF に移行した後、CSF とともに脳内を循環し、CSF-ISF 交換機構で脳実質内まで送達される可能性が示された。鼻腔から脳への

薬物移行経路を評価した報告はこれまでになく、本成果が新規知見であると同時に、現在でも不明瞭な鼻腔から脳への薬物移行メカニズムの解明に繋がる重要知見が得られた。実用性のある経鼻薬物送達システムとして確立するためには、実際の治療効果を検討し有効性を明確に示す必要があるため、今後は、中枢疾患モデル動物に対する治療効果の検討を予定している。

結論

過去に、経鼻投与後の直接移行経路の寄与度や変動を定量評価した例はなく、本研究成果が初知見と考えられる。脳部位別に薬物移行動態を解析し、DTPを利用した脳移行経路の分離評価を行うことで、経鼻投与後の脳移行動態を詳細に定量評価できることが明らかとなった。今後は、経鼻投与後の脳移行メカニズムの詳細解明に向けた研究を継続し、脳内薬物送達性の変動因子を解明することで、経鼻投与を有用な脳内薬物送達システムとして確立させ、中枢系疾患に対する有効な薬物治療戦略の開発を目指したい。

参考文献

1) 厚生労働省「認知症施策推進総合戦略～認知症高齢者等にやさしい地域づくりに向けて～」（新オレンジプラン）, 2017.
2) Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri C.P, The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 9 (1), 63-75, 2013.
3) van Rooy I, Cakir-Tascioglu S, Hennink WE, Storm G, Schiffelers RM, Mastrobattista E., In vivo methods to study uptake of nanoparticles into the brain, *Pharm. Res.*, 28 (3), 456-471, 2011.
4) 中林哲夫、玉浦明美、近野健一、日本における医薬品開発の現状と展望　精神神経疾患領域の臨床開発を中心に，*ファルマシア,* vol. 47, No. 9, 2011.
5) Chapman CD, Frey WH 2nd, Craft S, Danielyan L, Hallschmid M, Schiöth HB, Benedict C., Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans, *Pharm. Res.*, 30 (10), 2475-2484, 2013.
6) Mistry A, Stolnik S, Illum L., Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int. J. Pharm.*, 379 (1), 146-157, 2009.
7) Illum L, Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality?, *J. Pharm. Pharmacol.*, 56 (1), 3-17, 2004.
8) Iliff JJ, Nedergaard M, et al., A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β. *Sci. Transl. Med.*, 4 (147), 147ra111, 2012.
9) Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M, Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*, 342 (6156), 373-377, 2013.

ドイツ健康靴の日本市場への導入・定着に関する歴史的研究

就実大学　経営学部

三浦　紗綾子

概要

本研究の目的は、ドイツ健康靴及びその関連技術（靴を足に合わせる調整技術）が、日本にいかに定着したかを明らかにすることにある。本研究では、とりわけ、ドイツ健康靴市場の定着に寄与した企業の、雑誌記事や書籍といった資料に残されていない行動や戦略的意図について、インタビュー調査によって明らかにする。

本件研究によって明らかになった事実は大きく分けて 3 つある。第一に、日本でドイツ健康靴を最初に輸入したアリス社の設立経緯を明らかにした。第二に、ドイツ健康靴に関連する技術を学ぶ研修の場を設けた 4 大卸と、小売の間では、ビジネス上の戦略や志向性の違いによる相互作用があり、それ故に時期によって異なる研修の場が栄えたことと、そのプロセスの詳細が明らかになった。第三に、ビジネス上の思惑による相互作用を超えて、業界を横断する団体が設立されたが、その経緯も明らかになった。

1　本研究の目的

本研究の目的は、ドイツ健康靴とその関連技術がいかに日本に根付いたのかを明らかにすることである[1]。ドイツ健康靴が日本に輸入されはじめた 1980 年代当時、それは特異な存在だった。「コッペパン」や「ナマズ」と言われるような“おしゃれ”ではない靴なのに、当時でも 3 万円ほどする高価な靴だったからである。本研究では、とりわけ、雑誌記事や書籍といった資料に残されていない、ドイツ健康靴市場の定着に寄与した企業の行動や戦略的意図について、インタビュー調査によって明らかにする。

2　学術的背景

日本人の健康にとって靴は重要であるにもかかわらず、ドイツ健康靴導入・定着の経緯についてこれまでほとんど研究は進んでいない。またそもそも、産業規模の小ささ故、靴産業に関する研究自体がほとんど見られない状況である（三浦、2017）。しかし靴は「生活の質」（Quality of life）に関わる重要な製品である。生活の質と密接な関係があるにもかかわらず国の経済力には大きな影響を与えてこなかった産業の歴史的研究は、靴産業に限らず相対的に遅れていることが指摘されている（佐々木、2009）。しかし、生活の質の向上に関わるが故に、そうした製品を人々に根付かせるための活動は、新たな文化の形成に結びつく（佐々木、2009）。このように、生活の質の向上に関わる製品が導入され日本市場に定着したプロセスを明らかにすることは、魅力的な研究課題である。

ドイツ健康靴についての限られた既存研究から明らかになっているのは、以下の点である（三浦、2018）。

① 「コッペパン」や「ナマズ」と言われるような“おしゃれ”ではない靴なのに、1980 年代半ば当時でも 3 万円ほどする高価な靴だったので、最初は売れなかったが、1990 年ごろから売れ始め、バブル崩壊後も市場は拡大した。

② 1980 年代半ば頃に日本への組織的輸入が始まった（それ以前にも持ち込まれたことはあったかもしれないが、企業が商品として輸入を開始したのはその頃から）。その最初の会社は 1983 年に設立されたアリス社であった。

③ 輸入卸大手として活躍したのはアリス社と、バン産商、清水要（足と靴の科学研究所）、シュリット、の 4 社であった。

④ それらの 4 社は、初めはドイツ健康靴を輸入するだけであったが、1990 年前後から、整形外科靴マイスターを招いて、ドイツ健康靴を顧客の足に合わせるようにする調整技術に関する研修を、小売相手に始めた。整形外科靴マイス

ターとは、整形外科的知識を持って、医師の処方に基づいて靴を制作する、国家資格に合格した職人のことである。

⑤ そうした場で小売店が学ぶことで、小売店は、「コッペパン」や「ナマズ」のような“おしゃれ”ではないが高価なドイツ健康靴が、いかに足の健康によいかを説得し販売する技術を身に付けて行った。

3 本研究の成果

インタビュー調査とその裏づけを取るための文献調査から、①アリス社設立の経緯と、②ドイツ健康靴関連技術の研修にまつわる卸 4 社の相互作用と、それらと小売との相互作用の詳細、③それを経た業界横断組織の発足の経緯が明らかになった。

3.1 アリス社設立の経緯

ドイツ健康靴の日本における最初の輸入卸であるアリス社は、1983 年にドイツ人女性アリス・クリスチャンスによって神戸で設立された。神戸医科大学整形外科学講座（当時。現、神戸大学医学部整形外科）の学生や教員にドイツ語を教えに行っていた彼女が、同講座教授の柏木大治（当時）から、足の悩みに対応した靴がドイツにはあるようだから紹介してもらえないかと相談を受けたことが会社設立のきっかけである[2]。また素人ではあったが靴には関心があったので、ドイツ健康靴の輸入に乗り出すことにしたことは既知の事実である。

しかし、(1) なぜクリスチャンスが日本にいたか、(2) 靴に関心を持っていたのはなぜか、(2) 靴については素人だったクリスチャンスがなぜ靴の輸入ビジネスを開始することができたのは不明であり、本研究でこの点が明らかになった。

アリスが日本にいたのは、クリスチャンスの夫が、ドイツの産業機械メーカー、ヨハネス・リッカーマン社の日本総代理店リッカーマン社の副社長として日本にいたからであった[3]。リッカーマン社はドイツ健康靴を扱っていたわけではなかったが、医療関係機器の取り扱いはあった。したがって、夫の知識やネットワークを活用して、クリスチャンスはドイツ健康靴の輸入会社 K. K. アリスを 1983 年に開始するに至った[4]。

クリスチャンスは、靴には素人とはいえ関心があったといわれているが、靴に関心があった理由としては、息子の存在が挙げられる。クリスチャンスは、知り合いの川村義肢株式会社川村一郎社長（当時）に対して、息子ステファンに履かせるために、ドイツには良い靴が色々あるのに日本にはないと述べていた[5]。子どもを育てる上で、靴に関心を持っていたことが伺える。

なお、川村は、「やってみなはれ」が口癖で、クリスチャンスに対しても、「ほんならあんたが［輸入を］やらはったらよろしいねん。［ドイツに］あるなら」と言ったという[6]。そうした経緯故、アリス社が 1987 年に神戸に直営小売店を設立して開始した、月 1 回の消費者向けの相談会には、毎回、川村義肢の社員を手伝いに派遣していた[7]。

3.2 ドイツ健康靴関連技術の研修にまつわる卸・小売の相互作用

ドイツ健康靴の 4 大卸会社が 1990 年前後から靴小売向けの教育・研修の場を設けたのは既知の事実である（表 1）。いずれも、整形外科靴マイスターをメイン講師として研修が行われていた。また、ドイツ健康靴を扱う小売店が、自主研修の場として G. O. S. R.（German Orthopaedic Shoe Research、ドイツ整形靴研究会）を 1999 年に発足したことも既知の事実である（表 1）。

アリスと足と靴の科学研究所、バン産商、シュリットが、卸として、小売店をある程度組織化して研修の場を提供していく理由としては、自社が扱うドイツ健康靴を正しく取り扱うことによって販売を拡大してもらうためだと解釈できる。しかし、（1）4 社という限られた企業が提供する各研修の場にどのような相互作用があったか、（2）なぜ小売によって G. O. S. R.が設立されたかについては十分に明らかになっていなかった。

表１　ドイツ健康靴関連技術研修の場

開始	運営主体	学校名、講座名	研修期間（頻度）
1987	アリス	フィッティング研修（正式名称不明）	詳細不明
1989	足と靴の科学研究所	フット・アンド・シューアカデミー	約2年
1992	シュリット	シュリット・オーソペディック・セミナー（2000年からは学校、フロイデに）	約2年
1993	バン産商	ベーウントエムハウグ・フスフレーゲ専門学校東京店によるトータル・コンフォート・セミナー（1996年からはフスウントシューインスティテュートに）	数日～数週間
1999	小売有志	G. O. S. R	定期的に勉強会開催

（出所）筆者作成。

調査の結果、ドイツ健康靴関連技術の研修に際して、卸４社は相互に影響を与え合ってきたこと、卸とその研修に参加した小売の間にも相互作用がありG. O. S. R.が設立されるに至ったことが分かった。

最初に整形外科靴マイスターをドイツから招聘したのはアリス社であった。アリス社が 1987 年に直営小売店を開設し、そこを取引先への研修の場にも活用したのである。扱っていたゾリドゥスやその他の靴のフィッティングについての研修を行った[8]。ドイツ健康靴に注目し、先駆的にそれを扱ってきた靴小売店は、この研修に参加した。

ただし、フィッティングについての研修は行ったものの、アリス社のアリス・クリスチャンスの姿勢は、靴の中に入れるアインダーゲン（英語でフットベッド。中敷）の調整まで行うのは資格を有する整形外科靴マイスターで、そうでない人は靴の中をいじるべきではないというものであった[9]。

これに満足しなかったのが、シュリット社長の久世泰雄である。久世は、顧客の足にあった靴を提供するためには、アインダーゲンの調整が必要と考えた。そこでドイツのクレマー社、シュピース社から、靴とアインダーゲンの輸入を開始した。これらを、整形外科靴マイスターではない日本の小売店に正しく使ってもらうために、彼は小売店に対する研修を開始した[10]。

1992 年には研修の場として直営のテクニカルショップ・シュリットを開設し、研修の定期開催を始めた[11]。久世の考えに賛同した小売はそれ以前から不定期の研修に参加してきたが、それが口コミで広がって、1993、1994 年ごろには研修は最盛期を迎えた[12]。シュリットは、ドイツに研修に出かけるというツアーも定期的に企画した。

ただし、久世のセミナーに対して満足できない小売も出てきた。第一に、整形外科靴マイスターの研修内容が必ずしも一貫しない、第二に、かなりの研修代を払って研鑽を積んできたのに、研修終了証の類が一切発行されない、というのが不満の理由だった。第一の点については、当時はまだ制度が整っておらず観光ビザでマイスターを呼ぶしかなかったので、人が頻繁に入れ替わっていたことが挙げられる[13]。小売店モネ・テラモトの社長寺本雅映は、今にして思えば、マイスターにもそれぞれ癖や特色があり、同じことをさまざまな角度から述べているのが分かるが、当時学び始めたばかりの自分たちはそれが分からなかったと述べている[14]。第 2 の点について、シュリットの意図は不明であるものの、学んだ証をと求める小売に対して証書は結局出されなかった[15]。

それ故、シュリットの研修に参加していた企業は、自ら研修の場を作ることを考え、G. O. S. R.が結成された。これは、資金をプールしてマイスター等の講師を自ら呼ぶとともに、共同購入を行って卸に対するパワーを持つことも意図された組織だった[16]。小売 20 人程度で発足した[17]。

ただし、この小売のネットワークに拘束されたくないと考える小売もいた[18]。彼らが求めた新たな研修の場が、バン産商社長の遠藤道雄が 1990 年代半ば以降にマイスターを招聘して始めたセミナーである。こちらも研修代を払うことに変わりはなかったが、最終的にはドイツに行って試験を受けて、合格したら証書が出るという仕組みになっていた[19]。この１期生の栗林によれば、それはオートテッククラブという名称で呼ばれていた。なお、おそらくこれと同じものを指していると思われるが、バン産商は 1996 年にはフス・ウントシュー・インスティテュー

トという学校を正式に設立している。

こうした流れとはあまり関りがなかったのが、足と靴の科学研究所の清水昌一によるフット・アンド・シュー・アカデミーである。アリス社が日本に始めて招聘したドイツ人整形外科靴マイスター、カール・ハインツ・ショットを、自らの研究所に引き入れて、彼を中心に独自の健康靴を開発したり、研修プログラムを開発したりしたというつながりはあった（清水、1995）。しかしその研修の場に参加した小売は、他とあまり重複がなかった。

この理由として考えられるのは、以下の4点である。第一に、シュリットとバン産商は東京を本拠とする会社であるが、足と靴の科学研究所は名古屋が本拠地で、地理的に距離があった[20]。

第二に、他のセミナーは必ずしも一人のドイツ人マイスターが前面に出てくることはなかったが、フット・アンド・シュー・アカデミーでは、ショットがメイン講師であった[21]。第三に、足と靴の科学研究所が主力で扱ったのはショットと開発した「ショット・シューズ」であり、輸入したドイツ健康靴ではなかった。この第二、第三の理由が、自然と、それに共鳴する小売店を選別したと思われる。

さらに第四に、清水自身にも、卸としての事業拡大の志向性が強くはなかった。彼には、ドイツ健康靴を扱う以前に父が経営していた卸を、自らの拡大志向によって倒産させた経験があり、健康靴を扱う会社として同社を再建した際には量を追わないことを決めていた（清水、2015）。直営小売店で会員制をとって自社開発のショット・シューズの販売を行っていたので、その最低ロットを売るのに自店では足りない分だけ他店に卸す必要があった。それ故、4、5社の小規模で取引を開始した[22]。またアカデミーへの参加者も毎年5名程度と限定していた[23]。

以上をまとめると、卸4社と小売の互いの戦略や志向性の違いにより、時期によって栄えた研修の場が異なったり、新たな研修の場が出来たりした。

3.3　業界横断組織設立

このように、互いがビジネスを行っているので、分かれたりまとまったりが繰り返されたが、2001年にはビジネスの思惑を超えて、ドイツ健康靴関連企業500社が参加して、I. V. O. Japan（日本整形靴技術協会）が設立された[24]。ここには、卸4社全てとそれぞれに連なる小売も、G. O. S. Rのメンバーも参加した。

設立の端緒としては、ドイツを発祥とするI. V. O.本部が開催する国際大会への日本人の参加が増えていたことが挙げられる。各卸が研修ツアーを組んで小売を連れて参加し、G. O. S. R.も参加し、個人でも参加があり、合計50名程度が参加していた[25]。そこで、アジア初の世界大会を2003年にやらないかと本部からもちかけられて、その準備のために2001年にI. V. O. Japanが発足した。2003年には、I. V. O.世界大会東京大会の開催が実現した。その後は、年1回の国内大会の開催を続けてきた。

ビジネス上でライバルにあるシュリットやバン産商、足と靴の科学研究所が一同に介してI. V. O. Japanが発足し、活動を続けてきたのは画期的であった。それが可能だったのは、ビジネス上の思惑があったとしても、ドイツ整形外科靴とそれに関するマイスター制度の素晴らしさについては各企業とも合意していたからであり、それを日本でも広めたいとの目的は共有していたからである[26]。

3.4　発見事実のまとめ

本件研究によって明らかになった事実は大きく分けて3つある。

日本でドイツ健康靴を最初に輸入したのは1983年にクリスチャンスが設立したアリス社である。その背後には、クリスチャンスの夫であるリッカーマン社副社長や、川村義肢株式会社川村一郎の存在があったことが本研究で明らかになった。

またそうして輸入され始めたドイツ健康靴は、おしゃれでないのに高価というハンディがあったが、卸が研修の場を提供して、小売がそこで技術を学ぶことで、消費者を説得するすべを小売が身に付けていった。研修の場を設けた4大卸と、小売の間では、ビジネス上の戦略や志向性の違いによる相互作用があり、それ故、時期によって異なる研修の場が栄えた。本研究では相互作用の詳細が明らかになった。

さらに、こうしたビジネス上の思惑による相互作用を超えて、業界を横断する団体が設立されたが、その経緯も本研究にて明らかになった。I. V. O.本部からアジア発の世界大会を持ちかけられたことがその端緒であるが、I. V. O. Japan の設立が実現したのは、ビジネス上のライバルでありながらも、ドイツ健康靴とその関連技術の日本への普及を目指すことは各社共通の目的だったからである。

本研究で明らかになった事実を踏まえた、ドイツ健康靴の日本への定着の歴史は、論文として出版予定である。

謝辞

インタビュー調査に快く応じてくださった靴業界の皆さまに感謝申し上げます。またその遂行に対して助成下さったウエスコ学術振興財団に心から感謝申し上げます。

---

1 本稿でドイツ健康靴といいうとき、日本で流通する、医療制度を介さないドイツ・オーソペディ・シューズとヘルシー・シューズの両方を含む。ドイツでは、両者は明確に区別されている。医師の処方を基に、整形外科的技術を用いて整形外科靴マイスターが作成する保険適応の靴がオーソペディ・シューズである。そうした医療制度を介さない、足の健康に配慮した靴は、ヘルシー・シューズ（コンフォート・シューズ）と呼ばれる。しかし日本では、上記のような医療保険制度がなく、後述するように、整形外科靴マイスターの持つ整形外科的技術を一般の靴屋（卸・小売）が取り入れてきた。それ故、ドイツ製の足に配慮した靴やその関連サービスについて、それが医師を介さない一般に流通するものだとしても、オーソペディというラベルが付されてきた。

2 『フットウエア・プレス』「インタビュー　創業15周年を迎えたアリス　ドイツの健康靴を日本に紹介　コンフォートシューズ市場を開拓」1999年3月，p. 104-105。

3 マキの靴　シューズライフコーディネーター　真喜屋光子インタビュー、2017年10月1日。インタビュー自体は助成期間以前に行われたものだが、助成金によってテープ起こしをすることで、この事実が発見できた。このインタビューは、筆者が私用で沖縄を訪れた際に予定外に偶然行われた非構造的なもので、多岐にわたる話題を4時間にわたって聞いたため、全体のテープ起こしをするまで本事実を拾えていなかった。なお、東洋経済新報社・アイアールエム（1985）、p. 300に、副社長ウィリー・クリスチャンス名前が見られる。

4 注3と同じ。

5 川村義肢株式会社製造本部製造第1部製靴課主任技師　義肢装具士　1級義肢装具技能士　眞殿浩之インタビュー　2018年12月12日。

6 注5と同じ。［　］は筆者。川村グループ社内報川村一郎巻頭言集のタイトルは『やってみたらええ』である（川村義肢株式会社広報室、2013）。

7 そこに参加していたのが注5の眞殿である。

8 注1と同じ。

9 株式会社シュリット、株式会社アルカ　取締役社長　久世泰雄インタビュー、2018年3月9日。

10 注9と同じ。

11『フットウエア・プレス』「シュリット　直営のテクニカルショップをオープン」1992年8月、p. 102。

12 注9と同じ。

13 モネ・テラモト　代表取締役　寺本雅映インタビュー、2019年2月1日。

14 注13と同じ。

15 FOOTMIND代表取締役　栗林薫インタビュー、2019年1月31日。

16 注15と同じ。モネ・テラモトの寺本も、「靴業界的にはG.O.S.Rというのは煙たいんですよ。どこにも属さない、どこにもこび、売らない。そのくせ整形靴としてはそれなりにみんな販売していこうとするから」と述べている（インタビュー、2019年2月1日）。

17 注13と同じ。

18 注15と同じ。FOOTMINDの栗林もその一人だった。

19 注15と同じ。

20 ただし、場所を問わずさまざまな場に研修に出かけた小売も見られるため、これだけでは十分な理由にはならないだろう。例えば、アルファ美輝代表　木田倫子は、北海道の小売ながら、シュリットやバン産商の研修に参加し、G. O. S. R.のメンバーでもある（インタビュー、2018年10月4日）。また彼女は、当時の熱心な小売は研修の機会があればどこともいとわず飛んでいったと別の場で述べている（第14回日本整形靴技術協会学術大会京都大会での発言、2018年2月18日）。

21 それ故、ショットが来日しなくなってからは、アカデミーは開講されなくなった（足と靴の科学研究所　所長　清水昌一インタビュー、2017年12月14日）。

22 足と靴の科学研究所　所長　清水昌一インタビュー、2017年12月14日。

23 ただし清水は、小売店では会員制をとり、また1992年からは消費者向けに「靴のフェスティバル」と称した啓蒙イベントを企画して毎回数千人を集めていた（清水、1995）。シュリットの久世によれば、清水は、これらの場を通じて、消費者に直接、かなりの量のショット・シューズを販売していた（イン

タビュー、2018 年 3 月 9 日)。
[24] 注 22 と同じ。
[25] 注 15 と同じ。
[26] 足と靴の科学研究所　所長　清水昌一インタビュー、2017 年 12 月 14 日；FOOTMIND 代表取締役　栗林薫インタビュー、2019 年 1 月 31 日。

参考

- 川村義肢株式会社広報室編（2013）『やってみたらええ　川村一郎』川村義肢株式会社。
- 三浦紗綾子（2017）「戦前の革靴産業―軍需と民需の推計―」『一橋商学論叢』Vol. 12, No. 1, pp. 54－61。
- 三浦紗綾子（2018）「ドイツ健康靴を売る―先人たちの挑戦」第 14 回日本整形靴技術協会学術大会京都大会，京都大学芝蘭会館（京都府京都市），2018 年 2 月 18 日。
- 佐々木聡監修（2009）『暮らしを変えた美容と衛生』芙蓉書房出版。
- 清水昌一（1995）『歩くこと・足そして靴』風濤社。
- 東洋経済新報社・アイアールエム編（1985）『外資系企業総覧　1986 年版』東洋経済新報社。

新しい細胞動態評価法でスクリーニングした抗腫瘍薬の応用

川崎医科大学 生化学教室

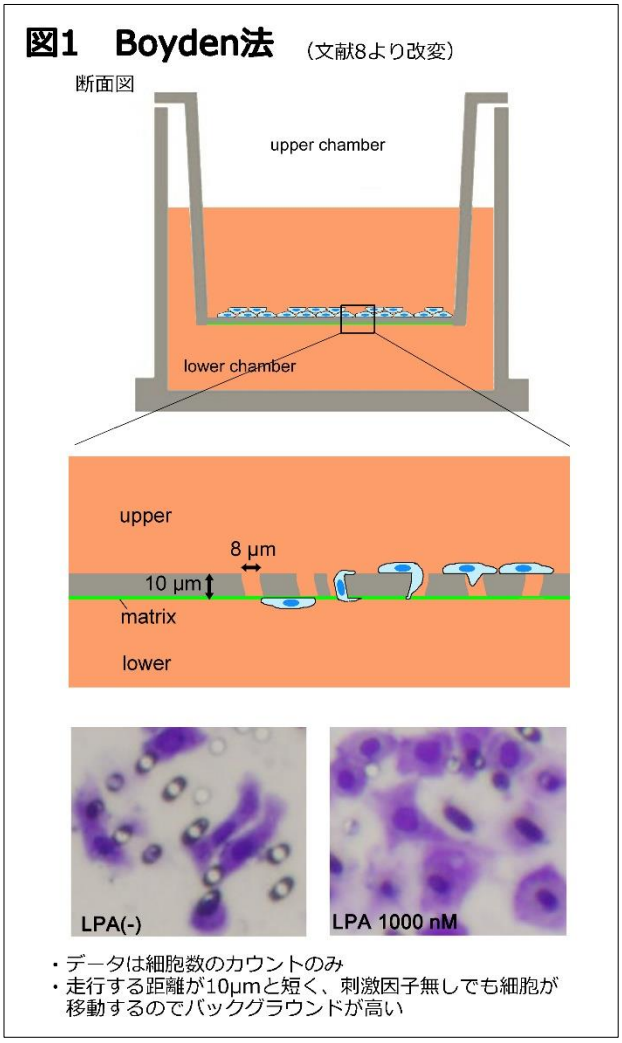
山内 明

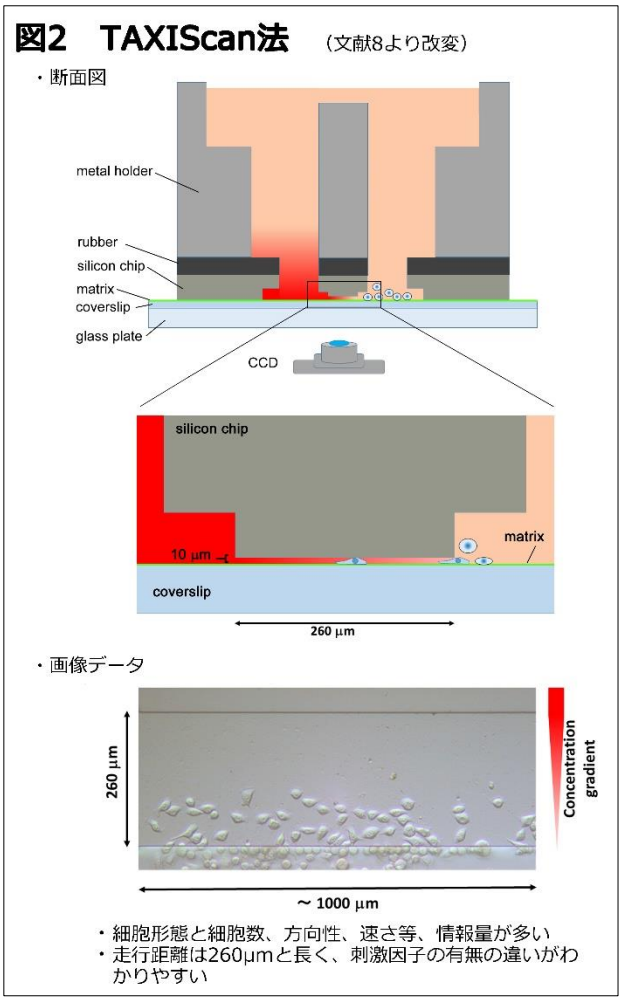
（概要）悪性新生物（癌）は日本人の死因第１位であり死亡率は増加の一途である。癌は転移・浸潤を抑えることができれば手術により治癒が期待できることから、我々は転移・浸潤を標的に治療法を模索してきた。その試みの一つとして、最近我々は癌細胞の細胞動態を評価する実験系を確立した。この評価系を用いて、既知・新規の化合物をスクリーニングし、新規化合物４種が癌細胞の移動を抑制することを見出した。この化合物は細胞生存には影響がなく移動のみを抑えることが示された。ヒット化合物の１つは、担癌マウスの腫瘍の増大と転移の両方を抑える効果があることが分かった。現在この抗腫瘍効果の分子メカニズムを解析中である。本ヒット化合物は癌転移抑制という新しい機序に基づいた癌治療薬となりうると考えられる。

【背景】

悪性新生物（癌）は 1980 年代に日本人の死因の第 1 位となり、その後高齢化社会の到来とともに死亡率が右肩上がりに増大している（文献 1)。癌細胞は増殖する形質と転移・浸潤する形質の両方を併せ持ち、死因の主たる原因とされるのは転移・浸潤であると考えられている。ほとんどの癌の病期分類では遠隔転移があるとステージⅣとされ、手術の適応が無くなり、抗癌剤や放射線などの集学的治療が主になってくる。つまり、転移・浸潤を抑えることができれば、手術によって取り除くことで治癒を目指すことができると考えられる。

癌細胞が転移するのは、細胞が移動する形質を持っており、正常細胞よりも移動する能力が高いからだと考えられる。細胞の移動を評価する方法として、Boyden 法（図 1、文献 2)、Zigmond 法（文献 3)、Dunn 法（文献 4）などいくつかの方法が開発されたが、どれも一長一短で、限界があった。例えば Boyden 法を使った評価法は、厚さ 10μm 程の多孔性の膜をすり抜けた細胞の数を数えて評価する方法で、細胞数は計測することができるが、細胞の形や移動の速さなどは不明である。また、Dunn 法、Zigmond 法では画像解析が主で、細胞の形は捉えることができるが、細胞集団全体の評価には向かない。近年、これらの短所を克服する画期的な細胞動態評価方法が Kanegasaki らによって考案された（図 2、文献 5)。TAXIScan 法と呼ばれるこの方法は、画像解析による細胞動態の計測方法であり、微量のサンプルで、移動する細胞の数と速さ・方向性に加えて細胞形態も同時に解析できるものである（文献 6)。筆者らはこの方法を応用して、白血球の細胞遊走の解析を行ってきた（文献 7)。最近、癌細胞、特に膵癌細胞の細胞動態を評価する実験系を確立した（図 3、文献 8)。この評価方法では、細胞の移動に影響を及ぼす物資





の効果も評価できる。

本研究では、TAXIScan 法を用いて、膵癌細胞の遊走を制御する化合物を見出し、新しい癌治療薬へ応用することを目的としており、その初期段階である化合物のスクリーニングと抗腫瘍効果の評価を行ったので報告する。

【材料と方法】

試薬：RPMI1640 培地は Sigma 社から、ウシ血清アルブミンはナカライテスク社から購入した。

細胞：ヒト膵癌細胞株 BxPC-3 を用いた。BxPC-3 細胞は、10%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地にて培養し、実験日に接着した培養皿から剥離して用いた。緑色蛍光タンパク質 GFP を発現した BxPC-3 細胞は AntiCancer 社から購入した。

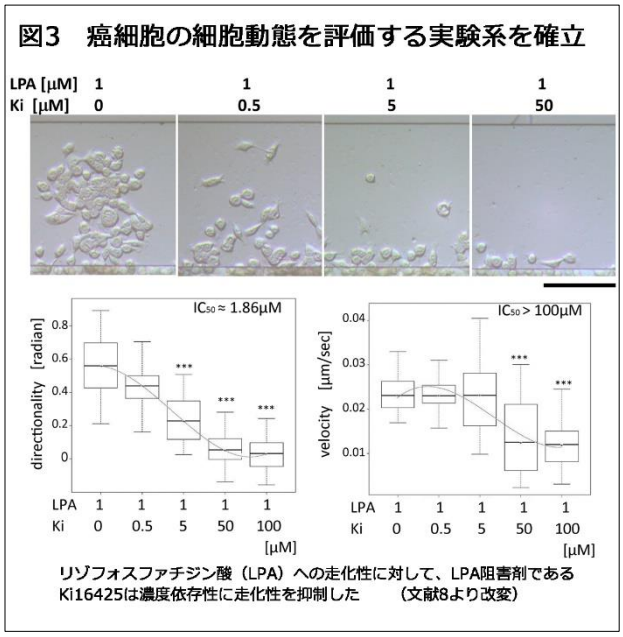
化合物ライブラリー：市販の化合物ライブラリー（CaymanChemical 社）およびアカデミア保有の化合物を用いた。合計 200 種の化合物について評価した。

細胞動態アッセイ：細胞動態測定および細胞遊走抑制効果の判定は EZ-TAXIScan（ECI 社）を用いて行った（文献 5）。予め BxPC-3 細胞と各化合物（最終濃度 10μM）を 24 時間または 72 時間共培養した後に、細胞を培養皿から剥離し、アッセイバッファー（0.1%ウシ血清アルブミンおよび 20mM HEPES 含有 RPMI1640 培地）に $2x10^6$ 個/ml の濃度で懸濁し、EZ-TAXIScan へアプライした。遊走を刺激するリガンドは 10%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地を使用した。移動する細胞の数、速さ、方向性の解析は、アッセイした画像を取得後に TAXIScanAnalyzer2 ソフトウェアを用いて行った（文献 6）。

細胞毒性評価：WST-1 アッセイキット（タカラバイオ社）を用いて細胞生存能力を評価した。

動物実験（異種異所移植実験）：生体内での抗腫瘍効果を評価するために、ヌードマウス（BALB/c-Ajcl-nu-/nu, 6 週齢、雄）に BxPC-3 細胞を 1 匹あたり $1x10^6$ 個、背部に接種し、1 週間後に米粒大の腫瘍形成を確認した後、既存薬 Gemcitabine（腹腔投与、1mg/匹）、または化合物（経口投与、1mg/匹）を週 1 回、7 週間に渡って投与した。腫瘍径を週 1 回計測し、次の変換式で腫瘍体積を推定した。

腫瘍体積 $[mm^3]=(長径[mm])\times(短径[mm])^2 \times 1/2$



動物実験（異種同所移植実験）：ヒト化合物による癌転移抑制効果を評価するために、ヌードマウス（BALB/c-Ajcl-nu-/nu, 6 週齢、雄）に GFP ラベルした BxPC-3 細胞（AntiCancer 社、一部の実験を委託）を 1 匹あたり 1x10^6 個、背部に接種し、数週間後に形成された腫瘍形成を外科的に取り出した。取り出した腫瘍を 4 mm^3 の大きさに刻んだ後、別のヌードマウスの膵臓へ移植した。移植後 50 日間に渡って体表から GFP の蛍光を検出し、1 週間毎に蛍光の個数を評価するとともに蛍光量を測定した。

【結果と考察】

膵癌細胞の移動を抑制する化合物

細胞動態解析方法 TAXIScan 法を用いて、膵癌細胞株 BxPC-3 の胎児血清への移動に対して、既知・新規をともに含む 200 種類の化合物の中から、移動を抑制する化合物をスクリーニングした。この中から 4 種の化合物について、BxPC-3 細胞移動の速さを抑制する新規化合物（A, B, C, および D）を見出した（図 4）。この結果は、これらの化合物が膵癌細胞の胎児血清への走化性を抑えることを示している。この抑制効果が、細胞移動機構の抑制によるものか、細胞毒性によるものかを検討する必要があり、次の実験に進んだ。

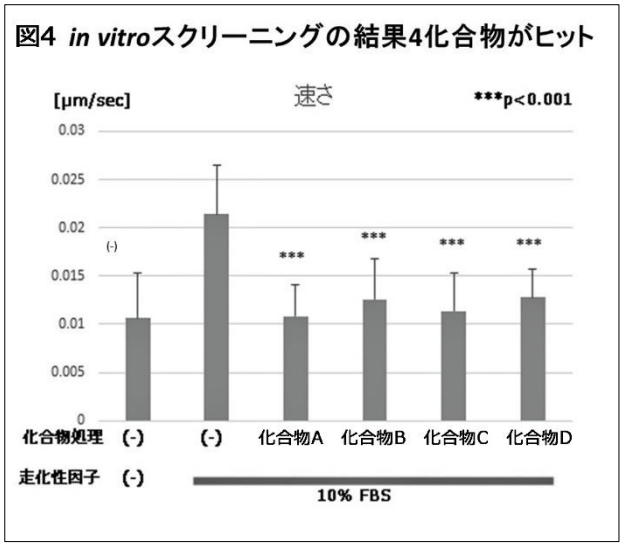


図4 *in vitro*スクリーニングの結果4化合物がヒット

ヒト化合物の細胞毒性

細胞動態評価にてヒットした化合物 4 種について、WST-1 アッセイ法にて、細胞生存能力を評価した。細胞は BxPC-3 細胞を用い、確実に細胞毒性を示すコントロールとして、膵癌治療の既存薬 Gemcitabine を用いた。その結果、Gemcitabine では 1μM の濃度で増殖抑制が観られたが、ヒット化合物 4 種どれも 32μM では毒性は観られず、100μM ではじめて増殖抑制が観られた（図 5）。このことから、ヒット化合物の細胞毒性は Gemcitabine よりも少なくとも 100 倍は低いこと、さらに、細胞移動抑制効果は、細胞毒性ではなく、細胞移動機構の抑制であることが分かった。

これらの化合物は、*in vitro* 実験にて細胞走化性を制御することから、新たな癌治療薬となる可能が示唆され、*in vivo* での抗腫瘍効果を確かめるために動物実験へ進んだ。

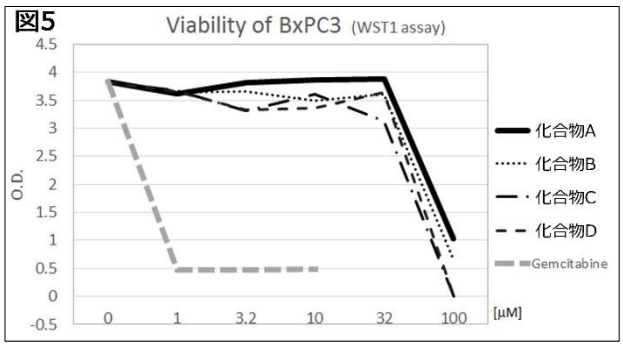
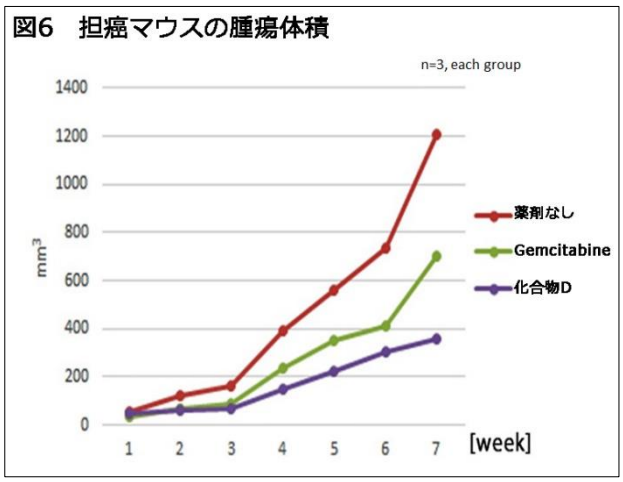


図5

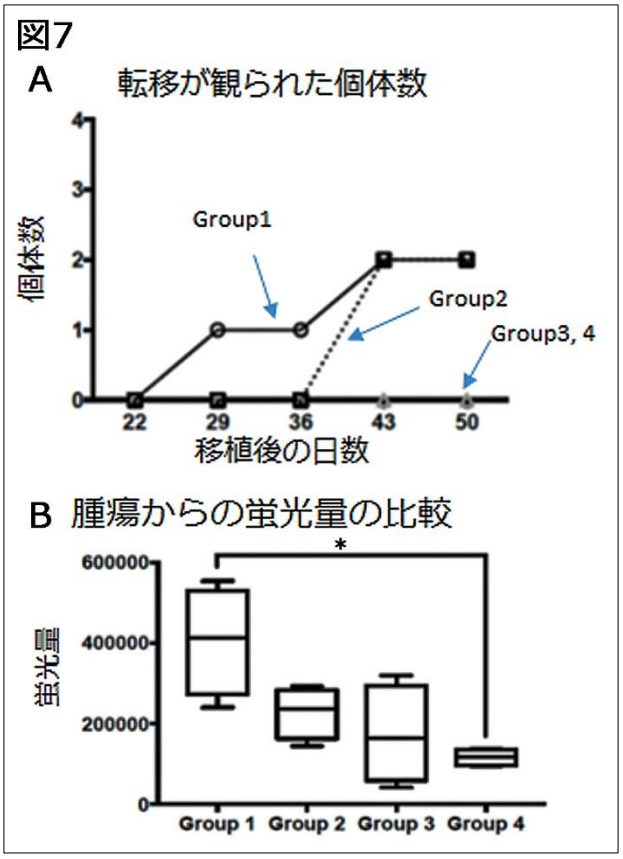
担癌マウスを用いた抗腫瘍効果

免疫不全マウスであるヌードマウスにヒトの膵癌細胞 BxPC-3 を背部に移植し、癌の増殖能を検討した（異種異所移植モデル）。*in vitro* 実験にて膵癌細胞の移動を抑制した化合物 4 種のうち 1 種（化合物 D）を膵癌治療の既存薬 Gemcitabine と比較した（n=3）。膵癌細胞を移植後、Gemcitabine を腹腔投与あるいは化合物 D を経口投与してその抗腫瘍効果を比較した。その結果、移植 7 週後には、薬剤なしの腫瘍体積（平均値）よりも Gemcitabine または化合物 D を投与したグループでは明らかに腫瘍体積（平均値）が小さかった（図 6）。

さらに、ヌードマウスの背部に緑色蛍光色素 GFP を発現した膵癌細胞 BxPC-3 を移植してできた腫瘍を取り出し、4mm^3 大に刻んだ腫瘍塊を別のヌードマウスの膵臓へ移植し、癌の増殖能を検討した（異種同所移植モデル）。4 つのグループ（各 4 匹）で検討した（グループ 1 ：薬剤投与なし、グループ 2 :



Gemcitabine, 1mg/匹, 腹腔投与, グループ 3：化合物 D, 1mg/匹, 経口投与, グループ 4：Gemcitabine+化合物 D、n=4)。体表から 50 日間に渡って蛍光を測定したところ、グループ 1 では 29 日目に、グループ 2 では 43 日目に転移巣とみられる蛍光が検出された。一方、グループ 3 およびグループ 4 では 50 日目までに転移巣とみられる蛍光像は検出されなかった（図 7A)。この結果は、化合物 D を投与したグループ 3、4 では癌転移が抑制されたことを示している。また、最終日（移植 50 日後）におけるそれらの蛍光量を比較したところ、グループ 1 よりもグループ 2、3 で低い傾向がありグループ 4 で有意に蛍光量は低かった（図 7B)。このことは、Gemcitabine または化合物 D を投与したグループでは腫瘍増大が抑制されたことを示している。



【まとめ】

今回、我々は新規化合物の中から、*in vitro* 実験にて癌細胞の走化性を制御し、*in vivo* 実験にて癌転移・浸潤を抑制する化合物を見出した。本ヒット化合物は癌転移抑制という新しい機序に基づいた癌治療薬となりうると考えられる。今後は、本化合物が癌転移を制御する分子メカニズムを解明し、治療のターゲットとすべき分子を見出すとともに、これらのヒット化合物を新しい抗腫瘍薬として開発できるよう努力したい。

【謝辞】

本研究を支援してください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。また、アカデミア保有の新規化合物をご提供くださいました福山大学薬学部町支臣成先生に感謝いたします。本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）橋渡し研究加速ネットワークプログラム（課題番号 JP18lm0203008）の支援を受けています。

【文献】

1. がんの統計 2017, 公財がん研究財団編
2. Boyden S. *J Exp Med.* 115:453-466, 1962
3. Zigmond SH. *J Cell Biol.* 75:606-616, 1977
4. Zicha D, et al. *J Cell Sci.* 99:769-775, 1991
5. Kanegasaki K, et al. *J Immunol Methods.* 282:1-11, 2003
6. Nitta N, et al. *J Immunol Methods.* 320:155-163, 2007
7. Yamauchi A, et al. *J Immunol Methods.* 404:59-70, 2014
8. Yamauchi A, et al. *BMC Cancer.* 17:234, 2017

糖尿病性腎症における糸球体内皮・上皮細胞連関における Inflammasome を介した炎症遷延化（慢性炎症）機序解明

（所　属）川崎医科大学　腎臓・高血圧内科学

（氏　名）長洲　一

（概要）

アルブミン尿は糖尿病以外にも、高血圧、肥満、メタボリックシンドローム等でも共通して出現し、この病態は慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease:CKD)と総称される。糖尿病性腎症を代表とする生活習慣病関連 CKD では、共通して血管内皮機能障害（Endothelial cell dysfunction:ECD）が付随する。多くの臨床研究よりアルブミン尿出現が CVD 発症と関連することからも内皮障害によってアルブミン尿が出現する蓋然性は高い。本研究では糸球体内皮細胞障害から糸球体上皮細胞障害への移行機序に Inflammasome 活性化の関与があることを示した。特に内皮機能の中で重要な eNOS-NO 経路の破綻は糸球体上皮細胞におけるミトコンドリア障害を介して NLRP3-Inflammasome 活性化を促す。この Inflammasome の活性化制御により糸球体硬化病変の形成を抑制しうる。今後はより直接的な Inflammasome 制御を介した慢性腎臓病治療開発を目指して研究を続ける。

（本文）

背景：本邦における腎臓病患者は増加傾向にあり、死因の第 8 位を占め、約 30 万人が透析療法を余儀なくされている。アルブミン尿は糖尿病性腎症の早期指標であり、同時にアルブミン尿が脳卒中、虚血性心疾患等の心血管病（Cardiovascular Disease:CVD)、認知症発症と強く連関していることも判明している。アルブミン尿は糖尿病以外にも、高血圧、肥満、メタボリックシンドローム等でも共通して出現し、この病態は慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease:CKD）と総称される。糖尿病性腎症を代表とする生活習慣病関連 CKD では、共通して血管内皮機能障害（Endothelial cell dysfunction:ECD）が付随する。多くの臨床研究よりアルブミン尿出現が CVD 発症と関連することからも内皮障害によってアルブミン尿が出現する蓋然性は高い。

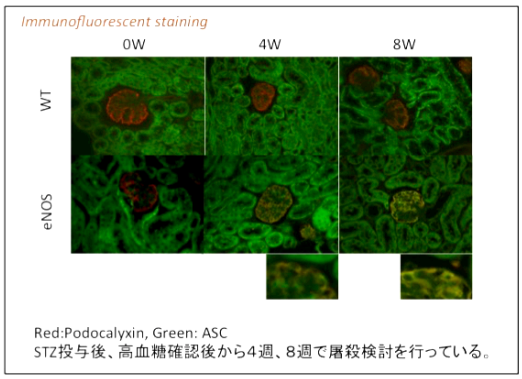
しかしながら既存の基礎研究から糸球体上皮細胞障害が腎不全に至る糸球体硬化病変の形成に重要であることが判明している。糸球体上皮細胞障害（特にミトコンドリアストレス、apoptosis）の結果、上皮細胞が脱落し糸球体硬化が進行する。これらの事実から**糖尿病性腎症はその進展とともに病態形成の主座が変わっていく。つまり最早期病態（アルブミン尿）には糸球体内皮障害が関与し、その後の腎不全に至る過程には、糸球体上皮障害が深く関与することが想定される。**このため糸球体内皮細胞から上皮細胞への障害機序伝搬・クロストーク機序（内皮―上皮連関）が想定されるが、実態は不明である。

そこで申請者は腎疾患進展における Inflammasome 活性化に着目した。申請者自身も腎疾患の進展における Inflammasome 活性化の重要性を報告している(Kidney Int. 2013)。特に近年は糸球体上皮細胞における Inflammasome 依存的慢性炎症の重要性が指摘されており、その制御機構の解明は臨床的意義が高い。

以上より「糸球体内皮細胞における eNOS-NO 経路は糸球体上皮細胞における Inflammsome 活性化を抑制的に制御する」との仮説が想起される。つまり糸球体内皮細胞機能正常に機能している時には NO により糸球体上皮細胞内の NLRP3 Inflammsome は抑制的に制御されている。一方で内皮機能障害により eNOS-NO 経路破綻を来すと Inflammsome が活性化され糸球体上皮細胞障害が惹起される。

① eNOS-NO 経路の破綻は糸球体上皮細胞障害を進行させる。

内皮障害モデルマウスとして eNOS 欠損マウスを使用する。糖尿病モデルを作成するため eNOS 欠損マウスおよび野生型マウス（WT）に Streptozocin（STZ）投与行い糖尿病を発症させた。継時的にアルブミン尿を測定したところ高血糖確認後４週で WT-STZ で軽微なアルブミン尿を認めたが eNOS-STZ では有意に増加していた。アルブミン尿の透過性には糸球体上皮細胞が大きな役割を担っている。このため糸球体上皮細胞障害を Desmin 染色で確認したところ、WT-STZ では認めない Desmin 陽性細胞が eNOS-STZ で顕著に認めた。また上皮細胞障害と密接に関連があるミトコンドリア障害を電子顕微鏡 (TEM)で評価したところ eNOS-STZ ではミトコンドリアの小型化と数の減少を認めた。次に Inflammasome 活性化を免疫染色（ASC: apoptosis- associated speck-like protein containing CARD）で評価した。ASC は NLRP3 Inflammasome 活性の Key molecule である。ASC−Podocalyxin 染色を行い Inflammasome 活性化の主座を検討する。糸球体内の Inflammasome 活性化(下図 Podocin-ASC２重染色)は糸球体上皮細胞で活性化していることがわかった。

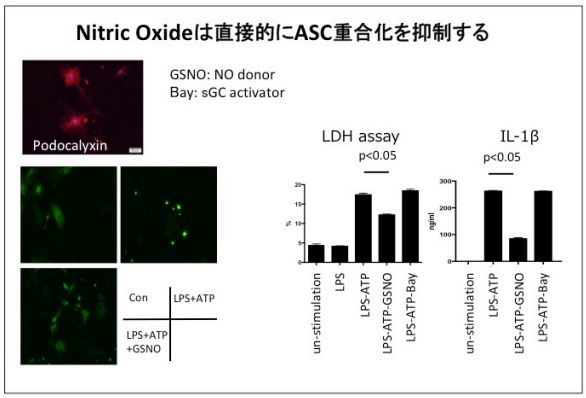


②Inflammasome 活性化制御は糸球体硬化病変の治療ターゲットとなりうる。

in vivo 実験で糸球体上皮細胞における Inflammasome 活性化と糸球体病変形成の関連について検討を行う。eNOS-ASC double 欠損マウスを作成し STZ 投与により糖尿病発症させた。eNOS-ASC-DKO では高血糖モデル作成してもアルブミン尿出現が抑制され、糸球体硬化病変が軽減していた。本知見より糖尿病性腎症による糸球体効果病変形成には Inflammasome 活性化が重要であることが示された。

③ Nitric Oxide は Inflammasome 活性化を制御する。

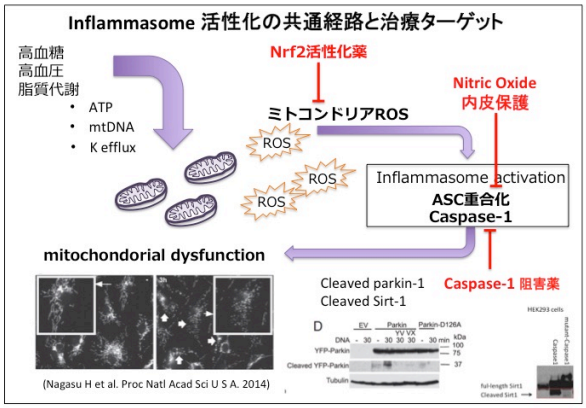
マウスより糸球体上皮細胞を採取し研究を行なった。ASC 欠損マウスより採取した糸球体上皮細胞に ASC-GFP plasmid を transfection 行い Inflammasome 活性化の指標である ASC の重合化を可視化した。LPS-ATP は一般的な NLRP3-Inflammasome の活性化刺激であり、これにより ASC が重合化することを確認した。また NO ドナーでこの重合化が抑制され、同時に Inflammasome 依存的細胞死（pyroptosis）が抑制された（下図）。しかしながら NO 下流のシグナルである sGC 活性化薬では Inflammasome 活性化を抑制出来ず、NO による直接的作用であることが示された。



以上の結果を踏まえ現在以下のような作業仮説を立て治療介入を試みている。

多くの生活習慣病主体の腎疾患では糸球体上皮細胞障害により糸球体硬化病変が形成される。その過程でミトコンドリア障害が重要であることは既知の事実である。

本研究よりこのミトコンドリア障害、特にミトコンドリア活性酸素が Inflammasome 活性化を介して糸球体病変形成に重要であることが示された。



カルバペネム耐性大腸菌の駆除を目指したファージ療法の開発

川崎医科大学　微生物学教室

川野 光興

本研究では、アンチセンス RNA を発現するファージを用いて、薬剤耐性の性質を付与する接合伝達プラスミドを保有する細菌のみを標的とする新規抗菌法の開発を行った。まず、細菌の生存に必須な遺伝子を標的とするアンチセンス RNA (asRNA) の発現により細菌の生育を阻害することのできる遺伝子発現系の構築を行った。次に、そのアンチセンス RNA による遺伝子サイレンシングシステムを、ファージとプラスミドの両方の性質を兼ね備えた M13 ファージミドに組込み、F 性線毛特異的感染作用を用いて宿主大腸菌株に導入し、それら細菌への生育阻害効果を調べた。その結果、臨床分離カルバペネム耐性腸内細菌科細菌において 99.999%以上の抗菌効果のある人工アンチセンス RNA 配列を複数同定することができた。この結果、ファージ療法研究において世界で初めて asRNA を用いた抗菌作用を得ることができた。本法は一般的なファージ療法と異なり、ファージ感染自体による殺菌および溶菌反応を伴わないため、エンドトキシンショックの誘発を低減でき、耐性菌の蔓延も防止できると考えられる。

1. はじめに

抗菌薬の濫用により、従来の抗菌薬が効かない薬剤耐性（AMR）細菌が世界中で増えている。さらに、複数の抗菌薬に耐性をもつ様々な「多剤耐性菌」が確認されている。特に「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）」は、細菌感染症治療において最後の切り札とされるカルバペネム系抗菌薬に対しても耐性を示し、臨床医療の現場での脅威となっている。このため、感染症の治療が困難になるケースが増加しており、その拡散伝播防止対策が臨床的にも公衆衛生学的にも最重要課題となっている。抗菌薬と耐性菌の問題は国内だけの問題ではなく全世界的な問題となっており、このまま対策が取られなければ、全世界における死者数は2050年までに1000万人にのぼり、1000 兆ドルの国内総生産が失われるとの試算もある[1]。しかし、製薬企業による新薬開発の重点はより多くの収益が見込める慢性病治療薬へと移り、抗菌薬の開発は急減している。耐性菌に対して抗菌薬以外の方法で制御可能な治療法を見出すことは重要かつ急務である。薬剤耐性菌の急速な増加による諸問題が明らかとなったことで、世界では薬剤耐性菌に対する代替治療法を模索している。そこで研究者に注目されている治療法の一つがファージ療法である。抗菌薬と比較した場合のファージ療法の利点は、その宿主特異性の高さにある。一般的にファージはある特定の細菌種（株）にのみ感染し宿主菌を殺す。標的細菌以外には一切影響を与えず、それ以外の生体内の常在菌といった良性の細胞を殺すことはない。ただ、現在のファージ療法には大きな欠点があり、現在治療に使われているバクテリオファージは自身の増殖のために宿主細菌の細胞を破裂させるため、それと同時に細胞内のエンドトキシンも外部に放出され、最悪の場合は患者の死につながるといった望ましくない副作用をもたらす可能性がある。また、利点として述べたファージの高い宿主特異性であるがこれは同時に欠点でもあり、患者にファージを薬として処方する際には感染症とその原因菌を正確に診断し、それに厳密に対応したファージを処方しなければいけない。ただ、この点に関しては複数種のファージを混合した「ファージカクテル」を処方することでも対応でき、この手法によってファージ耐性菌の出現を抑えることもできる[2]。

ファージ感染により生育阻害を引き起こす方法はいくつかあり、毒性タンパク質発現遺伝子を細胞内で発現させて殺菌作用を発揮する方法[3]や、抗生物質を無力化するタンパク質発現遺伝子の mRNA に

結合し、翻訳を阻害することのできる小分子 RNA を発現させることで抗生物質への感受性を高める方法[4]などが報告されている。我々は、まだ研究報告の例がない、大腸菌の必須遺伝子や Toxin-Antitoxin system（TA system、毒素-抗毒素システム）の antitoxin（抗毒素）を標的とした aRNA を利用して細菌を殺す方法を考案した。この方法の利点は、大腸菌の生育に必須なタンパク質の翻訳阻害や大腸菌に元々備わっている TA system における毒素タンパク質の発現を阻害する抗毒素タンパク質の翻訳阻害が小分子の asRNA によってのみ行われるため、大腸菌にとって有害となる asRNA が何らかの形で細胞外に放出されても副作用が起こりにくいという点である。今回、我々は大腸菌生育阻害の標的必須遺伝子として *rplN* を、TA system の標的抗毒素タンパク質発現遺伝子として *relB* を選び、これらの mRNA に相補的に結合する asRNA を発現する遺伝子をファージミドの系に組み込んで実験を行い、このシステムが組込まれた人工ファージミド保持ファージに感染した大腸菌の生育が阻害されるか調べた。

2. 材料と方法

1) プラスミド pMKN104

クロラムフェニコール耐性遺伝子を持つ pAZ3 プラスミドを改変し、アラビノース誘導プロモーターの下流にマルチクローニングサイトを持たせた 5192 bp のプラスミドである。1 細胞あたり約 20 のコピー数を保持する。以下、pMKN104-no insert とする。

2) プラスミド pMKN104-ArplNU

pMKN104 の P_{BAD} プロモーターにより、アラビノース存在下において 50S リボソームを構成する L14 タンパク質をコードする *rplN* mRNA の翻訳を阻害する ArplNU RNA (asRNA) を発現するプラスミドである。

3) プラスミド pMKN104-ArelBU

pMKN104 の P_{BAD} プロモーターにより、アラビノース存在下において抗毒素タンパク質を産生する *relB* mRNA の翻訳を阻害する ArelBU RNA (asRNA) を発現するプラスミドである。

4) LB+Cm(25)+ara(0.2%) プレート

LB プレートと同じ組成で混合液を作製し、121°C で 20 分間オートクレーブにより高圧蒸気滅菌した。溶液の温度が下がった後、クロラムフェニコール溶液（25 mg/ml）を終濃度 25 μg/ml、20% L-アラビノースを終濃度 0.2%となるように入れ、固まる前にディッシュ 1 枚あたり約 23 ml の培地を入れ、固まるまで静置し、4°C で保管した。

5) ファージアッセイ

ファージミド保持ファージを標的菌に感染させ、菌体内に侵入したファージミドによってアラビノース入りプレート上で生育阻害がみられるかを確認するために行った。大腸菌 MV1184 を 2 ml の 1×M9 グルコース培地で一晩振とう培養した菌液 100 μl を 10 ml の 2×YT 培地に加え、50 ml チューブを用いて 37°C で振とう培養した。OD_{600} が 0.8 のときに振とう培養を止め、培養液 1 ml とファージミド保持ファージ溶液 1 ml を混合し、37°C で 2 時間インキュベートした。2500×g で 15 分間遠心分離した後上清を除き、200 μl の 2×YT 培地を加えて菌体を懸濁した。懸濁液を 100 μl ずつ、LB+Cm(25)プレートと LB+Cm(25)+ara(0.2%)プレートの組み合わせで、または LB プレートと LB+ara(0.2%)プレートの組み合わせで塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、コロニー数を測定した。

3. 結果と考察

今回のファージ感染実験では、pMKN104-no insert、pMKN104-ArplNU、pMKN104-ArelBU を用いた。これらのファージミドのうち、pMKN104-ArplNU、pMKN104-ArelBU は、事前に形質転換にて大腸菌 TOP10 に導入し、アラビノースを添加した LB+Cm(25)液体培地を用いて、aRNA 発現による生育阻害が起きることを確認し、ファージ感染実験でこれらのサンプルが同様の生育阻害効果を発揮するかを調べた。次に、M13 ファージにファージミドをパッケージングさせるために大腸菌 TG1 を形質転換し、各種 pMKN104 ファージミドを導入した。次に、pMKN104 ファージミド保持菌でのモデル実験を行う際に作製した M13 ヘル

パーファージ液を用い、M13 ファージに各種 pMKN104 ファージミドをパッケージングさせ、各種 pMKN104 ファージミドを保持するファージ液を調整した。このファージミド保持ファージのタイターを測定したところ、1.0×10^9～5.0×10^9 pfu/ml であった。これらファージを用いてファージアッセイを行ったところ、pMKN104-ArelBU ファージミド感染ではコロニー形成能の低下は観られなかったが、アラビノース存在下において、pMKN104-ArplNU ファージミド感染によりコロニーの形成を 0.1%程度に減少することができた (Figure 1A, B)。

これらの結果から、生育必須遺伝子を標的とする aRNA を発現するファージを用いて世界で初めて抗菌作用を得ることができた。今回開発した方法は、耐性遺伝子の種類に依存せず、薬剤耐性プラスミド保有菌に特異的な抗菌作用をもたらす方法であるため、新規の薬剤耐性菌においても応用可能である。最近の臨床分離カルバペネム耐性腸内細菌科細菌を用いた実験では、99.999%以上の抗菌効果を示す aRNA を同定することもできた。今後は感染モデル動物実験を行い、治療効果の検証を行う予定である。

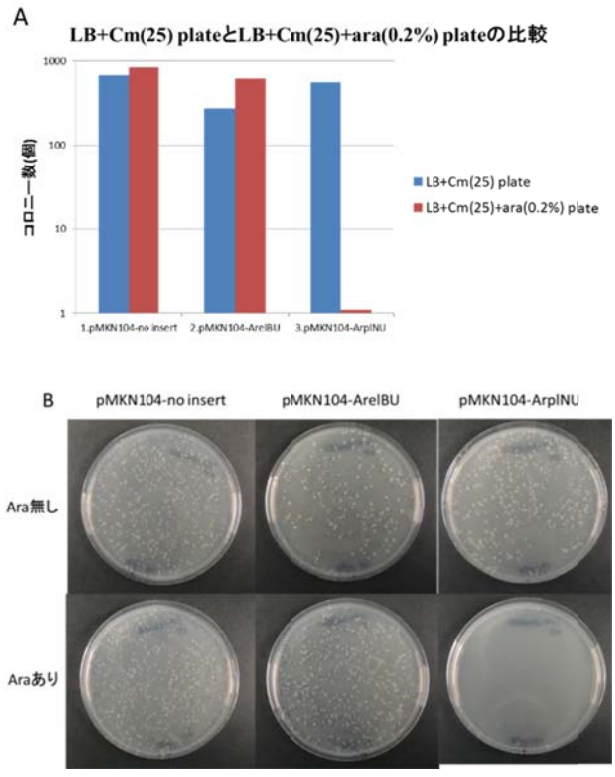


Figure 1. pMKN104-no insert, pMKN104-ArplNU, pMKN104-ArelBU ファージミドでのファージアッセイの結果。(A) ファージに感染した大腸菌 MV1184 をプレートに塗布し、37°C で一晩培養した後のコロニー数を示したグラフ。LB+Cm(25)プレートを用いてアッセイを行い、アラビノース無しは■、アラビノースありは■で示した。(B)アッセイを行ったプレートの様子。上段の写真はアラビノース (Ara) 無し、下段の写真はアラビノースありのものである。

4. おわりに

本研究課題を遂行することにより薬剤耐性菌を駆除できる方法を確立できれば、水平伝播による薬剤耐性遺伝子の拡散防止や、新規薬剤耐性遺伝子による耐性菌の出現を遅らせることができ公衆衛生的な問題に貢献できると思われる。将来的には、医療費を含む社会的・経済的負担の大幅な軽減にもつながると考えられる。

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心より感謝いたします。また、研究代表者が 2019 年 3 月末まで所属していた川崎医科大学微生物学教室の齊藤峰輝教授をはじめ教室員の方々には、研究支援をいただいたことに厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

1. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. (2014)

2. Tanji Y, Shimada T, Yoich M, Miyanaga K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. Appl Microbiol Biotechnol 64:270–274 (2004)

3. Russell K, Prerna B, Michael L, James C. Engineered Phagemids for Nonlytic, Targeted Antibacterial Therapies. Nano Lett. 15 (7), 4808-4813 (2015)

4. Vincent L, Aude B, Clovis B, *et al*, Silencing of Antibiotic Resistance in *E. coli* with Engineered Phage Bearing Small Regulatory RNAs. ACS Synthetic Biology 3(12):1003-1006 (2014)

腸内環境維持とコンディションに関する研究 –外環境変化と腸内細菌叢の関連–

川崎医療福祉大学　医療技術学部　健康体育学科

松生香里　脇本敏裕　斎藤辰哉　門利知美

（概要）

本研究は、外環境・季節変化と腸内細菌叢の変化の関連性を突き止めるため、3 年間の研究計画で実施している。春から夏への暑熱に対する順化（環境変化）に伴い、腸内環境（腸内細菌叢）が変化するかどうかを明らかにし、暑熱におけるコンディション維持のための一資料を作成することが目的である。将来的には、暑熱順化に関連する腸内細菌を同定し、夏季における腸内環境維持対策や、夏場の効率の良い水分摂取方法の確立などの運動を含めたコンディション処方の一助として現場貢献を目指している。

昨年度は、研究計画の 1 年目であることから、川崎医療福祉大学倫理委員会への申請・承認、さらに、運動生理学会へ参加し、類似研究の報告から意見収集を行った。また、研究実施に必要な消耗品を購入し、実験・測定準備が整い、全て計画通り順調に遂行している。2 年目に向けた 2019 年 3 月から実験協力者を募り予備実験を開始している。春から夏への暑熱に対する身体の順化を鍵とし、一過性の運動に伴う直腸温の上昇変化から、生理・心理学的指標と合わせて腸内細菌叢の関連について実験中である。

（背景）

腸内細菌は骨格筋の適応や恒常性維持に重要な役割を担っていることから、動物実験を用いて、「腸と筋」の関連を明らかにしてきた（Matsuo ら 2009）。

一方、運動処方を目的とした実践的研究では、中高年の運動習慣者を対象に、腹腔内圧を高めるトレーニング（腹圧トレーニング）を実施した。その結果、ベースラインの腸内細菌叢に異なりが見られ、体組成との関連性が認められた。体脂肪率が高い対象者は、腸内細菌叢のクロストリジウム属が多いことが示され、さらに、腹圧トレーニングの実施によって、便通の改善および、便形状の改善が認められた（河村、松生 2018）。

さらに、アスリートを対象とした研究で、高所トレーニング前後を含め、合計 4 回の腸内細菌叢を調べた結果、同じ食生活であるにも関わらず、各選手の腸内細菌叢のパターンが異なることを報告した（松生ら 2015）。興味深いことに、腸内細菌叢の変化が少ない選手は、安静時心拍数や体温等、自律神経系指標において、変化が小さいこと、また、高所順化・適応が容易にできる選手と適応困難な選手が存在することが明らかになった。これらの現場的・実践的研究の結果から、外環境の変化と生理学的指標および腸内細菌叢との関連は密接であることが考えられる。

（目的）

これらの実践的・現場的研究背景より、本研究は春から夏への暑熱に対する順化(環境変化)に伴い、腸内環境（腸内細菌叢）が変化するかどうかを明らかにし、運動処方現場やスポーツ選手のコンディション現場に活用できる資料を作成することを目的とした。本研究の初年度は、本研究課題の基礎となる研究の学会発表および運動可能な対象者の選定を中心とした情報収集の実施、川崎医療福祉大学倫理委員会への申請・承認を得ることを目的とした。

（進捗状況）

本研究課題は３年間の継続課題であり、1 年目の進捗状況は、全て予定通りに遂行できている。また、本研究の特徴が、春から夏への季節の変化が研究の中心的要素となる。そのため、昨年度は、川崎医療福祉大学倫理委員会への申請・承認および、研究実施に必要な消耗品類を揃え、実験・測定準備、運動

生理学会へ参加して、類似研究の報告から意見収集を行った。このようにして初年度の研究は、全て計画通りに遂行できている。引き続き、春から夏への暑熱環境に変化していく際の身体の順化を鍵とし、一過性の運動に伴う直腸温の上昇変化を基準とし、生理・心理学的指標と併わせて、腸内細菌叢との関連を調査して行く。

研究の被験者は、一般健康成人男性10名程度を予定している。実験は、夏前の4-6月を目安に、春から夏へ身体が暑熱順化していく期間に実施をスタートしている。直腸温の測定、腸内細菌叢の測定および、アンケート調査への協力が得られた上で実施する。一過性の運動は、自転車エルゴメータを用いて、50%HRmax強度で30-60分間実施する。また、コントロールの環境条件として、秋から冬9-11月への環境においても同様に実施予定である。

なお、昨年度の運動生理学会における発表と情報収集および、倫理委員会の審査において、被験者の年齢・特徴に関する変更を行った。本研究の申請時の被験者は、川崎医科大学の運動教室に通う中高年者であった。被験者は、自転車エルゴメータを用いた60分の有酸素運動と、運動時の直腸温の測定を取り入れるため、心身への負担度を考慮し一般健康成人に変更した。このようにして、1年目の実験準備（情報収集、倫理委員会への申請・承認）は滞りなく実施された。

（学会発表）

Effect of intestinal microbiota on Abdominal Pressure Training in Older Adults. Kaori Matsuo, Takayuki Kawamura. The 26th Annual Meetings of Japan Society of Exercise and Sports Physiology. July 28-29. Osaka. Advance in Exercise and Sports Physiology. p65. vol24. 4. 2019.

研究概要：普段から運動習慣がある中高年者を対象とし、腹腔内圧を高めるトレーニングで呼吸筋や腹部周囲の筋へ刺激を与えることによって、腸内細菌叢が変化するかどうかを調べた。腹圧トレーニング前の腸内細菌群において、各々の対象者による異なりが観られた。腸内細菌のClostridium subclusterとBMIの間に相関関係が認められた。被験者の便形状は、便通異常の対象者においては、腹圧トレーニングによって改善される傾向が認められた。

（参考文献）

1. **Matsuo K,** Zhang X, Ono Y, Nagatomi R. Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid: Brain, Behavior, and Immunity. Vol.23. p108-115. 2009.
2. 河村孝幸, **松生香里**. 中高年の運動習慣者における腸内細菌叢の特徴と体脂肪率の関連性―末端標識制限酵素断片多型分析法による解析―. 42(45),111-118. 2018.
3. **松生香里**, 岡崎和伸,杉田正明. 長距離・マラソン選手の腸内環境とコンディションの関連.-意識調査と外環境の変化に伴う影響について-. 陸上競技研究紀要. 10:140-145.2014.

（謝辞）

本研究課題の実施準備・遂行にあたり、平成30年度、公益財団法人ウエスコ学術振興財団に感謝申し上げます。

食餌誘導性肥満マウスの不安行動におよぼす運動の効果

川崎医療福祉大学　医療技術学部　健康体育学科

小栁　えり

（概要）

【背景】運動習慣は、肥満予防とともに、精神疾患に対する予防効果も期待できるものと考えられるようになったが不明な点も多い。そこで本研究では、食餌誘導性肥満モデルマウスの抑うつおよび不安行動に対する運動習慣の発症予防効果について検討することを目的とした。【方法】C57BL/6 雄マウス 4 週齢 (n=60)を、通常食餌安静（CDSED）群、通常食餌自発運動（CDWR）群、高脂肪食餌安静（HFDSDE）群、高脂肪食餌自発運動（HFDWR）群に分け、通常食および高脂肪食は自由摂取とし、自発運動には、24 時間アクセス可能な回転ケージを使用し、10 週間飼育した。行動テスト後、脳内（大脳と海馬）の各種遺伝子発現解析を実施した。【結果】オープンフィールドテストでは中央滞在時間に運動群で安静群と比較して高い値が示され、不安様行動の回避が観察された。一方で、ガラス玉覆い隠しテストでは、運動群で常同行動を示す傾向であった。強制水泳テストでは、運動群で無動作時間の短縮が生じており、うつ様状態の抑制効果が観察された。しかしシュークロース嗜好テストで観察された高脂肪食による無欲状態に対する運動の効果は観察されなかった。大脳での BDNF および NPY の遺伝子発現に顕著な影響は観察されなかったが、海馬では高脂肪食による明らかな発現抑制が生じていた。脳内炎症性サイトカイン発現には、明らかな変化は観察されなかった。【結論】以上の結果から、運動による不安様行動、あるいはうつ様行動の抑制効果が示されたが、その影響は通常食および高脂肪食にかかわらず誘導されることが示された。一方で、脳内遺伝子発現結果からは、運動の不安様行動・うつ様行動の抑制効果に関する脳内分子機構は明らかとはならなかった。

【背景】全世界の肥満人口は21億人とも報告され [1]、「減量に成功した国はひとつもない。」とさえ言われる現状である。精神疾患も、将来的な肥満リスクが 2 倍となることが示唆される一方で [2]、肥満そのものが精神疾患のリスクファクターと言われるようになった [3]。精神疾患患者は、2014(平成 26)年には 392.4 万人となってあおり、いわゆる 4 大疾患(がん、脳卒中、急性心筋梗塞、糖尿病)よりも多い状況となっている(厚生労働白書、2017)。事実、脂肪を多く含む食事を摂取する割合と肥満者の増加、さらにそれらを要因として発症する生活習慣病が問題とされている。さらに、高脂肪食摂取による行動異常 [4]が報告されていることから、運動習慣は、単に肥満の予防効果にとどまらず、精神疾患に対する予防効果も十分期待できるものと考えられる。実際に、運動習慣による抑うつ様行動の改善効果が報告されている [5]。これらのメカニズムとして脳内BDNFやNPYの活性化と行動変容 [6]さらに運動による脳内炎症が抑制される [7] ことが報告されており、運動は脳機能の変化を介して不安障害の改善効果を有する可能性が推測される。そこで本研究では、食餌誘導性肥満モデルマウスの抑うつおよび不安行動に対する運動習慣の発症予防効果について検討することを目的とし、運動の精神疾患予防効果の可能性について明らかにすることとした。

【方法】

実験動物

実験動物には C57BL/6 雄マウス 4 週齢 (n=60) を用い、それぞれ通常食餌安静マウス（CDSED）群 (n=8) 、通常食餌自発運動マウス（CDWR）群 (n=8)、 高脂肪食餌安静マウス（HFDSDE）群 (n=8) 、高脂肪食餌自発運動マウス（HFDWR）群 (n=8)に分け、通常食 (CD) および高脂肪食 (HFD) は自由摂取とし、自発運動には、24 時間アクセス可能な回転ケージ (WR) を使用し、10 週間の飼育をおこなった。

本研究は、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を受けて実施した（17-004）。

行動テスト

オープンフィールドテスト (Open Field Test: OFT) は、マウスを行動テスト用の箱（32 cm x 32 cm）に入れ 30 分間滞在させた。行動評価のために、0~5 分および 25~30 分の各 5 分間の行動をデジタルカメラ（COOLPIX P6000, Nikon, Tokyo, Japan）で撮影しマイクロ SD カードに保存した。動画解析には、Frame-DIAS V 3D (DKH, Tokyo, Japan) を用い、10 分間の位置座標を解析した。1 秒間のサンプリングレートは 2 コマとし、5 分間の動画より 600 枚の静止画像を作成した。動画解析から得られた位置座標より総移動距離、移動速度、中央移動時間、および中央以外での移動時間を算出した。

ガラス玉覆い隠しテスト (Mable Burning Test: MBT) は、透明なケージ (30 cm x 30 cm) を用いて、約 5cm の深さで床敷きを敷き詰め、環境に慣れさせるために、30 分間放置した。その後、床敷き上に 16 個のガラス玉を均等に配し 30 分間自由に探索させた。30 分後、真上から観察した時、2/3 以上床敷きが覆いかぶさっているガラス玉の数を数え評価した[4]。

強制水泳テスト (Forced Swim Test: FST) は、水温 25℃の水道水を張った円筒状の容器内でマウスの無動時間 (呼吸及び浮くために必要な動作以外は動かないでいる時間) を測定した[8]。

シュークロース嗜好性テスト (Sucrose Preference Test: SPT) は、3%シュークロース水溶液と滅菌水道水を用意し、1 ケージにそれぞれ 1 本ずつ設置した。飲水は自由飲水とし、24 時間後の飲水量を測定した[9]。

試料採取

行動測定終了後、イソフルラン麻酔下で、眼下静脈叢より採血の後、脳（大脳および海馬）摘出を実施した。

脳内遺伝子発現解析

RNA 抽出には、RNeasy Mini Kit （QIAGEN, Valencia, CA）を用いた。その後、NanoDrop system を用いて Total RNA 濃度を測定し、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit （Applied Biosystems, Carlsbad, CA）を用いて、逆転写反応により cDNA を作製した。その後、cDNA は、Fast SYBR Green PCR Master Mix （Applied Biosystems）を用いて、Fast real-time PCR Step one Plus (Applied Biosystems) により PCR を行った。PCR 条件は、cDNA の変性に 95℃、3 秒、アニーリングに 60℃、30 秒の条件を用いて、40 サイクル繰り返した。標的遺伝子のプライマーは、マウスの行動に関連する脳内（大脳、海馬）遺伝子発現として神経由来栄養因子（*Bdnf, Npy*）および炎症マーカーの脳内遺伝子発現（*Il-1β, Tnf-α*）を評価した(Table 1)。

Table 1. Primer sequences for real-time RT-PCR analysis

Gene	Forward	Reverse
bdnf	GGGTCACAGCGGCAGATAAA	GCCTTTGGATACCGGGACTT
npy	TTTCCAAGTTTCCACCCTCATC	AGTGGTGGCATGCATTGGT
il-1β	AAAAAAGCCTCGTGCTGTCG	GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTG
tnf-α	CCTCCCTCTCATCAGTTCTA	ACTTGGTGGTTTGCTACGAC

【結果】

1. 高脂肪食餌摂取および自発運動による体重の推移

高脂肪食餌ならびに自発運動負荷による体重の変化は、高脂肪食餌摂取により有意に高値を示し、運動による体重増加抑制を確認した（Fig. 1）。

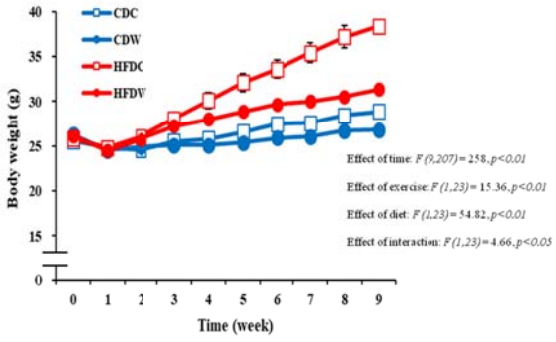


Fig. 1 Changes in body weight

2. 高脂肪食餌摂取および自発運動がマウスの行動テストに及ぼす影響

(1) OFT

オープンフィールド内でのマウスの総移動距離、および移動速度には、運動および食餌の影響は観察されなかった。一方、中央滞在時間は、両食餌条件ともに運動群で安静群と比較して有意に高い値を示した（$p<0.05$, Fig. 2)。

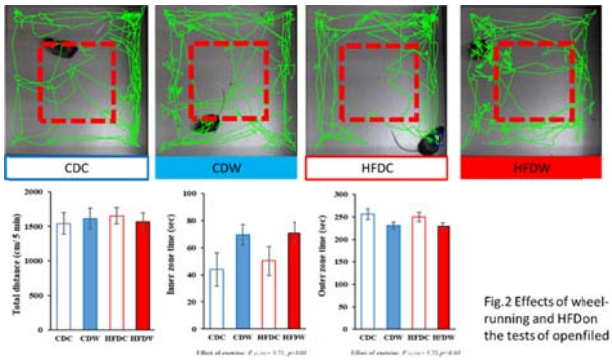


Fig.2 Effects of wheel-running and HFDon the tests of openfiled

(2) MBT

MBT は、両餌群ともに、自発運動条件で隠した数が多く、常同行動を示す傾向が観察された (p=0.054, Fig. 3A) 。しかしながら、高脂肪食餌摂取による影響は示されなかった。

(3) FST

FST は、両餌群ともに、自発運動条件で無動作時間の短縮が生じており (p<0.01, Fig. 3B) 、うつ状態の改善効果が観察された。しかしながら、高脂肪食餌摂取による影響は示されなかった。

(4) SPT

ヒトのうつ病で認められる無欲状態を反映するとされる SPT[12]は、CD 群と比較し、HFD 群で有意な低下を示し (p<0.01, Fig. 3C) 、高脂肪食餌摂取による無欲状態が観察された。しかしながら、自発運動による影響は示されなかった。

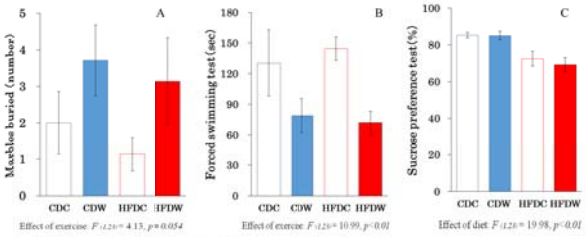


Fig. 3 Effect of marbies burying (A) , forced swimming (B) , sucrose preference (C) tests in mice

3. 脳内の行動関連分子 mRNA 発現の変化

大脳の *Bdnf* および *Npy* 遺伝子発現には明らかな差は観察されなかった (Fig. 4A, B) 。また、*Il-1β* および *Tnf-α*遺伝子発現にも明らかな差は観察されなかった (Fig. 4C, D) 。

一方、海馬の *Bdnf* 遺伝子発現は、CD 群と比較し、HFD 群で有意に低くなる結果が観察された (p<0.05, Fig. 5A) 。*Npy* 遺伝子発現も、CD 群と比較し、HFD 群で有意に低くなる結果が観察された (p<0.01, Fig. 5B) 。*Il-1β*および *Tnf-α*遺伝子発現には明らかな差は観察されなかった (Fig. 5C, D) 。

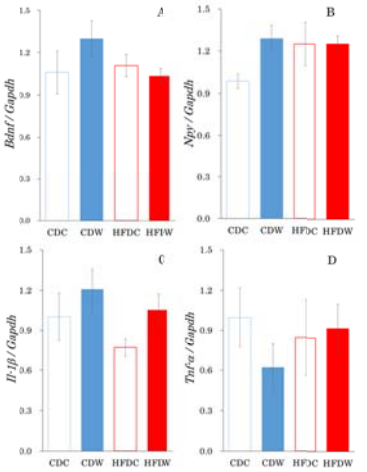


Fig.4 Effects of wheel-running and HFD on mRNA expressions of *Bdnf* (A), *Npy* (B), *Il-1β* (C) and *Tnf-α* (D) in the cerebrum of mice

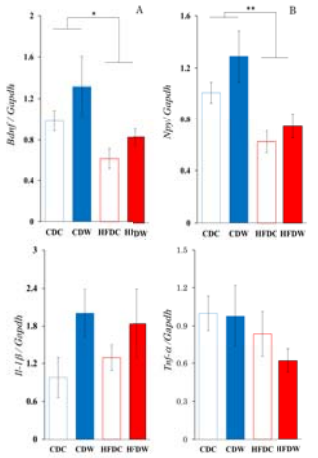


Fig. 5 Effects of wheel-running and HFD on mRNA expressions of *Bdnf* (A), *Npy* (B) *Il-1β* (C) and *Tnf-α* (D) in the hippocampus of mice
*p<0.05 and **p<0.01

【考察】

本研究は、10 週間の自発運動が高脂肪食餌によって誘導された不安様行動を抑制すると仮説をたて実験を行った。高脂肪食摂取による明らかな体重増加と運動トレーニングによる体重減少が観察された。OFT の結果から高脂肪食摂取により誘導された不安行動が、運動によって改善されたことになり、マウスの不安行動に及ぼす運動の影響についての評価が OFT で可能となることが示唆された。

さらに、FST の結果からも、うつ様行動の改善を生じる可能性が示された。FST では、うつ様行動を示すと水に入れた直後、マウスはストレスを回避しようと精力的に動き回るが、次第に動かない時間 (無動作時間) が増え、いわゆる回避「あきらめる」ようになるが、抗うつ薬を投与すると無動作時間が減少することが報告されている [9]が、本結果では、運動群で無動作時間の明らかな短縮が観察されたことから、運動によるうつ様行動の改善が示されたものと考えられる。抗うつ薬投与による無動作時間の減少と同様の結果が運動でも観察されたことから、運動が抗うつ効果をもたらす可能性が FST によって示されたものと考える。

一方で、MBT は、試行後に覆いかぶさっているガラス玉の数が多いほど、不安様行動の中でも常同

行動が亢進しているとされる[10]。常同行動とは、無目的に同じ行動を何度も繰り返すことであり、何の害もないガラス玉を次々と床敷きで覆い隠そうとする行動がヒトの常同行動のモデルとされている。本結果では、運動群で高値を示したことから、運動により常同行動が増大するという負の作用が示されたことになる。ヒトでは知的障害、自閉症スペクトラム、遅発性ジスキネジア、常動運動障害、前頭側頭型認知症や前頭側頭葉変性等で常同行動が観察されることから、負の作用とも考えられるが、原因が同じであるのかについてさらに詳細に調べる必要がある。

さらに、3%ショ糖溶液の摂取量で評価する SPT では、FST と同様にうつ様行動を評価できるテストとされているが、自発運動による改善効果は観察されなかった。一方で、CD 群と比較して、HFD 群で有意な摂取量の減少が観察された。したがって、嗜好性の低下すなわち HFD 群でうつ様行動が観察されたことになる。このテストでは、FST とは異なり運動の影響があらわれなかったことになる。このように、すべての行動テストの結果は必ずしも一致した結果とはならず、いくつかの行動テストを併用することで、マウスの不安行動を詳細に評価することの必要性が示唆された。

本研究では、さらに、マウスの不安行動メカニズムを遺伝子発現から評価を行った。先行研究によると、海馬における BDNF の減少がうつ様行動に深く関連することが報告されている[11]。また、海馬における BDNF 発現が低下することで、SPT で嗜好性が低下することも報告されている[12]。本結果では、CD 群と比較し、HFD 群で有意に BDNF 発現が低値を示したことから、高脂肪食摂取でうつ様行動が観察された SPT の結果を支持するものとなった。さらに、海馬における NPY 発現が高脂肪食摂取で有意に低値を示したことから、食欲促進に関わる NPY が嗜好性の評価である SPT の結果を支持するものとなった。海馬での BDNF と NPY の発現低下が、SPT で観察されたうつ様行動を誘導した可能性が示唆された。自発運動でうつ様行動の改善が観察されなかった理由として、Venzia らの研究によると、20 週間の自発運動で BDNF 発現が増加したことが報告されている[13]ことから、本研究では、自発運動を負荷した期間が短かったことも考えられる。

【結論】

以上の結果から、運動による不安様行動、あるいはうつ様行動の抑制効果が示されたが、その影響は通常食および高脂肪食にかかわらず誘導されることが示された。一方で、脳内遺伝子発現結果からは、運動の不安様行動・うつ様行動の抑制効果に関する脳内分子機構は明らかとはならなかった。

【謝辞】

本研究に、ご協力いただいた、川崎医療福祉大学渡邉知央氏、矢野博己教授に深謝する。本研究は、公益財団法人ウエスコ学術振興財団、ならびに JSPS 科研費 18K17876 の助成を受けて実施された。

【利益相反開示】

本研究に関して利益相反関係にある企業等はない。

【参考文献】

1) Ng M, Fleming T, et al., Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014, 384: 766-781.
2) Kivimäki M, Lawlor DA, et al., Common mental disorder and obesity: insight from four repeat measures over 19 years: prospective Whitehall II cohort study. *BMJ*. 2009, 339: b3765.
3) Bruce-Keller AJ, Keller JN, et al., Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochim Biophys Acta*. 2009, 1792: 395-400.
4) Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, et al., Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of

obesity. *Biol Psychiatry*. 2015, 77: 607-615.
5) Agudelo LZ, Femenía T, et al., Skeletal muscle PGC-1α1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. *Cell*. 2014, 159: 33-45.
6) Caviedes A, Lafourcade C, et al., BDNF/NF-kB signaling in the neurobiology of depression. *Curr Pharm Des.* 2017, 23: 3154-3163.
7) Duda W, Kubera M, et al., Suppression of pro-inflammatory cytokine expression and lack of anti-depressant-like effect of fluoxetine in lipopolysaccharide-treated old female mice. *Int Immunopharmacol*. 2017, 48: 35-42.
8) West AP, Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1990, 14: 863-877.
9) Iniguez SD, Riggs LM, et al., Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress*. 2014, 17: 247-255.
10) Njung'e K, Handley SL, Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991, 38: 63-67.
11) 山田伸子, 勝浦五郎, 他, レプチンの抗うつ作用と肥満に合併するうつ病態における意義. 肥満研究. 2010, 16: 188-191.
12) Grillo CA, Piroli GG, et al., Downregulation of hypopthalamic insulin receptor expression elicits depressive-like behaviors in rats. *Behav Brain Res*. 2010, 222: 230-235.
13) Venezia AC, Guth LM, et al., Sex-dependent and independent effects of long-term voluntary wheel running on *Bdnf* mRNA and protein expression. *Physiol Behav*. 2016, 156: 8-15.

保育士の早期離職対策としての「リアリティショック予防プログラム」の開発

山陽学園大学総合人間学部[1]・山陽学園短期大学幼児教育学科[2]

[1]松浦美晴・[1]上地玲子・[2]荒島礼子

新人保育士の早期離職の理由として「リアリティショック」（Kramer，1974）がある。本研究では，ラザラスらのストレス理論の枠組みを用い，新人保育士へのサポートプログラムとして，①新人保育士交歓会，②新人保育士研修会，③主任・管理職保育士研修会の 3 つを実施した。プログラム参加者の反応から，新人保育士は就職後 1 か月後には既にギャップを経験していること，3 カ月後にはギャップを経験するとともに具体的な対処を行っていること，③主任・管理職保育士は新人保育士の求めるサポートを実施しようとするが，新人保育士と同様業務負担の問題にさらされていることや新人保育士とのコミュニケーションの困難により，サポートを妨げられていることが浮き彫りになった。②の参加者は，異なる施設で同じ立場に立つ者同士の分かち合い，知識の獲得，の意義があったと述べた。③の参加者は，情報交換，新人保育士の要望についての知見獲得，の意義があったと述べた。

1. 背景

保育士の早期離職問題の背景に「リアリティショック」，すなわち，「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」(Kramer, 1974)があると考えられる。子どもと接する仕事というイメージを持たれがちな保育士であるが，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。本研究では，保育士のリアリティショックを，ストレス理論（Lazarus & Folkman, 1984)の枠組みで捉える立場をとる。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ッサーとなり，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。本研究では，新人保育士を対象とするサポートするプログラムを考案する。プログラムは，①新人保育士交歓会，②新人保育士研修会，③主任・管理職保育士研修会の 3 つからなる。プログラム参加者の感想や自由記述などをデータとし，保育士が抱える問題を抽出するとともに，サポートプログラムの効果を検証することが，本研究の目的である。

2.新人保育士意見交歓会（プログラム①）

水田（2004）によれば，就職後 3 ヶ月後にリアリティショックが生じるとされる。そこで新人保育士へのサポートとして，その前の段階である，就職後 1 か月が経過した 5 月下旬に，新人保育士同士の意見交換会を開催した。RS をもたらすギャップやサポートについて保育士としての経験や意見を参加者間で共有し，理解を深める話し合いを行った。本研究代表者の所属機関を会場とし，就職 1 年目の保育士 16 名が参加した。

まず，研究代表者が「保育士のリアリティショック」の要点と，交歓会の目的を説明した。続いて，参加者が 4 名ずつの 4 グループに分かれ，研究代表者，共同研究者計 3 名も加わって，「就職してびっくりしたこと」（本研究の枠組みにおいては，ストレッサーに相当），「困ったときや思い通りにならないとき，どうしますか」（ストレスへの対処に相当）について語り合った。テーマごとにグループの再編成を行い，異なるメンバーで語り合いを行うようにした。語り合いの際，グループごとに 1 枚，用紙を配布し，メモを記録するよう求めた。交歓会の終了後，参加者の同意を得て，メモのコピーを回収した。記録された内容の類似するものをカテゴリー化し，表 1 に示す。なお，語り合いの最中にメモした内容であるため，必ずしも設定したテーマ（問い）への回答にはなっていないものがある。

3. 新人保育士研修会（プログラム②）

厚生労働省の「待機児童解消加速化プラン」は，保育士を対象とするリアリティショックについての研修が必要である，としている。そこでA県の委託により，県内新人保育士を対象に「RS対応研修会」を開催した。参加者の反応をデータとし，新人保育士の経験する「就職前と就職後のギャップ」とそれへの対応，新人保育士が先輩保育士に求めるサポートの内容，研修会の効果を検討した。

新人保育士研修会の概要

対象　平成30年4月よりA県内の保育施設に勤務する，就職1年目の新人保育士を対象とした。

研修の目的　「新人保育士がRSについての知識を得，ストレッサーとしてのギャップとその対応策について考え，同じ立場の新人保育士とそれらを共有し，理解を深めること」が目的であった。

開催時期　就職3カ月後の平成30年7月に開催した。

研修内容　(1) RSについての講義：　「RSとは何か」について，ストレスモデルに沿った内容を解説した。(2) RSとソーシャルスキルのセルフチェック：　RSのチェックリストとして，保育士RS尺度（松浦・上地・皆川・岡本・岩永，2018），ソーシャルスキルのチェックリストとして，Kiss-18（菊池，1988）から6項目を用いた。(3)ストレッサーとしてのギャップと対応のセルフワーク：　参加者にワークシートを配布し，「就職前の予想」，「予想についての就職後の現実」「予想と現実のギャップにどのように対処したか」記入するよう求めた。(4) ギャップと対応策についてのグループワーク：　5，6名ずつのグループに分かれた参加者が，「就職前の予想」，「予想についての就職後の現実」「予想と現実のギャップにどのように対処したか」を，出し合い，分類し，3つを対応付ける形で，模造紙に配置した。(5)発表による情報共有：各グループの代表が，グループワークで得られた予想と現実のギャップと，対処方法について口頭発表を行った。(6) アンケート記入：「研修会の感想」，「先輩保育士にしてほしいサポート」について，自由記述を求めるアンケートを行った。

研修の始めに，参加者に上記をデータとして使用することについて，プライバシーの保護，匿名性の保持，不利益はないこと，結果は学会などで公表するが個人が特定されないこと，提出は任意であり提出をもって同意とみなすことを口頭で説明した。

参加者の概要

参加者54名，うち常勤保育士49名，非常勤保育士2名，任期付き1名，記載なし2名であった。セルフチェックにおける保育士RS尺度（取りうる得点範囲 1 から 5）では，「業務負担の重さ」の平均3.63，標準偏差0.70，「職場の問題」の平均2.96，標準偏差0.73，「力量不足」の平均4.08，標準偏差0.63，「心理的孤立」の平均2.17，標準偏差1.22であった。ソーシャルスキル（取りうる得点範囲6から30)の平均17.69，標準偏差4.21であった。

経験されたギャップと対処方法

セルフワークシートに記述された「就職前の予想」「就職後の現実」のそれぞれの組み合わせからギャップの内容を抽出し，分類した。抽出にあたっては，予想と現実が同じであったものを除いた。ポジティブな方向のギャップについては，早期離職にはつながらないと考え，分類から除いた。ギャップのカテゴリーを，同様に分類した対処方法のカテゴリーとともに，表2に示す。

先輩保育士にサポートとして望むこと　「先輩保育士にしてほしいサポート」を内容の類似により分類した（表3）。

参加者の感想

感想の記述を，内容の類似により分類した。分類の結果を表4に示す。

4. 主任・管理職保育士研修会（プログラム③）

新人保育士は，周囲からのサポートを必要とする。新人保育士に対しサポートを行う立場にあるのが，職場の先輩である主任・管理職保育士である。彼らが効果的にサポートを行うことで，新人保育士のRSを緩和できると考えられる。そこで，A県の委託により，県内の主任・管理職保育士を対象とする研修会を開催した。

主任・管理職保育士研修会の概要

対象　A 県内の保育施設に勤務する主任・管理職保育士を対象とした。

研修の目的　「主任・管理職保育士が新人保育士の RS を理解し，サポートについて考えること」が目的であった。

開催時期　保育施設の仕事の繁忙期ではない，平成 30 年 12 月に開催した。

研修内容　(1) RS についての講義：　新人保育士研修会と同様に行った。(2) 新人保育士研修会の報告　研修に参加した新人保育士の反応を，個人が特定できない形で次のように紹介した。まず，保育士 RS 尺度と Kiss-18 からの 6 項目について，新人保育士研修会参加者のセルフチェックによる得点分布を紹介した。次に，新人保育士研修会参加者から得られた「先輩保育士にしてほしいサポート」のカテゴリーを紹介した。(3)サポートの具体的な実践方法のセルフワーク：参加者は 5，6 名ずつのグループに分かれた。各グループに，課題として(2)の「先輩保育士にしてほしいサポート」が 2 カテゴリーずつ割り振られた。ワークシートを配布して，各カテゴリーに対する「具体的で可能なサポート方法」「サポートの難しい点とその理由」を記入するよう求めた。(4) サポートの実践についてのグループワーク：各グループで，「具体的で可能なサポート方法」「サポートの難しい点とその理由」を出し合い，分類し，2 つを対応付ける形で，模造紙に配置した。さらに，「困難を超えた実践策」について，話し合った。(5) アンケート記入　「研修会の感想」，「新人保育士の指導で困っていること」「これまで保育の仕事を続けることができた理由」について，自由記述を求めるアンケートを行った。自身が保育士を辞めたいと思ったことがあるかどうかについても，1：「まったくない」から 5：「いつも思う」までの 5 段階評定を求めた。本報告書ではこのうち，「研修会の感想」のみ結果を示す。倫理的配慮は，新人保育士研修会と同様であった。

参加者の概要

参加者 29 名，うち園長 7 名，主任保育士 9 名，副主任保育士 6 名，分野別リーダー1 名，役職なし 3 名，記載なし 3 名であった。

サポートの実現可能性

セルフワークシートに記述された「具体的で可能なサポート方法」「サポートの難しい点とその理由」を，内容の類似によりそれぞれ分類した。概要を表 3，表 4 に示す。新人保育士の要望するサポートごとに登場したそれらのカテゴリーを表 3 に示す。

参加者の感想

感想の記述を，内容の類似により分類した。分類の結果を表 5 に示す。

5.プログラム参加者の反応からの考察

保育士交歓会における語りの内容

就職後 1 か月が経過した 5 月の時点で，新人保育士が既にギャップの多くを経験したことがわかる。対応として，職場内外の相手に相談したことがわかる。

研修会に見られるギャップの内容

新人保育士の「就職前と就職後のギャップ」と対応　新人保育士の記述から抽出されたギャップの多くは，従来の研究（松浦・上地・皆川・岩永・岡本，2019，印刷中）でも見られたものであった。ギャップへの対応として，行動面における問題焦点型のストレス対処（Folkman & Lazarus, 1980）が多く見られた。新人保育士が具体的な対処行動を起こしていることがうかがえる。また，先輩保育士からのサポートを受けていることがわかる。

新人保育士が先輩保育士に求めるサポートと，主任・管理職保育士によるサポート実現可能性　主任・管理職保育士の考案したサポートは，新人保育士が求めるサポートの内容に対応していた。しかし，サポートを困難にする要因も多くあがった。「仕事の画一化の困難」「子どもの個性や状況に左右される」「命に係わる業務であること」は，子どもを相手とする対人専門職である保育士に特有の問題と考えられる。また，業務量の多さに関して新人保育士のギャップの経験と重なっており，中堅以上の保育士が新人と同様の問題に曝されていることがわかる。「新人との関係づくりの困難」は，先輩保育士がコーチングやメンターの技術を習得する機会を増やすことが対策になると考えられる。総じて，新人保育士のサポー

トに必要とされる時間と人員の確保が難しく，サポート不足による早期離職をもたらし，人員不足ひいては時間の不足へとつながるという，悪循環が生じているといえる。

研修会の効果

感想として，新人保育士において最も記述数が多かったのは，異なる施設で同じ立場に立つ者同士の分かち合いの意義についてであった。また，知識の獲得の意義があげられていた。主任・管理職保育士においては，情報交換の意義，新人保育士の要望について知見を得ることの意義があげられた。研修についての要望として，時間の確保を求めるものがあった。

新人保育士によってあげられたギャップに対する対処，主任・管理職保育士のサポート案は具体的であり積極的なものであった。これらを振り返り，検討し，参加者間で共有することは，今後の現場におけるリアリティショック対策に，一定の効果をもたらすと期待できる。

文献

Folkman, S., & Lazarus, R. S. (1980). An analysis of coping in a middle-aged community sample. *Journal of Health and Social Behavior,* **21**, 219-239.

菊池章夫 (1988). 思いやりを科学する 川島書店.

厚生労働省(2013) 待機児童解消加速化プラン 厚生労働省 2014 年 4 月 3 日
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kodomo/pdf/taikijidokaisho_01.pdf>(2019 年 1 月 23 日)

Kramer, M. (1974). *Reality Shock: Why Nurses Leave Nursing?* The C.V. Mosby Co.

Lazarus, R. S., & Folkman, S. (1984). *Stress, Appraisal, and Coping*. Springer.

松浦美晴・上地玲子・皆川順・岡本響子・岩永誠 (2018). 新人保育士のリアリティショック尺度の開発 ―予備尺度再因子分析と基準関連妥当性の検討― 日本健康心理学会大会発表論文集 **30**, 56.

松浦美晴・上地玲子・皆川順・岡本響子・岩永誠（印刷中） 新人保育士のリアリティショックを引き起こす予想と現実のギャップの抽出 ―カテゴリーと分類軸― 保育学研究.

水田真由美 (2004). 新卒看護師の職場適応に関する研究:―リアリティショックと回復に影響する要因― 日本看護研究学会雑誌, **27**, 91-99.

表 1 新人保育士交歓会の語り合いの記録から得られたカテゴリー

①「就職してびっくりしたこと」	
仕事の大変さ	書類作成が大変/子ども対応への不安←遊びの方法の工夫/子どもの問題/行事や習い事の多さ/給食の時間が足りない/子どもの人数の多さ←子どもの人数で担当者を調整できている→クラス運営の連携の難しさ/子どもの退園
力量への不安	子ども対応への不安←遊びの方法の工夫/先輩保育士に助言を求めることの難しさ
職場の人間関係	先輩保育士とうまくやっていけている←→先輩保育士との上下関係がある
施設の問題	園の方針の合う合わない/待遇が悪い/施設の装備に問題がある
②「困ったときや思い通りにならないとき，どうしますか」	
相談する	先輩保育士や同期に相談する/園外の相談相手に相談する
子どもから認めてもらう	子どもから認めてもらえない→子どもの注意を集める工夫をする
仕事の負担が解消しない	仕事が負担/なかなか帰宅できない/人手不足
仕事で求められる判断が難しい	自分で判断ができないときがある/問題を抱える子どもへの対応の困難
先輩保育士から理不尽な要求をされる	先輩保育士から理不尽な要求をされる

表 2 新人保育士が記述したギャップと行った対応のカテゴリー

ギャップカテゴリー（記述数）	対応カテゴリー
予想と違い，人間関係が難しい（13）	周囲との関係を作る努力をする/人間関係の作り方を習得する/同業の友人に相談する/上の先生に相談する/話しかけやすい先輩から仲良くなってゆくようにする/ある程度はあきらめ，割り切るようにする/解決できない
予想より書類作成の負担が大きい（13）	書き方の本を読んで学ぶ/先輩から学ぶ/子どもをよく観察する/時間を見つけてコツコツと書く/何とかやっていく
予想と違い，子どもとの関わりが難しい（12）	先輩保育士からやり方を教わる/関わり方を工夫する/勉強し経験を積む/子どもの成長過程だととらえる/保護者と共通理解をする
予想より，子どもに手がかかる（5）	関わり方を工夫する/先輩から学ぶ/担任間で連携し，子どもの体調に注意する
予想と違い，時間に余裕がない（5）	時間配分を工夫する/落ち着いて行動する/アイテムを工夫する
予想と違い，新人でも責任が重い（5）	先輩保育士に助けてもらう/仕事をできるよう努力をする
予想より，配慮が必要な子どもが多い（4）	関わり方を工夫する/先輩から学ぶ/職員間で連携する
予想と違い園の方針が一貫していない（3）	自分から提案すると同時に言われた方法も試してみる/複数の方針から自分がやりたいものを選ぶ

予想を超えて保護者対応が難しい（2）	先輩保育士からやり方を教わる
思ったより，悩みの相談ができない（2）	自分から先輩保育士に相談する
予想と違い，休日が少ない（2）	遊ぶ予定を立てておく/1 年目は仕方がないと思う
予想と違い，職員間の連携が必要（2）	連携を心がける
予想より，園独自の方針がある（2）	先輩保育士から聞いて勉強する
予想より仕事が多い（2）	施設に相談する/同期と協力する
予想を超えた残業がある（2）	我慢するしかない/定時で上がっていいといわれたときは従う
予想を超えた持ち帰り仕事がある（1）	頑張ってこなす
予想と違い，同期の早期退職が多い	自分も 1 年働いたら辞めようと思っている
予想と違い，最初から主担当はさせてもらえない（1）	いつか主担当になる日のために先輩保育士の技やアイテムを見て準備をする

表 3　新人保育士の要望するサポートに対し主任・管理職保育士
があげた「具体的で可能なサポート方法」「サポートの難しい点とその理由」として登場したカテゴリー

新人保育士の望むサポート	先輩保育士が考える具体策	困難の理由
子どもや保護者への接し方を教えてほしい	ポイントを絞って指導	仕事の画一化の困難/仕事をしながらの細かい指導の困難/新人との関係づくりの困難
	具体的に指導	仕事の画一化の困難/新人との関係づくりの困難
	教えたことができたか後で確認する	新人との関係づくりの困難
	仕事の目的や重要性を説明する	
	フィードバックを与える	
	一対一での指導	
	新人との関係づくり	
	職員間で仕事の分担	
書類の書き方を教えてほしい	具体的に指導	時間確保の困難/職員間の協力の困難
	環境整備	新人の成長を妨げてしまう
	フィードバックを与える	
	ポイントを絞って指導	
	まず困っている点を聞く	
	仕事の目的や重要性を説明する	
	職員間で仕事の分担	
書類を減らしてほしい	ポイントを絞って指導	時間確保の困難
	一対一での指導	時間確保の困難
	具体的に指導	新人との関係づくりの困難
	環境整備	仕事量を減らすことの困難
	時間の確保	
	職員間で仕事の分担	
	新人との関係づくり	
勤務時間中に仕事ができる時間づくりをしてほしい	時間の確保	仕事の画一化の困難/仕事量を減らすことの困難/時間確保の困難/人手が足りない
	職員間で仕事の分担	子どもの個性や状況に左右される/新人との関係づくりの困難
	環境整備	仕事の画一化の困難
研修や巡回指導は適度にしてほしい	環境整備	新人との関係づくりの困難
	時間の確保	臨機応変な対応の困難
	ポイントを絞って指導	
	仕事の目的や重要性を説明する	
先輩同士だけでなく新人にも情報共有させてほしい	職員間で仕事の分担	時間確保の困難/管理職の動きづらさ/仕事をしながらの細かい指導の困難
	環境整備	時間確保の困難/新人との関係づくりの困難
	新人との関係づくり	新人との関係づくりの困難/臨機応変な対応の困難
指示は具体的にしてほしい	指導の工夫　教えたことができたか後で確認する	仕事をしながらの細かい指導の困難/新人との関係づくりの困難
	フィードバックを与える	仕事をしながらの細かい指導の困難
	ポイントを絞って指導	子どもの個性や状況に左右される
	一対一での指導	新人との関係づくりの困難
	具体的に指導	仕事をしながらの細かい指導の困難
	仕事の目的や重要性を説明する	新人との関係づくりの困難
	時間の確保	仕事の画一化の困難
休みを取りやすくしてほしい	職員間で仕事の分担	人手が足りない/管理職の動きづらさ/仕事の画一化の困難
	新人との関係づくり	人手が足りない/臨機応変な対応の困難
	環境整備	臨機応変な対応の困難
定時で帰りやすい雰囲気づく	環境整備	臨機応変な対応の困難/時間確保の困難

りをしてほしい	時間の確保	時間確保の困難
	新人との関係づくり	仕事量を減らすことの困難
	職員間で仕事の分担	
相談しやすい雰囲気を作ってほしい	新人との関係づくり	時間確保の困難/新人との関係づくりの困難
	環境整備	人手が足りない
	ポイントを絞って指導	新人との関係づくりの困難
優しく接してほしい	新人との関係づくり	新人との関係づくりの困難/命に係わる業務であること/仕事をしながらの細かい指導の困難
	一対一での指導	新人との関係づくりの困難
	新人との関係づくり	時間確保の困難
	フィードバックを与える	
えこひいきをやめてほしい	職員間で仕事の分担	新人との関係づくりの困難
	新人との関係づくり	新人との関係づくりの困難

表 4　新人保育士研修会の感想カテゴリーの概要と記述例

カテゴリー（記述数）	概要	記述例
同じ悩みを持つ人が多いとわかって少し楽になった（35）	他の施設の新人保育士同士話をすることで，同じ悩みを持つ人がおり，自分だけが辛いわけではない，自分が間違っているわけではないとわかり，気が楽になった。	「同じことを思っている人がたくさんいて少し嬉しかった」「 悩みを共有でき，自分だけではないと思えました」
いろいろな人の話や意見を聞くことができた（12）	普段他の人の意見を聞くことは難しいが，研修の場を通じて他の人の意見や工夫を聞くことができた。	
施設による悩みの違いを知ることができた（3）	施設によって悩みが違うことを知った。自分の勤務する園については自分で確認する必要があると思った	「様々な園の方のお話を聞くことができ，園ごとの内容などにもギャップを感じました」「園によってやはり違うので，そこで自分ができることをどうやってやるかを先輩に自分から聞いていかなければならないと思った」
ギャップをなくす対策の必要性を感じた（3）	大学教育や，学生時代のボランティアなどによって，ギャップを減らす対策が必要と思った	「大学ではより現実に近い勉強が必要」「ボランティアに行っていた園に就職をするのは，かなりメリットが多い」
リアリティショックのチェックができた（2）	自分がリアリティショックにあてはまることがわかった。自分が困っていることを整理することができた。	「チェックリストに当てはまるものが多く，驚きました」「チェックリストを通して自分が何が大変だと思っているのか整理できてよかった」
リアリティショックについて知ることができた（1）	リアリティショックについて知らなかったが，理解することができた	「聞き慣れない言葉でしたが，よくわかりました」
これから先, ギャップを感じた時に参考になると思った（1）	今はギャップを感じていないが，これから感じたり辛くなったとき参考にしたい	「今の所現実とのギャップを感じていないので，これから先辛くなったり，ギャップを感じたら今日のことを思い出したい」
やる気が出た（1）	頑張りたい	「保育教諭になれたことに誇りを持ち，日々頑強の気持ちを持ち頑張りたい」
待遇を上げてほしいと思った（2）	残業をなくし給与を上げてほしい	「もう少し給料を上げてください」「残業 0 になったらな…」

表 5　主任・管理職保育士研修会の感想の上位・下位カテゴリーと記述例

上位カテゴリー	下位カテゴリー（記述数）	記述例
情報交換ができた	他施設の同じ立場の職員の声を聞くことができた（10）	「同じ立場上で働いている先生方の話を聞く，共有し合うことができて良かった」「新人の育成の難しさを，同じ目線で話し合え，それぞれの意見が聞けた」
	保育士同士悩みを共有することができた（7）	「それぞれの園での悩みを聞くことができて良かった」「話を聞けて共感できたり，話を聞いてもらって悩み事も少し解決できたと思う」
新人保育士対応を学ぶことができた	新人保育士の気持ちを知ることができた（6）	「“昔はこうだったのよ”はダメなんですね」「新人保育士の SOS を見ながら自分が新人の頃と比較し，気持ちがわかる部分もあるなと感じた」
	新人保育士を育ててゆきたい（3）	「新人保育士を大切に育てていかないとと改めて感じた」
研修についての要望	もっと時間をとってほしい（2）	「時間が少なく残念でした。また，こういう機会を多く設けていただきたい」「テーマを 2 つすることは時間が短くできなかった」
	研修の手法がよかった（2）	「グループワークや話しをすることで学ぶことや方法，サポートをわかりよかった」
	もっと具体的な情報を提供してほしい（1）	「参考になった部分もありましたが，具体的にもっとわかるとよかった」

日常活動レベルの異なる対象者における筋音筋電センサの有効性に関する研究

環太平洋大学　体育学部　健康科学科

早田　剛

（概要）コンディショニングを把握することは、アスリートであっても、介護予防に参加する人であっても、パフォーマンスを向上させるために重要である。そんな中、筋音図と筋電図が同時に計測できる筋音筋電センサ「Measee」が開発された。そこで本研究の目的は、日常活動レベルの異なる対象者（一般成人・アスリート・高齢者）における筋音筋電センサの有効性について検討することとした。

[実験１:筋音筋電センサによるパラメータの検討]　実験１では、筋音筋電センタによるパラメータを決定するため、各解析項目の級内相関係数を基に検討することを目的とした。5 回試技中に計測された各解析項目について、被験者を因子として、級内相関係数を求めた。その結果、①筋電図 RMS、③筋音図傾き(+)、⑤筋音図 RMS、⑥筋音図/筋電図については級内相関係数が高かく、更に平均の信頼性が高かった。

[実験２：下腿へのストレッチポールが筋音筋電図へ及ぼす影響]　実験２では、ストレッチポールの「ほぐす」効果について、筋音筋電センサによる測定を行い、各パラメータの変化を検討することを目的とした。ストレッチポールによる 1 分間の介入前後に筋音筋電センサの測定を行った。その結果、③筋音図傾き (+) において、Post は Pre と比較し有意に傾きが小さくなった。筋電図 RMS の活動電位は変化がなかったことから、筋の柔らかさが影響していると考察された。以上より、筋音筋電図によってストレッチポールの効果が示唆された。

（本文）

【背景】　現在は、65 歳以上の高齢者が人口の 26.7%、4 人に 1 人となり（総務省，2016）、そのおかげで、介護の負担が大きくなっている問題と、年金、医療といった社会保障給付費が増えている問題が顕在化している。そのため、介護予防への取り組みは、どの地域においても重要な課題となっている。健康づくり運動の継続については、運動教室に参加する約５０％が６ヶ月以内にドロップアウトするという報告 (Dishman, 1988) があり、容易ではない。それは、運動の効果が直ぐに可視化できないことが理由の 1 つであると考える。そこで運動教室への参加がトレーニングとなり得ているのか、オーバーロードになりすぎていないのかを明確にしていくことは、運動継続への後押しとなると考えられる。その他病後の早期リハビリテーションを行うことで、筋力の維持・増強を促し、生活の質（QOL）を向上させることが求められている。また、アスリートにおいても、コンディショニングを把握することは、パフォーマンスを向上させるために重要である。そのためトレーニングの効果、疲労度が可視化できることにより、コンディショニングへのアプローチが変わってくることが考えられる。

日常生活やスポーツ現場では、「筋肉が硬くなった」「筋肉が張っている」など、「筋の硬さ」がしばしば、問題となる。筋硬度の測定方法としては、筋硬度計、超音波検査のエラストグラフィー、筋音図が用いられている。それら多くの研究から、疲労に伴って筋が硬くなることが報告されている (Murayama et al., 2000, 2005)。運動後の筋硬度変化は、運動後に起こる浮腫によって筋内圧が増加するためといわれている (Lacourpaille et al., 2014)。また、Murayama ら (2005) は、筋の張力発揮により筋が硬くなると報告し、筋の長さ-張力関係と筋硬度の関係性を示唆している。米須らは筋硬度そのものの問題としては、筋硬度が何を反映しているのか、まだ詳細な事柄が明らかにされていないと述べている。更に今後の発展として、筋に対するミクロな視点、骨格筋系だけでなく、神経系からのアプローチも必要であると述べている（米須ら，2014）。

近年、筋音筋電センサ（「Measee」，㈱エヌ・シー・ピー社製：岡山県）が開発された。筋音図は筋収縮

にともなって体表面上に発生する微細振動を記録した信号を取得するものであり、一方、筋電図は神経的な活動電位を信号として取得するものであり、波形が異なる(島, 2014)。この装置は波形だけでなく、筋の硬さ・筋の反応・筋の疲労を 10 段階評価で示すことが可能となっており、トレーニングが効果的でより継続性の高いものとなると謳っている。

【目的】そこで本研究の目的は、日常活動レベルの異なる対象者（一般成人・アスリート・高齢者）における筋音筋電センサの有効性について検討することとした。

実験 1. 筋音筋電センサによるパラメータの検討

【背景】筋音筋電センサについては、同時に筋音図と筋電図が測定できることにメリットがある。しかしながら、筋電図と筋音図の相互的なパラメータは明らかな指標となっていない。

【目的】そこで実験 1 では、筋音筋電センサによるパラメータを決定するため、各解析項目の級内相関係数を基に検討することを目的とした。

【方法】被験者は、下肢に既往歴のない健常な成人大学生 9 名とした（男性：3 名・女性 6 名、平均年齢 20.1±0.8 歳)。被験者には、研究目的・実験内容を十分説明した上で研究内容を理解し、承諾しした者が本研究へ参加した。

筋音筋電センサ（「Measee」，㈱エヌ・シー・ピー社製：岡山県）は、軸足（ボールを蹴るときの軸脚）の腓腹筋内側頭へ電極 2 つの上に筋音筋電センサを貼付した。腓腹筋内側頭への貼付位置は下腿（踵骨隆起から腓骨頭）の長さの上部 1/3 とした(**Figure 1**)。その後、ベルクロ付き伸縮ベルトにてセンサの固定を行った。



Fig. 1 筋音筋電センサ貼付位置（下腿上 1/3）

運動条件は、両足を肩幅に開き、基本的立位姿勢にて、ヒールレイズ運動を繰り返し行った。ヒールレイズ運動の実施リズムは、100BPM とした。リズムに合わせる練習を 2 回行い、実行可能になったことを確認した後、実験を行った。被験者のヒールレイズ運動中における筋音筋電センサによる計測は 1000Hz にて 10 秒間記録した。

次に筋音筋電センサの解析は、筋音筋電データを MicroSD カードより CSV ファイルとして、Excel にインポートした。その後、Excel VBA を用いて、筋電図の全波整流し、ローパスフィルターをかけ、平均値による基線の確定及びグラフ化を行った。典型的なグラフを **Figure 2** へ示した。

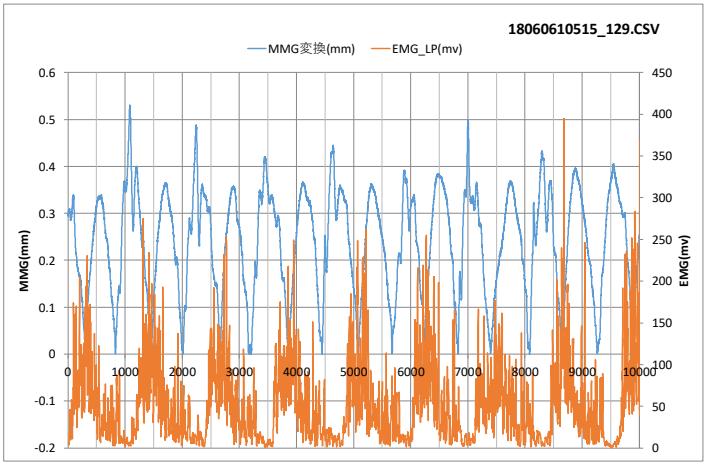


Figure 2 ヒールレイズにおける筋音筋電図の典型例

ヒールレイズは、筋放電開始から筋放電終了までを 1 試技と判断した。解析対象の試技は、前半はばらつきが大きかったため、運動条件中の最後の 5 試技を解析対象とした。解析項目は、各試技における①筋電図の RMS（Root Mean Square）：以下、筋電図 RMS(mv)、②筋放電開始からの筋音図最大値の時間：以下、筋音図ピーク時間（msec)、③筋放電開始後の筋音図最大値に向かう正の傾き：以下、筋音図傾き(+)、④筋放電開始後における筋音図最大値からの低下する負の傾き：以下、筋音図傾き（-)、⑤筋放電中の筋音図の平均値：以下、筋音図 RMS(mm)、⑥⑤筋音図の平均値を①筋電図 RMS で除したもの：以下、筋音図/筋電図（mm/v）とした。**Figure 3** に解析項目を図示した。

統計処理は、各被験者にヒールレイズを 2 回実施

してもらい、その結果における再現性の評価を級内相関係数（Intraclass correlation coefficient: ICC）を使用した。ヒールレイズ間の比較には、一元配置分散分析を用い、有意水準は5%未満とした。全ての統計は、Excel 統計（株式会社 社会情報サービス社製：東京）を用いて解析した。

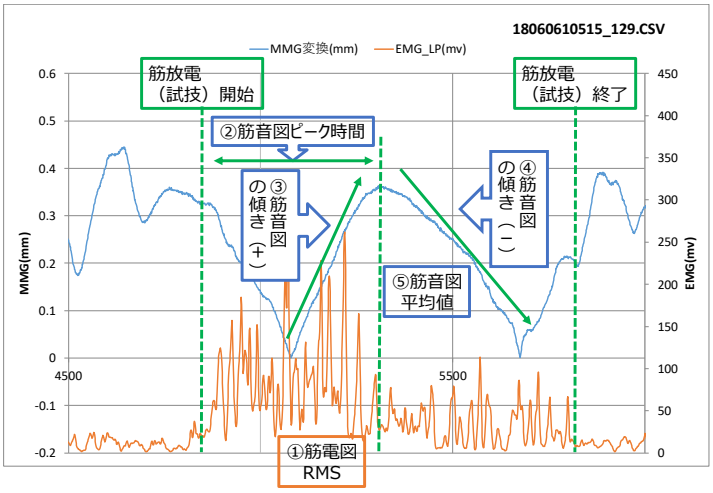


Figure 3：解析項目

【結果】各解析項目における ICC（1,1）（1,2）の結果を Table 1 へ示した。すなわち、5 回計測された各解析項目について、被験者を因子として、ICC(1,1)（1,2）を求めた。その結果、①筋電図 RMS、③筋音図傾き(+)、⑤筋音図 RMS、⑥筋音図/筋電図については級内相関係数が高かった。また、単一の信頼性と平均の信頼性を比較するとすべての解析項目において、平均の信頼性が高かった。

【考察】本実験 1 では、各解析項目について級内相関係数（ICC）を用いて評価した。ICC は測定対象（object of measurements）の分散が全分散に占める割合と定義される（桑原ら、1993）。その結果、①筋電図 RMS、③筋音図傾き(+)、⑤筋音図 RMS、⑥筋音図/筋電図については級内相関係数が高かった。Bartko（1966）は、ICC による再現性評価として、ICC 0.81～1.00 を excellent、0.61～0.80 を good、0.60 以下を poor と分類している。これに従えば、上記の①筋電図 RMS、③筋音図傾き(+)、⑤筋音図 RMS、⑥筋音図/筋電図は、平均の信頼性において、good 以上を示しており、今後の検討に対する可能性を示唆した。

逆に②筋音図ピーク時間及び④筋音図の傾き(－)は、ICC は低い結果となった。これにはヒールレイズの動作方法が影響していると考えられた。特に力をあまり必要としない、ヒールレイズの落下時期はバラツキを大きくすることが考察された。今屋らは、スポーツ復帰に直結するヒールレイズの評価方法に関しては、上肢による支持や評価肢位の違いにより代償動作が生じることが多く、これによりヒールレイズの能力を見誤る可能性が高いと述べている（2017）。このことからも、踵のあげ方や下ろし方についての統一性を高めていくことが今後の課題となると考えられた。

また、本実験では、下肢のコンディショニングの指標として評価すべきと考え、腓腹筋内側頭における級内相関係数を検討した。しかしながら、スポーツ復帰と片足ヒールレイズ 20 回以上の時間が相関していると報告もあり、片足や外側頭での検討など、さらに別部位や筋腹部での影響なども今後検討していく必要があると考えられた。

Table 1　各解析項目における級内相関係数〔ICC(1, 1)、(1, 2)〕

解析項目	一元配置変量	級内相関係数	95%信頼区間 下限値	95%信頼区間 上限値	F検定（H0:級内相関係数=0） F 値	自由度1	自由度2	P 値
①筋電図RMS(mv)	単一の信頼性 ICC(1,1)	0.739	0.573	0.847	6.671	44	45	P < 0.001 **
	平均の信頼性 ICC(1,2)	0.850	0.728	0.917	6.671	44	45	P < 0.001 **
②筋音図ピーク時間（msec）	単一の信頼性 ICC(1,1)	0.125	-0.170	0.400	1.285	44	45	0.202
	平均の信頼性 ICC(1,2)	0.222	-0.410	0.571	1.285	44	45	0.202
③筋音図傾き(+)	単一の信頼性 ICC(1,1)	0.530	0.275	0.716	3.253	41	42	P < 0.001 **
	平均の信頼性 ICC(1,2)	0.693	0.431	0.834	3.253	41	42	P < 0.001 **
④筋音図傾き（-）	単一の信頼性 ICC(1,1)	-0.009	-0.310	0.295	0.982	40	41	0.523
	平均の信頼性 ICC(1,2)	-0.019	-0.900	0.455	0.982	40	41	0.523
⑤筋音図RMS(mm)	単一の信頼性 ICC(1,1)	0.828	0.708	0.901	10.611	44	45	P < 0.001 **
	平均の信頼性 ICC(1,2)	0.906	0.829	0.948	10.611	44	45	P < 0.001 **
⑥筋音図/筋電図（mm/v）	単一の信頼性 ICC(1,1)	0.610	0.390	0.765	4.131	44	45	P < 0.001 **
	平均の信頼性 ICC(1,2)	0.758	0.561	0.867	4.131	44	45	P < 0.001 **

**：P<0.01

実験２．下腿へのストレッチポールが筋音筋電図へ及ぼす影響

【背景】スポーツ現場では、よくポール系器具を使った下腿筋群のケア方法が用いられている。下腿筋群には､前脛骨筋や腓腹筋､ヒラメ筋などが含まれ、もちろんアキレス腱も同様の方法で「ほぐす」ことができるといわれている。

多くの研究から、疲労に伴って筋が硬くなることが報告されている(Murayama et al., 2000, 2005)。ストレッチポールを用いることにより、筋の硬さを「ほぐす」ことを定量化することができることにより、有用性は高まる。それら筋の硬度筋音筋電センサについては、同時に筋音図と筋電図が測定できることにメリットがある。しかしながら、ストレッチポールに対する効果を筋電図と筋音図の相互的なパラメータから検証した研究は見当たらない。

【目的】そこで実験２では､ストレッチポールの「ほくず」効果について、筋音筋電センタによる測定を行い、各パラメータの変化を検討することを目的とした。

【方法】被験者は、下肢に既往歴のない健常な成人大学生 23 名とした（男性：12 名・女性 11 名、平均年齢 20.5±1.0 歳、下腿長：40.3±3.2 ㎝)。被験者には、研究目的・実験内容を十分説明した上で研究内容を理解し、承諾しした者が本研究へ参加した。

下腿へのストレッチポールのアプローチ方法は、片足を伸ばして、筋音筋電センサを付けた部分に、ポールにのせた｡その後､逆足を下腿部の上にのせ、上から足を押さえるようにし、痛気持ちいいくらいの強度でポールを転がした。ストレッチポールの時間は左右 1 分間ずつとした。

ストレッチポールによるアプローチの前後に筋音筋電センサによる測定を行った。ストレッチポール介入前を Pre 測定、介入後を Post 測定とした。

筋音筋電センサ（「Measee」，㈱エヌ・シー・ピー社製：岡山県）は､軸足（ボールを蹴るときの軸脚）の腓腹筋内側頭へ電極２つの上に筋音筋電センサを貼付した。腓腹筋内側頭への貼付位置は下腿（踵骨隆起から腓骨頭）の長さの上部 1/3 とした(**Figure 1**)。その後、ベルクロ付き伸縮ベルトにてセンサの固定を行った。

計測中の運動条件は、両足を肩幅に開き、基本的立位姿勢にて､ヒールレイズ運動を繰り返し行った。ヒールレイズ運動の実施リズムは、100BPM とした。リズムに合わせる練習を２回行い、実行可能になったことを確認した後、実験を行った。被験者のヒールレイズ運動中における筋音筋電センサによる計測は 1000Hz にて 10 秒間記録した。

次に筋音筋電センサの解析は、筋音筋電データを MicroSD カードより CSV ファイルとして、Excel にインポートした。その後、Excel VBA を用いて、筋電図の全波整流し、ローパスフィルターをかけ、平均値による基線の確定及びグラフ化を行った。その後、実験１の結果より、①筋電図 RMS、③筋音図傾き(+)、⑤筋音図 RMS、⑥筋音図/筋電図を解析パラメータとした。

統計処理は､ストレッチポール前後 (Pre vs Post) の比較には、paired-t 検定を用いた。また、正規分布していないデータに関しては、ウィルコクソンの符号付き順位検定を用いた。有意水準は 5%未満とした。全ての統計は、Excel 統計を用いて解析した。

【結果】ストレッチポール前後（Pre vs Post）の比較結果を Table 2 に示す。その結果、③筋音図傾き（+）において、Post は Pre と比較し有意に傾きが小さくなった（P=0.016)。また⑤筋音図 RMS において、Post は Pre と比較し、低くなる傾向がみられた（P=0.073)。⑥筋音図/筋電図において、Post は Pre と比較し、低くなる傾向がみられた（P=0.089)。

Table 2　ストレッチポール前後における結果比較

解析パラメータ	Pre	Post	検定方法	P値	
①筋電図RMS(mv)	104.971 ± 36.292	108.390 ± 37.779	paired-t	0.460	
③筋音図傾き(+)	0.000269 ± 0.000297	0.000157 ± 0.000176	Wilcoxon signed rank	0.016	※
⑤筋音図RMS(㎜)	0.054 ± 0.033	0.051 ± 0.047	Wilcoxon signed rank	0.073	
⑥筋音図/筋電図（㎜/v）	0.645 ± 0.631	0.544 ± 0.538	Wilcoxon signed rank	0.089	

※P＜0.05

【考察】本実験２の結果、①筋電図の変化は認められなかった。しかしながら、③筋音図の傾き(+)は、有意な低下が認められ、⑤筋音図 RMS、⑥筋音図/筋電図についても、低下傾向を示した。このことは、③筋音図の傾きの低下については､「ほぐす」効果により筋の硬さが取れたことにより、活動電位が同等

であれば、柔らかい筋は緩やかに収縮されることが考えらえた。この結果が、有意差は認められなかったものの、⑤筋音図 RMS と⑥筋音図/筋電図にも影響がでていると推察された。

一方、生波形を確認すると、筋音図は筋電図１波に対して、2 波が発生している被験者が多くみられた。このことは、1 回目：踵の挙上時の短縮性収縮、2 回目：踵接地時での、伸張性収縮ではないかと推察される。従って、今後の課題は、筋音図の波形が説明できるために、筋力と筋音筋電図の関係や皮下脂肪への影響など、基礎的研究も進めていく必要があると考えられた。

以上

新規ゲノム編集ラット作製法 rGONAD 法を用いた腎臓病モデルラットの開発

重井医学研究所　分子遺伝部門

松山　誠

CRISPR-Cas9 に代表されるゲノム編集技術の発展により，これまで遺伝子改変が困難であった生物においてもゲノム編集が行われるようになった．ラット（Rattus norvegicus）は腎臓病や高血圧など様々な疾患モデル動物として古くから利用されてきた．マウスよりも個体サイズが大きく，扱いやすいなど実験的利点がある一方で，近年まで ES 細胞が樹立されず，ノックアウトラットの作製や遺伝的解析を行う上での欠点となっていた．現在はゲノム編集技術を利用した遺伝子改変ラットの作製法が発達し，遺伝的解析の有用なモデル動物となりつつある．しかし，実際の作製過程においては，ex vivo での受精卵の取り扱いやマニピュレーターによるマイクロインジェクションなど非常に高度かつ専門的な技術が必要とされる．しかし，2015 年遺伝子改変マウス作製を簡便にする手法「GONAD (Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery)法」が開発された．この研究により，マウス体外に受精卵を取り出すこと無く，卵管内にある着床前の受精卵の細胞膜に微細な穴を開け，細胞外の核酸・タンパクを受精卵に入れることで着床前胚のゲノム編集を行い，特定の遺伝子が改変されたマウスを作製することが可能になった．本研究では，肥満や高血圧など代表的な疾患モデル系統が存在するラットにおいて，遺伝子改変ラットの作製を簡便にする rGONAD 法の開発に成功した．今後 rGONAD 法は，ラットの疾患モデル系統を用いた基礎医学研究だけでなく，マウス・ラットと比較して胚操作が困難であるブタ，ウシなど家畜への応用も可能であると期待される．

はじめに

これまで遺伝子改変マウスの作製には，ES 細胞の培養，相同組み換え技術，遺伝子改変 ES 細胞の受精卵への顕微注入など，熟練した技術と高価な設備が必要であった．近年では，ZFN，TALEN，CRISPR/Cas9 といったゲノム編集技術が次々と登場し，ES 細胞を使わない遺伝子改変マウスの作製方法が爆発的に広まった 1)．しかし，顕微鏡下でガラス針を操作し受精卵に遺伝子導入するマイクロインジェクション法は，熟練した技術が必要である．そのため誰もが容易に遺伝子改変マウスを作製できる状況にはなかった．

2015 年遺伝子改変マウス作製を簡便にする手法「GONAD (Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery)法」が開発された 2)．この研究により，マウス体外に受精卵を取り出すこと無く，卵管内にある着床前の受精卵の細胞膜に微細な穴を開け，細胞外の核酸・タンパクを受精卵に入れることで着床前胚のゲノム編集を行い，特定の遺伝子が改変されたマウスを作製することが可能になった．また私たちは，GONAD 法より高効率に遺伝子改変マウスを作製できる i-GONAD 法の開発に成功した 3)．しかし，この GONAD 法の技術はまだマウスだけしか成功しておらず，他の哺乳類での報告はまだ無かった．そこで本研究では，肥満や高血圧など代表的な疾患モデル系統が存在するラットにおいて，遺伝子改変ラットの作製を簡便にする GONAD 法の開発に取り組んだ．その結果，ラットにおいても GONAD 法を用いて遺伝子破壊（Knockout; KO）や遺伝子挿入（Knock-in; KI）が可能であることが分かった．

材料と方法

1.　実験動物

WKY ラットをチャールズリバー，DA ラットを日本 SLC から購入した．動物を 12:12-h の明暗時間で飼育した．

図 2a にあるように，ラットを用いた GONAD 法のエレクトロポレーションの効率を検討するために，雌ラットに 20U の PMSG と 10U の hCG のホルモンを腹腔に

投与した．投与した雌を雄と一晩交配した．図３と図４の CRISPR/Cas9 の実験では，雌にホルモンを投与せずに交配を行った．

2.　蛍光デキストランの作製

エレクトロポレーションの効率を検討するために，0.5mg/ml のテトラメチルローダミンをラベルしたデキストラン（Thermo）と 0.1%トリパンブルーを使用した．

3.　CRISPR/Cas9 溶液の作製

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集を行うために，CRISPR/Cas9 溶液を Alt-R CRISPR/Cas9 システム（IDT）の取扱説明書にしたがって作製した．gRNA の配列を CHOPCHOP ホームページ（http://chopchop.cbu.uib.no/)のアルゴリズムを使用して作製した.IDT 社によって合成された crRNA と tracrRNA を 200uM にそれぞれ調整し,両者を混合 95℃5 分加熱後，室温までゆっくり冷却した． IDT 社の Cas9 タンパク,ユーロフィンジェノミクス社で合成した KI 作製のための一本鎖 DNA（ssDNA）を使用した．

4.　rGONAD 法

受精卵が1細胞期にある交配後0.75日の雌ラットを用いた（図 2a)．インジェクション直前に，終濃度が 30uM gRNA，1mg/ml Cas9，1mg/ml ssDNA になるように試薬を調整した．背中側から卵管を露出させ，実体顕微鏡（オリンパス社）（図 2b）下で，2-2.5ul の調整した混合液を卵管に注入した（図 2c,d)．試薬を注入後，卵管に PBS を濡らしたキムワイプをつけ，ネッパジーン社の電極を用いてエレクトロポレーションを行った．使用したエレクトロポレーターは，NEPA21（ネッパジーン社）（図 2b)．エレクトロポレーションの条件は，次の通り：Poring pulse；50 or 40 or 30 V，5 msec pulse，50 msec pulse interval，number of pulse 3 times，10% decay（± pulse orientation）and Transfer pulse；10 V，50 msec pulse，50 msec pulse，number of pulse 3 or 6 times，40% decay（± pulse orientation）（図 2e,f）．

5.　蛍光の検出とジェノタイピング

エレクトロポレーションの効率を検討するために，テトラメチルローダミンをラベルしたデキストランとインジェクションした雌ラットから，インジェクション後 2 日後に採卵した.採卵した胚を IX73 顕微鏡（オリンパス）を用いて，蛍光の確認を行った．ゲノム編集によって生じた遺伝子変異を，PCR 法とシーケンス法により検討を行った．ラットのゲノム DNA を耳や尻尾から採取した.PCR とシーケンスでは，下記のプライマーを使用した：Tyr-fw（5′-ttggttttcacagatcatttg-3′），Tyr-rv（5′-gctgaaattggcagttctatc-3′）．

結果

1.　蛍光デキストランを用いたラット GONAD 法の最適条件の検討

これまで，マウスを用いた i-GONAD 法では，インジェクションする胚が 1 細胞期になるように，交配後 0.7 日の雌を用いて実験を行っていた．ラットにおいて受精卵の確認を行ったところ,交配後 0.75 日において，１細胞期の胚を得る事ができた．そのため以後のインジェクションを交配後 0.75 日にて施工することにした．次に，ラットにおける GONAD 法のエレクトロポレーションの条件を検討するために，テトラメチルローダミンをラベルしたデキストランを用いて検討した．WKY ラットにおいて，交配した雌の卵管に 2-2.5ul の溶液を注入後，エレクトロポレーションを行った．今回，5 種類の電気条件（voltage with poring pulse: 50 V, or 40 V, or 30 V; number of pulses with transfer pulse: 3 times or 6 times; 図 2e,f,i 参照)を用いて検討を行った．インジェクション 2 日後に採卵し，蛍光を有する胚の割合を確認した．その結果，多く胚が蛍光を有していることが確認できた（図 2g,h)．また，今回のエレクトロポレーションの条件では，「電圧が 50V・トランスファーパルスが 6 回」の時，1 番効率が高いことが明らかになった．次にラットの系統間によってエレクトロポレーションの効率に差がないかを

検討するために，WKY 系統，DA 系統，WKY/DA（F1）系統のラットを用いてその比較を行った．3 つの系統間において，エレクトロポレーションの効率に大きな差は見られなかった（図 i-k，表 1）．以上の結果から，ラットにおける GONAD 法の条件は，「電圧が 50V・トランスファーパルスが 6 回」が最適であることが示唆された．よって私たちは，この技術を rGONAD 法（Rat improved GONAD）と名付けた．

2. rGONAD 法を用いた KO ラット作製の試み

次に，rGONAD 法が CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集が可能であるかを検討した．ターゲットとする遺伝子として，毛色に関連する Tyr 遺伝子を用いた．野生型の Tyr 遺伝子に対する gRNA を作製し，Cas9 タンパクとともに，WKY と DA 系統を交配した雌の卵管にマイクロインジェクション・エレクトロポレーションを行った（図 3a）．エレクトロポレーションの条件を，3 種類の電気条件（voltage with poring pulse: 50 V, or 40 V, or 30 V; number of pulses with transfer pulse: 6 times）にて行った．エレクトロポレーション後，施術した雌は妊娠し，仔を出産した（表 2）．出産した個体の一部は，白色の毛色の仔であった（図 3b）．シーケンス解析によって，生まれてきた仔ラットの Tyr 遺伝子を確認したところ，白色の仔の遺伝子に変異が入っていることが分かった（図 3c,d）．またエレクトロポレーションの効率を検討したところ，50V，40V，30V におけるゲノム編集の効率は，それぞれ 58.7%，35.３%，13.4%であった（図 3e，表２）．さらに系統間によるゲノム編集の効率に大きな差はなかった（図 3f，表２）．以上の結果から，さまざまな系統のラットにおいて，rGONAD 法を用いたゲノム編集が可能であることが示唆された．

3. rGONAD 法を用いた KI ラット作製の試み

また rGONAD 法が遺伝子変異だけでなく，ラット遺伝子の修復や外来遺伝子の挿入にも可能かを検討した．今回もターゲットとする遺伝子として，毛色に関連する Tyr 遺伝子を用いた．アルビノ個体は，Tyr 遺伝子に変異が入っているために，毛色が白色になる．この遺伝子変異を修復するため，変異 Tyr 遺伝子を認識する gRNA，Cas9 タンパク，さらに変異変異 Tyr 遺伝子を修復するための ssDNA を，交配した雌の卵管にマイクロインジェクション・エレクトロポレーションを行った（図 4a）．施術した雌から出産した個体から，一部黒色の毛色を持つ仔を得た（図 4b）．シーケンス解析によって，生まれてきた仔ラットの Tyr 遺伝子を確認したところ，黒色を持つ仔の Tyr 遺伝子が修復されていることが分かった（図 4c）．以上の結果から，rGONAD 法が KI も可能であることが分かった．

考察

今回の研究により，受精卵を体外に取り出さずに遺伝子改変ラットを作製できる手法 rGONAD 法の開発に成功した 4）．この研究成果により，これまで遺伝子改変が困難であったラットにおいても簡便に作製できることが明らかになった．

ラットには，高血圧や関節炎などマウスには無くラットにある独特な疾患モデル系統も存在する．特に腎臓の分野では，腎炎を発症する WKY 系統を用いた基礎医学研究がある．しかし，近年まで遺伝子改変ラットの作製が不可能であったため，ラットは遺伝子の機能を個体レベルで解析することが困難であった．GONAD 法により簡便な遺伝子改変ラットの作出が可能となれば，腎臓病の研究がより進展することが期待される．さらに GONAD 法によるゲノム編集は，マウスと比較して胚操作が困難であるブタ，ウシなど家畜への応用も可能であると考えられる．

文献

1. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng, AW Zhang F, Jaenisch R: Cell, 153: 910-8 (2013)

2. Takahashi G, Gurumurthy CB, Wada K, Miura H, Sato M, Ohtsuka M: Sci Rep, 5: 11406 (2015)

3. Ohtsuka M, Sato M, Miura H, Takabayashi S, Matsuyama M, Koyano T, Arifin N, Nakamura S, Wada K, Gurumurthy CB: Genome Biol, 19: 25 (2018)

4. Kobayashi T, Namba M, Koyano T, Fukushima M, Sato M, Ohtsuka M, Matsuyama M: BMC Biotechnol, 18: 19 (2018)

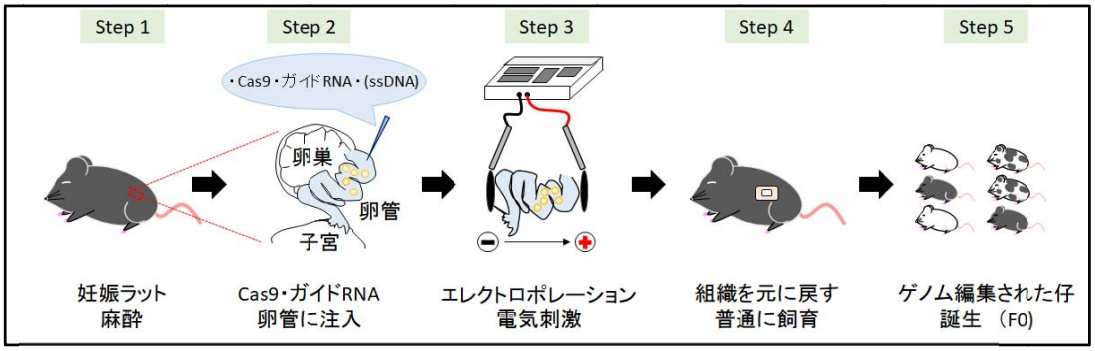


図1
rGONAD (Rat Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery)法の流れ

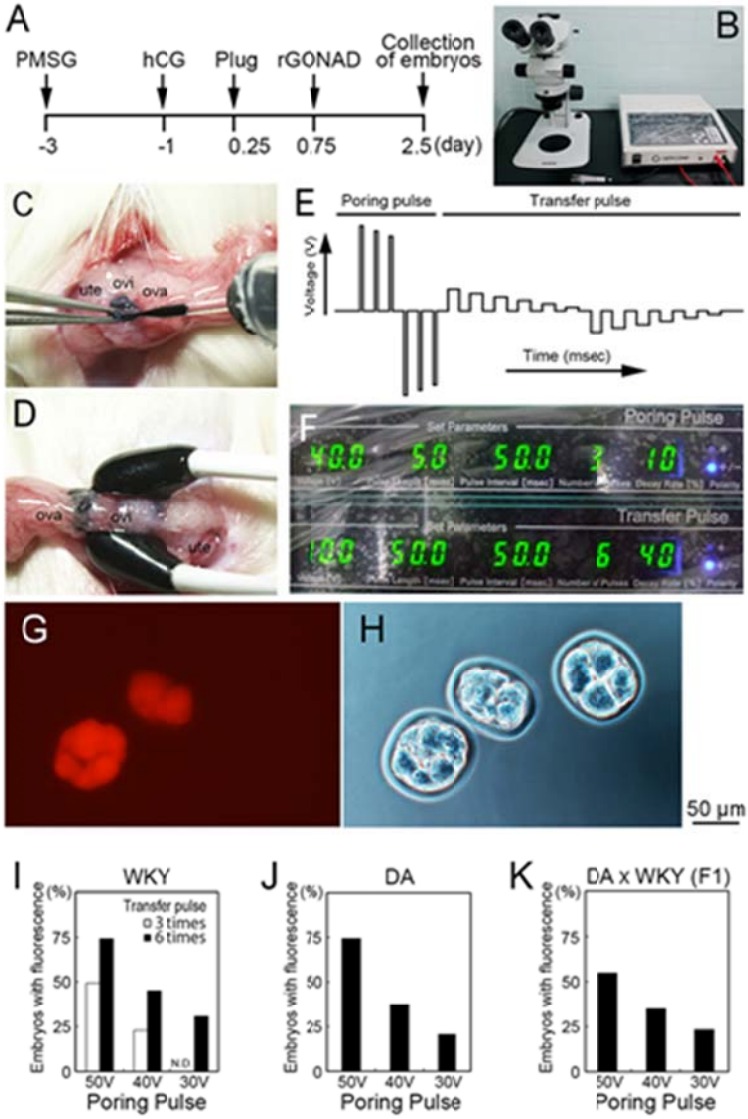


図2
rGONAD法の確立
(a)rGONAD法のスケジュール (b)実体顕微鏡とエレクトロポレータ (c, d)ラット卵管へのインジェクションとエレクトロポレーション (e)エレクトロポレーションの電気波形 (f)エレクトロポレーションの条件 (g, h)蛍光デキストランがラット胚に導入されている (i-j)ラット系統間における導入効率の差の検討

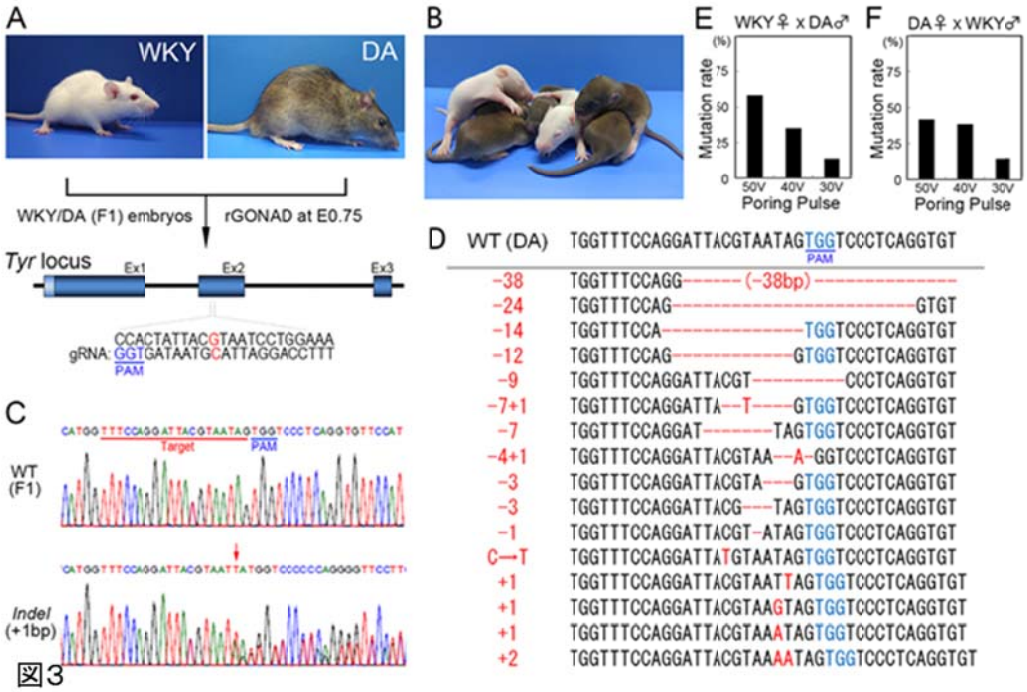


図3

rGONAD法を用いたKOラット作製の試み

(a)WKYとDAを交配した受精卵（F1）にCRISPR/Cas9を導入 (b)ゲノム編集されたラットの仔は毛色が白になる (c)ゲノム編集された個体のシーケンス波形 (d)ゲノム編集された個体にはさまざまな遺伝子変異が導入されている (e,f)ラット系統間におけるゲノム編集効率

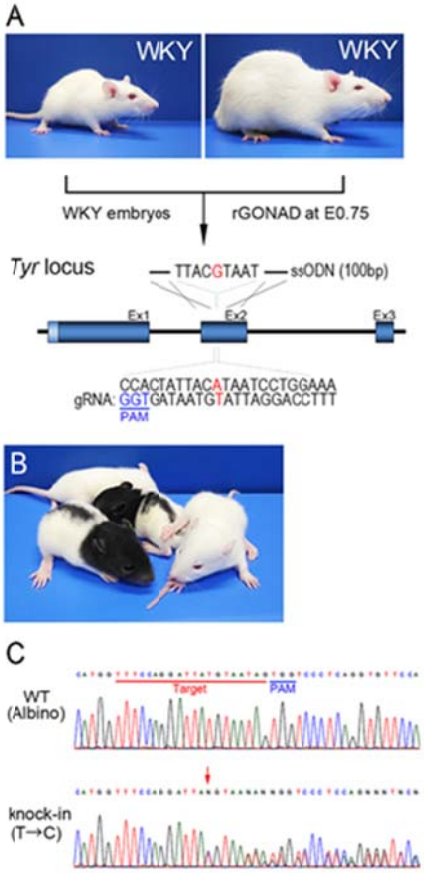


図4

rGONAD法を用いたKIラット作製の試み

(a)WKYを交配した受精卵にCRISPR/Cas9を導入 (b)ゲノム編集されたラットの仔は毛色が白から一部黒色になる (c)ゲノム編集された個体のシーケンス波形

Stain	Poring Pulse Voltage (V)	Transfer pulse No. of Pulses	No. of >2-cell embryos (A)	No. of embryos with fluorescence (B)	% (B/A)
WKY	50	3	138	68	49.3
	50	6	116	86	74.1
	40	3	158	36	22.8
	40	6	124	56	45.2
	30	6	123	38	30.9
DA	50	6	118	88	74.6
	40	6	109	41	37.6
	30	6	110	23	20.9
WKY x DA (F1)	50	6	122	67	54.9
	40	6	154	54	35.1
	30	6	133	31	23.3

表1
蛍光デキストランを用いたラット胚の蛍光導入率の検討

Stain	Poring Pulse Voltage (V)	Injected	Pregnant	Pups (A)	KO (B)	% (B/A)
WKY♀ x DA♂	50	10	9	46	27	58.7
	40	10	9	68	24	35.3
	30	9	8	67	9	13.4
DA♀ x WKY♂	50	9	6	19	8	42.1
	40	9	5	26	10	38.5
	30	7	6	28	4	14.3

表2
GONAD法を用いたTyr遺伝子KOラットの作製効率

Stain	Poring Pulse Voltage (V)	Injected	Pregnant	Pups (A)	KO (B) (%: B/A)	KI (C) (%: C/A)
WKY x WKY	50	8	6	26	13 (50)	7 (26.9)
	40	9	7	45	8 (17.8)	5 (11.1)

表3
GONAD法を用いたTyr遺伝子KIラットの作製効率

音声・言語障害における新規代用音声法の開発

岡山済生会総合病院耳鼻咽喉科

平井美紗都

（概要）

頭頸部腫瘍などによる喉頭機能の障害で、自分自身の声を失うケースの中には、他者とのコミュニケーションが良好にとれないことで活動意欲の低下に繋がる事例が少なくない。口頭コミュニケーションの代替法には、非侵襲的な代用音声法として電気式人工喉頭、食道発声があるが、長期的なトレーニングを要し、習得までの個人差も大きい。われわれは、非侵襲、かつ、長期訓練を要しない新規代用音声法の開発に取り組むため、喉頭機能障害をもつ代用音声使用者にアンケート調査を行い、発話シーンを収集した。対象者は 23 名（男性 21 名、女性 2 名）、平均年齢は 74.6 歳（62～92 歳）、いずれも喉頭全摘術を受けた成人であった。現在使用中の代用音声法によるコミュニケーション満足度は、罹患前（健常時）に比べ 50%程度であった。Voice Handicap Index は食道発声群で 67.8 点、電気式人工喉頭群は 30.9 点であった。高齢発話障害者に対する読唇認識率は、健常若年者との間に大きな差は認めず、年齢や頸部手術による影響なく読み取り可能であり、さらに本技術を発展させることで代用音声法の１手段になると考えられる。

（本文）

１．はじめに

頭頸部腫瘍（喉頭癌、咽頭癌、甲状腺癌など）や交通外傷等による頸部損傷で、喉頭機能障害あるいは喪失により自身の声を失うケースに遭遇することは稀ではない。また、高齢化社会による難聴者の増加等で聞き取りもうまくできない例も多く、コミュニケーションがうまくとれず社会生活に適合できない人がいることも深刻な問題である。口頭によるコミュニケーションの代替法として、筆談、手話が知られているが、喉頭摘出者は専用の機械を用いて発声する人工喉頭、手術による気管食道瘻（シャント）形成、食道発声法を用いている。コミュニケーションが良好にとれないことは本人の生活の質(Quality of Life；QOL）に影響する。事実、患者自身やその家族からコミュニケーション障害・活動意欲低下の悪循環に陥っている話を聞く。喉頭の全摘出を受けると「音声を全く発することができない状態」になり、「音声機能の喪失」として身体障害者 3 級に該当する。術後の代用音声法として食道発声法は習得が難しく、日本では人工喉頭、欧米ではシャント形成術による外科的代用発声法の選択者が多い。シャント形成術では瘻孔部分に留置するボイスプロテーゼのトラブルで発声困難になるケースも多く、定期的な交換・通院が必要であり、またその交換等による処置にも多少の苦痛を伴う。いずれの代用法も、家庭内の日常生活活動（電話対応など）に難渋し、外出先では欲しい物品を要求できない（通じない）などの問題がある。

本研究ではカメラ画像から発話内容を読み取る読唇技術を用いて前述の問題を解決し、患者のニーズに合致した次世代の代用音声法の開発を目的としている。本研究で開発する代用音声法は、現行の代用音声法が何らかの理由で使用困難になった場合の代替法として有用である。喉頭機能障害者は精神的な不安から突発的な通院に至ることがあり、代替法の存在は患者の精神的な不安を軽減でき、医療費抑制にも繋がる。読唇技術は、患者の選択肢が増えるだけでなく、非侵襲かつ長期トレーニングを要しない代用音声法でもあり、重症・高齢・合併症などで現行法の獲得困難な患者への適応が期待できる。「意思表示ができる」、「他人とコミュニケーションをとれる」という自信・安心感により活動意欲が上昇し、QOL 改善にも繋がると考えられる。本報告では新規代用音声法開発に向けた最初の取り組みとして頭頸部癌等の治療にて喉頭の全摘出術を受けた患者への

アンケート調査、発話シーンの収集、また収集した発話シーンを用いた読唇実験を実施した結果を報告する。

２．研究方法

アンケート対象者は、当院に通院、あるいは日本喉摘者団体連合会による発声教室に通われている人で、頭頸部癌等の治療にて喉頭の全摘出術をうけた成人、かつ、本研究への参加同意を得た方とする。アンケートの項目として、現行の代用音声方法、これまで受けた治療、現在の発声方法の簡易的な満足度（罹患前の声を 10 点として比較）を調べた後、現在のコミュニケーション満足度や社会活動の指標として、アメリカにて音声障害患者の自覚的評価尺度として用いられている Voice Handicap Index（VHI）を基準に作成された日本音声言語医学会推奨版 VHI（表１）を用いる。VHI は機能的側面（F)、身体的側面（P)、感情的側面（E）の 3 つの観点から構成され、それぞれ 10 項目ずつ質問があり、ランダムに配置されている。機能的側面は自身の声の障害による社会生活での支障度や活動制限を問う項目からなる質問である。身体的側面は自分の声の状態がどの程度悪いと感じているか、それに対する努力発声の度合いについての質問である。感情的側面は自分の声に対する不安や精神的な抑圧などを問う項目となっている。これらの 30 項目について、0～4 点の 5 段階で選択回答形式（全く当てはまらない・問題ない：0 点、少しある：1 点、ときどきある：2 点、よくある：3 点、いつもある：4 点）で、120 点満点での評価である（点数が高いほど障害 Handicap を強く感じている）。

次に対象者の発話シーンを撮影した。撮影には市販のタブレット端末を用いた。発話シーンのデータは九州工業大学と共有し、画像処理技術により、保存する患者の発話シーンは顔下半分画像を切り出し、個人を特定できない画像に変換した（図２）。得られたデータを、健常若年者の発話シーンから作成した既存読唇技術を用い、読唇認識実験を行った。

なお本研究は、岡山済生会総合病院倫理委員会（承認番号：180610）の承認を得て実施している。

表１　日本音声言語医学会推奨版 VHI

1. 私の声は聞き取りにくいと思います。
2. 話していると息が切れます。
3. 騒々しい部屋では、私の声が聞き取りにくいようです。
4. １日を通して声が安定しません。
5. 家の中で家族を呼んでも、聞こえにくいようです。
6. 声のせいで、電話を避けてしまいます。
7. 声のせいで、人と話すとき緊張します。
8. 声のせいで、何人かで集まって話すことを避けてしまいます。
9. 私の声のせいで、他の人がイライラしているように感じます。
10. 「あなたの声どうしたの？」と聞かれます。
11. 声のせいで、友達、近所の人、親戚と話すことが減りました。
12. 面と向かって話していても、聞き返されます。
13. 私の声はカサカサした耳障りな声です。
14. 力を入れないと声が出ません。
15. 誰も私の声の問題をわかってくれません。
16. 声のせいで、日常生活や社会生活が制限されています。
17. 声を出してみるまで、どのような声が出るかわかりません。
18. 声を変えて出すようにしています。
19. 声のせいで、会話から取り残されていると感じます。
20. 話をするとき、頑張って声を出しています。
21. 夕方になると声の調子が悪くなります。
22. 声のせいで、収入が減ったと感じます。
23. 声のせいで、気持ちが落ち着きません。
24. 声のせいで、人づきあいが減っています。
25. 声のせいで、不利に感じます。
26. 話している途中で、声が出なくなります。
27. 人に聞き返されるとイライラします。
28. 人に聞き返されると恥ずかしくなります。
29. 声のせいで、無力感を感じます。
30. 自分の声を恥ずかしいと思います。

３．結果

３．１　アンケート結果

アンケート対象者は 23 名でいずれも喉頭全摘術を受けた成人であった。性別は男性 21 名、女性 2 名で、年齢は 62～92 歳で平均 74.6 歳（男性 73.3 歳、女性 88.5 歳）であった。現行の代用音声で最も使用しているものについては、電気式人工喉頭 13 名、食道発声 8 名、気管食道瘻発声 1 名、筆談 1 名であった。これまでに受けた治療内容（重複例あり）としては、手術 23 名、放射線治療 11 名、化学療法 5 名であった。

罹患前の自身の声を 10 点満点として、現行の代用音声法の満足度は何点かという質問では、回答数 21 例で平均 5.1 点であった。

VHI によるアンケートでは、女性 1 名（92 歳）が未回答であり、結果は全体平均では 41.6 点で、食道

発声群では平均 67.8 点、電気式人工喉頭群では平均 30.9 点であった。

３．２　高齢発話障害者の発話シーン

発話シーン撮影に用いる発話内容は表 2 に示す。

表 2　発話内容

#	よみ	#	よみ
0	ぜろ	10	ありがとう
1	いち	11	いいえ
2	に	12	おはよう
3	さん	13	おめでとう
4	よん	14	おやすみ
5	ご	15	ごめんなさい
6	ろく	16	こんにちは
7	なな	17	こんばんは
8	はち	18	さようなら
9	きゅう	19	すみません
		20	どういたしまして
		21	はい
		22	はじめまして
		23	またね
		24	もしもし

撮影における話者への負担を軽減するため、撮影機器はモニタサイズの大きいタブレットに統一して、発話内容が画面上部に表示される図 1 に示す専用ソフトウェアを利用した。一度の撮影で話者は 25 単語を 1 回ずつ順番に発話した。男性 16 名、女性 2 名、計 18 名の発話シーンを収集した。年齢は 62～92 歳であり、平均 74.8 歳であった。18 名より抽出した口唇 ROI（対象領域：Region of Interest）を図 2 に示す。17 名は 5 回ずつ撮影し、1 名のみ撮影回数は 3 回であり、18 名より 2200 サンプルの発話シーンを撮影した。

３．３　発話シーンの解析

本研究では、従来の健常若年者発話シーン 36 例（一部を図 3 に示す）と高齢発話障害者 18 名の 2 種類の発話シーンを比較解析した。撮影方法および発話内容は同じとしている。健常若年者は 20～26 歳の大学生 36 名（男性 21 名、女性 15 名）で発話シーンは 27000 サンプルである。

全ての認識実験では、学習データとテストデータに異なる人物の発話シーンを用いる不特定話者認識実験を実施した。若年者の発話シーンのみで学習データを作成しテストデータを認識実験させたところ（条件 1）、認識率は 76%であった。高齢発話障害者で学習データを作成しテストデータを認識実験させたところ（条件 2）、認識率は 45.3%と低下した。これらの学習データ数は条件 1 の約 1 割であり、学習データ数が少ないため認識精度が低くなったと推測する。若年者の学習データを用い、高齢発話障害者の発話シーンを用いて追加学習させ、高齢者のテストデータで認識実験させたところ（条件 3）、認識率は 73.2%と条件 1 とほぼ同等の認識精度を得た。若年者群と高齢発話障害者群での単語毎の読み取り認識率の相関係数は 0.761 で認識率の傾向には強い相関を認めた（図４）。15 挨拶語の平均認識率はそれぞれ若年者 85.5%、高齢発話障害者 81.3%だが、一方、10 数字単語の平均認識率はそれぞれ若年者 61.7%、高齢発話障害者 61.2%であった。数字単語の方が、音素数が少ないため、認識が難しいと推測する。

図 1 発話シーン撮影用ソフトウェアの撮影画面



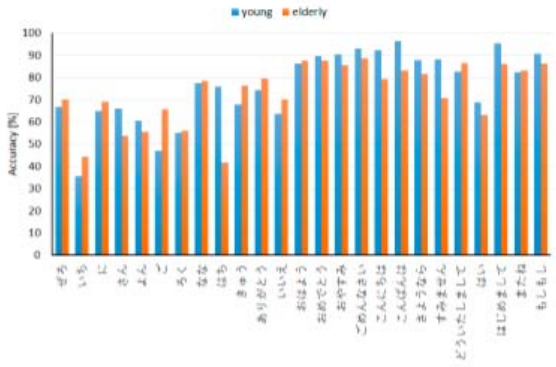
図 2 高齢発話障害者 18 名の口唇ＲＯＩ



図 3 健常若年者の口唇ＲＯＩ



図 4　単語毎の認識率



４．考察・まとめ

罹患前（健常時）の自身の声によるコミュニケーションと比較して、現行の代用音声によるコミュニケーション満足度は平均 5.1 点（10 点満点）であった。つまり健常時のコミュニケーションの約 50%程度の満足度しか得られていない。その理由を含めた詳細調査のため、日本音声言語医学会推奨版 VHI によるアンケートを行ったところ、食道発声群では平均 67.8 点、電気式人工喉頭群では平均 30.9 点であった。自身の声に近く、また、外観上は通常発声のように見え、さらに発声の充実感があるという点から、電気式人工喉頭群よりも点数が低いと推測していたが、結果的には逆であった。年齢による結果の差異について検討したところ、食道発声群の平均年齢は 71.8 歳、電気式人工喉頭群の平均年齢は 75.1 歳であり、参加者全体の年齢中間値 73.5 歳でそれより年齢の低い群と高い群にわけたところ、年齢の低い群では平均 45.3 点、高い群では平均 41.8 点と大きな違いはなく、年齢による偏りではないと思われる。食道発声群 7 名、電気式人工喉頭群 13 名と少ないため、さらに回答者数を増やす必要がある。またアンケート結果が 2 点～111 点と個人差が大きかったことも気になる点ではあった。今回の研究参加者は高齢者であり、VHI 調査は質問項目が 30 と多く、回答に負担を要する印象を持った。質問を 10 項目に絞った VHI-10（Rosen ら提唱）という簡易版も従来の VHI の結果と相違がなかったという報告もあり、VHI-10 の導入を今後は検討したい。

発話シーン解析については、高齢発話障害者を対象としたため、多数のシーンを収集することは困難と考え、健常若年者の発話シーンを用いた既存読唇技術を用いて解析を進めたところ、認識精度が若年者を対象にした場合より低いという結果であった。これは、図２と図３の比較に見られるように、高齢発話障害者の方が皺の彫りが深く、加齢に伴う外観変化が原因と考えられ、従来の健常若年者の発話シーンを用いたアルゴリズムに高齢発話障害者の発話シーンを用いて追加学習させ、再度認識実験をしたところ、認識率は 73.2%と健常若年者が対象の場合とほぼ同等の認識精度を得た。画像からの読唇技術は年齢や、健常者と頸部手術後の区別はなく読み取り可能であるといえる。

以上より、高齢発話障害者は現行の代用音声への満足感は未だ低く、高齢発話障害者に対する読唇認識率は、健常若年者との間に大きな差は認めず、年齢や頸部手術による影響なく読み取り可能であることがわかり、さらに本技術を発展させることで代用音声法の１手段になると考えられた。

平成３０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

賴藤　貴志

■概要

カナダのオタワで2018年8月27日～2018年8月30日に開催されたISEE(国際環境疫学会) 2018に参加し、アジア・太平洋地域の研究者と、当該地域で喫緊の課題である大気汚染の健康影響に関するシンポジウムを開催した。シンポジウムの中で、各地域における大気汚染の慢性曝露の健康影響について発表し、その後質疑応答を行った。シンポジウムを通し、アジア・太平洋地域の研究者間における研究協力・方法論の統一化、若手研究者の育成を目指した。その他、学会会期中に様々な知見を入手した。今後、アジア・太平洋地域での大規模な研究協力、知見の政策への応用を目標とする。

■渡航内容

□渡航先：カナダ　オンタリオ州　オタワ市

□渡航日程：2018年8月26日～2018年9月2日

□渡航の背景：

近年、世界的に（室外）大気汚染による健康影響が注目されている。2015年には世界中で，大気汚染により420万人の死亡が引き起こされたと推計され，大気汚染は世界中の死亡における第5位のリスク要因と考えられている（Cohen et al., Lancet 2017)。その420万人の大気汚染による死亡数の中でアジア地域が占める割合は大きく、59%が南～東アジアで生じたとされており、アジア地域における喫緊の課題と考えられる。

このような背景を受け、アジア・太平洋地域の大気汚染や地球温暖化などの健康影響に取り組んでいる研究者の間で、AIRCAP（Asian Initiative for Research on Climate and Air Pollution）というネットワークを作り、活動を行っている。AIRCAPの活動を通し、研究協力、若手研究者の育成、研究成果の政策や実践への応用を目指している。今回の渡航者・賴藤はAIRCAPの9人の運営委員会の中の一人である。

今回、International Society for Environmental Epidemiology（ISEE、国際環境疫学会)という我々の領域における最大規模の学会の2018年の集会がカナダのオタワで開催された。その学会において、AIRCAPとして大気汚染の健康影響に関するシンポジウムを開催した。

□渡航の目的：ISEE 2018において、アジア・太平洋地域の研究者とシンポジウムを開催すると同時に、学会のその他の企画に参加し、大気汚染やその他の環境物質による健康影響に関する最新の知見を手に入れる。

□内容：

<u>シンポジウム概要</u>

学会3日目8/29木曜日に「Effects of Long-Term Exposure to Ambient Air Pollution in the Asia-Pacific Region（座長: Prof. Bin Jalaludin, University of New South Wales, Sydney, Australia)」と題し、シンポジウムを開催。各地域における大気汚染の慢性曝露の健康影響について発表し、その後質疑応答を行った。今回の渡航者・賴藤は、シンポジウムの5人の発表者のうちの１人である。その他、韓国、中国、オーストラリア、また他地域からの研究者としてオランダの研究者が発表を行った。それらを通し、アジア・太平洋地域の研究者間における研究協力・方法論の統一化、若手研究者の育成をシンポジウムの成果として目指した。

ちなみに、AIRCAPの運営委員会の一人であるソウル国立大学の研究者は、世界保健機構（WHO）西太平洋事務局と国連環境計画（UNEP）が事務局を務めるアジア各国の国際会議である「Regional Forum on Environment

and Health」の「大気汚染部会」の部会長を務めており、AIRCAP より得られる知見のアジア各国の政策への応用は可能と考えている。

発表内容

私は、「Long-term exposure to $PM_{2.5}$ and all-cause and cause-specific mortality in Japan」と題し、岡山県岡山市の住民を対象にした研究発表を行った。具体的には、衛星画像より推測された $PM_{2.5}$（微小粒子状物質）濃度を研究対象者約 6 万人に割り振り、全死亡・死因別死亡との関係を解析。結果として、日本においても $PM_{2.5}$ の曝露により、全死亡や死因別死亡が増加していることが示された。発表は、好評であり、フロアより様々な質問を受けた。現在、当該内容について論文を執筆しているところである。

その他の学会会期中の活動

その他、他の環境物質への曝露ということで、メチル水銀中毒に関するポスター発表を行ったり、様々なシンポジウムや口頭・ポスター発表の場へ参加したりし、多くの知見を手にいれた。また、AIRCAP ではもう一つワークショップを開催しており、こちらにも参加し、大気汚染の曝露濃度の割り振り方について更なる知見を得た。これらの知見を今後の日本・アジアにおける研究へ活用していく予定である。

□今後の展望：

今後、AIRCAP を通した、アジア地域の研究者との共同研究やシンポジウムなどの開催により、アジア地域における大気汚染の健康影響に関する知見を集積していく。我々の研究から得られた知見がアジア地域における大気汚染政策に応用されることが期待される。

□謝辞：今回、旅費を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学術研究費助成事業「海外渡航費助成」に感謝いたします。



写真１．発表中の渡航者



写真２．学会場から見えるリドー運河

平成 30 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

門田　有希

（概要）平成 30 年 9 月 5 日～8 日にかけて韓国（全州市）の Rural Development Administration（RDA：和名では，農村振興庁）で開催された 8th International Sweetpotato Symposium に参加し，研究発表を行った．このシンポジウムはサツマイモに関する唯一の国際シンポジウムであり，日本・中国・韓国を含め，アメリカやインド，カザフスタンなど世界各国からの研究者が集う場となっている．第８回目となった本シンポジウムでは総勢 120 名を超える参加者があり，「Promoting High-value Added Industry of Sweetpotato for the Forth Industrial Innovation」というテーマのもと，開催された．以下詳細を示す．

【日程】

本海外渡航に関する旅程

日程	内容	詳細
9 月 5 日	移動日	岡山桃太郎空港－仁川空港（大韓航空利用　10:30 発－12:00 着） 仁川空港から全州市までバス移動 シンポジウム受付 Committee member での打ち合わせに参加
9 月 6 日	シンポジウム一日目	Opening Ceremony Keynote Lectures General Session I: Genetic Resources, Breeding and Cultivation General Session II: Physiology and Biotechnology Genetal Session III: Biochemistry and Processing
9 月 7 日	シンポジウム二日目	Poster Presentation Special Session I: Genomics Special Session II: Biomaterials Special Session III: Yong Scientists Technical Tour (RDA Institutes) Closing Ceremony
9 月 8 日	移動日	全州市－仁川空港までバス移動 仁川空港－岡山桃太郎空港　（大韓航空利用　8:00 発－9:30 着）

【活動内容】

申請者は，シンポジウム二日目の Special Session III (Young Scientists)にて口頭発表を行った．このセッションでは，日本・韓国・中国から１名ずつ若手の研究者が最新の研究成果を披露した．申請者はトップバッターであったが，ここ数年進めてきたサツマイモの遺伝解析結果について紹介した（参考写真 1)．発表タイトルは「Genome-wide Genetic Analysis for Several Agronomical Traits in Sweetpotato」であり，サツマイモを対象に次世代シーケンサー（以降 NGS とする）を利用してゲノムワイドな遺伝解析を行っている内容を紹介した．従来，サツマイモは遺伝解析が極めて困難な作物種とされてきた．しかしながら，最近申請者らは，NGS を駆使することで病害抵抗性や塊根の着色など，様々な農業形質についての遺伝解析を実施してきた．実際に，線虫抵抗性に関する遺伝子座の特定ならびに抵抗性個体の選抜 DNA マーカーの開発にも成功しているため，それら研究内容を紹介した．加えて申請者らは，農作物品種の保護，食の安心・安全に関わる品種識別技術の開発にも力を入れてきた．農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（実用技術開発ステージ）「現場での検査導入を実現する農作物品種 DNA 判定法の開発」という研究プロジェクトでは，サツマイモをはじめ，カンキツ・リンゴ・イチゴ等複数の作物種を対象にレトロトランスポゾンという複製 DNA 配列を利用した品種識別マーカーを開発した．その際も NGS を駆使することで，効率的に多数の品種識別 DNA マーカーを開発することができている．共同研究先の農研機構九州沖縄農業研究センター（都城拠点）では，申請者らのデータを使い，育成されたばかりの新品種についてもいち早く DNA マーカーを開発している（未発表データ）．今回はこれら研究内容を紹介するとともに，新たな研究費の獲得に向けて，共同研究者らと研究内容に関するディスカッションを行った．現在進めている研究内容についても，お互いの進捗状況を報告することができ，今後取り組むべき問題点などについても協議することができた．



写真1．シンポジウムで発表する様子

また，研究に関するディスカッションだけではなく，国際シンポジウムの開催・運営に関する打ち合わせにも参加した（9 月 5 日の Committee member での打ち合わせ）．本シンポジウムでは，中国・韓国・日本から選ばれた数名が committee member となっている．申請者もその一人であるため，学会の運営・開催に関する打ち合わせに参加した．今後益々このシンポジウムが発展するよう，メンバー同士が意見交換し，President や Vice-president の決定，また今後のシンポジウム開催地域や時期（２年後には中国，４年後には日本）の決定についても協議した．シンポジウム最終日には Closing Ceremony にて，メンバーで手を取り合い，写真撮影を行った（写真 2)．



写真2．Closing Ceremonyでの記念撮影

以上のことから，本シンポジウムに出席することで自身の研究内容の紹介，また研究費の獲得に向けた打ち合わせや Committee member としての打ち合わせに参加することができた．夜のパーティでは，多数の研究者と意見交換することができ，新たな研究者ネットワークも広げることができたと思う．宴会の途中，乾杯の音頭を担当させて頂いたことも良い思い出となった．もちろん，他の講演者の発表からも重要な情報を得ることができた．今後自身の研究に大いに役立てようと思う．この度は，海外渡航への助成をいただき，本当にありがとうございました．

平成３０年度　海外渡航報告書

岡山大学異分野基礎科学研究所

寺嶋　健成

(概要)イタリアローマ大学の N. L. Saini 教授との超伝導体の局所構造解析に関する共同研究のため渡欧し、スペインの放射光施設 ALBA およびフランスの放射光施設 ESRF にて x 線吸収微細構造および x 線発光の測定を行った。鉄系超伝導体および類似物質の Pd 基超伝導体の測定を行った。ALBA における追加実験参加のため滞在を 1 ヶ月弱延長し、7/26 に帰国した。

日程：

2018/6/7：岡山空港発　イタリア ローマ大学に移動

6/11-6/15：スペイン バルセロナ郊外の放射光施設 ALBA にて x 線吸収・発光実験を実施

6/15-6/26：ローマ大学にてデータ解析・議論。

6/26-7/4：フランス　グルノーブルの放射光施設 ESRF にて x 線吸収実験を実施。

7/4-7/18：ローマ大学にてデータ解析・議論。

7/18-7/22：スペイン　バルセロナ郊外の放射光施設 ALBA にて x 線吸収実験を実施。

7/22-7/25：ローマ大学にてデータ整理

7/25：ローマ発、7/26：関西空港着、7/27：岡山着

実施した実験、背景、結果

1. 鉄系超伝導体

鉄を含む超伝導体は、2008 年の東工大細野教授による発見以来、現在でも超伝導転移温度の向上した物質報告が続いている。現在の最高転移温度は鉄セレン薄膜が 60-100 K(ケルビン、絶対温度)である。この鉄セレンは、単体では~8 K で、加圧下で~35 K で超伝導を示す。また鉄セレン層間にアルカリ元素を導入した場合(例:$K_xFe_2Se_2$)~35 K で超伝導を示すことが知られている。これらの物質における転移温度向上を統一的に理解できるメカニズムは未だ解決されておらず、固体物理の重要課題の１つとして残っている。我々はごく最近合成された別のアルカリ元素含有鉄セレン系物質、$Li_x(FeOH)_yFeSe$, $Li_x(NH_3)_yFeSe$ に着目し、これまで様々な手段で研究されてきた $K_xFe_2Se_2$ との局所結晶構造・磁気状態の比較を行うべく、これらの試料における x 線吸収微細構造(EXAFS)および x 線発光分光測定を行った。

図１に、測定で得られた $Li_x(FeOH)_yFeSe$ の Fe 原子周りのボンド長の分布を示す。その分布は、過去に我々が報告した $Li_x(NH_3)_yFeSe$[1]とよく対応しており、両者が基本的に同様な構造を有することを示す。次頁に示すような原子の平均位置を考慮したモデル計算による解析を現在進行中で、今後ボンド長や結合角の詳しい比較をアルカリ元素含有鉄セレン超伝導体に対し行う予定である。

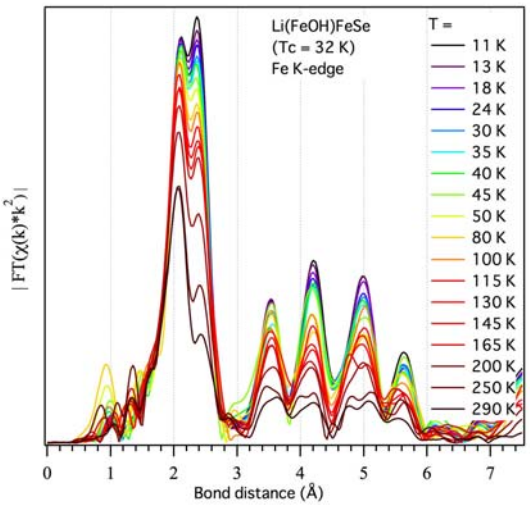


図 1 $Li_x(NH_3)_yFeSe$ の Fe K 端 x 線吸収微細構造から得たボンド長の分布.

2. Pd 基超伝導体

Pd 基超伝導体は、Fe 系超伝導体と同様の結晶構造を有する関連物質である。Fe 系超伝導体では、特定の条件下で Fe の磁気モーメントが消失するとともに As-As 距離が大きく減少して超伝導が大きく抑制される、いわゆる格子コラプス転移の存在が知られている。このような物質の Fe を他の遷移金属で置換した場合、超伝導転移温度は Fe の場合よりも低いものの超伝導を示す。Pd 基超伝導体はその 1 つである。近年この Pd 基超伝導体で「比熱から見積もられたデバイ温度が低いほど超伝導転移温度(T_c)が高い」という、従来の超伝導機構である BCS 理論とは一見真逆の相関関係が報告された[2]。ボンド毎に分解した格子振動の情報を得てこの系をより理解するため、$BaPd_2As_2$ (T_c = 3.5 K)、$CaPd_2As_2$ (T_c = 1.3 K)、$SrPd_2As_2$ (T_c = 0.9 K) 試料の Pd K 端および As K 端 x 線吸収微細構造の測定を行った。この 3 試料は、電子比熱係数が同等であることが報告されている[2]。従って BCS 機構においてデバイ温度の他に T_c に寄与する重要な物理量である状態密度が 3 試料で同程度と考えられるため本研究の測定試料に選定した。

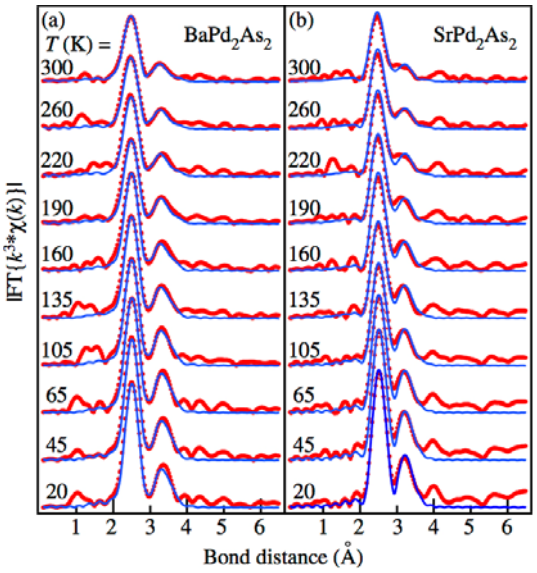


図 2 $BaPd_2As_2$(a)および $SrPd_2As_2$(b)の As K 吸収端の微細構造から得た As まわりのボンド分布(赤点)とモデル計算による再現結果(青線).

図 2 に、$BaPd_2As_2$ および $SrPd_2As_2$ の As K 端 x 線吸収微細構造より得た As 周りのボンド長の分布を示す。実験結果は赤点で、青線は As-Pd, As-As, As-Ba/Sr の 3 ボンドを考慮したモデル計算による再現結果である。このモデル計算から、各ボンド長とその平均変位の温度変化を見積もった結果を図 3 に示す ($CaPd_2As_2$ は解析中のため省略)。両試料における平均変位の温度変化を比較から、As-Pd ボンド(図中赤丸)に 2 つの差異を見出した。即ち(i) $BaPd_2As_2$ の方が $SrPd_2As_2$ よりも昇温に伴い値の上昇が大きい。 (ii) $BaPd_2As_2$ の方が $SrPd_2As_2$ よりも低温(100 K 以下)での値が大きい。特徴(i)は、2 つの試料で As-Pd ボンドに由来する格子振動数が異なっており、$BaPd_2As_2$ がより"柔らかい"結合を有することを示す。これは両試料における比熱のデバイ温度の違いに対応し、その原因が As-Pd ボンドに由来することを示唆する。特徴(ii)は、$BaPd_2As_2$ の方が原子位置の"乱れ"が大きいことを示す。BCS 機構では通常原子位置の乱れは超伝導を抑制する方向に働く。$BaPd_2As_2$ は準安定な結晶構造をとることが知られており[2]、その不安定性が"柔らかい"格子振動の原因と解釈した。本研究結果は、結晶の構造不安定性を利用することにより超伝導転移温度が上昇しうることを示唆する。

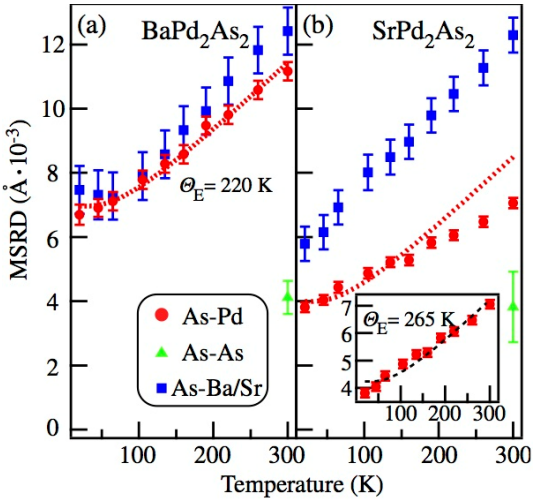


図 3 $BaPd_2As_2$(a)および $SrPd_2As_2$(b)の As K 吸収端の微細構造から得た As まわりの各ボンドの平均変位の温度変化. 点線はアインシュタイン温度 220 K の場合のシミュレーション結果.

現状では Pd 原子まわりの情報が欠如しているが、Pd K 吸収端測定結果を解析中である。

最後に、本助成の援助をいただくことにより、今回の海外渡航を実現することができたことを感謝申し上げます。

[1] E. Paris *et al.*, Sci. Rep. **6**:27646, (2016).

[2] K. Kudo *et al.*, J. Phys. Soc. Jpn. **86**, 063704 (2017).

平成３０年度　海外渡航報告書

岡山県立大学情報工学部人間情報工学科

大田　慎一郎

（概要）

IMECE2018（International Mechanical Engineering Congress and Exposition2018）はASME（American Society of Mechanical Engineers）が開催する年１回開催される当該分野最大規模の国際会議である．今年はアメリカ合衆国，ピッツバーグで開催され，機械工学分野を中心としたエネルギー，振動，流体，伝熱工学など全２０分野に分かれ，最新の技術の研究発表がなされた．申請者は，共同研究者の講演や振動関連「DYNAMICS, VIBRATION AND CONTROL」のセッションを中心に聴講を行い振動制御技術に関する世界最新の研究成果を調査した．さらに，申請者は「DEVELOPMENT OF VEHICLE SEAT BY EMBEDDING URETHANE WITHIN AIR CELL」と題して講演した．

【日程】

2018・11・10 移動日（岡山発→ピッツバーグ着）

2018・11・11-14 IMECE2018 へ出席し，発表・討論，情報交換等を行う．また，関連する研究発表について公聴を行う．

2018・11・15-16 移動日（ピッツバーグ発→岡山着）



図１ 学会会場の風景



図２ 発表セッションにおける写真

【発表内容】

申請者は自動車走行時における乗り心地を向上させるため，「発泡ウレタン封入エアセルを用いた新規自動車用シート」を研究開発している．

図 3 は本研究で構築したプロトタイプシートを示している．図に示すように発泡ウレタンを封入したエアセルをシート座面に挿入し，エアポンプを用いてセル内の空気圧を変化させ，自動車用シートの振動特性を制御する．

自動車用シートの振動特性を明らかにするために，図 4 に示す振動測定システムを構築した．これはプロトタイプシートが加振テーブルに設置してあり，セル内の空気圧を変化させた場合の振動特性を，加振機を用いた加振実験により調査することが可能である．

本研究の成果として，図 5 に示す通りエアセルの空気圧を 0k Pa～10k Pa まで制御することで，シートの共振周波数を 0.75 Hz 変化させることができた．以上の結果から，発泡ウレタン封入エアセルがプロトタイプシートの振動特性へ及ぼす影響が明らかとなった．

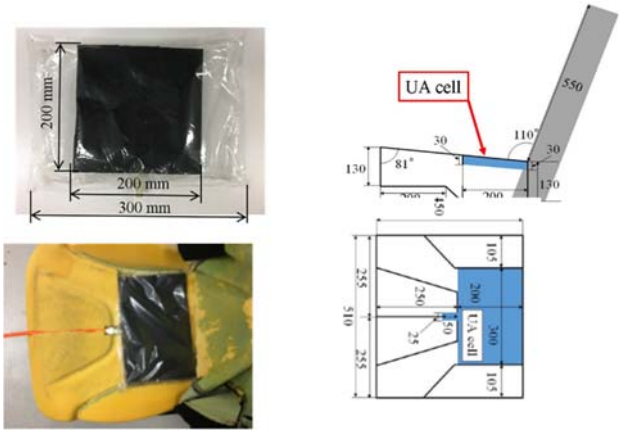


図 3 発泡ウレタン封入エアセルを用いたプロトタイプシートの試作

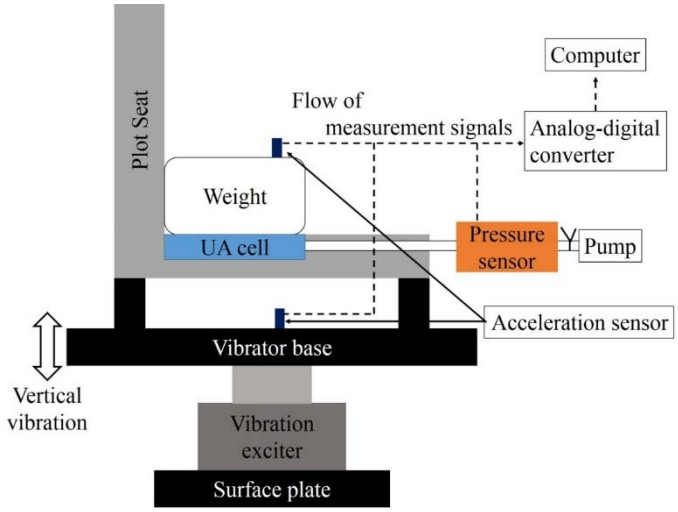


図 4 振動測定実験

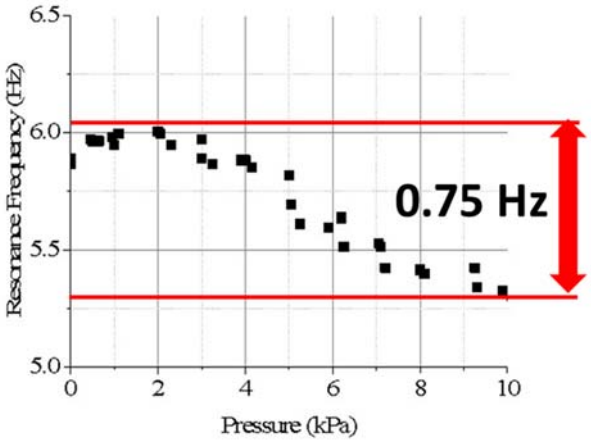


図 5 共振周波数と空気圧の関係

平成３０年度　海外渡航報告書

岡山県立大学　情報工学部

瀬島　吉裕

（概要）　2018 年 7 月 15 日（日）から 20 日（金）までの 6 日間，米国・ラスベガスで The 20th International Conference on Human-Computer Interaction（HCII2018）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，2018 年 7 月 16 日（土）に出国して，3 日間ラスベガスに滞在し，7 月 20 日（金）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-機械を対象としたインタフェース設計や，それらのインタラクション等を網羅した国際会議で，該当分野に関する国際学会では発表件数が最も多い学会である（図 1）．開催地であるラスベガスは，砂漠気候であるため気温が 40 度を超えることが多いが，湿度が低いため日本と比較して比較的過ごしやすい気候であった．また，会場である Caesars Palace Hotel（シーザーズ パレス ホテル）は，ラスベガスの中心部にあり，多くの人で賑っていた．



図 1　会場の様子

HCII2018 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 21 件開催され，ソーシャルメディアの評価法や音声入力インタフェース設計だけでなく，人工知能やセキュリティ等，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 2）．本年は参加者が 74 カ国から 1700 人（主催者発表）で，一般講演 1,170 件，ポスター発表 195 件であった．また，HCII2018 では，2 種類の賞（Best Paper Award：14 件（各発表領域より 1 件），Best Poster Award： 1 件）が設けられていた．

申請者は 1 日目に口頭発表を行った（図 3）．発表内容は後述するが，発表会場に来場した参加者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．ポスター発表の会場は，件数が多いため，広い会場での行われており，参加者の多くが活発な議論を行っていた．



図 2　講演会場の様子



図 3　発表時の様子

申請者は，HCII2018 において，「A Video Communication System with a Virtual Pupil CG Superimposed on the Partner's Pupil」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映像を介して行うビデオコミュニケーションを支援することを目的として，瞳孔反応による感情伝達効果に着目し，瞳孔 CG をビデオ映像上にリアルタイムに重畳合成するシステムを開発した（図 4）．このシステムでは，カメラ映像から対話相手の眼球位置（目頭と目尻）を検出し（図 5(a)），個人の眼の大きさに応じて黄金比となるように瞳孔 CG を調節して（図 5(b)），リアルタイムに重畳合成している．さらに，対話者の発話に同調して瞳孔を拡大反応させることで，対話相手への興味や親近感等の感情伝達を向上させる．このシステムを用いて，コミュニケーション実験を行い，重畳合成した瞳孔 CG が反応することで，感情伝達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．その結果，「個人に応じて瞳孔の大きさが変化するのは良い」，「瞳孔反応で感情伝達が高まるのは面白い」，「瞳孔反応により本人の意図とは異なる感情が伝達される可能性があるのではないか」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，一般発表およびポスター発表において，人の瞳孔反応から興味特性を推定する研究等，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 21 回会議となる次回の HCII2019 は，米国のフロリダで 2019 年 7 月 26 日から 7 月 31 日の期間に開催される予定である．（参考 URL http://2019.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．

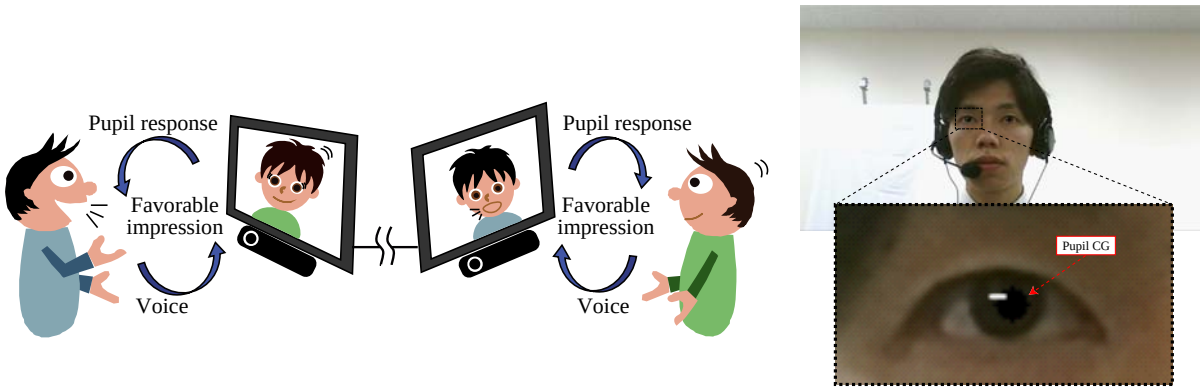
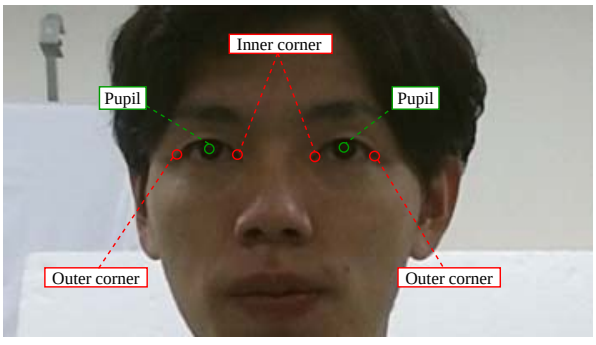
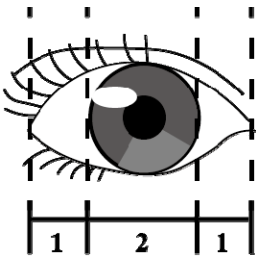


図 4　瞳孔 CG をビデオ映像上に重畳合成するビデオコミュニケーションシステムの概要



(a) 対話相手の眼球位置の検出



(b) 黄金比による瞳孔 CG の調節

図 5　瞳孔 CG の重畳合成手法

平成３０年度　海外渡航報告書

岡山大学大学院自然科学研究科

武安　伸幸

（概要）公益財団法人ウエスコ学術振興財団のご支援を賜り、フランスのストラスブールにて2018年6月18-22日で開催されたE-MRS(European Materials Research Society) Spring Meeting 2018に出席した。会場は、Strasbourg Convention Centreで、6月20日から22日で学会に参加し、21日に講演を行なった。

今回の講演内容は以下の通りである。

表面プラズモン形成に伴い、貴金属表面には、増強電場が生じる。この際、貴金属ナノ表面に吸着した分子は、その増強電場に曝されることとなり、著しく増強されたラマン散乱光（表面増強ラマン散乱）が観測される。この表面増強ラマン散乱を利用すると、通常のラマン散乱計測では検出することが困難な極微量試料をも検出することが可能となり、物理・化学分野だけにとどまらず、バイオ・医療分野においてもニーズが高まっている。一方で、表面増強ラマン計測は、通常のラマン計測とは異なるスペクトルを与えることが知られていた。この原因は、金属-分子間の電荷移動と考えられてきたが、近年、測定中に分子自身が化学変化を起こし、その化学変化が表面増強ラマンと通常ラマンスペクトルとの差異を生じ得ることが指摘されてきた。本研究では、パラ-アミノチオフェノール（*p*-ATP)を試料に用い、銀ナノ粒子２次元アレイ表面を表面増強ラマン活性基板として利用し、表面増強ラマン計測を行い、*p*-ATP が化学変化を起こすことを示した。

銀ナノ粒子２次元アレイは、水中油滴型エマルションを利用して、油水界面にナノ粒子を集めることによって作製した。それをガラス基板に移し取り、表面増強ラマン活性基板として用いた。計測においては、励起レーザー強度を 4, 40, 400, 4000 W/mm^2 で変化させた。強度を上昇、下降させて計測を行い、それぞれ上昇中、下降中では同じポイントで計測した。試料に最初に 4 W/mm^2 を照射した時、1080、1595 cm^{-1} に大きなピークが観測された。レーザー強度を 10 倍の 40 W/mm^2 にすると、1142、1386、1426 cm^{-1} に新たにピークが生じた。これらのピークは、レーザー強度の上昇とともに、さらに大きくなった。一方、最初に 4000 W/mm^2 を照射し、その後、レーザー強度を下降させても、ピーク強度は低下するものの、スペクトル形状に大きな変化は見られなかった。同じ 4 W/mm^2 で計測したスペクトルでも、一旦、高強度光を照射すると、全く異なる形状のスペクトルが得られた。これらの結果から、*p*-ATP は表面増強ラマン計測中に化学変化を起こすことがわかった。

表面増強ラマン計測においては、その計測中の分子自身の化学変化は回避したい。そこで、金属ナノ表面にガラス薄膜を形成し、増強電場を活用できるが、分子が金属に接触しない環境で表面増強ラマン計測を行った。試料には同じく p-ATP を用いた。励起レーザー波長は 633 nm であった。金ナノ粒子２次元アレイに *p*-ATP をつけたサンプル（緑）からは、銀ナノ粒子２次元アレイを用いた時と同様に、1138、1389、1434 cm^{-1} に化学変化由来のピークが観測された。一方、金ナノ粒子２次元アレイの表面に 5 nm の SiO_2 薄膜を付けた基板を用いて *p*-ATP を計測すると、化学変化由来のピークは観測されなかった。以上の結果から、SiO_2 薄膜がその化学変化の抑制に有効であることが示せた。これは同時に、金属表面が化学変化を起こしていることを意味している。このように、SiO_2 薄膜を用いて、化学変化を抑制しながら増強ラマン散乱を観察することができたが、分子と金属表面とにギャップが生じ、その結果、ラマン信号強度は低下した。今後は、反応を抑制しながらも大きなラマン信号が得られる手法の開発と、それとは逆に、光触媒としての利用を展開して行く予定である。

発表の日には、セッションオーガナイザーらと夕食をともにするなど、大変有意義な時間であった。公益財団法人ウエスコ学術振興財団に御礼申し上げる。

平成３０年度　海外渡航報告書

岡山県立大学 情報工学部 情報通信工学科

高林 健人

本申請者は 2018 年 6 月 3 日(月)から平成 30 年 6 月 7 日(木)までの間，スペイン バスク州 ビスカヤ県 ビルバオ エウスカルドゥナ国際会議場で開催された，米国電気電子学会（IEEE）通信ソサエイティ主催の国際会議「2018 Global Internet of Things (IoT) Summit (GIoTS 2018)」において，「Performance Evaluation of Error Control Scheme in ETSI SmartBAN PHY」と題した研究成果発表及び研究調査を行った．今回の国際会議 GIoTS 2018 は IoT Forum が主催する IoT Week 2018 内で行われ，7 件の基調講演の他，約 80 件の研究成果発表が 9 つの並列セッションから 2 並列セッションを利用して発表され，各会場ともに活発な議論がなされていた．

本国際会議では，Internet of Things（IoT）に関する様々な分野について，最新の研究発表が為されていた．例えば，IoT を構成する通信システムなどの基礎的な技術に焦点を当てたセッションの他，IoT のセキュリティに関するセッション，IoT の応用事例やサービスについてのセッション，IoT を利用した実験についてのセッションなど，様々な分野からの研究発表が報告された．とりわけ IoT の通信システムについてのセッションでは，申請者自身の研究にも応用できそうな内容が発表されており，非常に参考になった．加えて，本国際会議では，学術的な側面からの研究報告の他に，欧州の産業界における IoT の応用事例の紹介や，産業界のリーダーによる IoT をとりまく今後のビジョンについての講演なども為されており，ビジネス的な側面からも参考になりそうな話を聞くことが出来た．

申請者は今回の研究発表では医療・ヘルスケア向け無線ボディエリアネットワークの最新の標準規格の一つである「SmartBAN」における物理層で定められている誤り制御方式について評価を行い，現実に即した通信路における情報パケットの再送の有効性を示した．限られた時間の中で 2 件の質問を受け，有意義な質疑応答が出来た．また，前述のように幅広い専門を持つ研究者が多数集まる国際会議であるため，研究者同士の示唆に富む意見交換を行うことができた．

最後に，この度の渡航費助成を賜りました公益財団法人ウエスコ学術振興財団様に深く感謝を申し上げます．



図１　研究発表時の様子

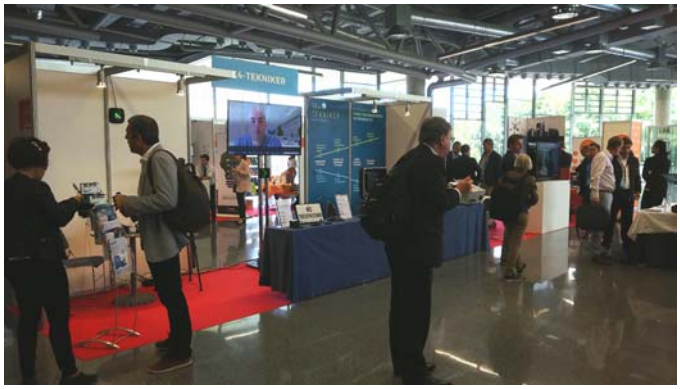


図２　会場内展示スペースの様子

平成 30 年度　海外渡航報告書

岡山理科大学教育学部

笹山　健作

1. 概要

国際会議名称：International Society of Behavioral Nutrition and Physical Activity　Hong Kong 2018

渡航先：香港

期間：2018 年 6 月 3 日～6 日

発表演題：Walking distance to/from school is associated with objective physical activity, but not with physical fitness in Japanese children

発表者：Kensaku SASAYAMA (Faculty of Education, Okayama University of Science)
Minoru ADACHI (Graduate School of Education, Okayama University)

International Society of Behavioral Nutrition and Physical Activity が主催する国際会議に，私自身はじめて参加した。参加者は，開催地が香港ということもあり，香港を中心に中国からの参加者が多く，次いでヨーロッパ，オーストラリア，アメリカの参加者が多い印象であった。シンポジウムや口頭，ポスター発表では世界各国の身体活動や栄養に焦点をあてた最新の研究内容があり，多くの情報を収集することができた。特に，今回発表した内容に近い子どもを対象に加速度計を用いて身体活動量を調査した研究が多く，今後の研究調査に大いに役立った。上記演題のポスター発表では，方法と結果についての質問を多く受けた。中でも，方法の身体活動のデータ選別について多くの質問があった。また，通学歩行距離は身体活動量と関連があるにも関わらず，体力とは関連しなかったことについても多くの質問があった。また，数名の研究者とは連絡先を交換し，今後，研究についての情報交換を行うことが可能となり，研究ネットワークを広げることができた。

2. 発表の内容

本研究の目的は 9 歳から 10 歳の日本人児童を対象に学校へ（から）の通学歩行距離と身体活動量，体力との関連を検討することであった。対象者の 633 名（9.3 ± 0.5 歳）は通学手段，形態，体力が調査された。対象者のうち，572 名（男子の 89.8%，女子の 90.9%）が学校へ（から）徒歩通学をしていた。対象者は通学歩行距離に基づいて 3 分類（tertile1，2，3）された。平日の歩数と中高強度身体活動（MVPA）は 1 軸加速度計によって評価した。体力は握力，上体起こし，長座体前屈，反復横跳び，20m シャトルラン，50m 走，立ち幅跳び，ソフトボール投げで評価した。3 分位による学校へ（から）の通学歩行距離は tertile1，2，3 でそれぞれ男子 1.0 ± 0.4，2.0 ± 0.1，3.6 ± 1.3（km/day），女子 0.7 ± 0.3，1.9 ± 0.2，3.7 ± 1.5（km/day）であった。男子の平日における歩数と MVPA は tertile2，3 に比べて tertile1 で有意に低かった。女子の平日における歩数と MVPA は 3 群間に有意な差が認められた。体力の結果は男女ともにどの項目にも 3 群間で有意な差が認められなかった。結論として，本研究では学校へ（から）の通学歩行距離は平日の身体活動量と関連することが示唆された。一方，本研究の結果では学校へ（から）の通学歩行距離は体力と関連しないことが示唆された。

3. 謝辞

最後に，今回の渡航に対して公益財団法人ウエスコ学術振興財団より，渡航費の助成を賜りました。このことに対して，心より感謝申し上げます。

平成 30 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

氏川　拓也

（概要）

2018 年 7 月 8 日から 12 日の日程で，フランスのパリで開催された 12th International Society of Physical and Rehabilitation Medicine World Congress（12th ISPRM World Congress，ISPRM 2018）に出席し，“The influence of cooling down exercise after steady loading exercise at the anaerobic metabolic threshold intensity on autonomic nervous activity”という題目で発表を行った. この研究は, 嫌気性代謝閾値（Anaerobic Threshold；以下，AT）での定常負荷運動後のクーリングダウンの適正強度を決定することを目的として，心拍変動解析を用いた心臓自律神経活動に着目して検討した．その結果，心臓自律神経活動からみたクーリングダウンの適正強度は AT レベルの 50%強度であった.

ISPRM 2018 には，リハビリテーションに携わる研究者が世界各国から参加されており，発表・討論を行い最新の知見を共有していた．他に運動療法後のクーリングダウンに関する研究発表は見受けられなかったが，研究発表を通して学会参加者と意見交換を行い，有意義な時間にすることができた．また，他分野における研究発表を聴講でき，これからの研究活動を進めていく上での良い刺激となった．なお，報告者の渡航日程および概要を表 1 に示す.

最後に，本国際会議に参加するにあたり，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および関係各位には，心より感謝申し上げたい.

表 1　渡航日程および概要

日程	概要
2018 年 7 月 7 日	移動：岡山⇒関西国際空港⇒パリ
2018 年 7 月 8～12 日	12th ISPRM World Congress に出席・発表
2018 年 7 月 13～14 日	移動：パリ⇒仁川国際空港⇒関西国際空港⇒岡山

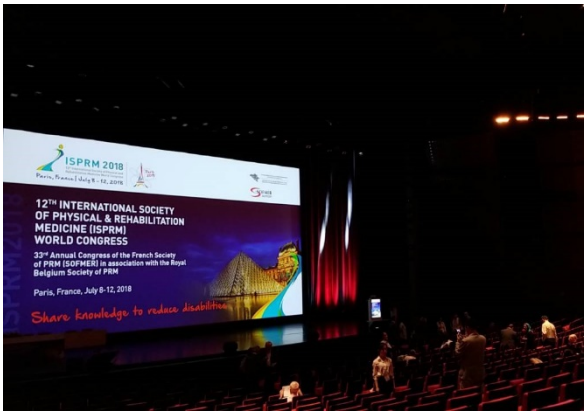


写真 1．会場の様子

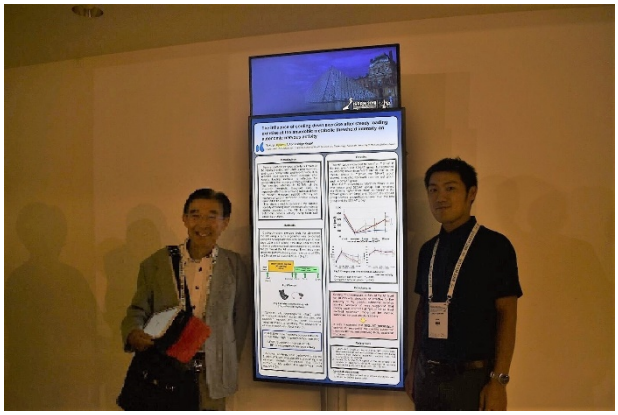


写真 2．ポスターと報告者（右）

口腔常在菌による骨代謝ネットワーク機構の解明

岡山大学病院予防歯科

入江　浩一郎

常在菌は腸内組織や免疫応答に加えて、骨代謝にも影響を与える。常在菌は破骨細胞形成の促進によって、骨量を減少させる事が報告されているが、骨芽細胞への影響についてはほとんど調べられていなかった。本研究では、無菌状態の germ free (GF) マウスと常在菌を有する specific-pathogen-free (SPF) マウスを用いて、骨芽細胞の石灰化制御に対する常在菌の影響について検討した。骨吸収マーカーである血清中の tartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRAP-5b) 濃度は、GF マウスよりも SPF マウスの方が有意に高かった。またアリザリンレッド染色では、SPF マウスよりも GF マウスの方が石灰化領域が有意に拡大していた。つまり常在菌は破骨細胞だけでなく、骨芽細胞に影響を及ぼす事によって下顎骨を含め全身の骨代謝に関与している事が示唆された。特に骨芽細胞における RANKL/OPG 比や osteocalcin の遺伝子発現に影響を及ぼし、石灰化を制御している可能性が示唆された。

【緒言】

常在菌は健康と密接に関係しており、宿主組織の構造や免疫応答に影響を及ぼしている（1）。腸内のみならず口腔内にも常在菌が共存している。しかし、口腔常在菌と宿主組織である歯周組織にどのような関連があるかは不明な点が多い。当研究室では、動物実験において、無菌状態の germ free (GF) マウスの歯肉接合上皮の厚さや面積は、常在菌を有する specific-pathogen-free (SPF) マウスに比べて小さく、免疫応答細胞の遊走が不十分であることを報告した(2)。また、顎骨形態の比較から、口腔常在菌は歯槽骨の代謝を促進していることも明らかにした(3)。一方、歯周病が発症・進行すると歯槽骨吸収が生じるが、破骨細胞の機能に関する研究は数多くされているのに対して、骨芽細胞に関する研究は少ない。

歯周組織の恒常性維持のために、口腔常在菌と骨芽細胞がどのように影響し合っているかは未だ不明である。それゆえに、口腔常在菌よる骨芽細胞の形態学的な変化や自然免疫への影響を明らかにすることは、歯周病における歯槽骨吸収の予防対策を検討する上で重要である。本研究では、骨芽細胞に着目し、GF マウスと SPF マウスを用いて、常在菌の有無による骨芽細胞側から見た、骨代謝への影響を、多角的・網羅的に解明することとする。

【方法】

8週齢のGFおよびSPFマウス（n＝6）を用いた。血清を採取し、骨形成マーカーとして osteocalcin を、骨吸収マーカーとして tartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRAP-5b) を ELISA 法で定量した。頭蓋冠より通法に従い骨芽細胞を単離し、分化誘導培地中で 5 週間培養後、アリザリンレッド染色で石灰化度を比較した。

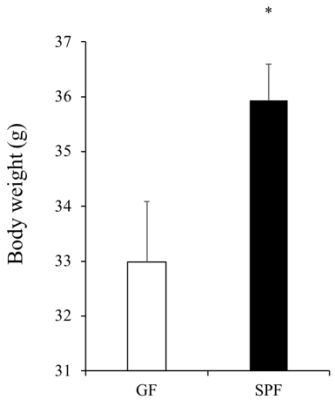
また骨芽細胞から RNA を抽出し、骨形成・骨吸収に関与する遺伝子の発現を調べた。さらに骨芽細胞内における転写因子発現解析を PCR アレイを用いて網羅的に行った。

また下顎骨からも直接 RNA を抽出し、骨形成に関わる遺伝子発現を PCR アレイを用いて解析した。

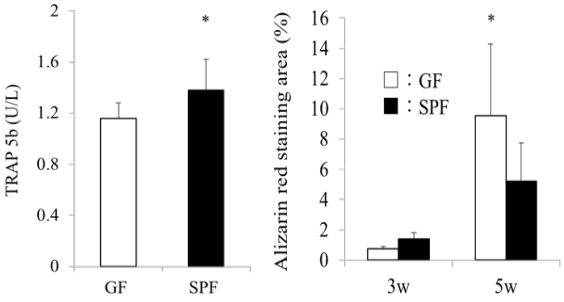
【結果】

8 週齢の GF および SPF マウスの体重を比較したところ、SPF マウスの方が有意に高かった（P＜

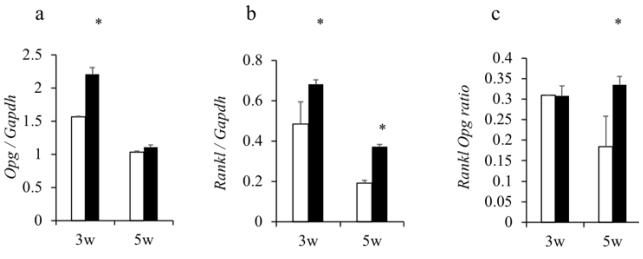
0.01)。



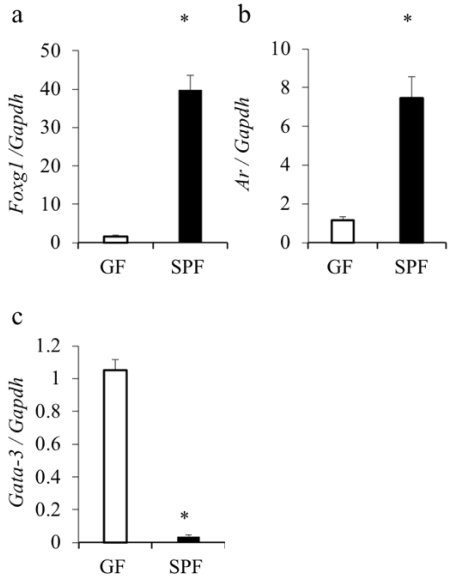
血清中 TRAP-5b 濃度は、GF マウスよりも SPF マウスの方が有意に高かった（P＜0.01)。骨芽細胞におけるアリザリンレッド染色では、SPF マウスよりも GF マウスの方が石灰化領域が有意に拡大していた（P<0.05)。



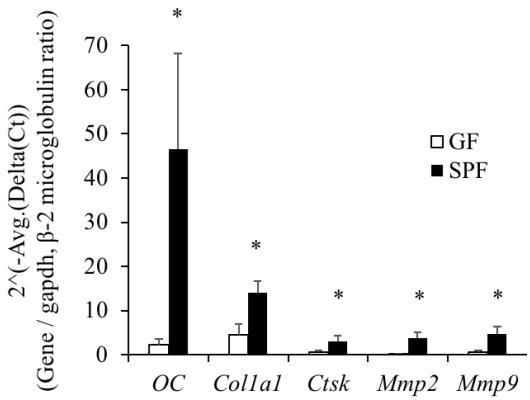
また骨芽細胞における遺伝子発現において、Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand（RANKL）/ osteoprotegerin（OPG）比は、GF マウスよりも SPF マウスが有意に高かった（P <0.05)。さらに，osteocalcin の発現は SPF マウスが GF マウスよりも有意に高かった（P <0.05)。

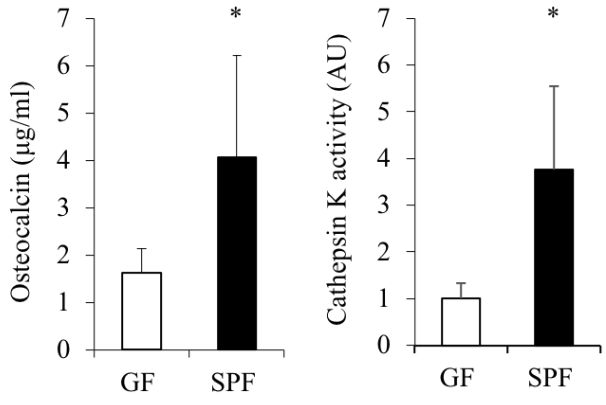


転写因子の網羅的解析から，SPF マウスでは，Forkhead box protein G1 (FOXG1）および androgen receptor の遺伝子発現が GF マウスと比較して増加し、GATA3 の遺伝子発現が減少した。



下顎骨由来 RNA の PCR アレイ解析では、SPF マウスにおける osteocalcin や cathepsin K といった骨のリモデリングに関与する遺伝子の発現が GF マウスと比べて有意に増加していた（P＜0.05)。





統計解析は、平均値（Mean）± 標準偏差（SD）で示した。有意差検定は、Student's two-tailed unpaired *t*-test を使用した。$P < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

【考察】

本研究から、常在菌は破骨細胞だけでなく、骨芽細胞に影響を及ぼし、下顎骨を含め全身の骨代謝に関与している事が示唆された。

今回、骨芽細胞におけるアリザリンレッド染色の結果から、SPF マウスよりも GF マウスの方が石灰化領域が有意に拡大していた。また、SPF マウスの骨芽細胞は GF マウスの骨芽細胞と比較して Osteocalcin の遺伝子発現が高かった。過去の報告から Osteocalcin KO マウスでは、石灰化の亢進を認めることがわかっている (4)。つまり、GF マウスにおける石灰化の亢進は、Osteocalcin の発現が抑制されていることが要因と考えらえる。

また血清中 TRAP-5b 濃度は、GF マウスよりも SPF マウスの方が有意に高かった。GF マウスでは、破骨細胞形成が低下することから、SPF マウスでは骨芽細胞からの破骨細胞誘導シグナルが亢進したと推測される。特に骨芽細胞における RANKL / OPG 比や osteocalcin の遺伝子発現に影響を及ぼし、石灰化を制御している可能性が示唆された。

また下顎骨の PCR array では、Osteocalcin や Cathepsin K といった骨のリモデリングに関与する遺伝子の発現が高かった。つまり、常在菌があることで骨代謝回転速度が亢進している可能性が考えられる。

本研究を通じて、常在菌は破骨細胞だけでなく、骨芽細胞に影響を及ぼす事によって、歯槽骨を含め全身の骨代謝に関与している事が分かった。特に骨芽細胞における RANKL / OPG 比や osteocalcin の遺伝子発現に影響を及ぼし、石灰化を制御している可能性が示唆された。

【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。

【参考文献】

1. Sjögren K, Engdahl C, Henning P, Lerner U, Tremaroli V, Lagerquist M, Bäckhed F, Ohlsson C. The gut microbiota regulates bone mass in mice. J Bone Miner Res., 27(2012), 1357–1367.

2. Irie K, Novince C, Darveau RP. Impact of the oral commensal flora on alveolar bone homeostasis. J Dent Res., 93(2014), 801-806.

3. Irie K, Tomofuji T, Ekuni D, Morita M, Shimazaki Y, Darveau RP. Impact of oral commensal bacteria on degradation of periodontal connective tissue in mice. J Periodontol., 86(2015), 899-905.

4. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. Nature., 382(1996), 448-52.