令和元年度研究費助成　研究成果報告書集

研究成果報告書　目次

■ 複合現実技術を用いた次世代骨盤手術支援ツールの開発
　岡山大学大学院　医歯薬学総合研究科　助教　長谷井　嬢 …… 1

■ 微小環境構築における S100 制御性がんの分子機構の解明
　岡山大学病院　泌尿器科　医員　光井　洋介 …… 3

■ HMGB1 が癌性骨痛に与える影響と新規癌性骨痛治療の開拓
　岡山大学病院　口腔外科　助教　奥井　達雄 …… 5

■ 妊娠期の胎盤形成における炎症抑制因子 HRG の生理的調節機能の解析
　岡山大学大学院　医歯薬学総合研究科　助教　勅使川原　匡 …… 7

■ CXCR4 阻害に着目した口腔癌の新規抗腫瘍血管治療の開発
　岡山大学大学院　医歯薬学総合研究科　助教　河合　穂高 …… 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 …… 17

■ 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 …… 22

■ 乳がん治療薬抵抗性獲得機構における NFYA の機能解明
　岡山大学大学院　ヘルスシステム統合科学研究科　助教　岡田　宣宏 …… 25

■ 抗酸化物質が免疫担当細胞に与える影響
　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 …… 28

■ G-CSF 刺激による好中球分化誘導シグナル伝達経路の解析
　岡山大学大学院　ヘルスシステム統合科学研究科　准教授　村上　宏 …… 32

■ 平成 30 年 7 月西日本豪雨時の旭川洪水の流況解析と CCTV 画像を用いた STIV 解析による検証
　岡山大学　環境理工学部　准教授　吉田　圭介 …… 36

■ 板ガラスへのニオブ系光触媒の直接薄膜とセルフクリーニング特性評価
　岡山大学大学院　環境生命科学研究科　准教授　西本　俊介 …… 42

■ 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 …… 44

■ CNP/NPR2 シグナルを介した卵胞発育シグナルの解明
　岡山大学大学院　環境生命科学研究科　准教授　辻　岳人 …… 50

■ 半田山南側斜面で発生した土砂災害を事例とした崩壊危険箇所と崩壊土砂量の詳細な推定法に関する研究
　岡山大学大学院　環境生命科学研究科　教授　鈴木　茂之 …… 53

■ 植物共生細菌のメタノール走化性の機構と重要性の解明
　岡山大学　資源植物科学研究所　准教授　谷　明生 …… 59

■ 糖尿病によるつらい気もちの評価法の開発に関する研究
　岡山大学大学院　社会文化科学研究科　教授　安藤　美華代 …… 62

■ 難治性心不全患者に対する循環器看護師の意思決定支援モデルの開発
岡山県立大学　保健福祉学部　准教授　名越　恵美 …… 68

■ 超音波を用いた看護師による爪のアセスメント方法の開発
岡山県立大学　保健福祉学部　准教授　佐々木　新介 …… 73

■ 被災時における生活困窮者への情報提供と避難行動～2018 年岡山県豪雨災害の経験から～
岡山県立大学　保健福祉学部　准教授　岩満　賢次 …… 78

■ 妊娠期からの育児期の両親の睡眠と抑うつ･愛着の関連
岡山県立大学　保健福祉学部　准教授　池田　理恵 …… 84

■ 機械学習を用いた熱可塑性炭素繊維強化プラスチック溶着接合の強度･品質予測
岡山県立大学　情報工学部　助教　金崎　真人 …… 90

■ 電力システムに対するスケーラブル制御器の開発
岡山県立大学　情報工学部　助教　泉　晋作 …… 93

■ バグ報告の記述及びソースコードの表現方法が自動不具合箇所特定手法の性能に及ぼす影響についての比較評価
岡山県立大学　情報工学部　助教　天嵜　聡介 …… 96

■ 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 ……102

■ 陶芸制作で共鳴する日米文化交流
岡山県立大学　デザイン学部　講師　作元　朋子 ……108

■ 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
岡山県立大学　デザイン学部　助教　岡本　汐加 ……113

■ 木育玩具による遊びと子どもの発達の対応分析
岡山県立大学　デザイン学部　助教　林　秀紀 ……119

■ 宇宙から飛来する暗黒物質による散乱過程の理論的研究
岡山理科大学　理学部　講師　長尾　桂子 ……125

■ スピン反転を利用した長寿命光電荷分離システムの創製
岡山理科大学　理学部　教授　満身　稔 ……131

■ 備前焼模様の材料科学的研究
岡山理科大学　工学部　教授　草野　圭弘 ……135

■ AI による LP データを用いた定量的な危険度評価手法の開発
岡山理科大学　生物地球学部　准教授　佐藤　丈晴 ……138

■ 血管機能に対する *Streptococcus* 属菌体毒素の影響:高血圧症の新規病態機序解明に向けて
岡山理科大学　獣医学部　助教　向田　昌司 ……144

■ 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 ……148

■ 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　准教授　椎葉　大輔 ……152

■ 筋音図･筋電図を用いたアスリートの筋コンディションの定量評価
倉敷芸術科学大学　生命科学部　准教授　枝松　千尋 ……156

■ 中国電力送電線への地磁気誘導電流の影響評価
吉備国際大学　農学部醸造学科　教授　橋本　久美子 ……162

■ 微細な水中漂流ごみを巻き込むように回収するクラゲ型ロボットの試作研究
津山工業高等専門学校　総合理工学科　准教授　細谷　和範 ……166

■ 生体深部の非侵襲･三次元･動的イメージングを実現する新規蛍光プローブの開発
津山工業高等専門学校　総合理工学科　助教　守友　博紀 ……172

■ 双方向可変剛性機構によるロボット義足に関する研究
津山工業高等専門学校　総合理工学科　助教　野中　摂護 ……177

■ *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 ……181

■ 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 ……185

■ ヒトシトクロム P450 の遺伝子多型が薬物相互作用に及ぼす影響の予測
就実大学　薬学部　教授　丹羽　俊朗 ……190

■ AGEs と相互作用する新規内在性起炎分子の同定と慢性炎症病態への寄与の解明
就実大学　薬学部　講師　渡邉　政博 ……195

■ 胎児期葉酸欠乏マウスにおける高次脳機能低下の発現メカニズムに関する研究
就実大学　薬学部　助教　吉川　弥里 ……199

■ 岡山県産黄ニラの抗酸化作用機序の解明
就実大学　薬学部　助教　川上　賀代子 ……203

■ 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　教授　山内　明 ……207

■ 小胞体ストレス応答転写因子の機能不全による糖尿病発症機序の解明
川崎医科大学　薬理学教室　助教　北風　圭介 ……210

■ 脾臓の形成過程における核内受容体 NR5A1 の機能解明
川崎医科大学　解剖学教室　教授　嶋　雄一 ……213

■ 活性酸素生成酵素 Nox の制御機構の破綻メカニズムの解明
川崎医科大学　生化学教室　助教　宮野　佳 ……216

■ ATP/P2 受容体経路による糖尿病性腎臓病の新規進展機序の解明と治療法の開発
川崎医科大学　腎臓･高血圧内科学　講師　城所　研吾 ……220

■ 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 ……223

■ ロイシン代謝産物 HMB の抗炎症作用はがん細胞誘発性の炎症反応を抑制しうるか
川崎医療福祉大学　医療技術学部　講師　三宅　沙知 ……227

■ 高脂肪食餌性 dysbiosis に及ぼすグアーガム部分分解物摂取と運動の相補作用効果
川崎医療福祉大学　医療技術学部　助手　青木　孝文 ……231

■ 老化による筋力低下に対するステロイド類の影響の行動学的解析
川崎医療短期大学　医療介護福祉科　准教授　平口　鉄太郎 ……236

■ 気候変動と土砂災害対策法制の課題～広島地域を事例として
山陽学園大学　地域マネジメント学部　准教授　澤　俊晴 ……239

■ ダウン症児における発話技報および言語理解促進に関する研究
山陽学園大学　総合人間学部　准教授　上地　玲子 ……245

■ 味覚センサーおよびブレスマスを用いた食品の味および香りの立体的評価法の検討
美作大学短期大学部　栄養学科　教授　桑守　正範 ……250

■ プレゴールデンエイジ期におけるキンダートーネン（子供体操）運動学習効果の科学的検証およびSECIモデルによるナレッジ・マネジメント導入に関する研究（1年目）
中国学園大学　国際教養学部　准教授　佐々木　公之 ……259

■ カルバペネム耐性細菌の駆除を目指したファージ療法の開発
中国学園大学　現代生活学部　准教授　川野　光興 ……265

■ 新規ゲノム編集法によるアルポート症候群モデルラット作製と病態解析
重井医学研究所　分子遺伝部門　研究員　古家野　孝行 ……270

海外渡航報告書　目次

■ 岡山大学　環境理工学部　准教授　本田　恭子 ……273

■ 岡山大学　資源植物科学研究所　特別契約職員(助教)　佐藤　有希代 ……275

■ 岡山大学　自然生命科学研究支援センター　教授　寺東　宏明 ……277

■ 就実大学　薬学部　助教　山田　陽一 ……279

■ 川崎医療福祉大学　医療福祉マネジメント学部　講師　三田　岳彦 ……281

■ 川崎医療福祉大学　医療技術学部　准教授　矢納　陽 ……282

複合現実技術を用いた次世代骨盤手術支援ツールの開発

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 運動器スポーツ医学講座

長谷井　嬢

（概要）

整形外科において「骨盤」とは最難関手術部位の一つである。それは複雑な立体的構造や、骨盤骨周囲に重要な血管神経が集中し麻痺や大出血のリスクが高いこと、展開が進めにくく視野が限られること等が理由として挙げられる。立体構造の把握が困難である事は、術者と他の手術参加者(助手や看護師など)との術中イメージ共有が得られにくく、チームとして手術を効率良く、高い医療水準で進めるには革新的な技術的進展が必要である。また、骨盤手術はハイリスクである事から、経験豊富なエキスパートしか手術機会を得られない事も多く、術者の教育・育成も行いにくい事が問題である。術者目線での手術経験の共有ができれば手術スキルの上昇に繋がり、患者側は質の高い医療が受けられ、医療側も教育・人材育成面でのメリットが得られる。
これらの問題を解決する為に、本研究では近年技術革新の目ざましい Virtual Reality(仮想現実)分野を用いた手術システムの開発を行う。

（本文）

Virtual Reality(仮想現実)分野の中でも Mixed Reality(MR)は、現実と仮想現実の情報を融合させる技術であり、仮想骨盤骨を現実の視野内に表示させる事で、狭い術野でも的確に術部の把握を可能とし、助手などの術者以外のスタッフも手術イメージの共有が可能となる。

骨盤手術には骨折だけでなく、悪性骨腫瘍切除もあり、適切な位置での切除は患者予後に直結する重大問題であり、本技術の発展は患者生命にかかわる重要課題である。

本研究の為に必要になるデバイスとして Microsoft 社の HoloLens(下図)を用いる事としたが、



2019 年にスペインのバルセロナで行われた Mobile World Congress で、Microsoft は拡張現実バイザー「HoloLens」（ホロレンズ）の第 2 世代を発表した。同デバイスは装着性、視野角、反応速度や稼働時間など含めて多くの点で改善が図られており HoloLens 2(下図) を用いての開発を計画した。



。

発売日は当初 2019 年 9 月であったが、延期され、2019 年 11 月から販売されたとされている。本研究が開始されてすぐに日本マイクロソフト社に HoloLens 2 の購入予約を行っているが、順次販売連絡を行うとの通達はあるものの、実際のデリバリーは開始されておらず、現在デバイス待ちとなっている。初期型の HoloLens とは画像処理上の規格が異なることから、HoloLens2 がデリバリーされてからの開発とする必要があり、研究がすすめられずにいる。待機期間中に、骨盤ナビゲーションで使用しているナビピンを共同研究先の Holoeyes 社に送り、形状やサイズについてのデータを収集していただいた。

また、術中 CT 撮影に使用する O-arm で作製され

るDICOMデータの出力についてメーカーと協議を行った。骨盤手術時、1 回の撮影で全範囲が入りきらず、頭尾側に撮影範囲を移動して撮影するが、この２つのデータを、撮影機材内で連結し、連続撮影DICOM データとして出力できるような設定が可能となった。

デバイスが発売され次第、スムーズに研究が遂行できるように準備は完了している。

微小環境構築における S100 制御性がんの分子機構の解明

岡山大学病院　泌尿器科

光井　洋介

がんの進展には様々な要素が関与しており、近年、がん細胞の増殖・浸潤や転移などにがん周囲の間質が積極的に関与していることが明らかにされている。がんの病態解明、新たな診断治療法の開発を行ううえでも、間質の役割を理解することは重要である。特に膀胱がんは、その周囲に存在する豊富な線維性間質を特徴としており、がん細胞とその周囲に存在するがん関連線維芽細胞との相互作用は、がんの浸潤・転移に重要な役割を持っているとされているが、その詳細は明らかではない。今回、我々は膀胱がん細胞と癌関連線維芽細胞におけるクロストークががんの進展に関与するメカニズムの一部を解明した。膀胱がん細胞は S100 たんぱく質や HMGB1 などを分泌し、線維芽細胞にはそのレセプターである RAGE が豊富であることは過去の研究により同定されている。今回の研究により、膀胱癌と癌関連線維芽細胞の共培養におけるがん遊走能、浸潤能の亢進と、その経路を RAGE-Fc（RAGE 阻害薬）によって阻害されることを見出した。これらの研究成果より癌自体を抑制するだけでなく、癌周囲の間質組織をターゲットとした治療を組み合わせることで、より有効な治療戦略の開発が期待され、RAGE-Fc は治療薬の候補としても期待できる。

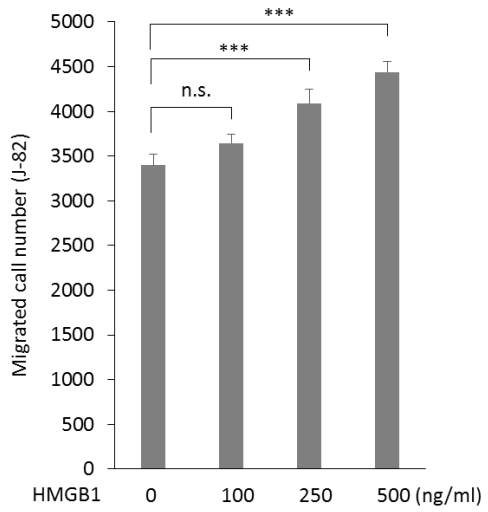
はじめに

最近の知見では、がん細胞の増殖・浸潤・転移、化学療法抵抗性にはがん細胞そのものの動態だけでなく、がん細胞を取り巻く微小環境、その中でも特にがん関連線維芽細胞　(CAF: Cancer-associated fibroblast) が重要である。膀胱がんでは浸潤や転移によって治療方法や予後が大きく変わるため、それらメカニズムの解明の臨床的意義は大きい。S100 たんぱく質や HMGB1 たんぱく質は種々がん細胞から分泌されオートクラインにてがん細胞の増殖を促進することが知られている。細胞外 S100、HMGB1 たんぱく質が、がん細胞に機能するためには細胞膜受容体が必要であり、それが RAGE である。しかし、膀胱がんでは S100、HMGB1 たんぱく質の活発な産生分泌があるものの、RAGE の発現が低くそれらがオートクラインで働いている事象が得られていなかった。膀胱がんにおいて S100、HMGB1 たんぱく質の報告は多数あるが、一定の見解を得られていないのが現状である。ここで我々が着目したのは膀胱がんの特性である。膀胱がんの多くは、浸潤に伴い間質が増大する。他の間質が豊富ながん種において、がんの浸潤に先立ち CAF が増殖・遊走し、がんの進展を促すことが報告されている。さらに CAF は、薬物のがん到達を制限する厄介者と認識され、近年、がん間質を効果的に抑制する手法の開発が切望されている。しかし、これが何に起因するのか、そして増大した間質のがん進展への真の深い理解が頓挫しているため、革新となりうる医療への応用が成されていない。我々はこれまでの成果を基盤とした現研究から、上記に対する重要な発見を得ている。それは、間質線維芽細胞側に RAGE が発現しており、がん細胞側の S100 たんぱく質をパラクラインとして受け取ることで線維芽細胞の増殖が活発となること、そしてさらに S100-RAGE 経路が膀胱がんにおける遊走・浸潤・転移に重要である可能性を見出している。

研究の成果

今回の研究では主に HMGB1 におけるデータを述べる。まず初めに膀胱がんの細胞株(T24、UMUC-1、UMUC-3、TCC-sup、J82、RT-4）の上清に S100 たんぱく質や、HMGB1 が分泌されることを確認した。そして HMGB1 が膀胱がん細胞株の細胞遊走能を亢進するのを確認するために、Boyden Chamber を用いた Migration Assay にて確認した。図 1 のように、HMGB1 濃度依存性に細胞の遊走能が亢進していることが分かった。

図１：HMGB1 刺激による膀胱がん細胞株の遊走能の亢進（Migration assay）



次に、HMGB1 のレセプターである RAGE をターゲットとした実験を行った。まずは RAGE を Knock out させた線維芽細胞を 24well に接着・培養後に Migration assay を行った（図２）。このようにすることで、癌細胞と線維芽細胞の共培養における遊走能を確認することができる。線維芽細胞と共培養することで膀胱がん細胞株の遊走能は亢進し、RAGE を KO することで遊走能は抑制することが分かった。これより、膀胱がんと線維芽細胞の間には遊走能を亢進させる相互作用があり、その一端を線維芽細胞側の RAGE が関与していると考えられた。さらに、RAGE の重要性、HMGB1 の影響を調べるために、RAGE－Fc（HMGB1 と結合することで RAGE のインヒビターとして働く）を用いた実験を行った（図３）。線維芽細胞と共培養することで亢進した遊走能は、RAGE-F c によって抑制されることが分かった。これにより、遊走能の亢進には HMGB1-RAGE 経路が関与している可能性が考えられた。

今後の展望

今後は HMGB1-RAGE 経路の下流の経路をさらに突き詰めるとともに、in Vivo による実験系での RAGE-Fc の治療薬としての可能性について考察を深める予定である。

図２：線維芽細胞（RAGE WT, RAGE KO）と膀胱がん細胞株の共培養、細胞遊走 assay

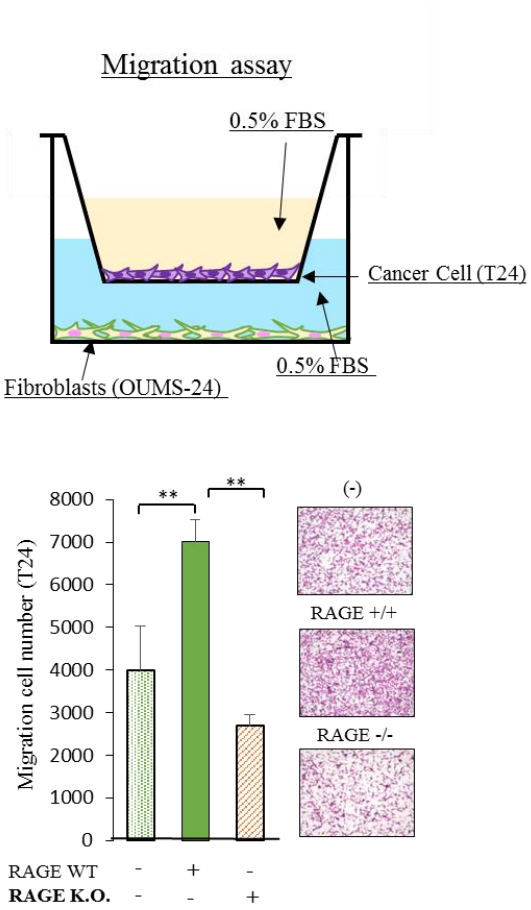
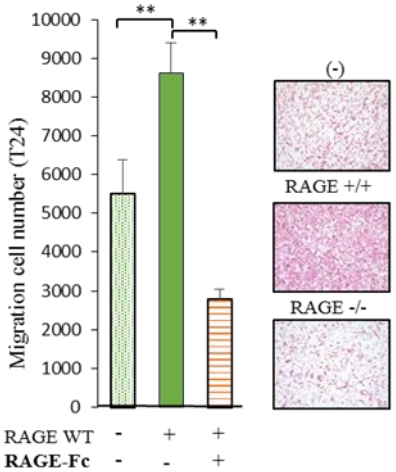


図３：RAGE-Fc を用いた細胞遊走 Assay



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。

HMGB1 が癌性骨痛に与える影響と新規癌性骨痛治療の開拓

岡山大学病院 口腔外科(病態系)

奥井達雄

(概要)

乳癌、前立腺癌などの骨指向性悪性腫瘍は高頻度に骨に転移する。 悪性腫瘍の骨転移時に生じる癌性骨痛は通常の鎮痛薬が奏功しにくく、患者の QOL を著しく低下させる。癌性骨痛の強さは腫瘍の大きさと相関しないことも多く、癌細胞が産生するある種のサイトカインが疼痛シグナルを受容する神経細胞軸索終末に影響を与えていることが示唆されているが、詳細はほとんど不明である。申請者らは乳癌細胞をマウス骨髄内に移植すると骨髄内で神経軸索が伸長することを報告した(Hiasa et al, *Cancer Res,* 2016)。本研究では多数の神経終末を有する骨での癌増大が痛覚神経の興奮、疼痛に与える影響を神経誘導因子である High mobility group box 1(HMGB1)に着目し検討した内容を報告する。

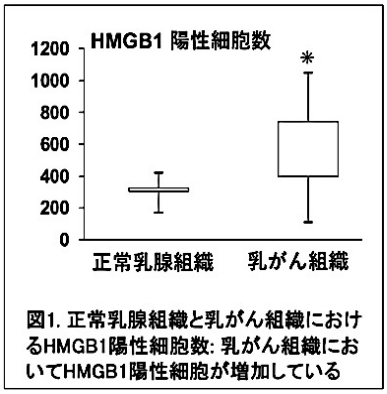


図1. 正常乳腺組織と乳がん組織におけるHMGB1陽性細胞数: 乳がん組織においてHMGB1陽性細胞が増加している

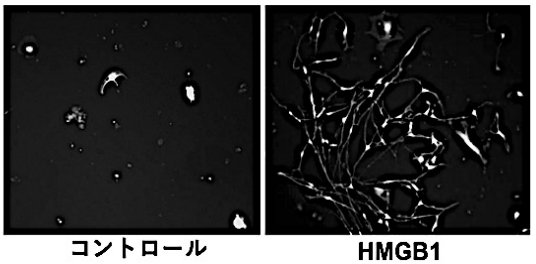


図2. 知覚神経細胞軸索伸長にHMGB1が与える影響: 知覚神経細胞をHMGB1存在下で培養すると神経軸索の伸長が促進される

HMGB1 シグナルが、癌細胞の増殖ならびに知覚神経新生に及ぼす影響、メカニズムを新規 HMGB1 中和抗体、HMGB1 受容体である TLR4、RAGE アンタゴニストを用い in vitro, in vivo にて明らかにする。

1. 各種癌細胞(乳がん細胞 MDA-MB-231, 4T1 における HMGB1, TLR2, TLR4, RAGE 発現量の比較検討を行った。

i)乳癌 (MDA-MB-231, MCF-7, 4T1)を用い、これらの癌細胞における HMGB1 の発現量を Western blot 法にて検討した。MDA-MB-231 は HMGB1 低発現株、4T1, MCF7 は高発現株であった。

HMGB1 中和抗体, RAGE アンゴニスト(FPS-ZM1), TLR4 アンタゴニスト(TAK-242)が上記各種癌細胞の細胞増殖ならびに知覚神経細胞の神経軸索伸長、細胞興奮に与える影響の検討

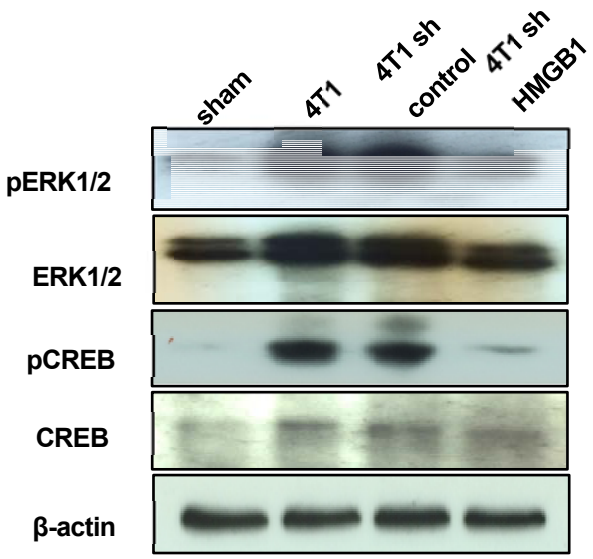
i) RAGE アンゴニスト(FPS-ZM1), TLR4 アンタゴニスト(TAK-242)は4T1, MDA-MB-231 乳がん細胞の増殖抑制効果を示さなかった。 マウス知覚神経細胞株(F11,50B11)に対しても増殖抑制効果を示さなかった。

ii)DRG 神経細胞をラミニンコーティングディッシュ上で培養し神経これに対し(i)で検討した HMGB1 高発現癌細胞株 4T1 の培養上清を添加し神経軸索の変化を測定すると HMGB1 高発現株 4T1 培養上清添加により知覚神経軸索伸張が著明に増加した。またこの効果はHMGB1 中和抗体ならびにRAGE 阻害薬の添加により阻害された。

iii) RAGE アンゴニスト(FPS-ZM1), TLR4 アンタゴニスト(TAK-242)が知覚神経興奮マーカーである p-ERK, p-CREB の発現に及ぼす影響 : DRG 細胞 10% ウシ胎児血清(FBS)添加 Neuro bassal media で培養し HMGB1 高発現群である 4T1 の培養上清また 4T1 の

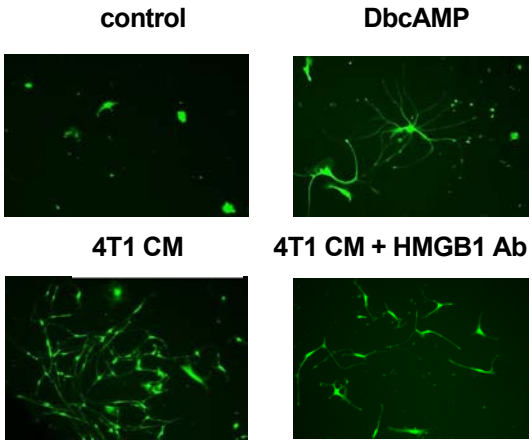
HMGB1 を shRNA を用いて発現抑制した培養上清を添加し 30 分後、細胞を可溶化させタンパク質を回収し上記抗体を用いてウエスタンブロット法にて解析を行った。

4T1 培養上清あるいはコントロール shRNA を導入した 4T1 の培養上清では DRG 細胞の p-ERK, p-CREB 発現が増強していることが明らかになった。対照的に 4T1 の HMGB1 を抑制すると DRG の p-ERK, p-CREB が共に抑制されることが明らかになった。(下図)



iv) DRG 神経細胞をラミニンコーティングディッシュ上で培養することで神経軸索伸長能を測定した。この培養系に対して、HMGB1 高発現群である 4T1 の培養上清、HMGB1 中和抗体を添加し 3 日後、神経軸索の変化を測定した。

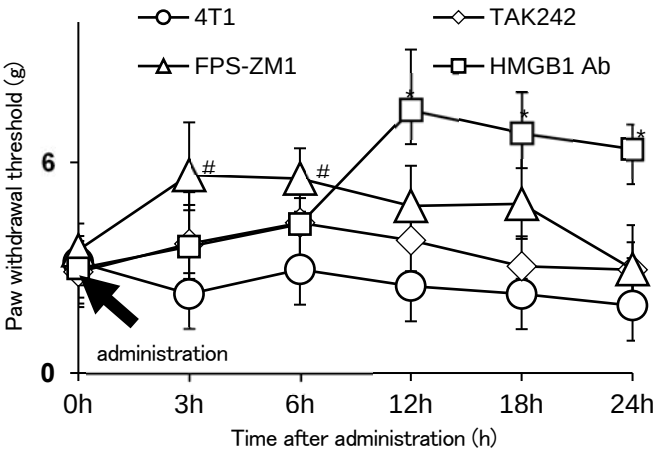
4T1 培養上清は神経軸索の伸張を有意に促進した。HMGB1 中和抗体を添加するとこの作用が阻害された。(下図)



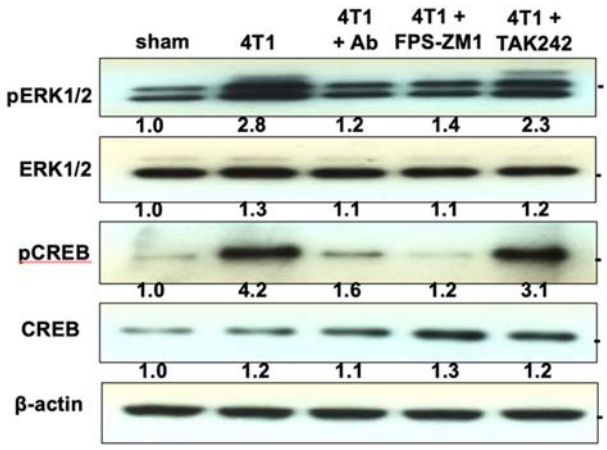
3. HMGB1 中和抗体, RAGE アンゴニスト(FPS-ZM1), TLR4 アンタゴニスト(TAK-242)がマウス癌性骨痛に与える影響の検討.

HMGB1 高発現癌細胞株を 5 週齢雌 BalbCnu/nu 系ヌードマウス脛骨骨髄内に打ち込み癌性骨痛を誘導した。このマウスに RAGE アンゴニスト(FPS-ZM1), TLR4 アンタゴニスト(TAK-242)を投与し Von Frey assay をにて癌性骨痛に対する影響を評価した。

4T1 移植によって誘導された癌性骨痛は HMGB1 中和抗体投与、RAGE 阻害薬投与によって減弱した。しかしながら TLR4 阻害薬の投与は有意な疼痛減弱効果を示さなかった。(下図)



また同マウスの DRG を摘出し神経細胞マーカー発現を western blot にて検討すると HMGB1 中和抗体、RAGE 阻害薬投与マウスでは ERK のリン酸化、CREB のリン酸化が抑制され、癌性骨痛による神経興奮が抑制されることが明らかになった。(下図)



妊娠期の胎盤形成における炎症抑制因子 HRG の生理的調節機能の解析

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

勅使川原　匡

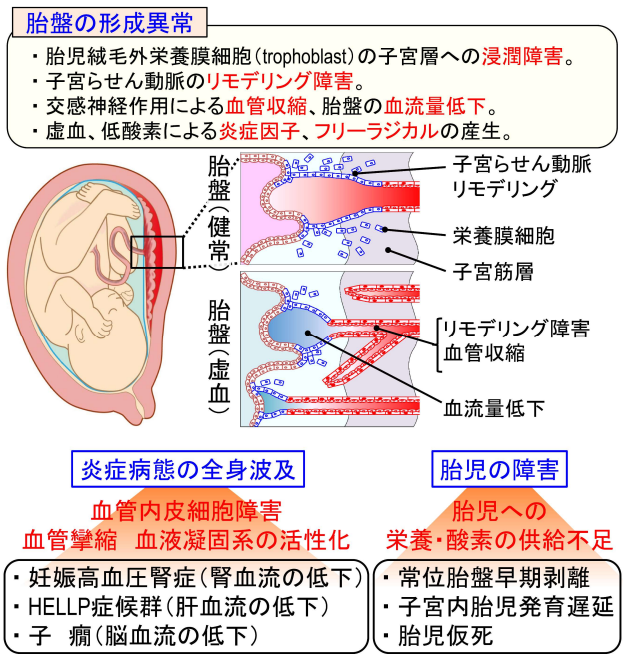
胎盤の形成異常によっておこる妊娠高血圧症候群（HDP）は、発症機序に不明な点が多く、根本的な治療法・予防法は確立していない。重篤化した HDP は、妊娠高血圧腎症、子癇、子宮内胎児発育遅延などを合併し、母児の予後不良につながる。近年、ヒト妊婦において血漿高ヒスチジン糖タンパク（HRG）の著しい減少が、妊娠高血圧腎症の進展と相関することが報告された。血漿 HRG は、全身性炎症病態の進行を制御する抗炎症因子である。本研究は、HRG 遺伝子欠損（HRG KO）マウスや野生型健常マウスを用いて、血漿 HRG が、妊娠期の母体と胎児に与える影響について解析した。妊娠期の血漿 HRG の減少は、胎盤組織に起因する HRG クリアランスの亢進によると考えられた。また、HRG KO マウスは、炎症惹起因子である HMGB1 の血中濃度が恒常的に高値であり、さらに、妊娠期に高血圧と胎盤過形成がみられた。これらの結果は、病態制御因子である HRG が、健常妊娠において何らかの生理的役割をもつ可能性を示唆する。妊娠 HRG KO マウスは、HRG によって制御される胎盤形成機構に異常を生じる HDP 様病態モデルとなる可能性がある。

1. はじめに

妊娠高血圧症候群（hypertensive disorders of pregnancy, HDP）は、胎盤の形成異常による高血圧・血管内皮細胞障害(炎症)を伴った病的状態であり、全妊婦の約５％が罹患する。健常な妊娠母体は、胎児由来の絨毛外栄養膜細胞（extravillous trophoblast, EVT）が子宮内膜層・筋層に浸潤し、子宮らせん動脈の血管壁細胞が栄養膜細胞と置換される。このリモデリング機構によって血管が拡張することで、胎盤の絨毛間腔に十分な血液が供給される。一方、HDP では、栄養膜細胞の子宮内浸潤・血管リモデリングが障害されることで、交感神経作用による血管収縮がおこり、胎盤循環血流量の低下が生じる。この代償として、母体血圧は上昇するが、胎盤の虚血・低酸素状態は、各種の炎症性サイトカインやフリーラジカルの産生を亢進し、免疫細胞の活性化や血管内皮細胞障害を誘導する。胎盤から全身へ波及する炎症因子は、妊娠高血圧腎症、HELLP 症候群、子癇などを合併させ、HDP 病態を重篤化させる。また、胎児への栄養・酸素の供給不足は、常位胎盤早期剥離、子宮内胎児発育遅延、胎児仮死などの障害を引き起こす（図 1）[1-3]。

臨床的に HDP は、絶対安静・栄養管理・降圧薬などの治療が施される。しかし、栄養膜細胞の子宮内浸潤・血管リモデリングが障害される分子機序は、未だ十分な解明に至っておらず、HDP の根本的な治療法・予防法は確立していない。

図 1：妊娠高血圧症候群（hypertensive disorders of pregnancy, HDP）



2．高ヒスチジン糖タンパクと妊娠高血圧腎症

高ヒスチジン糖タンパク（histidine-rich glycoprotein, HRG)は､肝で産生される分子量 75kDa の血漿糖タンパクである。血漿 HRG は、自然免疫系炎症において、血液・血管の病態イベントを抑制的に制御する多機能タンパクと考えられている。これまでに我々の研究室では、血漿 HRG が炎症惹起因子 HMGB1（high mobility group box protein 1）[4] と結合親和性があり、HMGB1 誘導性の血管新生を抑制すること、好中球過剰活性の抑制、血液凝固線溶系の制御、血管内皮保護作用などを報告してきた[5-10]。

血漿 HRG は、ヒト健常妊娠期に減少することが古くに報告されている[11-12]。近年、ヒト妊娠期における血漿 HRG の著しい減少が､妊娠高血圧腎症(現在は、妊娠高血圧症候群（HDP）と定義されている)の進展リスクと相関することが報告された[13-14]。しかし、HDP 発症における血漿 HRG の関与は、これまで基礎研究に基づいた解析がほとんどない(図２)。

本研究では、周産期生理および妊娠高血圧症候群に対する血漿 HRG の関与を明らかとすることを目的とし、野生型健常マウス（C57BL/6N）の周産期における血漿 HRG の動態、及び、HRG 遺伝子欠損マウス（HRG KO）の妊娠期表現型を解析した。

3．健常妊娠マウスにおける HRG の動態

最初に、野生型健常マウス（BL6）の妊娠期における血漿 HRG タンパクの変動を確認した。血漿 HRG タンパクは、糖鎖修飾の違いによって分子量が異なる２種類のタンパクとして検出された。BL6 マウスの妊娠 12 日目において、血漿 HRG は、ヒト妊婦と同様に減少し､特に高分子 HRG が著しく減少していた。血漿 HRG の減少が、単純に妊娠期間の母体血液量の増加による希釈効果でないことを示すために、妊娠前に対する妊娠 12 日目の血漿総タンパク濃度比(約 20%減少）と、血漿中の HRG、アルブミン、IgG１のタンパク減少率を比較しても、高分子 HRG の減少率が顕著だった。また、妊娠期の血漿 HRG タンパクの減少は、出産によって、妊娠前の血漿 HRG 量まで回復した。一方、妊娠期間を通して、肝 HRG 遺伝子の

図2：高ヒスチジン糖タンパク（Histidine-Rich Glycoprotein, HRG）

- 肝において産生される血漿糖タンパク。*Z Physiol Chem, 353:1133-40. (1972)* *Biochemistry,* 25(8):2220-5. (1986)
- 炎症惹起因子HMGB1（High mobility group box-1）と結合親和性があり、HMGB1誘導性の血管新生を抑制する。*Eur J Pharmacol,* 623:89-95. (2009)
- 好中球過剰活性の抑制、血液凝固線溶系の制御、血管内皮保護作用など、多機能な抗炎症作用をもつ。*EBioMedicine,* 9:180-94. (2016) *Br J Pharmacol,* in press. (2019)

ヒト妊娠期において、
血漿HRGの減少量と妊娠高血圧腎症の進展は相関する。
Proc Soc Exp Biol, 158:647-51. (1978)
Am J Hypertens, 24(4):496-501. (2011)

妊娠期高血圧の発症における血漿HRGの関与は、基礎研究に基づいた報告が皆無である。

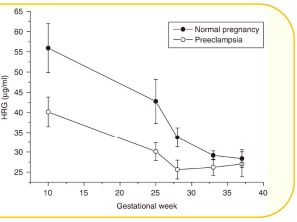


図3：野生型BL6マウスの血漿HRGは 妊娠期に減少する

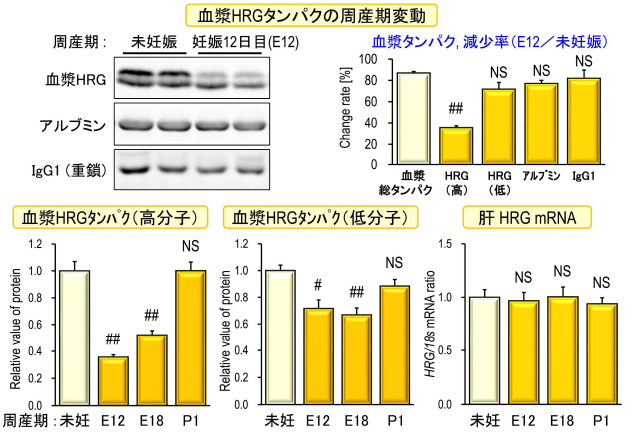


図4：血漿HRGの生物学的半減期は 妊娠期に減少する

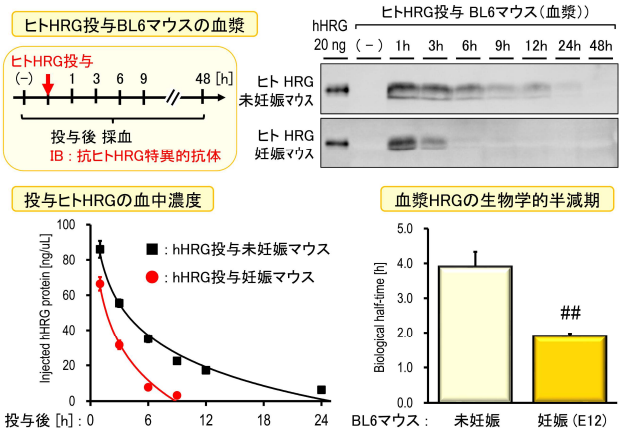
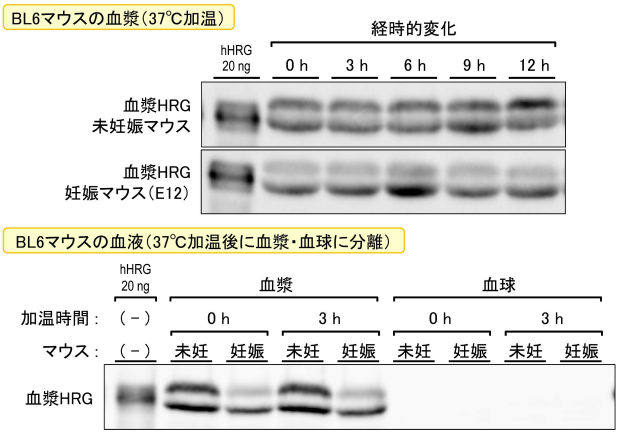


図5：妊娠期の血漿HRGの減少は 血中成分（血漿・血球）に依存しない



発現量は、変化がなかった（図３）。これらの結果から、妊娠期の血漿 HRG は、タンパクレベルの代謝回転が亢進していると考えられた。

そこで、ヒト精製 HRG タンパクを未妊娠、または、妊娠 BL6 マウスに投与し、ヒト HRG 特異的抗体をもちいて、投与したヒト HRG タンパクの血中濃度を経時的に調べたところ、未妊娠マウスに比べて、妊娠マウスのヒト HRG タンパクは、非常に早く減少しており、生物学的半減期はほぼ１／２に減少していた（図４）。この HRG の減少が、血液中のプロテアーゼのような液性因子による可能性を考えて、BL6 マウス血漿を加温し、経時的な HRG タンパクの分解効果を検討したが、変化はなかった。同様に、血液そのものを加温し、その後に分離した血漿・血球中の HRG を検出したが、これも変化はなかった（図５）。これらの結果から、妊娠期の血漿 HRG の減少は、血液中の液性因子による分解、血球による取込みに依存しておらず、どこかの末梢組織によって調節されていると考えられた。

その候補を子宮組織と考えて、妊娠 BL6 マウスから子宮を除去したところ、妊娠マウスの血漿 HRG は、未妊娠マウスのレベルまで回復した（図６）。この結果から、妊娠期の血漿 HRG の減少は、子宮組織（おそらくは胎盤）に依存すると考えられた。妊娠母体は、血液凝固系が亢進し、穏やかな慢性炎症状態にある。胎盤においては、トロンビンやマトリックスメタロプロテアーゼの発現が増加し、絨毛外栄養膜細胞の子宮内浸潤・血管リモデリングや出産時の止血機構に貢献している[15-17]。これらのプロテアーゼが、血漿 HRG の代謝クリアランスにも関与しているのかもしれない。

４. HRG 遺伝子欠損マウスの妊娠期表現型

次に、妊娠期の血漿 HRG の減少が、母体や胎児に与える影響について検討するため、HRG 遺伝子欠損マウス（HRG KO）の妊娠期表現型を検討した。

最初に、血圧を測定したところ、未妊娠の HRG KO マウスの平均血圧は、野生型 BL6 マウスの平均血圧と差がなかった。しかし、HRG KO マウスは、妊娠期間が 12 日目、18 日目と進むに従って、血圧値の有

図６：妊娠期の血漿HRGの減少は 子宮組織（胎盤・胎児）に依存する

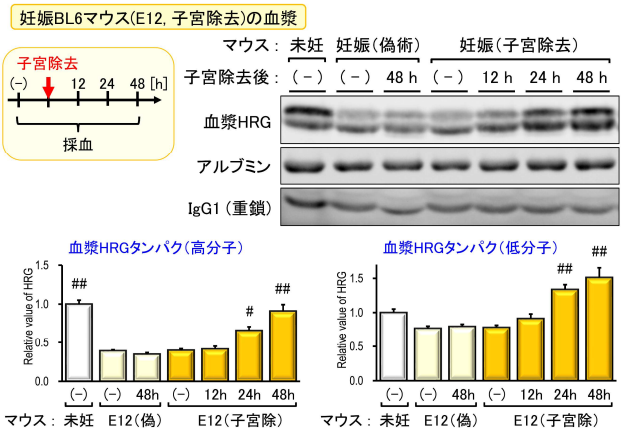


図７：HRG KOマウスは 恒常的に血中HMGB1濃度が高い
また、妊娠HRG KOマウスは 高血圧を発症する

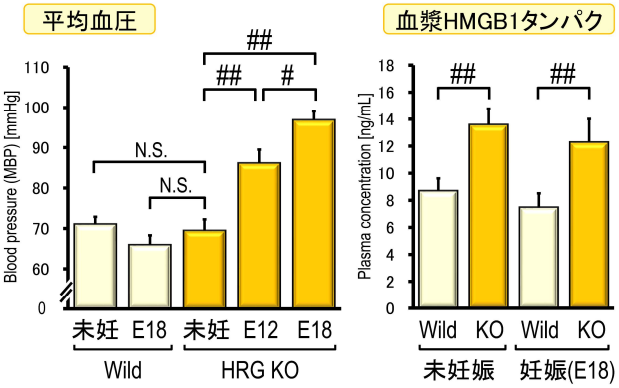


図８：妊娠HRG KOマウスは 胎盤過形成がみられる

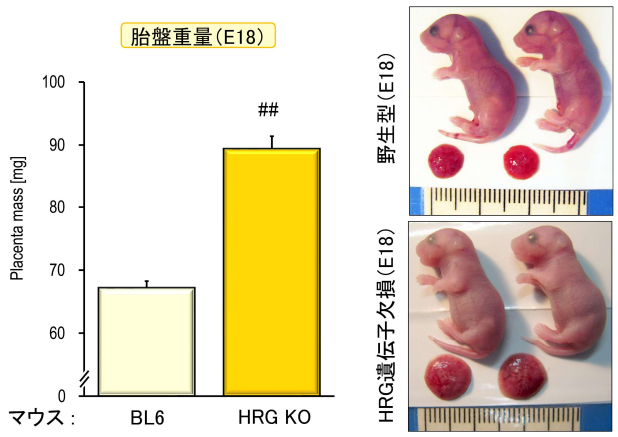
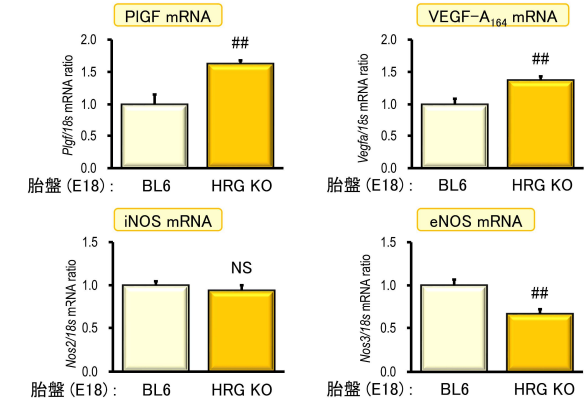


図９：HRG KOマウスの胎盤組織は 血管新生因子の発現亢進
と血管内皮型NOSの発現減少がみられる



意な上昇がみられた。加えて、HRG KO マウスは、炎症惹起因子である血中 HMGB1 量が、妊娠に関係なく恒常的に高値を示していた（図７）。この結果から、HRG KO マウスは、妊娠期の高血圧によって血管内皮細胞障害が易発しやすい可能性が考えられた。

また、妊娠 18 日目において、HRG KO マウスは、胎盤重量の有意な増加がみられた（図８）。加えて、妊娠 HRG KO マウスの胎盤組織は、血管新生因子である PlGF と VEGF の発現量が有意に増加していた。また、炎症性 NO 合成酵素である iNOS の発現量に変化はなかったが、生理的 NO 合成酵素である eNOS の発現量が有意に減少していた（図９）。

今後の詳細な解析が必要ではあるが、これらの変化が、胎盤内の血管新生亢進による胎盤の過形成、胎盤微小血管の収縮による血流障害（血圧の上昇）を引き起こしているのかもしれない。

５．現在までの HDP 病態解析

現在、HDP の病態は、「Two step theory」によって理解されている（図 10）[18-19]。第 1 段階は、胎盤形成不全（血管リモデリング障害）がおこる。虚血・低酸素状態による胎盤の組織障害は、胎盤の血管新生・血管拡張をさらに抑制し、胎盤循環血流量の低下を増悪化させる。第 2 段階は、血管内皮細胞障害（胎盤組織のアポネクローシスによる炎症）がおこる。胎盤への免疫細胞の浸潤・活性化も亢進する。胎盤で産生される炎症因子は、血液循環によって母体全身に波及し、他の末梢臓器や中枢組織においても血管内皮細胞障害を惹起する。また、胎児への栄養・酸素の供給不足は、常位胎盤早期剥離や子宮内胎児発育遅延などの障害を引き起こす。

HDP における妊娠母体の全身性炎症反応の亢進は、健常妊娠でもみられる現象である。このことから、「正常または異常」という対立的原因によって HDP が発症するのでなく、健常周産期でおこる生理的な免疫活性が過剰亢進した状態が、HDP 病態であると考えられる[20]。実際、糖尿病や高血圧、自己免疫疾患などを合併しているヒト妊婦は、HDP の発症率が高い。これは、妊娠前から発症している血管内皮細胞障害が、妊娠期の炎症負荷を増大させるためと考えられる。

胎盤形成不全は、絨毛外栄養膜細胞（EVT）の子宮内浸潤と血管リモデリングの障害が主要因と考えられているが、その機能障害がおこる原因は未だ明らかとなっていない。妊娠期に胎盤産生量や血中濃度が変動するいくつかの炎症因子・血管新生因子・血圧制御因子は、HDP の発症・重篤化と相関性をもつことが報告されており、HDP の早期診断・治療を目的としたバイオマーカータンパクとなる可能性が示唆される[21-23]。RAAS 系が妊娠期の血圧調節に関与することも、古くから報告されている[24]。

６．HRG 作用に基づく HDP 治療戦略の展望

自然免疫活性に起因する血管内皮細胞障害や血液凝固・線溶系活性において、HRG と HMGB1 は、全身性炎症病態の進行を制御する拮抗的因子である。一方、これらの血液・血管にみられる病態イベントは、周産期の胎盤形成・妊娠の維持においても重要な生理現象である。もし、組織・細胞傷害によって顕在化する病態制御因子の HRG と HMGB1 が、健常周

図10：Two step theoryによるHDPの病態機序

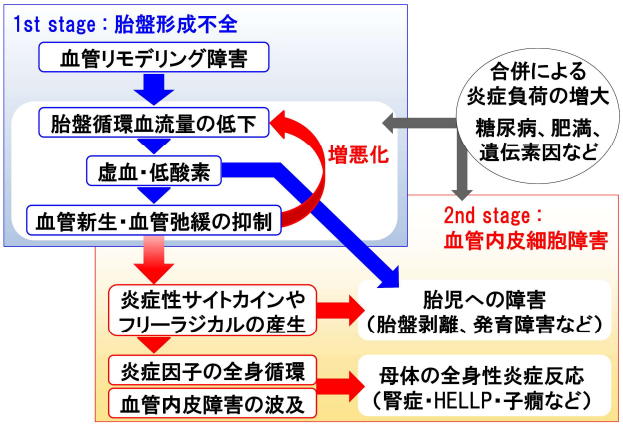
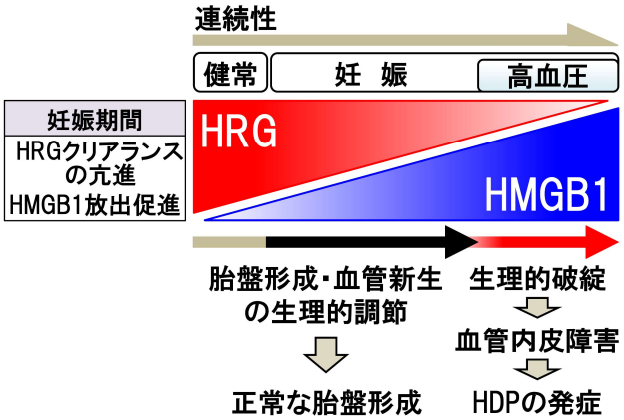


図11：妊娠高血圧症候群（HDP）の新規病態仮説



産期の胎盤形成に生理調節因子として作用するなら、周産期生理学領域に新しい知見を提唱できる可能性がある。HDP の治療戦略として、HRG 補充療法も期待できる。抗炎症因子ではなく、胎盤形成における生理因子としての血漿 HRG の機能解析は、世界的にみても本研究が先駆性の高い試みとなる。

本研究は、胎盤の形成・維持における血管新生の制御が、HRG と HMGB1 の生理的拮抗作用にあると考え、妊娠期における HRG と HMGB1 の調節異常が HDP 病態の本態であるという新規病態仮説を提唱している（図 11）。妊娠期の血漿 HRG の減少によって、胎盤では HMGB1 が相対的優位に作用して、胎盤形成（血管新生）が誘導されると考える。この調節機構の破綻は、HMGB1 の過剰刺激による血管内皮細胞障害（HDP 発症）を惹起するかもしれない。妊娠期は、母体のあらゆる生理機能が劇的に変化しながら、その恒常性を維持している。HRG と HMGB1 の生理作用の量的過不足が恒常性を破綻させるという発想は、独創的といえる。

６.おわりに

HDP は、母体や胎児の生命予後に関わる周産期管理上の重要疾患である。重篤化した場合は、緊急の胎児娩出によって妊娠継続を終了させることもある。HDP の発症リスクが高い妊婦を早期に診断し、治療介入する医療を確立するためにも、HDP の発症機序を解明することは、重要な研究課題といえる。

７.謝辞

本研究の推進にご支援頂いたウエスコ学術振興財団に深く感謝致します。なお、本研究は、2019 年度学術研究助成基金助成金 基盤研究（C）、第 59 回宇部興産学術振興財団学術奨励賞の助成も受けております。

８.参考文献

[1] Faas MM, Spaans F, De Vos P. Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. Front Immunol. 298(5):1-11.(2014)

[2] Hod T, Cerdeira AS, Karumanchi SA. Molecular Mechanisms of Preeclampsia. Cold Spring Harb Perspect Med. 5(10):a023473.(2015)

[3] Nissaisorakarn P, Sharif S, Jim B. Hypertension in Pregnancy: Defining Blood Pressure Goals and the Value of Biomarkers for Preeclampsia. Curr Cardiol Rep. 18(12):1-14.(2016)

[4] Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science. 285:248-51.(1999)

[5] Wake H, Mori S, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M. Histidine-rich glycoprotein inhibits high mobility group box 1 in complex with heparin-induced angiogenesis in matrigel plug assay. Eur J Pharmacol, 623:89-95, 2009.

[6] Wake H, Mori S, Liu K, Morioka Y, Teshigawara K, Sakaguchi M, Kuroda K, Gao Y, Takahashi H, Ohtsuka A, Yoshino T, Morimatsu H, Nishibori M. Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic Lethality through Regulation of Immunothrombosis and Inflammation. EBio Medicine. 9:180-94.(2016)

[7] Zhong H, Wake H, Liu K, Gao Y, Teshigawara K, Sakaguchi M, Mori S, Nishibori M. Effects of Histidine-Rich Glycoprotein on Erythrocyte Aggregation and Hemolysis: Implications for a Role under Septic Conditions. J Pharmacol Sci. 136(3):97-106.(2018)

[8] Terao K, Wake H, Adachi N, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H1, Mori S2, Nishibori M. Histidine-Rich Glycoprotein Suppresses Hyperinflammatory Responses of Lung in a Severe Acute Pancreatitis Mouse Model. Pancreas. 47(9):1156-64.(2018)

[9] Gao S, Wake H, Gao Y, Wang D, Mori S, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M. Histidine-rich glycoprotein ameliorates endothelial barrier dysfunction through regulation of NF-κB and MAPK signal pathway. Br J Pharmacol. In press. (2019)

[10] Nishimura Y, Wake H, Teshigawara K, Wang D, Sakaguchi M, Otsuka F, Nishibori M. Histidine-rich glycoprotein augments natural killer cell function by modulating PD-1 expression via CLEC-1B. Pharmacol Res Perspect. 7(3):e00481.(2019)

[11] Morgan WT, Koskelo P, Koenig H, Conway TP. Human histidine-rich glycoprotein. II. Serum levels in adults, pregnant

women and neonates. Proc Soc Exp Biol Med. 158(4):647-51.(1978)

[12] Tatra G, Nasr F, Hoyer E. Histidine-rich-3,8S-alpha 2-glycoprotein in normal pregnancy and EPH-gestosis.[Article in German] Z Geburtshilfe Perinatol. 187(3):124-6.(1983)

[13] Kårehed K, Wikström AK, Olsson AK, Larsson A, Olovsson M, Akerud H. Fibrinogen and histidine-rich glycoprotein in early-onset preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 89:131-9.(2010)

[14] Bolin M, Akerud P, Hansson A, Akerud H. Histidine-rich glycoprotein as an early biomarker of preeclampsia. Am J Hypertens. 24:496-501.(2011)

[15] O'Brien PJ, Koi H, Parry S, Brass LF, Strauss JF 3rd, Wang LP, Tomaszewski JE, Christenson LK. Thrombin receptors and protease-activated receptor-2 in human placentation: receptor activation mediates extravillous trophoblast invasion in vitro. Am J Pathol. 163(4):1245-54.(2003)

[16] Harris LK. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. Placenta. 31:S93-8.(2010)

[17] Chen J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. Prog Mol Biol Transl Sci. 148:87-165.(2017)

[18] Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. Placenta. 30:S32-7.(2009)

[19] Pollheimer J, Vondra S, Baltayeva J, Beristain AG, Knöfler M. Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment. Front Immunol. 9:2597.(2018)

[20] Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 180(2 Pt 1):499-506.(1999)

[21] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. N Engl J Med. 350(7):672-83 (2004)

[22] Holmlund U, Wähämaa H, Bachmayer N, Bremme K, Sverremark-Ekström E, Palmblad K. The novel inflammatory cytokine high mobility group box protein 1 (HMGB1) is expressed by human term placenta. Immunology. 122(3):430–7(2007)

[23] Keelan JA, Mitchell MD. Placental cytokines and preeclampsia. Front Biosci. 12:2706-27(2007)

[24] Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. J Clin Invest. 52(11):2682-9.(1973)

CXCR4 阻害に着目した口腔癌の新規抗腫瘍血管治療の開発

岡山大学　医歯薬学総合研究科　口腔病理学分野

河合穂高

【概要】

ケモカインレセプターである CXCR4 は様々な組織で発現が確認され，幹細胞の維持や腫瘍の進展，遠隔転移など幅広い領域で様々な役割が報告されている．口腔領域の悪性腫瘍のうち，主要な組織型である扁平上皮癌においても，腫瘍血管に CXCR4 が発現していることが明らかとなり，同血管を阻害することで抗腫瘍効果が期待された．本研究では，マウスにヒト由来口腔扁平上皮癌細胞株を移植し，CXCR４阻害剤を投与することで腫瘍の増殖にどのような効果があるか，検討を行った．

腫瘍移植マウスに薬剤を投与すると，腫瘍組織内に優位に壊死領域が増加し，血管周囲を取り巻くような構造で広がる特徴的な組織像が観察された．また，HIF-1a 陽性腫瘍細胞が増加していることから，低酸素状態に陥った領域が拡大していることも明らかとなった．また，腫瘍血管の全長，本数，長さをそれぞれ計測すると優位に数値の現象がみられ，腫瘍血管の新生や分岐が阻害されていることが示唆された．

これらのことから，口腔扁平上皮癌において CXCR4 は腫瘍血管の申請や分岐に関与し，腫瘍の生存や増殖に関与していることが示唆された．

【緒言】

CXCR4 は血液系，非血液系に関わらず，多彩な細胞に発現するケモカイン受容体である [1-4]．CXCR4-SDF-1 (stromal cell-derived factor-1, CXCR12) axis は，血液系幹細胞を骨髄に留める際に重要な役割を果たしている [5]．また胎児期では胃腸管を栄養する大血管の形成に関わることが知られ，近年様々な機能が明らかになりつつある．腫瘍組織では，グリオブラストーマや肝癌，乳癌や食道癌など多彩な臓器の腫瘍細胞で CXCR4 の発現が報告されており [6]，CXCR4 発現症例ではリンパ節転移や遠隔臓器転移が多く [7]，予後不良因子とされている．

口腔領域の悪性腫瘍のうち主要な組織型である口腔扁平上皮癌においても，CXCR4 は 50~60%の症例で発現が確認され [8]，内田らは CXCR4 発現症例のリンパ節および遠隔臓器転移の優位な上昇を報告している [9]．また，腫瘍細胞を移植したマウスに CXCR4 を阻害剤を投与すると腫瘍径が減少し，CXCR4 の抗腫瘍効果が示唆された [18]．しかし，CXCR4 の阻害は in vitro の系において，腫瘍の増殖・生存に直接影響を及ぼさないことが明らかとなっており [10]，生体でも腫瘍の縮小は，腫瘍細胞以外の因子の阻害によるものであると考えられた．

今回我々は，口腔扁平上皮癌を栄養する腫瘍血管に CXCR4 が発現することに注目し，CXCR4 を阻害することで抗腫瘍効果が期待できると考え，ヒト由来口腔扁平上皮癌株を用いて CXCR4 阻害による腫瘍組織への影響を組織学的に検討した．

【材料と方法】

1. AMD3100 溶液の作成

AMD3100 (Plerixafor, ChemScene)は CXCR4 のアンタゴニストである．AMD3100 10mg を生理食塩水 20 ml に溶かして AMD3100 溶液を作成した．溶液は 4℃下で保管した．

2. 癌細胞株移植マウスの作製および AMD3100 の投与

高分化型ヒト由来口腔扁平上皮癌細胞株（HSC2）をヌードマウス（BALB/c-nu/nu）の背部皮下に 10×105cells / 匹ずつ移植した．一週間後に腫瘍の生着を確認してから，21 日間 AMD3100 (50ug/day)の腹腔内投与を行った．対照群として同数の腫瘍細胞を背部皮下に移植したマウスに，一週間後から生食を腹腔内投与した．

ただし，対照群のうち 1 匹は HSC2 が生着しなかっ

たため，後に述べる結果からデータを除外した.

3. 腫瘍移植マウスの組織学的検討

AMD3100 溶液あるいは生理食塩水を 21 日間投与した後，10%中性緩衝ホルマリンを用いてマウスを灌流固定した．腫瘍を摘出し，10%中性緩衝ホルマリン浸漬固定後,常法に従い,アルコール系列で脱水,パラフィン包埋した．厚さ約 3μm のパラフィン切片を作製し,ヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡的に観察した.

4. 壊死領域の測定方法

1 腫瘍につき無作為に 5 視野/x400 ずつ選び,imageJ を用いて壊死領域を計測した.

AMD3100 溶液投与群　（以下 CXCR4 阻害群とする）と対照群とで壊死領域を比較した.

5. 免疫組織化学的検討

切片を脱パラフィン後, 内因性ペルオキシダーゼをブロッキングするために 0.3%過酸化水素メタノール溶液に 30 分浸漬した．抗原賦活化のために加熱処理を行い，一次抗体を 4℃下にて一晩反応させた(表参照). 200 倍希釈 2 次抗体を 30 分室温で反応させた後，55 倍希釈アビジンービオチン複合体を 30 分室温で反応させた．なお，希釈には 0.05M トリス塩酸緩衝生理食塩水 (pH7.4)を用いた. 発色基質は,0.01%H2O2 加 0.02%3,3-ジアミノベンチジン 4 塩酸塩(0.05M トリス塩酸緩衝液)を用いた．発色後,Mayer のヘマトキシリンで核染色を行い，光顕的に観察した.

一時抗体	メーカー	希釈倍率	抗原賦活化処理
CD34	Abcam	x100	Microwave
HIF−1α	Abcam	x200	Cooker

6. 血管走行の比較および長さの測定

CD34 を用いて, 薬剤投与群と対照群での血管の走行や分布の違いを検討した． 1 腫瘍につき 5 視野/x200 ずつ無作為に選び, imageJ を用いて CD34 陽性の血管の長さを計測した．CXCR4 阻害群と対照群を血管の長さの合計で比較した.

7. HIF1-α陽性領域の測定

HIF1-α を用いて，CXCR4 阻害群と対照群での低酸素濃度領域を検討した．1 腫瘍につき 5 視野/x400 ずつ無作為に選び，ImageJ を用いて HIF1-α陽性領域を計測した．CXCR4 阻害群と対照群とで HIF1-α陽性領域の合計を比較した.

【結果・考察】

1. CXCR4 阻害による腫瘍組織への影響

CXCR4 阻害群および対照群の腫瘍組織を摘出し組織切片を作製，組織学的に比較検討を行なった．CXCR4 阻害群では，対照群と比較して優位な腫瘍組織の壊死を認めた（図 1）.

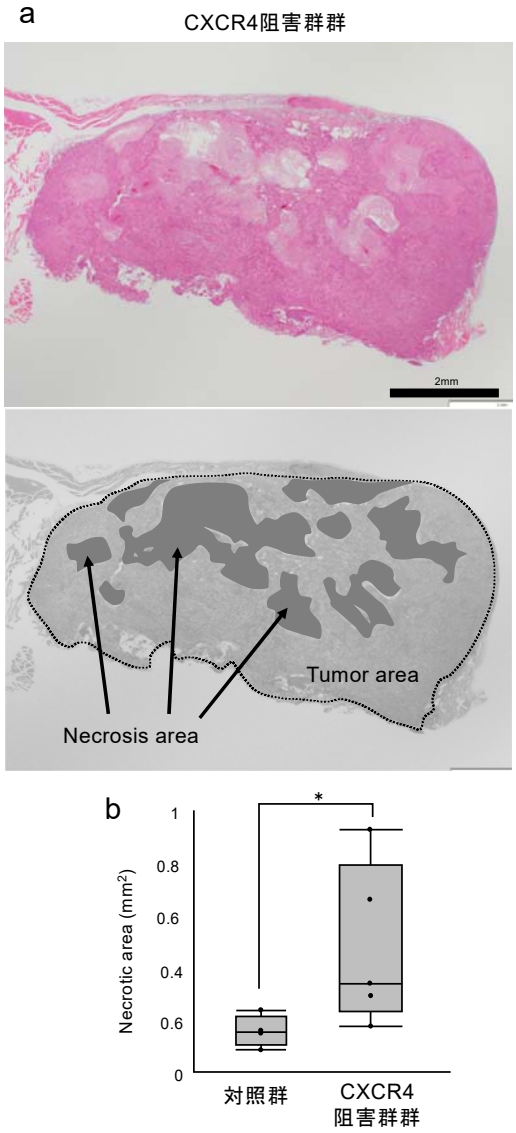


図1. 腫瘍壊死領域の組織学的検討
a) 腫瘍のHE像（ルーペ像）. 腫瘍の壊死領域が, 腫瘍辺縁部まで広がっている. b) 壊死領域の面積の比較。薬剤投与群で壊死領域の優位な増加がみられた

また，CXCR4 阻害群では腫瘍の壊死が腫瘍の中心部だけでなく辺縁部にも認められ，腫瘍血管周囲一

層の腫瘍組織を残し，その周囲が脱落したような特徴的な壊死像を示した（図２）．これは臨床検体で認められる一般的な腫瘍壊死の像とは異なり，CXCR4 阻害に伴い特異的な腫瘍環境が形成された可能性が考えられた．

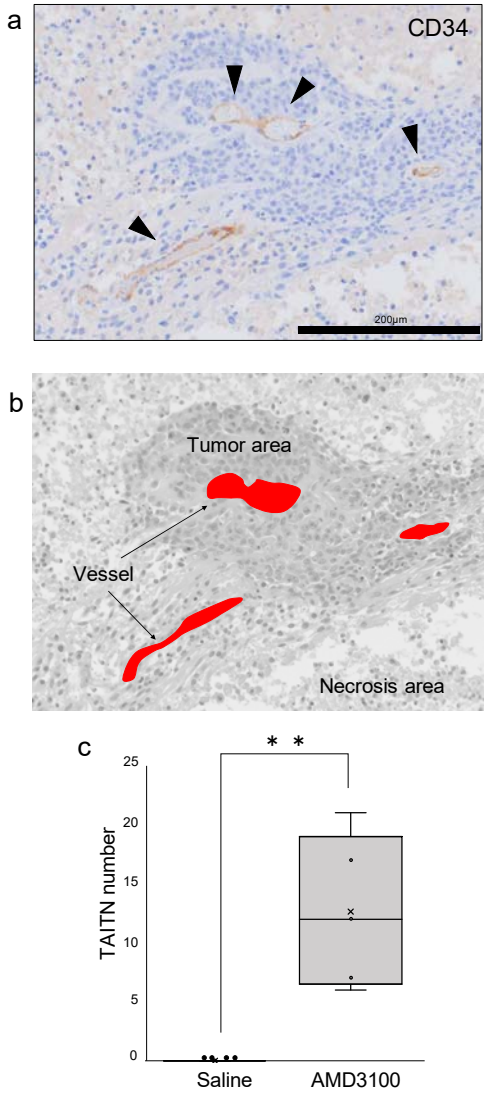


図２．CXCR4阻害によりみられた特徴的な腫瘍壊死の検討
a) CXCR4阻害群の腫瘍壊死部のCD34免疫組織化学染色．b) CXCR４阻害群壊死部の模式図.血管周囲一層の腫瘍組織を残して、特徴的な壊死組織が広がっている．c) 特徴的な壊死領域の数の比較．CXCR4阻害群のみ特殊な壊死組織が観察された。

2. 低酸素領域の検討

HIF-1a は hypoxia induced factor の名称通り，細胞が低酸素状態に置かれることで誘導される因子である．HIF-1a の発現は，腫瘍細胞が低酸素状態に置かれていることを意味する．腫瘍細胞の HIF-1a の発現を検討すると，対照群では HIF-1a の発現領域は腫瘍の中心部に限局しているのに対して，CXCR4 阻害群では HIF-1a 発現領域は腫瘍全体に広がりその領域が優位に増加していた（図３）．本実験系では，マウスにヒト由来の培養細胞を移植して検討を行っており，ヒト抗原に交差性のある抗体を用いて染色を行えば，ヒト腫瘍細胞の染色性のみ検討を行うことができる．本実験で用い HIF-1a 抗体はヒト HIF1-a 抗原にのみ交差性があるため，HIF-1a の陽性領域は腫瘍細胞の HIF-1a の発現と同義である．CXCR4 阻害群では，壊死がみられない腫瘍組織にもおいても，多くの細胞で HIF-1a の発現がみられ，腫瘍細胞が低酸素状態に置かれていることが示唆された．

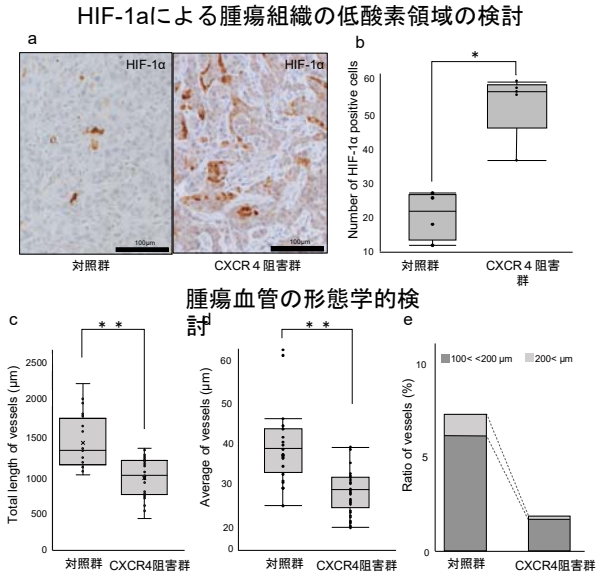


図３．低酸素領域および腫瘍血管の検討
a) HIF-1a免疫組織化学染色（高倍像）．HIF-1a陽性腫瘍細胞が観察される.b) HIF-1a陽性細胞数のカウント。CXCR4阻害群で陽性細胞が優位に増加している．c) 腫瘍血管全長の比較． d) 腫瘍血管の長さの平均の長さ．e) 血管の長さの割合．いずれもCXCR4阻害群で減少している．

3. 腫瘍血管の計測

高倍視野における腫瘍血管の全長，数，長さにおいて，CXCR4 阻害群で優位な減少がみられた（図３）．CXCR4 は胎生期の血管形成で重要な役割を果たすことが知られており，その役割は血管の進展や分岐に関わる [11]．今回の実験結果は，CXCR４阻害により腫瘍壊死や，腫瘍組織の低酸素領域が増加する効果が確認され，CXCR４阻害により血管の分岐や新生に影響を及ぼしている可能性が考えられた．

今回の検討により，CXCR4 の阻害により腫瘍血管形成が抑制され，腫瘍増殖が抑制されたと示唆された．

CXCR4陽性の腫瘍血管に関する研究が進めば，口腔扁平上皮癌に対する新しい腫瘍血管抑制治療の開発につながる可能性が考えられた．以上の研究結果の一部は，2019年にTumor Angiogenic Inhibition Triggered Necrosis (TAITN) in Oral CancerとしてCells (doi:10.3390/cells8070761)に掲載された．

【参考文献】

1) Murdoch C, Monk PN, Finn A: *Immunology*, *98*, 36–41 (1999).

2) Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR: *Natl. Acad. Sci. USA*, *94*, 1925–30 (1997).

3) Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA: *Nature*, *382*, 829–33 (1996).

4) Schecter A.D, Berman AB, Taubman MB: *Microcirculation*, *10*, 265–72 (2003).

5) Bonig H, Papayannopoulou T: *Leukemia*, *27*, 24–31(2013).

6) Würth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T: *Front. Cell. Neurosci*, *8*, 144 (2014).

7) Salmaggi A, Gelati M, Pollo B, Marras C, Silvani A, Balestrini MR, Eoli M, Fariselli L, Broggi G, Boiardi A: *J. Neurooncol. 74*, 287–93 (2005).

8) Almofti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, Sato M: *Int. J. Oncol. 25*, 65–71 (2004).

9) Uchida D, Onoue T, Kuribayashi N, Tomizuka Y, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: *Eur. J. Cancer*, *47*, 452–9 (2011).

10) Uchida D, Onoue T, Kuribayashi N, Tomizuka Y, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: *Eur. J. Cancer*, *47*, 452–9 (2011).

11) Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S: *Nature*, *393*, 591–594 (1998).

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 の報告例はなかった。前年度、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 を開発することに成功した。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。本研究では様々な置換基を導入したキラル BODIPY を合成し、導入置換基がキラル光学特性に及ぼす効果を調査した。またキラル BODIPY 二量体も合成し、分子内相互作用について考察した。さらに螺旋型カルバゾール骨格を持つキラル BODIPY も新規に開発し、そのキラル光学特性について調査した。

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。

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 [1] 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（スキーム１）。前年度は 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。[2] 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。本年度は様々な置換基を導入したキラル BODIPY を合成し、導入置換基がキラル光学特性に及ぼす効果を調査した。また螺旋型カルバゾール骨格を持つキラル BODIPY も新規に開発し、そのキラル光学特性について調査した。

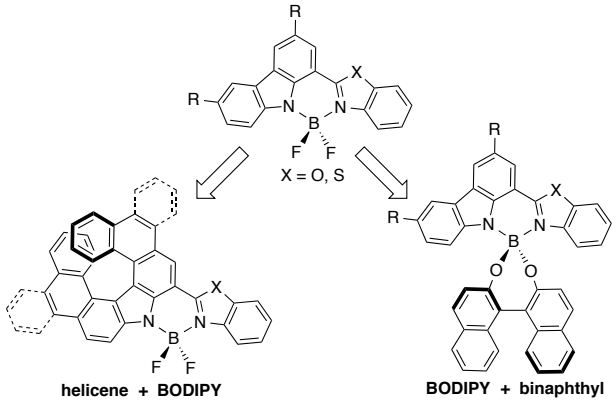
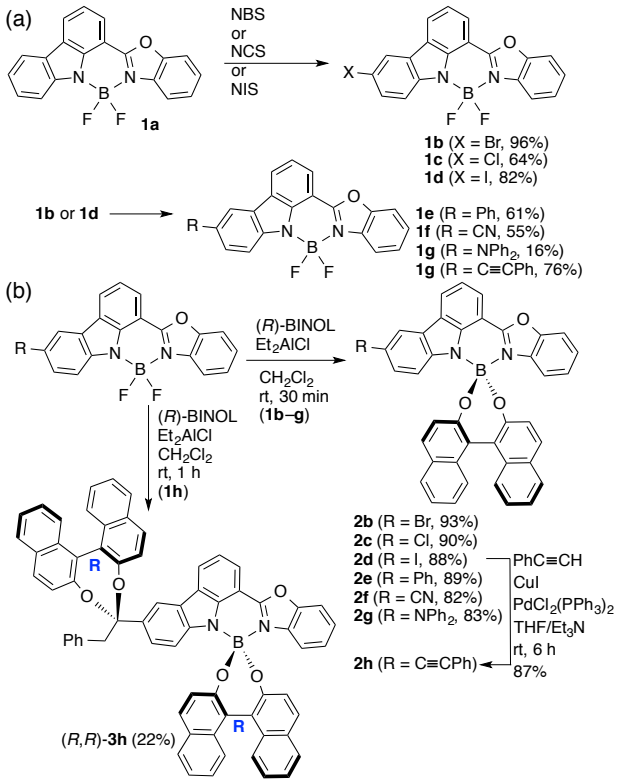


図１．カルバゾール骨格を持つキラル BODIPY

２．結果と考察

（１）様々な置換基を導入したキラル BODIPY の合成

まず電子的な摂動が大きいカルバゾール６位にハロゲンを導入した BODIPY 類縁体 **1b-d** を合成した。これらを用いてフェニル基、シアノ基、アミノ基、フェニルエチニル基を導入した **1e-h** を合成した（スキーム１）。続いて **1b-h** を Et_2AlCl を用いたビナフチルユニット導入反応に附したところ、キラル BODIPY**2b-g** を高収率で得た。一方 **1h** の反応では **2h** は得られずビナフチル基が２つ反応した **3h** が得られた。**2h** は **2d** から薗頭カップリングにより得た。フェニル基を持つ **2e** は結晶構造解析に成功した。パッキング内ではπ－πスタッキングにより一次元鎖を形成していた（図２）。



スキーム１．**1**，**2**，(R, R)-**3h** の合成

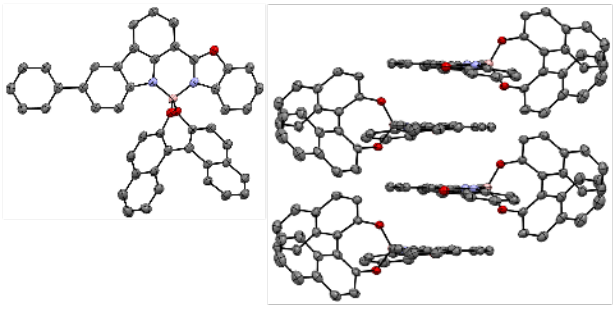
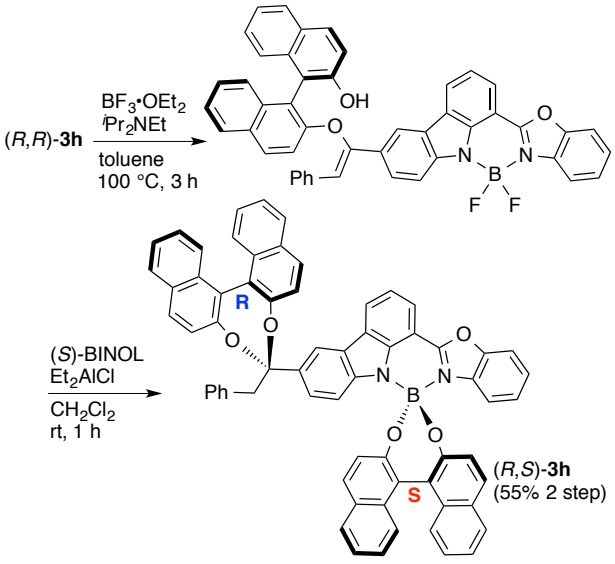


図２．**2e** の結晶構造

合成したキラル色素の光学特性を評価した（図３、表１）。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、効果的な置換基効果が確認された。

強い電子供与性基であるアミノ基を持つ **2g** は光誘起電子移動のため、**2b** と **2d** は重原子効果のため蛍光を示さなかった。その他のキラル色素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。この中ではクロロ基を持つ **2c** が最も強い CPL（g_{lum} = −3.8 × 10^{-3}）を示した。

(R, R)-**3h** は２つのビナフチルユニットを持つにもかかわらず、低い g 値を示した。(R, R)-**3h** の２つのビナフチルユニットは互いにキラリティを打ち消しあっているのではないかと考えて、ジアステレオマー(R, S)-**3h** を合成した（スキーム２）。(R, S)-**3h** は g_{abs}、g_{lum}値共に高い値を示したことから２つのビナフチルユニットによる相乗効果が示唆された。



スキーム２．(R, S)-**3h** の合成

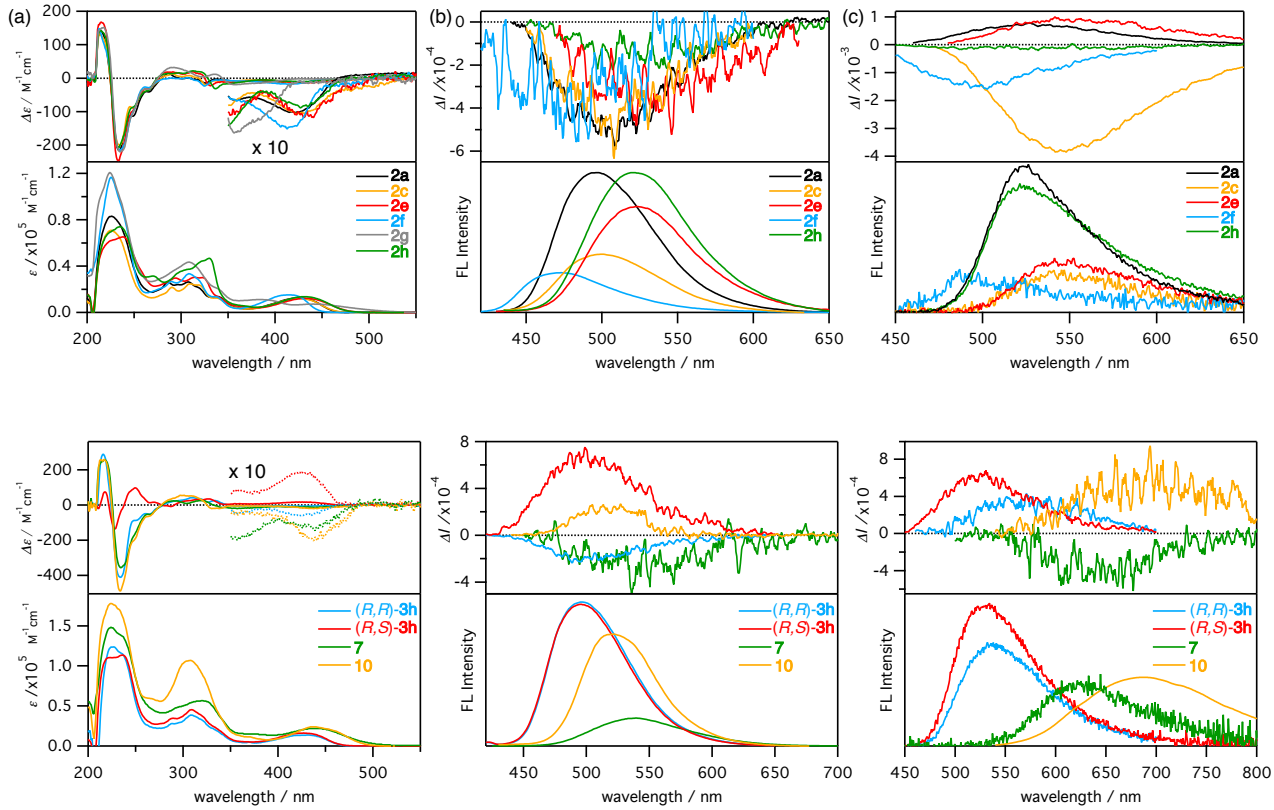
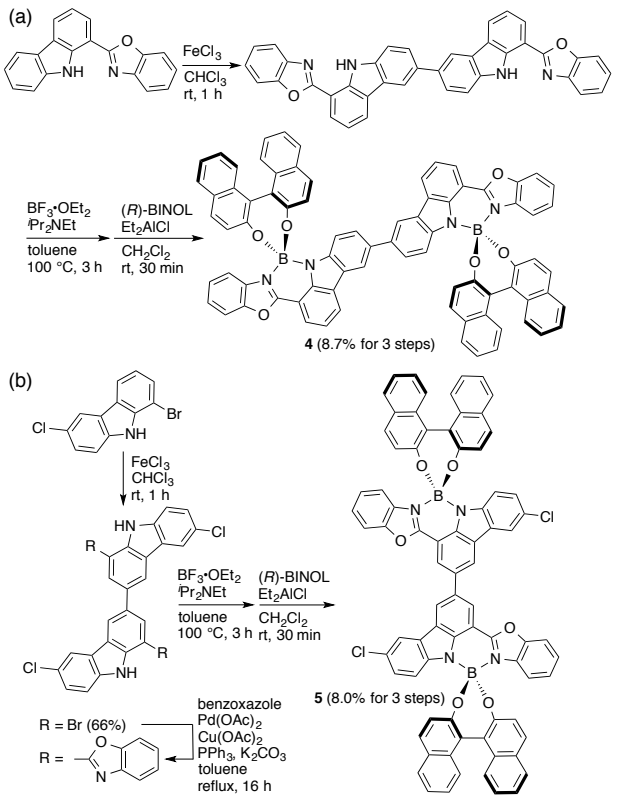


図３．(a) ジオキサン中の CD, UV スペクトル．(b) ジオキサン中の CPL, FL スペクトル．(c) 固体状態の CPL, FL スペクトル．

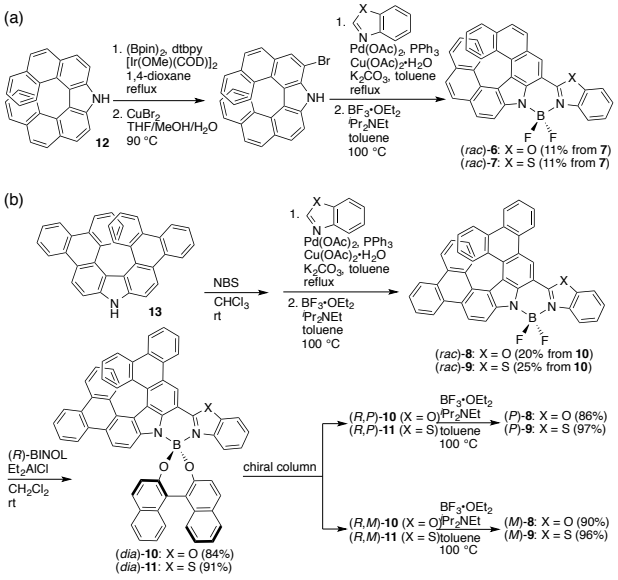
表１．2-5 のキラル光学特性

Compd	1,4-Dioxane						Powder		
	λ_A [nm]	λ_F[a] [nm]	$\Delta\nu_{St}$[b] [cm^{-1}]	Φ_F	g_{abs}[c]	g_{lum}[d,e]	λ_F[a] [nm]	Φ_F	g_{lum}[d,f]
2a	425	497	3410	0.245	-9.5×10^{-4}	-5.2×10^{-4}	524	0.232	$+7.2\times10^{-4}$
2c	426	499	3430	0.108	-1.0×10^{-3}	-4.5×10^{-4}	544	0.063	-3.8×10^{-3}
2e	433	523	3970	0.200	-1.0×10^{-3}	-3.3×10^{-4}	541	0.082	$+8.9\times10^{-4}$
2f	413	473[g]	3070	0.070	-1.2×10^{-3}	-3.9×10^{-4}	487[g]	0.067	-1.4×10^{-3}
2g	441	522	3520	0.007	-2.9×10^{-4}	–[h]	–[h]	–[h]	–[h]
2h	432	520	3070	0.250	-7.2×10^{-4}	-1.3×10^{-4}	523	0.226	-1.2×10^{-4}
(*R*,*R*)-**3h**	430	497	3140	0.319	-3.8×10^{-4}	-2.0×10^{-4}	533	0.084	$+3.0\times10^{-4}$
(*R*,*S*)-**3h**	427	495	3220	0.314	$+1.0\times10^{-3}$	$+6.7\times10^{-4}$	534	0.112	$+5.9\times10^{-4}$
4	440	540	4210	0.066	-5.7×10^{-4}	-2.7×10^{-4}	629	0.050	-3.9×10^{-4}
5	436	521	3740	0.229	-7.7×10^{-4}	$+2.3\times10^{-4}$	686	0.049	$+6.0\times10^{-4}$

最後に 3,3’位および 6,6’位で直接結合した二量体 **4**, **5** を合成し、分子内相互作用について考察した（スキーム３）。塩化鉄を用いた酸化反応によりベンゾオキサゾールを導入したカルバゾールの二量化を経て、ホウ素錯化することで **4** を得た。また 1-ブロモ-6-クロロカルバゾールの二量化を経て、直接アリール化によりベンゾオキサゾールを導入し、ホウ素錯化することで **5** を得た。二量化によりスペクトルの長波長シフトが確認された。特に固体状態の蛍光、CPL スペクトルは大きく長波長シフトした。興味深いことに **4** が負の CPL を示したのに対して、**5** が正の CPL を示した。これは **5** の励起状態が他の色素とは異なることが示唆された。このことは DFT 計算からも支持された。



スキーム４



スキーム５

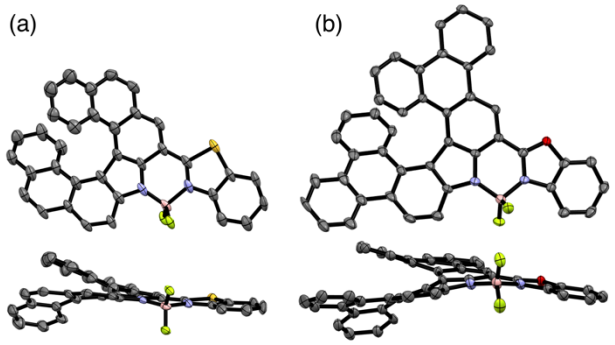


図４．(a)**7** と(b)**8** の結晶構造

(２)アザヘリセン骨格を持つキラル BODIPY の合成

ヘリセンはベンゼン環あるいはヘテロ芳香環がオルト位で縮環することで螺旋状に共役系が拡張したキラルパイ共役系化合物であり、強い旋光性を示すことで注目されている。近年 CPL 活性なヘリセンの合成が盛んに行われているが、一般的なヘリセンは修飾が困難であり青色領域での CPL を示すものが多い。一方で窒素を組み込んだアザヘリセンはプロトン化、金属配位、ドナーアクセプター相互作用を利用することで長波長領域での発光や CPL が可能である。本研究ではカルバゾール骨格を持つアザヘリセンを用いることで新規キラル BODIPY **6**-**11** を開発した。

アザヘリセン **12** に対して Ir 触媒を用いた直接ホウ素化、$CuBr_2$ を用いてブロモ基への変換、直接アリール化、ホウ素錯化により **6** と **7** を得た。またアザヘリセン **13** を新規に合成し、NBS によるブロモ化、直接アリール化、ホウ素錯化により **8** と **9** を得た(スキーム５)。**7** と **8** は単結晶が得られたため結晶構造解析によって構造を確認した（図４)。

6 と **7** はキラルカラムによりラセミ体を光学分割した。**8** と **9** は Et_2AlCl を用いた反応によりホウ素上に軸不斉ビナフチルユニットを導入し、ジアステレオマー(dia)-**10, 11** とした後キラルカラムにより(R,P)-**10, 11** と(R,M)-**10, 11** に分離し、BF_2 錯体に戻すことでそれぞれ(P)-**8, 9** と(M)-**8, 9** を得た。

エナンチオピュアなキラル色素を用いて光学特性を評価した（図５、表２)。は可視領域に吸収およびコットン効果を示し g_{abs} 値は 1.1×10^{-3}〜3.1×10^{-3} であった。可視から近赤外領域に至る蛍光と CPL を示した。蛍光量子収率は 0.20-0.36 であり、g_{lum} 値は 7.0×10^{-4}〜1.9×10^{-3} であった。g_{abs}、g_{lum} 値共に **2** と比較して向上した。興味深いことにビナフチルを導入した **10, 11** は **8, 9** より高い CPL を示し、軸不斉の導入によりヘリセンのキラル光学特性が向上した。

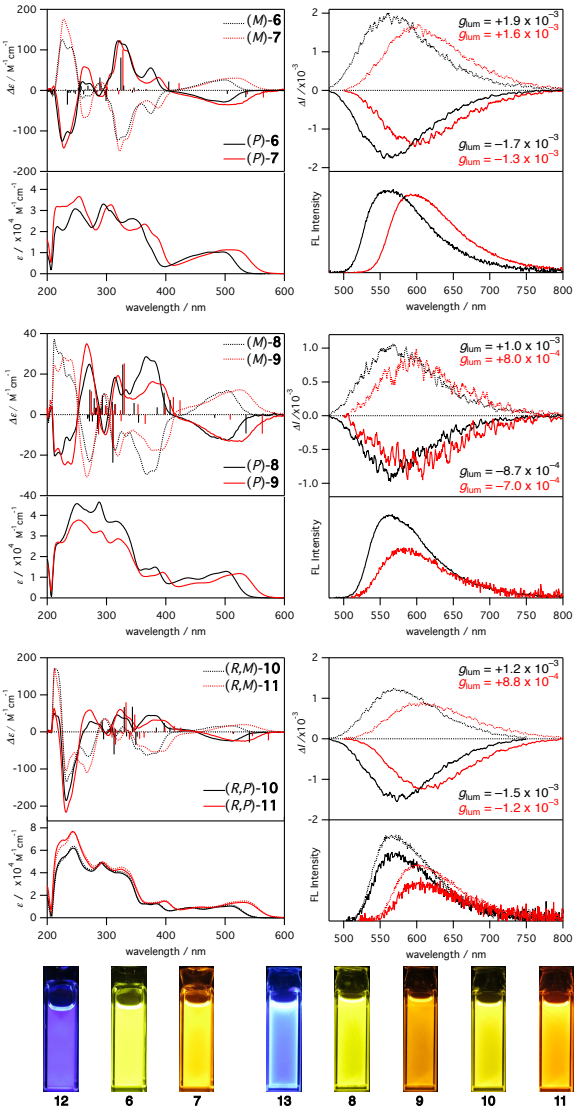


図５．ジオキサン中の CD, UV, FL, CPL スペクトルと UV 照射下での発光写真

表２．アザヘリセン類のキラル光学特性

compd	λ_A [nm]	g_{abs}	λ_F [nm]	Φ_F	g_{lum}
(*P*)-**6**	495	-2.7×10^{-3}	568	0.218	-1.7×10^{-3}
(*P*)-**7**	508	-3.1×10^{-3}	594	0.200	-1.3×10^{-3}
(*P*)-**8**	508	-1.2×10^{-3}	566	0.330	-8.7×10^{-4}
(*P*)-**9**	524	-1.1×10^{-3}	592	0.210	-7.0×10^{-4}
(*R,P*)-**10**	508	-2.3×10^{-3}	576	0.296	-1.5×10^{-3}
(*R,M*)-**10**	509	$+1.5 \times 10^{-3}$	571	0.364	$+1.2 \times 10^{-3}$
(*R,P*)-**11**	530	-1.8×10^{-3}	605	0.204	-1.2×10^{-3}
(*R,M*)-**11**	532	$+1.5 \times 10^{-3}$	602	0.265	$+8.8 \times 10^{-4}$
(*P*)-**13**	411	-1.8×10^{-3}	428	0.310	-1.9×10^{-3}

アザヘリセン **13** の光学分割を行い、CD と CPL スペクトルを測定した。g_{abs}、g_{lum} 値はそれぞれであり **6**-**11** と同程度であった。このことはヘリセン骨格のキラリティが BODIPY 骨格に効果的に転移したと考えられる。DFT 計算の結果 **6**–**11** の HOMO と LUMO はそれぞれアザヘリセン部分と BODIPY 骨格に分布しており分子内電荷移動が示唆された。

３．まとめ

本研究では様々な置換基を導入したキラル BODIPY を合成し、導入置換基がキラル光学特性に及ぼす効果について明らかにした。またキラル BODIPY 二量体を合成したところ、近赤外領域に達する固体発光と CPL を示した。[3] またアザヘリセン骨格を持つキラル BODIPY の開発にも成功した。このヘリセンに軸不斉ビナフチルを導入したところ、キラル光学特性の向上を確認した。[4]

４．参考文献

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

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

(3) C. Maeda, K. Suka, K. Nagahata, K. Takaishi, T. Ema, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 4261.

(4) C. Maeda, K. Nagahata, T. Shirakawa, T. Ema, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, in press.

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、外部刺激によって円偏光発光性 (CPL) が変化する有機色素が注目されており、いくつか報告されている。しかし外部環境や刺激によって CPL の符号が反転するスイッチ色素はほとんど知られていない。本研究では新たな CPL スイッチ色素の開発を目指し、軸性キラルな (*R*)-1,1'-ビナフチルでピレン環を挟んだ色素群を設計・合成し、評価した。ジクロロメタン溶液の CPL を調査したところ、化合物によって CPL の符号が異なり、ビナフチルの 2-位がヒドロキシ基である化合物は負の CPL を、アルコキシ基である化合物は正の CPL を示した。さらにヒドロキシ基を有する化合物は、非極性溶媒中では負の CPL を、極性溶媒中では正の CPL を示した。理論計算により、ヒドロキシ基を有する化合物は、非極性溶媒中では励起状態で分子内水素結合を形成し左回りにねじれたエキシマーを形成し、極性溶媒中ではこの水素結合は切断されることが示された。

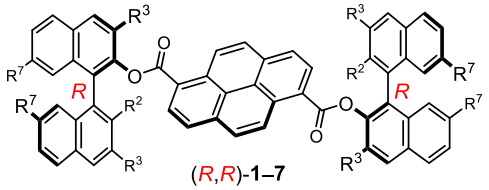
【1. はじめに】

円偏光発光性 (CPL) を示す有機色素が注目されており、近年、開発研究が活発である。例えば、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。CPL のスイッチング関連の研究も盛んであり、溶媒、濃度、温度、紫外光照射、光増感剤、金属イオン、ハロゲンイオンなどの影響により CPL が変化する色素が報告されている。しかし CPL の符号が反転するスイッチ色素はほとんど知られていない。

【2. CPL スイッチ色素の設計と合成】

我々はナフタレン四量体に複数のエキシマー性の発光団を導入すると強いエキシマー CPL を発現することを明らかにしている。[1,2] 本化合物群はキラルで剛直なエキシマー形成を導き、優れた CPL 特性を示したが、温度、濃度、溶媒といった外部環境によって CPL 特性がほとんど変化せず、スイッチ色素としては適さなかった。

そこでピレン環の周辺を自由度の高い構造とすることで CPL の外部刺激応答を達成しようと考え、軸性キラルビナフチルで 1 つのピレン環を挟んだ (*R*,*R*)-**1** を設計した (Figure 1)。**1** のピレン環はキラルかつ柔軟な分子間エキシマーを形成すると考えた。また、ビナフチルの 3,3'-位の置換基効果や 2-位のヒドロキシ基の必要性を確認するために (*R*,*R*)-**2**–**7** を設計した (Figure 1)。



1: R^2 = OH, R^3 = H, R^7 = H
2: R^2 = OH, R^3 = Me, R^7 = H
3: R^2 = OH, R^3 = Ph, R^7 = H
4: R^2 = OH, R^3 = F, R^7 = H
5: R^2 = OH, R^3 = H, R^7 = OBn
6: R^2 = OMe, R^3 = H, R^7 = H
7: R^2 = OBn, R^3 = H, R^7 = H

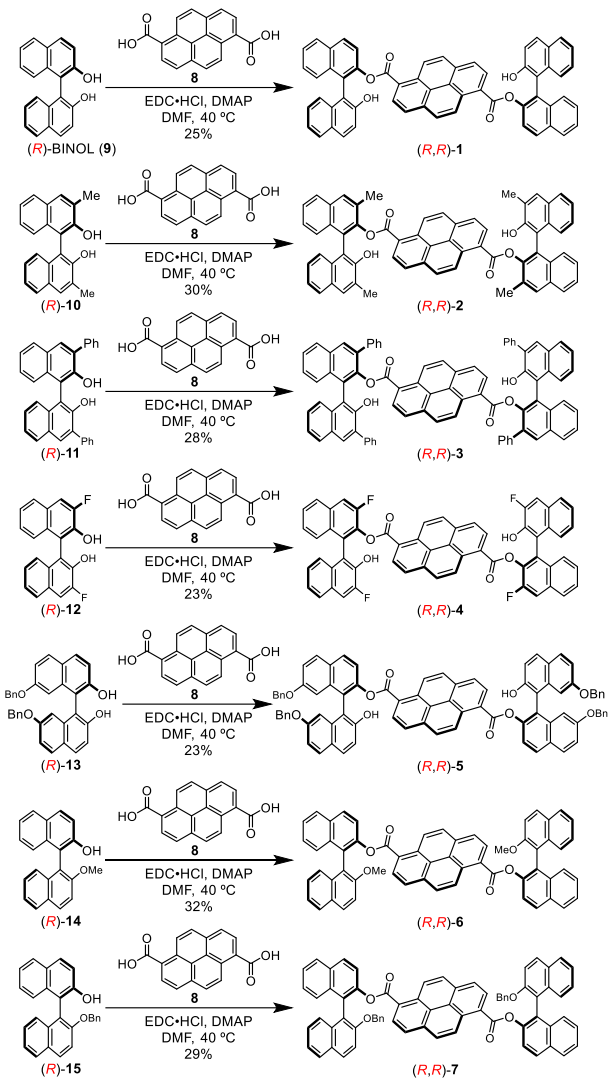
Figure 1. Chemical structures of (*R*,*R*)-**1**–**7**.

(*R*,*R*)-**1**–**7** は Scheme 1 に示した手法で合成した。(*R*,*R*)-**1** は (*R*)-BINOL と pyrene-1,6-dicarboxylic acid (**8**) を 5:1 のモル比で混合して縮合させた。(*R*,*R*)-**2**–**7** も対応するビナフチルを用いて合成した。これらはビナフチル類から 1 工程で合成でき、光学分割が不要である点で優れている。

【3. ジクロロメタン中の CPL 特性】

(*R*,*R*)-**1**–**7** のジクロロメタン溶液 (4.0×10^{-3} M) の蛍光と CPL スペクトルを測定した (Figure 2)。蛍光スペクトルではいずれもエキシマー発光のみが観測された。CPL スペクトルでは、興味深いことに、化合物によって CPL の符号が異なり、2-位にヒドロキシ基を持つ (*R*,*R*)-**1**–**3**, **5** は負の CPL を、メト

Scheme 1. Synthesis of (*R*,*R*)-**1**–**7**.



キシ基もしくはベンジルオキシ基が置換した (*R*,*R*)-**6** と (*R*,*R*)-**7** は正の CPL を示した。3,3'-位にフルオロ基を導入した **4** は CPL を示さなかった。このように、CPL を示さなかった **4** を除き、2-位のヒドロキシ基の保護基の有無で CPL の符号が異なることが明らかになった。

【4. 安定構造計算】

化合物によって CPL に差異が生じた要因を明らかにするため、まず (*R*,*R*)-**1** の分子間エキシマーの安定構造を求めた。その結果、左回りのキラリティーを持つエキシマー (a) と右回りのキラリティーを持つエキシマー (b) の 2 種類が得られた (Figure 3)。左回りのキラリティーを持つエキシマーは分子間のヒドロキシ基とカルボニルの酸素が互い

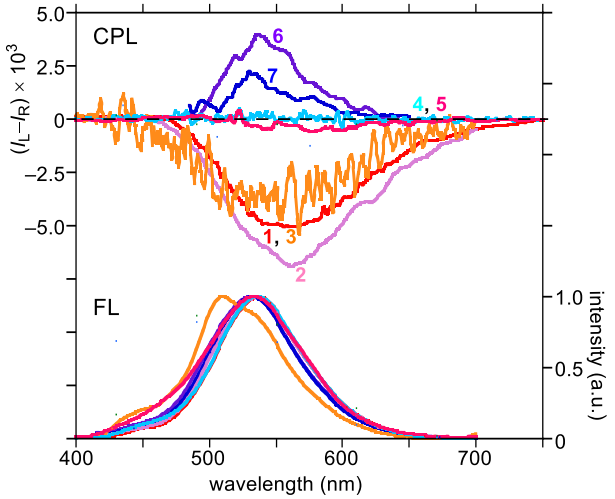


Figure 2. CPL and FL spectra of (*R*,*R*)-**1**–**7** in CH_2Cl_2. Conditions; 20 °C, light path length = 1.0 cm, 4.0 × 10^{-3} M, λ_{ex} = 355 nm.

に向き合い、水素結合を形成していた (1.60–1.88 Å, Figure 3a)。一方で、右回りのキラリティーを持つエキシマーはビナフチル同士が離れ、水素結合を形成していなかった (Figure 3b)。また、水素結合の寄与により左回りのエキシマーの方が 7.5 kcal/mol 安定であった。

一方で正の CPL を示した (*R*,*R*)-**6** は水素結合を形成するためのヒドロキシ基がないため、立体反発が少ない右回りのキラリティーを持つエキシマーの方が 4.4 kcal/mol 安定であった。

したがって、2-位のヒドロキシ基の保護基の有無で CPL の符号が異なっていたのは、分子間水素結合の有無によってエキシマーのねじれの向きが異なっていたためだと考えられる。また、3,3'-位にフルオロ基を導入した (*R*,*R*)-**4** が CPL を示さなかったのはフッ素原子とヒドロキシ基の水素原子が分子内水素結合を形成したためであると考えられる。7,7'-位にベンジルオキシ基を有する (*R*,*R*)-**5** の CPL 強度が小さいのは、ビナフチルの二面角が広がり水素結合を安定に形成できなかったためであると考えている。さらに、最も大きな CPL 強度を示した (*R*,*R*)-**2** のメチル基は、ヒドロキシ基の動きを抑制し水素結合を形成しやすくしていると考えている。以上のように水素結合の有無とその形成のしやすさが CPL 特性に大きく寄与することが明らかとなった。

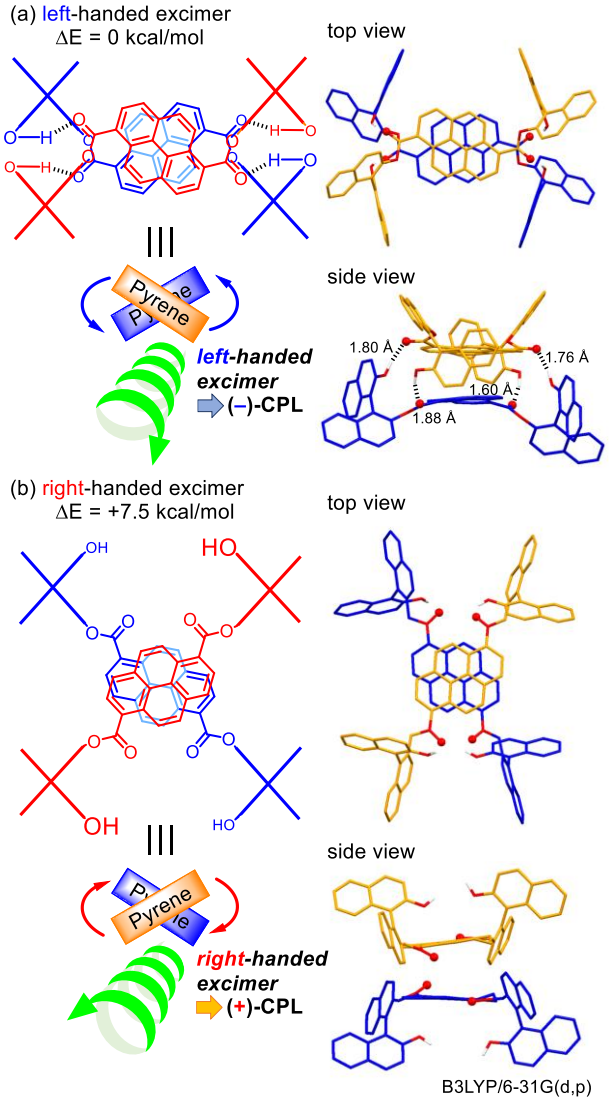


Figure 3. TD DFT-optimized excimers of (*R*,*R*)-**1**. The distances between pyrene faces are fixed at 3.2 Å.

【5. CPL 特性の溶媒依存性】

水素結合を形成/切断させることで CPL の符号の反転ができると考え、溶媒を変えて (*R*,*R*)-**2** の CPL を測定した (Figure 4)。その結果、CPL は溶媒によって劇的に変化し、非極性溶媒中 (トルエン, クロロホルム等) では負、極性溶媒中 (ジメチルスルホキシド, アセトン) では正の CPL を示した。CPL の g_{lum} 値はトルエンおよびジメチルスルホキシド中で大きな絶対値を示した ($g_{lum,toluene}$ = −0.012, $g_{lum,DMSO}$ = +0.012)。

最後に、非極性溶媒中で温度を変えて測定を行ったところ、高温では $|g_{lum}|$ 値は小さく、低温では大きくなった。このことは低温であるほど分子間水素結合が形成しやすいことを示している。

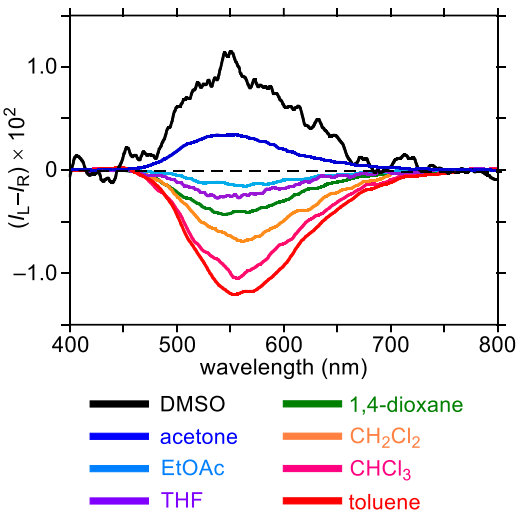


Figure 4. CPL spectra of (*R*,*R*)-**2** in various solvents. Conditions; 20 °C, light path length = 1.0 cm, 4.0 × 10^{-3} M, λ_{ex} = 355 nm.

【6. まとめ】

2-位にヒドロキシ基を有する軸性キラル 1,1'-ビナフチルでピレン環を挟んだ化合物は、溶媒を変えるだけで CPL の符号が反転した。この符号の反転は、分子間水素結合の有無によりエキシマーのねじれの向きが反転するためであると判断した。本研究により CPL の符号とエキシマーの立体構造の相関を明らかになった。今後の CPL 色素の分子設計においてこれらの知見は有用な情報になりうる。

【参考文献】

(1) Takaishi, K.; Takehana, R.; Ema, T. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 1449–1452.

(2) Takaishi, K.; Iwachido, K.; Takehana, R.; Uchiyama, M.; Ema, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 6185–6190.

【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】

"Solvent-Induced Sign Inversion of Circularly Polarized Luminescence: Control of Excimer Chirality by Hydrogen Bonding" Takaishi, K.; Iwachido, K.; Ema, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1774–1779.

乳がん治療薬抵抗性獲得機構における NFYA の機能解明

岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科

岡田　宣宏

乳がんにおける治療薬抵抗性の獲得は、乳がん患者の生存率改善に立ちはだかる難問である。乳がんは、悪性化進展過程で Luminal から Basal へ細胞系譜を転換させることにより治療薬抵抗性を獲得し、治療を困難にしていると考えられる。申請者はこれまでに、Luminal、Basal 細胞系譜間でスプライシングバリアントの発現パターンをスイッチさせている遺伝子 *NFYA* を同定した。さらに、NFYA の各バリアントが Luminal から Basal への細胞系譜転換を段階的に制御していることを明らかにした。しかし、NFYA による細胞系譜転換制御機構は明らかにできていない。本研究は、乳がん悪性化進展過程での NFYA による細胞系譜転換の制御機構を明らかにすることを目的とする。

[背景]

乳腺組織は、Luminal 細胞と Basal 細胞からなる 2 層構造を形成する 2 種の細胞系譜を有している。一般的に、Luminal 細胞系譜のがん細胞はホルモン受容体陽性細胞であり、ホルモン依存的に増殖するため、ホルモンの作用を阻害する内分泌療法により劇的な治療効果が得られている。しかし、Basal 細胞系譜のがん細胞はトリプルネガティブ乳がんと呼ばれ、ホルモン受容体陰性細胞であるため、内分泌療法が効かず、有効な治療法が存在しない。多くの乳がんは、Luminal 細胞から発生し、悪性化進展過程で Luminal、Basal 両細胞系譜が混在するがん組織を形成する（Van Keymeulen *et al.*, *Nature* 2015; Koren *et al.*, *Nature* 2015）。このことは、Luminal から Basal への細胞系譜転換により、乳がんは治療薬抵抗性を獲得することを示唆している。しかし、乳がんが悪性化進展過程で細胞系譜転換を起こすメカニズムは明らかになっていない。

申請者はこれまでに、Luminal、Basal 細胞間で 2 種のスプライシングバリアントの発現をスイッチさせている遺伝子 *NFYA* を同定し、以下の機能を明らかにした。NFYA short-form は、細胞系譜転換を開始させる『スターター』として機能し、Luminal 細胞を Luminal－Basal 中間細胞に転換させる。その後、NFYA long-form が、細胞系譜転換を促進させる『ブースター』として機能し、Luminal －Basal 中間細胞を Basal 細胞に転換させ、細胞系譜転換を完了させる。しかし、NFYA による細胞系譜転換制御機構は明らかにできていない。

[結果]

<u>NFYA スプライシングバリアントの機能解析</u>

CRISPR/Cas9 システムにより各バリアントの欠損乳がん細胞を作製し、機能解析を行ったところ、NFYA long-form の欠損は、細胞増殖・腫瘍形成能・幹細胞性を著しく減少させた。しかし、NFYA short-form の欠損による、それらへの影響は確認されなかった。また、各バリアント特異的な転写標的遺伝子の存在も確認しており、これら 2 種のスプライシングバリアントが異なる機能を果たすことにより、細胞系譜転換に寄与していることが明らかとなった。

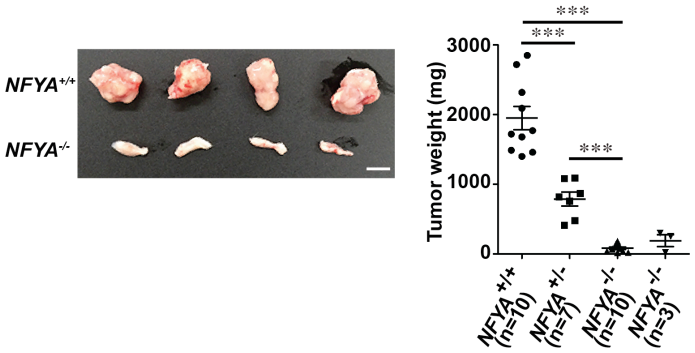


図 1：NFYA 欠損による腫瘍形成能の抑制
免疫不全マウス（NOD-Scid マウス）への同所移植により得られた腫瘍。NFYA 欠損細胞では腫瘍形成が起こらなかった。

乳がんモデルマウス MMTV-PyMT の解析

生体内での自発性乳がんにおいて NFYA が細胞系譜転換を制御しているか明らかにするために、本研究では乳がんモデルマウス MMTV-PyMT を使用する。MMTV-PyMT マウスは、乳腺上皮細胞特異的にポリオーマウイルスミドルT抗原を発現することにより乳がんを発症する乳がんモデルマウスである。まず、MMTV-PyMT マウスに発症する乳がんにおける Nfya の発現および細胞系譜転換により生じる腫瘍内不均一性を確認した。その結果、正常乳腺上皮細胞と比較し、乳がん細胞において Nfya 両バリアントの発現が高いことが確認された。また、乳がん細胞においてエストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体の発現が高いことが確認された。しかし、Her2 タンパク質をコードしている *Erbb2* 遺伝子の発現は変化がみられなかった。さらに、ホルモン受容体陽性細胞（Luminal 細胞）マーカーの減少とホルモン受容体陰性細胞（Basal 細胞）マーカーの増加が確認された。これらの結果は、MMTV-PyMT マウスで発生する乳がん組織の大部分は、ホルモン受容体陰性細胞（Basal 細胞）であるが、ホルモン受容体陽性細胞（Luminal 細胞）の存在も確認でき、細胞系譜転換を介して Basal 細胞、Luminal 細胞が混在している腫瘍内不均一性を形成していることを示唆している。

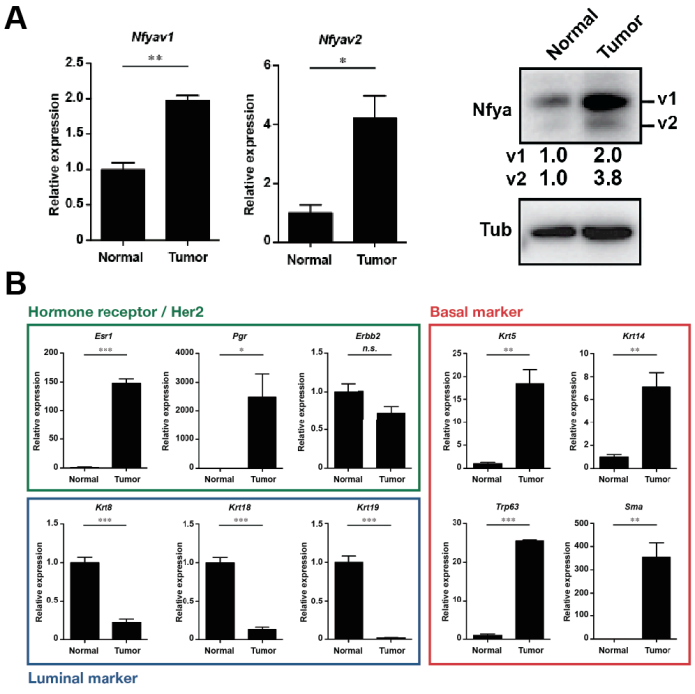


図 2 : 乳がんでの NFYA 発現および腫瘍内不均一性
A. 乳がんモデルマウス MMTV-PyMT に発症した乳がんにおける Nfya の発現解析。正常乳腺細胞と比較し、乳がん細胞では Nfya の発現が上昇している。B. 乳がんモデルマウス MMTV-PyMT に発症した乳がんにおける腫瘍内不均一性の確認。緑枠：ホルモン受容体、青枠 : Luminal 細胞マーカー、赤枠 : Basal 細胞マーカー。

NFYA 欠損マウスにおける乳がん悪性化への影響

これまでの研究から、NFYA long-form がホルモン受容体陰性細胞の増殖、生存において重要な役割を果たしていることを明らかにした。そこで、申請者らは NFYA long-form 特異的ノックアウトマウスを作製した。作製したマウスを MMTV-PyMT マウスと交配させ、乳がんを発症させることで解析を行った。その結果、NFYA long-form の欠損が乳がん発症を遅らせることを明らかになった。さらに、NFYA long-form の欠損がエストロゲン受容体陰性細胞を減少させることも分かった。

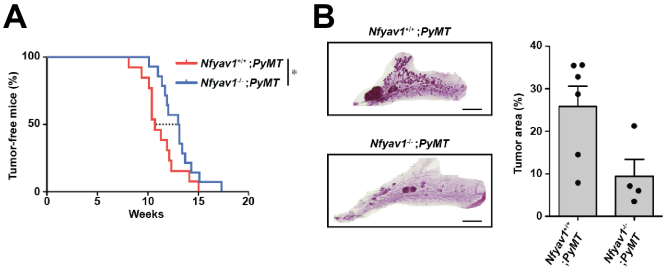


図 3 ：NFYA 欠損マウスにおける乳がん発症
A. NFYA long-form 特異的ノックアウトマウスでは、乳がん発症が遅れる。B. Carmine Alum による乳腺染色および腫瘍面積。15 週齢で乳腺を含む乳腺脂肪組織を回収、染色し、解析を行った。NFYA long-form 特異的欠損により、腫瘍面積が減少している。

［考察］

本研究により、NFYA long-form がホルモン受容体陰性細胞の生存、増殖に重要な機能を果たしていることが明らかになった。また、NFYA が細胞系譜転換を制御し、ホルモン受容体陰性細胞の拡大を制御していることが示された。さらに、この機能は乳が

ん細胞を用いた *in vitro* の実験系だけでなく、マウスを用いた *in vivo* の実験系においても同様の結果であった。

このように細胞およびマウスでの表現型から、NFYA の重要性を明らかにできたが、NFYA がどのような制御機構でこれらの機能を果たしているかは明らかにできていない。今後、NFYA が制御している因子・パスウェイを同定することにより、細胞系譜転換における制御機構を解明する予定である。さらに、NFYA および NFYA が制御する因子・パスウェイの阻害による、乳がんへの治療効果を検討していく予定である。

抗酸化物質が免疫担当細胞に与える影響

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

マウス腸間膜リンパ節から免疫細胞を抽出し、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. 腸管免疫能の評価

マウスを安楽死させ、無菌的に摘出した腸間膜リンパ節から免疫細胞を単離した。腸間膜リンパ節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、腸間膜リンパ節の免疫細胞（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。

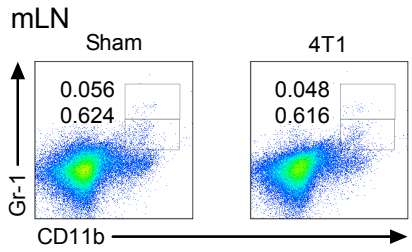


図 1. 4T1 担がんマウス腸間膜リンパ節(mLN)に MDSC は存在しない. 5×10^5 個の 4T1 細胞をマウスの右脇腹に皮下移植し 14 日後に腸間膜リンパ節からリンパ球を抽出し、MDSC をフローサイトメトリーにて解析し、対照群（Sham）と比較した. Gr-1^{hi} CD11b^+は顆粒系 MDSC (G-MDSC)を示し、Gr-$1^{intermediate}$ CD11b^+は単球系 MDSC (M-MDSC)を示す.

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。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あるが既報と異なり、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。

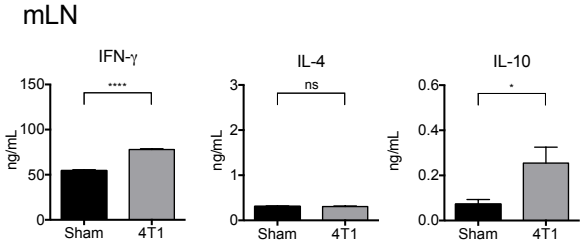


図 2. 4T1 担がんマウスに見られる抗腫瘍活性の減弱. 5×10^{5} 個の 4T1 細胞をマウスの右脇腹に皮下移植し 14 日後に脾細胞を抽出し、抗 CD3ε mAb 固相化プレートにて 48 時間培養した後、培養上清を回収した.

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 2)。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 2)。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 2)。

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腸管の免疫細胞の質的および量的変化を調べた。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, Gary GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. BMC Cancer 2008;8:228.

G-CSF 刺激による好中球分化誘導のシグナル伝達経路の解析

岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科（工学部）

村上　宏

（概要）

白血球のひとつである好中球は生体を細菌感染から守る働きを担う。好中球は骨髄中でサイトカインのひとつ G-CSF の刺激を受けて分化生成する。G-CSF 刺激によるリン酸化反応を解析する過程で、我々は Gab2 アダプタータンパク質が高度にリン酸化を受ける事を見出した。そこで、G-CSF 刺激依存の好中球分化を誘導する反応における Gab2 タンパク質の役割を明らかにする目的で、Gab2 と構造が類似する Gab3 タンパク質を好中球前駆細胞に過剰発現させる事で Gab2 の機能を Gab3 と置き換え、分化誘導に与える影響を検討した。Gab3 過剰発現細胞株 GM-Gab3 では、G-CSF 含有培地での成熟好中球への分化誘導が阻害された。また、親株での Gab2 のリン酸化に比べ、GM-Gab3 で Gab3 の G-CSF 依存のチロシンリン酸化が高まりかつ長期に継続していた。さらに、GM-Gab3 株では MAP キナーゼの高い活性が継続して見られた。よって、Gab3 過剰発現による G-CSF 依存の好中球分化誘導の阻害は定常状態での MAP キナーゼの活性の上昇による事が示唆された。すなわち、好中球分化誘導が起こるためには、G-CSF 刺激後 MAP キナーゼの活性が低く保たれる事が必要である事が明らかとなった。

（本文）

背景

白血球のひとつである好中球は体内に侵入した細菌を貪食し殺し生体を細菌感染から守っている。好中球の体内での寿命は短く、常に好中球は骨髄中で前駆細胞がサイトカインのひとつ G-CSF の刺激を受けて分化生成している。G-CSF が前駆細胞表面の受容体に結合すると細胞内で種々のタンパク質のチロシン残基のリン酸化が起こり、その情報が核内の遺伝子に伝達され、好中球分化誘導に必要な遺伝子の発現が誘導される。好中球前駆細胞株 GM-I62-1 を用いてこの反応を解析する過程で、我々は G-CSF の刺激を受けて Gab2 アダプタータンパク質が高度にリン酸化を受ける事を見出した。そこで、G-CSF 刺激依存の好中球分化を誘導するシグナル伝達における Gab2 タンパク質の役割を明らかにする目的で、Gab2 と構造が極めて類似の Gab3 タンパク質を好中球前駆細胞に過剰発現させることで Gab2 の機能を Gab3 と置き換え、好中球分化誘導に与える影響を解析した。

実験結果

Gab3 cDNA の発現ベクターの構築と過剰発現株の樹立

好中球前駆細胞株 GM-I62-1 より RNA を調整し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。これを鋳型として、Gab3 に特異的な primer を用いて PCR を行い Gab3 の遺伝子 DNA を得た。得られた DNA を動物発現ベクターpBOS-EX-Flag に組込み、C 末に Flag タグをつけた Gab3 発現ベクターを得た。puromycin 耐性を付与するプラスミドとともに GM-I62-1 株にエレクトロポレーションにより導入し、puromycin 耐性株としてクローンを単離した。得られたクローンの中で Gab3 の発現が最も多いものを抗 Gab3 抗体による western blot で選別し GM-Gab3 株として以後の実験に用いた。

G-CSF 依存の好中球への分化誘導

主に Gab2 を発現する GM-I62-1 細胞と人為的に Gab3 を過剰発現させた GM-Gab3 細胞株を用いてその性質の違いを解析した。IL-3 を添加した RPMI＋10%FBS 培地で Gab2 を主に発現した GM-I62-1 細胞は未分化の状態で増殖を続けるが、IL-3 を除き G-CSF を添加した培地では数日間増殖した後増殖を停止し（Fig.1A）、10 日以上経過すると細胞の形態が、未分化時の球状の核を持った細胞から核が花びら状

（分葉化）に変化した成熟好中球特有の形態に変わる（Fig.1B)。一方で、Gab3 を過剰発現させた GM-Gab3 細胞は IL-3 含有培地では、親株の GM-I62-1 細胞と同様に未分化のまま増殖を続けるが、G-CSF を添加した培地では、親株の GM-I62-1 細胞とは異なり増殖し続ける（Fig.1A)。また、細胞の形態も、G-CSF 含有培地でも細胞の核の形態は未分化の球状の状態を保ち花びら状に分葉化する事はなかった(Fig.1B)。したがって、Gab3 の過剰発現により G-CSF の刺激による好中球への分化誘導が阻害されたことが明らかとなった。

G-CSF 刺激依存のタンパク質のリン酸化

Gab2 を主に発現する GM-I62-1 細胞と Gab3 を過剰発現させた GM-Gab3 細胞とを持いて、G-CSF 刺激による細胞内のタンパク質のリン酸化と細胞増殖に深く関わる MAP キナーセの活性化の時間経過を western blot 法を用いて解析した。GM-I62-1 細胞では G-CSF を添加して 5 分後には Gab2 タンパク質のチロシン残基のリン酸化が見られたが、35 分後にはその３０％程度までリン酸化の低下が見られた（Fig.2)。一方、Gab3 を過剰発現させた GM-Gab3 細胞では、G-CSF を添加後 5 分で Gab3 の強いリン酸化が見られ、その後も Gab3 のリン酸化は高く維持され続けた。また、内在性の Gab2 のリン酸化の抑制が見られた（Fig.2)。さらに、細胞内の MAP キナーゼの活性化、すなわち活性部位のリン酸化を解析した。GM-I62-1 細胞では、G-CSF 添加後 5 分で MAP キナーゼの活性化が見られたが、その後活性化は低下していった（Fig.2)。一方で、GM-Gab3 細胞では、G-CSF 添加後 5 分で活性化した MAP キナーゼはその後も活性化状態が高く保たれた（Fig.2)。以上の結果から、主に Gab2 を持つ好中球前駆細胞 GM-I62-1 細胞に Gab3 を過剰に発現させると、G―CSF の存在か、Gab3 のチロシン残基のリン酸化が長期に渡り高く保たれた。その結果、細胞内シグナルの下流に存在する MAP キナーゼの活性化も高く維持されていることが明らかとなった。

考察

Gab2 を主に発現する好中球前駆細胞 GM-I62-1 で、人為的にその類似タンパク質 Gab3 を過剰発現させると、細胞内で内在性の Gab2 と過剰発現させた Gab3 とが G-CSF 刺激によるシグナルを競合し、親株 GM-I62-1 細胞では、Gab2 が活性化するが、Gab3 過剰発現細胞 GM-Gab3 では、Gab3 が活性化することが明らかとなった。すると、Gab タンパク質の下流で働く MAP キナーゼの活性化が、親株 GM-I62-1 細胞では、G-CSF 刺激後一時的に活性化したのち低下してしまうが、GM-Gab3 細胞では G-CSF 刺激により MAP キナーゼの活性が長期にわたり高く維持されていた。この高い MAP キナーゼの活性化が、GM-Gab3 細胞で見られた、好中球への分化誘導を阻害していると考えられた。今後、MAP キナーゼの高い活性と、好中球分化誘導時に見られる特異的な遺伝子の発現との関連を解析し、好中球分化誘導の阻害による白血病発症と MAP キナーゼ活性、および、分化誘導に必要な特異遺伝子の発現の抑制との関連を明らかにしていきたい。

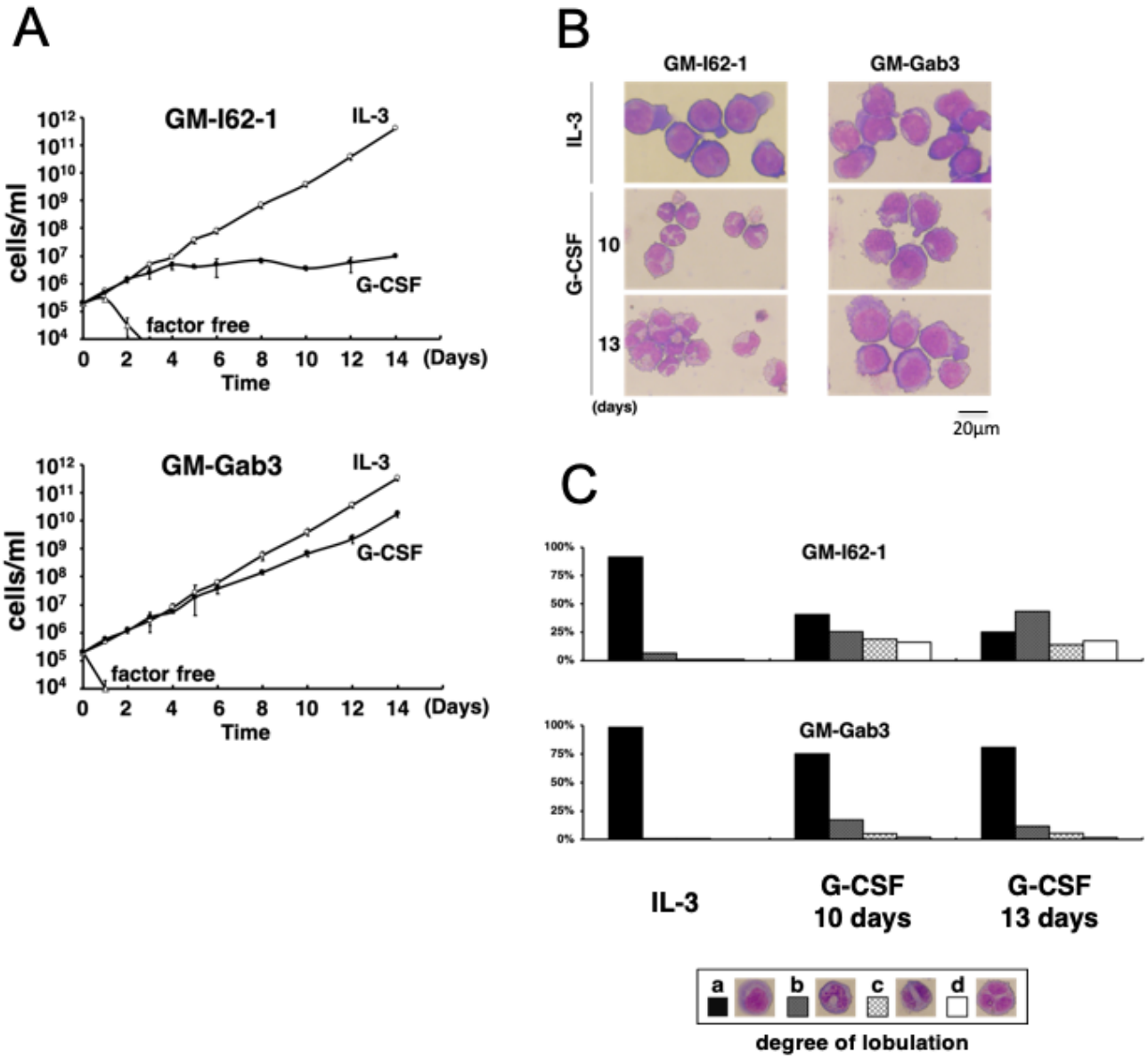


Fig.1　GM-I62-1 細胞と GM-Gab3 細胞での G-CSF に対する反応　A. 各細胞を、IL-3 あるいは G-CSF 含有培地、およびそれらを含まない培地(factor free)で培養した時の細胞数の変化。 B. 各細胞を IL-3 あるいは G-CSF 含有培地で 10 日あるいは 13 日培養後細胞をライト・ギムザ染色し、顕微鏡で観察した。右下 bar は 20μm を示す。C. 各細胞を B の条件で培養後、細胞の形態を下部に示したカテゴリーに分類し、その割合を示した。各培養条件の細胞を 100 ヶ以上調べた。

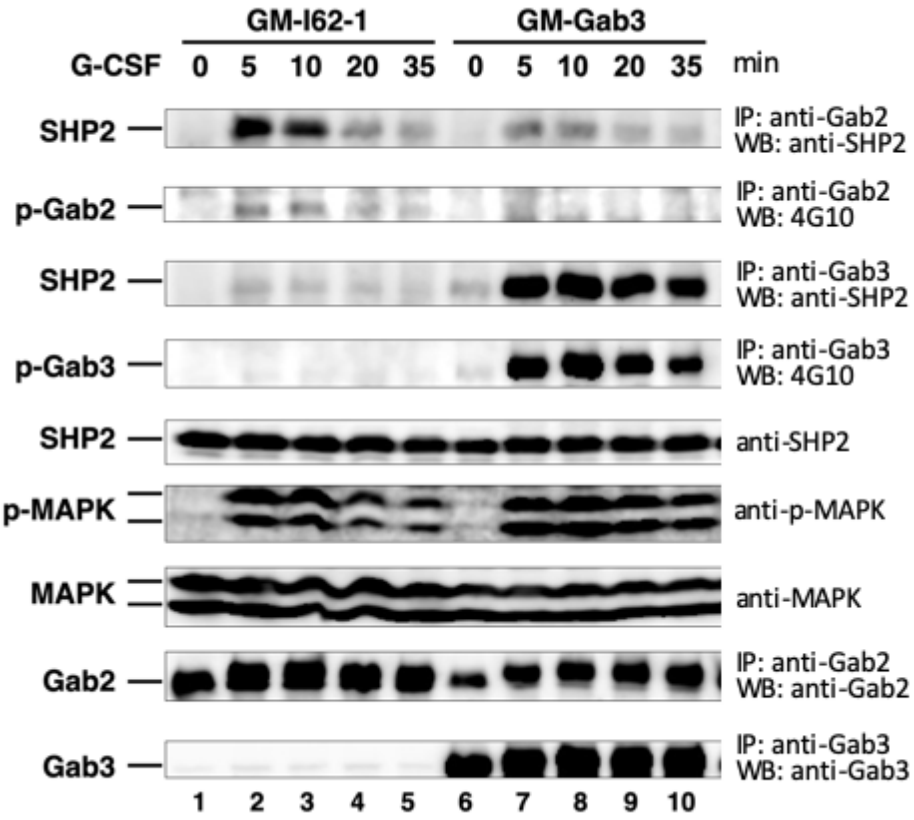


Fig. 2.　　G-CSF 刺激による細胞内タンパク質のリン酸化　　GM-I62-1 細胞と GM-Gab3 細胞を図に示した時間 G-CSF で刺激したのち細胞抽出液を調整し、図の右側に示した抗体を用いて免疫沈降（IP）およびウエスタンブロット（WB）を行った。抗体の結合を ECL により可視化した。

平成 30 年 7 月西日本豪雨時の旭川洪水の流況解析と CCTV 画像を用いた STIV 解析による検証

岡山大学　大学院環境生命科学研究科　准教授

吉田　圭介

現在，我が国では地球温暖化に起因する豪雨や洪水による水災害の増大が懸念されており，河川整備計画の再構築や水防活動の強化が求められている．その際に必要となるのは河川の実流量や水位の把握であるが，現地観測の安全性や効率化，つまり洪水観測の無人化や高度化は喫緊の課題である．本研究では平成 30 年西日本豪雨時に旭川下流部で生じた洪水を対象に，河川監視用 CCTV の映像を活用して STIV 解析から河川流量の算出を試みた．また，洪水前後に計測された航空レーザー測深（ALB）情報から現地の地形・地被分類・植生特性量の面的情報を得た後，水位流量ハイドログラフを境界条件に利用して洪水流況解析を行い，CCTV 設置箇所での流量を算出して比較した．その結果，STIV 解析による流量は洪水流況解析によるものと概ね一致したが，各種データから整合性を検証した結果，両解析における課題（悪条件下の画像の不鮮明化，河床変動の影響，H-Q 式による流量誤差など）が明らかとなった．

1．はじめに

平成 30 年 7 月上旬，西日本の広範囲で生じた記録的な豪雨は岡山県，広島県，愛媛県を中心に甚大な被害をもたらした（**図-1**，岡山県の降雨規模，近森教授より提供）．今次豪雨では岡山県倉敷市真備町では小田川やその支川の 8 箇所において主に越水が原因で堤防が決壊し，洪水氾濫により 51 名の方が亡くなった．現在，我が国では地球温暖化に起因する豪雨や洪水による水災害の増大が懸念されている．そのため，全国的に河川の治水計画を練り直す必要に迫られている．

一般に，治水計画では河川流量の設定が重要だが，その前提となるのは洪水時の実測流量の記録である．我が国ではこれまで洪水時の流量は原則，浮子によって観測されてきた．浮子観測は洪水時に河川の橋上などから浮子を投下し，浮子の流下する軌跡から流速や断面流量を求める実用的な手法である．しかし，浮子観測では豪雨時や河川が氾濫危険水位に達する場合には作業者に危険が及び，欠測となることがある．実際，西日本豪雨時には，本研究で対象とする旭川では，国直轄区間の中原橋（中ノ原）で長時間，水位が高い状態となり，現地観測班は撤退を余儀なくされた（**図-2**）．

今後，旭川に限らず，洪水時の浮子による流量観測は実施が困難になる可能性が高いと考えられている．浮子観測の学術的課題（偏流への追随，校正係数の妥当性）以外の実務上の理由として，(1)人手による現地観測には危険を伴い，適時観測や連続的観測には制約がある．(2)浮子観測を行う技術者が不足する，点が挙げられる．そのため，豪雨時の大出水でも安全に河川流量が計測できる方法を検討し，今後の治水計画のため，その精度を実洪水で検証する必要がある．

そこで，本研究では非接触型の表面流速観測手法である STIV(Space Time Image Velocimetry)法を用いて，

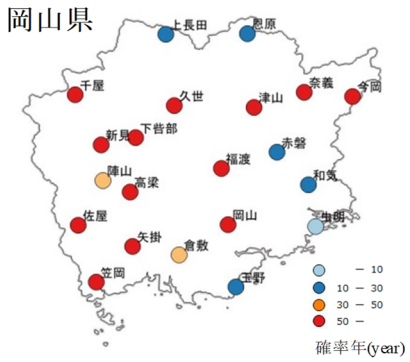


図-1 アメダスによる豪雨の確率年の推定値
（西日本豪雨時，降雨継続時間: 24 時間対象）

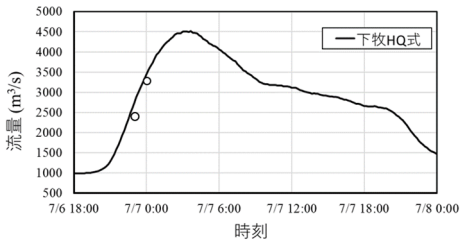


図-2 西日本豪雨時(7/6-7/8)の旭川・下牧観測所での流量時系列（実線：H-Q式，〇印：中原橋での浮子観測）

西日本豪雨時の旭川での洪水流量算定を試みる．特に，本研究では豪雨時に河川監視目的で運用された CCTV 映像を活用して水位情報や表面流の映像を取得する．また，洪水流の数値シミュレーションも併せて実施し，STIV 法で算定された流量精度を検証する．

2．対象河道と ALB 計測

研究対象の旭川（**図-3**）は岡山県を縦断して瀬戸内海に注ぐ，幹川流路延長 142km の一級河川である．治水上の観点では，上・中流域には多目的ダムである湯原ダム，旭川ダム，また，下流域の国管轄区間には百間川放水路や河口水門が整備されている．さらに，旭

(a) 旭川分流部　　(b) 百間川河口水門

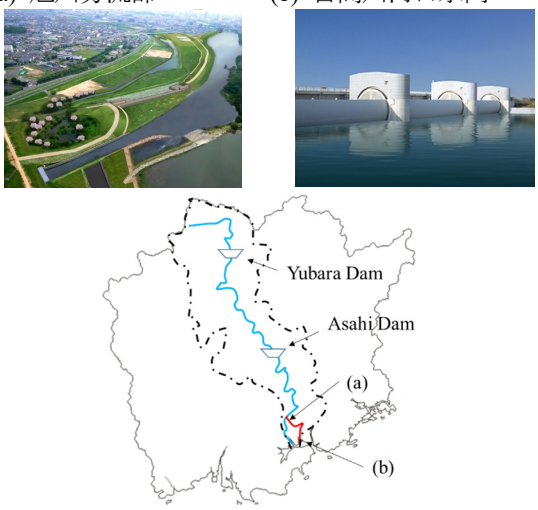


図-3 旭川流域と主要な治水施設

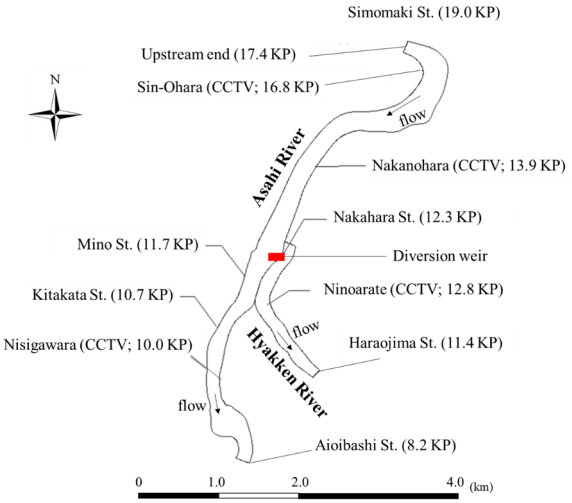


図-4 対象領域と水位観測所，及び利用した CCTV（注：KP(kilopost)は河口からの距離 km を示す）

川と百間川の分派点（旭川 12.4KP）では分流堰の改修事業が実施され，平成 30 年に概ね完成した．

図-4 には旭川下流部の対象区間を示す．上流端は国直轄区間の上流端（17.4 KP）とし，下流端は旭川では相生橋観測所，百間川は原尾島橋観測所とした．対象区間の平均河床勾配は 1/670 であり，セグメント 1 から 2-1 に相当する．1990 年代以降，河道の樹林化が航空写真等で確認されている．**図-5** には平成 30 年洪水の前後で撮影された空中写真を示す．この洪水はピーク流量では 40 年確率相当であり，洪水流によって河道内の樹木の多くが流出・倒伏した．**図-6** には**図-5** の D 地点と E 地点での竹林や樹木の倒伏状況を示す．

表-1 には本研究で用いた航空レーザー測深（ALB）データの範囲を示す．旭川河道では国交省および航測会社により高頻度に ALB 計測が実施されている．対象領域全体に対して 2017 年のデータには不足があるため，2018 年のデータで補った．以下では特に断りのない限り，用いた ALB の成果は 2m 解像度に内挿した正方格子状のデータとする．**表-2** には ALB 計測の諸元を示す．ALB 計測では緑と近赤外の 2 波長レーザーを用い，水面下の地形測量を可能とする．既往研究 [1]に従い，得られた ALB 点群から地被分類を行い，また河床高と植生高を算出した．

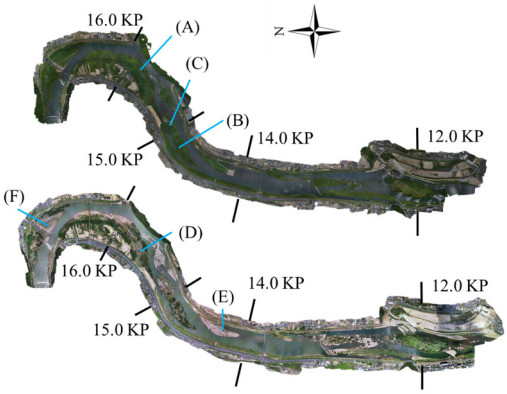


図-5 対象領域の空中写真（上：洪水前，下：洪水後）



図-6 洪水後の植生倒伏状況（左：竹林，右：樹木）

表-1 本研究で利用した ALB データの範囲

計測年月	2017 年 11 月	2018 年 1 月	2019 年 2 月
旭川	9.8-17.4 KP	8.2-9.8 KP	9.8-17.4 KP
百間川	未計測	11.4-12.8 KP	11.4-12.8 KP

表-2 ALB 計測の諸元（2017, 2018 年）

装置名	Leica Chiroptera II
レーザー波長（近赤外） レーザー波長（緑）	1064 nm 515 nm
レーザーパルス数（近赤外） レーザーパルス数（緑）	200,000 /s 35,000 /s
レーザー点密度（近赤外） レーザー点密度（緑）	2 in area of 0.5 m × 0.5 m 2 in area of 1.0 m × 1.0 m
飛行高度	500 m
飛行速度	220 km/s

図-7にはALBデータから得られた対象河道の河床高（2017年）および2019年との差異を示す．平成30年洪水では河道内では最大で1.5m程度の堆積や洗掘が見られる．**図-8**には12.5KPと14.6KPの各測線におけるALBデータと，2013年実施の定期横断測量成果を比較して示す．旭川下流部では平成30年（2018年）より前の比較的大きな出水は平成23年（2011年）の洪水（ピーク流量: 3403m^3/s）である．図よりALBデータと定期横断測量データは概ね一致することが分かる．

図-9 には対象河道内の植生種の分布図を示す．対象

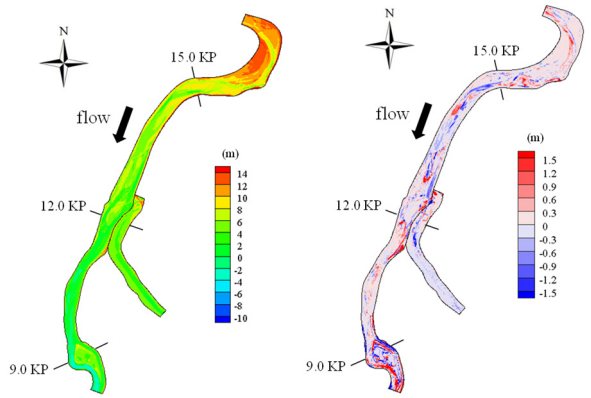
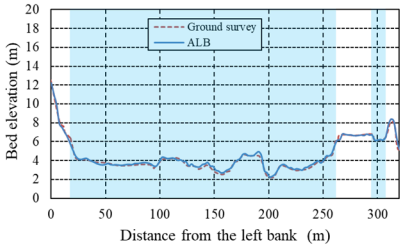


図-7 対象領域での河床高（左：2017 年のデータ，右：2017 年から 2019 年への変化量で正値は堆積を示す）

(a) 12.5 KP



(b) 14.6 KP

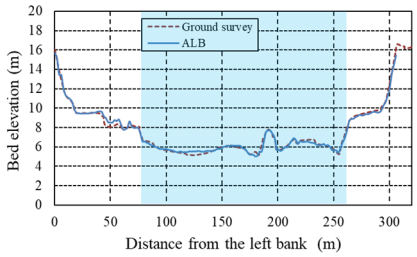


図-8 ALB 測量成果と定期横断測量データの比較（水色部は平常時の水部を示す.）

河道には様々な植生が繁茂するが，本研究では植生による流水抵抗の観点から草本類，木本類，竹林と 3 つに大別する．なお，木本類はヤナギ，草本類はシナダレスズメガヤおよびツルヨシが代表的である．図より，14KP より上流部および 12KP の分流部では竹林や樹木が密生することが分かる．**図-10** には木本類と竹林の存在割合の縦断分布を示した．木本類は最大で河道の 50%を占めており，かなり樹林化が進行している様子が窺える．2017 年から 2019 年の変化は洪水による流出や倒伏の影響を示す．**図-11** には ALB から推定した植生高の分布を示す．ここで植生高は DSM（Digital Surface Model）の値から DTM（Digital Terrain Model）の値を差し引いて算出した．木本類は平均で 8.6m，竹林は平均で 10.7m の高さを有し，洪水時には水没せずに流水抵抗をもたらすものと考えられる．**図-12** には木本類を対象に現地で計測した植生高と ALB により推定した植生高を比較した．既往の成果と同様に，ALB

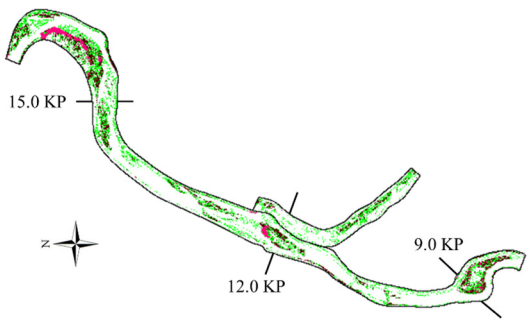


図-9 植生種分布（桃：竹林，茶：木本，緑：草本）

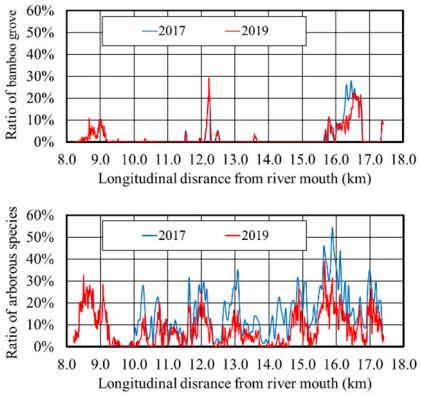


図-10 植生種の縦断分布（上：竹林，下：木本類）

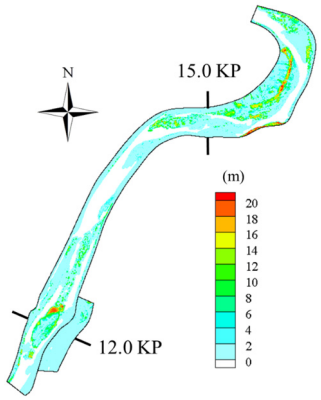


図-11 植生高分布（2019 年の ALB 計測成果）

データは現地計測値と比べてやや小さい傾向がある．これには ALB が植生の先端部を捉えられないことが理由の 1 つと考えられる．

3．対象洪水と数値シミュレーション及び STIV 解析

平成 30 年旭川洪水を対象として，浅水流モデルにより平面 2 次元の数値シミュレーションを行った．解析で境界条件として用いた水位流量ハイドログラフを**図-13** に示す．上流端は下牧観測所の流量（H-Q 式，速報値）を用い，下流端は相生橋観測所（旭川）と原尾島橋観測所（百間川）の水位を用いた．本研究では 7/6 18:00～7/8 6:00 を解析対象期間とした．解析では前章で示した河床高および植生パラメータを用いた．解析手法は既往文献[2]を参照されたい．

図-14 には旭川下流部の相生橋観測所と原尾島橋観

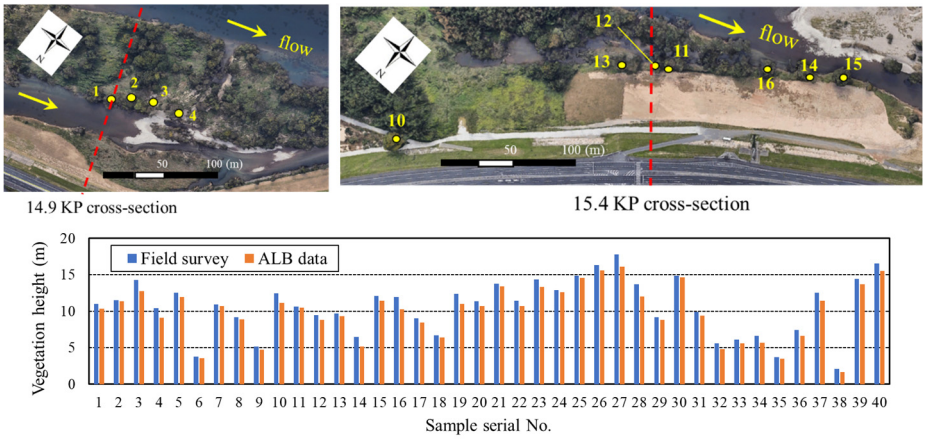


図-12 植生高の比較

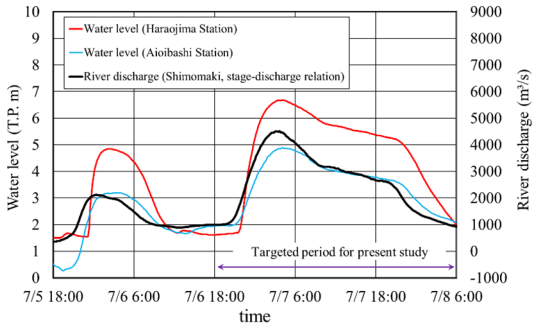


図-13 洪水時の水位流量ハイドログラフ

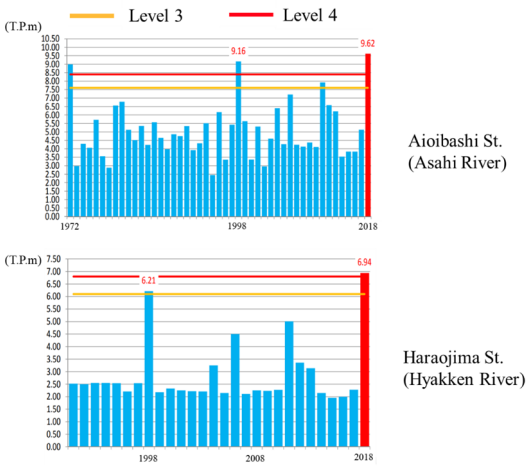


図-14 年最大水位の推移
（Level3：避難判断水位，Level4：氾濫危険水位）

表-3 CCTV カメラの諸元と STIV 解析での設定

項目	値，設定
カメラ画素数	1920*1080 ピクセル
画像撮影の時間間隔	30 Hz (通常) 3Hz (夜間)
STIV 解析ソフト	KU-STIV (Be-system, Inc.)
検査線長	20 m
解析時間	60 s



図-15 分流の様子（分流堰CCTV，7/6の午前6時）

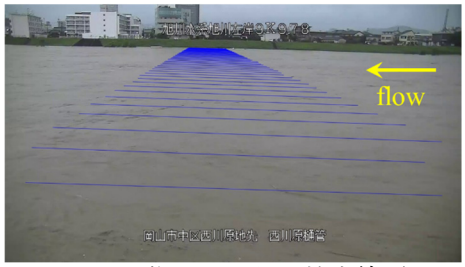


図-16 CCTVの画像とSTIV用の検査線（西川原）

測所における年最大推移の推移を示す．旭川では平成 10 年（1998 年）に旭川下流部の基準点である下牧地点で 4310m^3/s を記録しているが，平成 30 年洪水はそれを上回る規模の洪水である．本洪水では分流部において堰の改修後に初めて越流が観察された．

本研究では洪水時の流況データを取得するために，観測水位に加えて河川監視用 CCTV の映像を活用して地先の水位や水表面流速を得た．流速データの解析には STIV 解析（KU-STIV，Be-system 社製）を用いた．**表-3** には CCTV カメラの諸元と STIV 解析の設定を示す．**図-4** には用いた CCTV の設置箇所を示し，**図-15** には分派点 CCTV により捉えた流量ピーク後の分流堰での越流の様子を示した．本洪水前に分流堰は完成したため，旭川下流での浸水リスクは低減された．また，**図-16** には西川原に設置した CCTV による流況画像と STIV 解析時の検査線を併示した．なお，洪水流量ピーク時は夜間であり，かつ現地の天気は小雨であった．そのため，周囲の照明の程度や雨滴の有無により解析可能な CCTV 画像を選定して以下の解析に用いた．

表-4 には洪水流解析の検討ケースを示す．2017 年と 2019 年，つまり洪水前後に得られた ALB による地形と植生データを組み合わせて 4 通りの解析を行った．なお，洪水後には上流区間で倒伏などにより，ALB 点群構造に変化が生じ，植生分類データについては既往

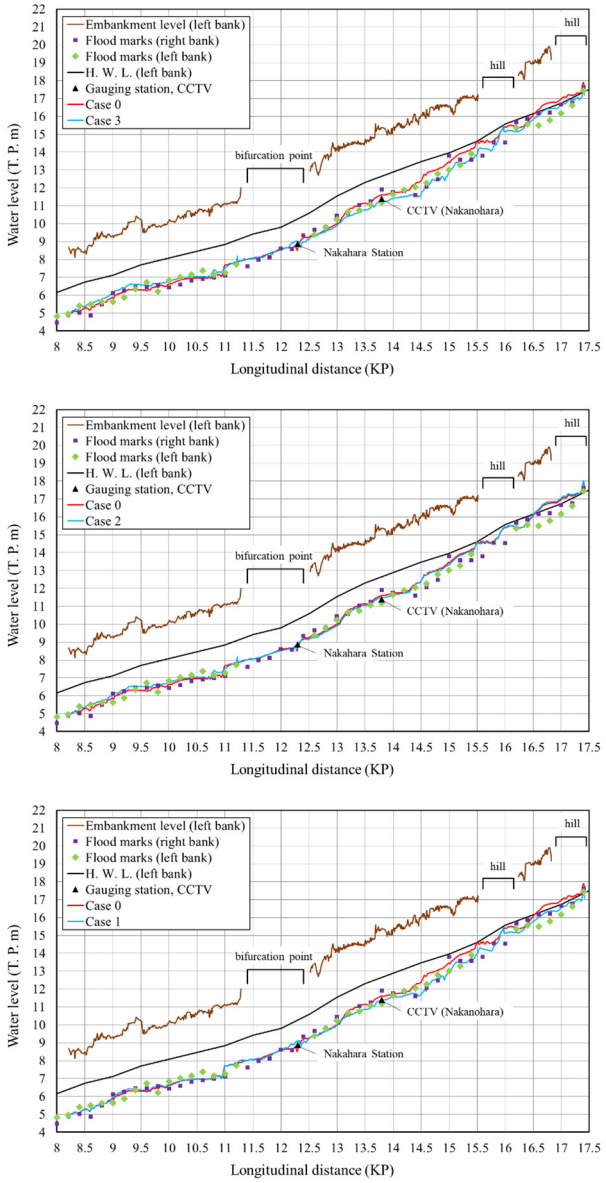


図-17 縦断水位の比較（旭川，上：植生と地形の変化，中：地形のみの変化，下：植生のみの変化を考慮）

の方法[1]を適用できなかった．そのため，2017 年の成果を援用した．

4．結果と考察

図-17 には洪水ピーク時の左岸側の縦断水位の解析結果，痕跡水位（左岸，右岸），計画高水位（左岸 H.W.L.），左岸側の観測水位（中原観測所，中ノ原 CCTV）を示した．いずれのケースでも解析結果は痕跡水位と概ね一致する．一方，湾曲部を有する上流区間（16.5KP～17KP）では解析結果は内岸で低く，外岸で高いが，痕跡水位では関係が逆転している．この理由として，(1)観測の誤差，(2)内岸で密生した竹林の影響の 2 点が考えられる．後者(2)の場合，現地の流れは左岸側（外岸）に集中し，左岸側の水位が低下することが予想される．解析では数値粘性の影響から流れの

表-4 解析ケース

		植生条件	
		2017 年	2019 年
地形条件	2017 年	Case 0	Case 1
	2019 年	Case 2	Case 3

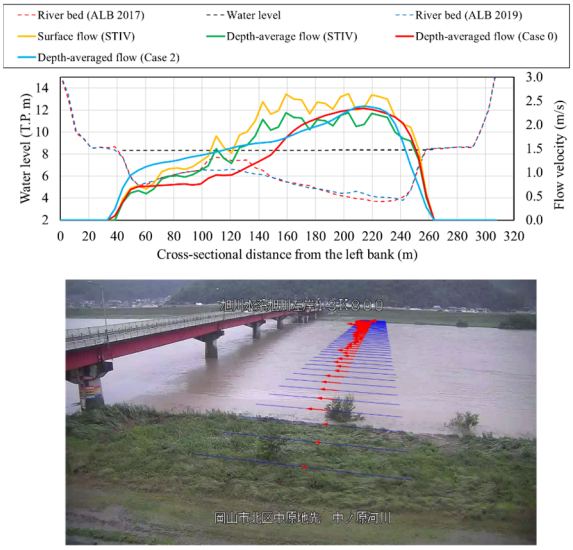


図-18 主流速の横断分布の比較とCCTV画像（中ノ原）

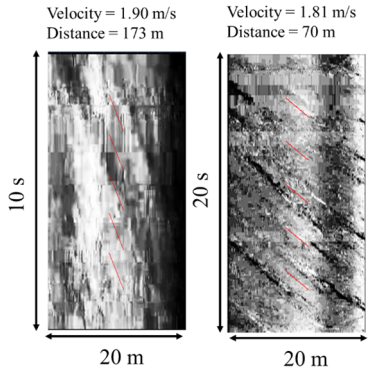


図-19 STI画像（中ノ原）

集中が再現されず，外岸がやや高くなったものと考えられる．一方，Case 0 と Case 2 を比較すると河床変動は下流区間を除いて水位にあまり影響せず，Case 0 と Case 1 を比べて分かるように分流部より上流区間では河道の樹林化と洪水時の植生流出の影響による水位変動が観察される．

図-18 には中ノ原での主流速の横断分布について，STIV 解析結果（更正係数 0.85, 赤矢印は流速ベクトル）と，数値解析の結果を併示した．ここでは洪水前後の地形の影響も考慮して，各々の条件で検討した．いずれの条件でも STIV の結果と数値解析の結果は一致するが，中ノ原では洪水前後で河床高が大きく変化し，数値解析の流速分布は平均的に STIV の結果を概ね再現している．**図-19** には**図-18** の中ノ原において横断距離(distance)が異なる STI 画像の例を示した．両画像ともに縞模様が認められるが，CCTV カメラから離れた画像（173m）では模様があまり鮮明ではない．

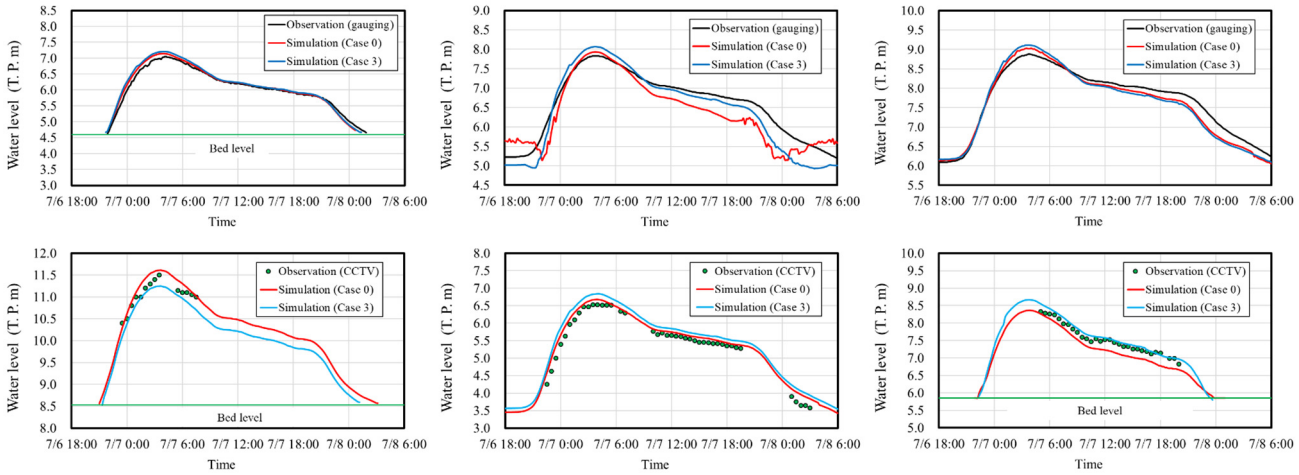


図-20 水位ハイドログラフ（上段左：北方，上段中：三野，上段右：中原，下段左：中ノ原，下段中：西川原，下段右：二の荒手）

図-20 には水位観測と CCTV 画像から読み取った水位データを流況解析結果と併せて示した．図より，解析水位は観測結果と概ね一致するが，他の特徴として以下 4 点が指摘できる．(1)北方，三野，中原のデータから，ピーク時には解析水位は観測水位より高く，解析で用いた H-Q 式の誤差が考えられる．(2)上流区間の中ノ原のデータから，樹林化と洪水時の植生流出の影響が観察される．(3) Case 3 の方が Case 0 より水位が高い三野と西川原ではその下流部の河床堆積の影響が認められ，二の荒手では旭川より川幅が小さいため，分流量の影響が現れやすい．(4)中原の結果からは，植生モデルの精度は解析値と一致するほど十分ではない．

最後に，**図-21** には中ノ原，西川原，二の荒手における流量解析値（実線）と STIV 解析結果に断面積を乗じた結果を併示した．図より，両者の傾向はほぼ一致しており，その誤差は 11～16%程度である．H-Q 式の誤差や更正係数の範囲を考慮すると，本研究で STIV 解析を用いて算出した流量は概ね妥当な値と言える．

5. まとめ

本研究で得られた知見を以下に纏める．

(1) 既設の河川監視用 CCTV を用いて，平成 30 年旭川洪水時の水表面流況を撮影し，STIV 解析結果から概ね確からしい断面流量値を得た．今後は撮影条件（夜間の照明，画像内の雨滴の排除，撮影距離，など）を改良したり，赤外線カメラを利用するなど計測の高精度化や頑強化に向けた取組みが必要である．また，河床変動が大きい箇所では流量算出に影響があるため，流況撮影時の変動量を推定または計測する必要がある．

(2) 洪水前後の ALB データから河床高や植生特性量の面的データを得て，現地計測結果から精度を検証した．また，現地の流量・水位ハイドログラフを得て洪水流況解析を行い，STIV 解析に基づく流量値と比較した．

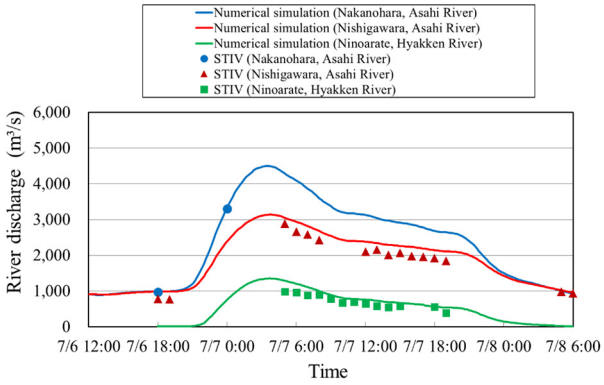


図-21 流量ハイドログラフ
（青：中ノ原，赤：西川原，緑：二の荒手）

洪水時の現地情報は量・質ともに限られるため，数値解析と現地計測（CCTV カメラからの情報を含む）の両者を比較しながら，流況データの整合性や精度を検証することが現地研究では重要と考えられる．

参考文献

1) 吉田圭介，前野詩朗，間野耕司，岩城智大，小川修平，赤穂良輔(2017)：航空レーザ測深を用いた河道の植生種分布の判定手法の検討，土木学会論文集 A2（応用力学），Vol. 73, No. 2, I_607-I_618.

2) 吉田圭介，前野詩朗，藤田駿佑，松山悟，岩城智大，平井康隆(2015)：旭川における植生分布の経年変化を考慮した洪水流の数値解析，土木学会論文集 B1(水工学) , Vol.71, No.4, I_1039-I_1044.

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および株式会社パスコからは多数の貴重なデータを提供頂きました．さらに，本学大学院の小川修平 君（現・神戸市）と永田貴美久 君には協力頂きました．ここに記して謝意を示します．

板ガラスへのニオブ系光触媒の直接成膜とセルフクリーニング特性評価

岡山大学大学院環境生命科学研究科

西本俊介

本研究では、省プロセスで製造可能なセルフクリーニングコーティング材料の開発を目指して、ゾルゲル法による板ガラスへの直接コーティングを行い、得られた試料のセルフクリーニング特性を評価した。ニオブ系コーティング液を用いることによって、透明なニオブ酸ナトリウム薄膜が作製された。この薄膜は、紫外線照射に応答する光触媒活性を有し、光誘起親水化特性を示した。さらに、紫外線処理後の試料表面は、油汚れに対する優れた防汚性を有していることが示唆された。また、ニオブ酸ナトリウム層の形成には、コーティング液中のニオブ成分と板ガラス中のナトリウム成分との反応が関与しており、板ガラス基板との高い密着性を有するコーティング膜であることが示唆された。

【はじめに】

酸化チタン光触媒がコーティングされた窓ガラス等の外装材はセルフクリーニング機能を示すことが知られている[1]。すなわち、太陽光に含まれる紫外線によって酸化チタンが強い酸化作用を示すため、付着した有機系汚濁は酸化分解される。さらに、この酸化作用と共に、酸化チタン自身の表面が水になじみやすい状態に変化するため(光誘起親水化特性)、雨水によって、付着した汚れが容易に洗い流され、表面を正常な状態に保つことができる。この技術は、日本発のものであり、高層ビルの窓ガラスやタイルなど、既に広く実用化されている。一方、PM2.5 などのますます深刻化する環境問題を考慮するとセルフクリーニング材料の更なる高機能化や製造プロセスの省エネルギー化などが今後の課題になると考えられる。

板ガラスとして一般的に利用されるソーダライムガラスに透明で密着性の高い酸化チタン薄膜を作製する場合は、直接酸化チタンのコーティングを行うと、焼成過程で板ガラス中のナトリウム成分と酸化チタンとが反応してしまい、光触媒活性が大きく損なわれてしまう[1]。そのため、酸化チタンコーティングの前に保護膜（シリカ）の作製プロセスが必要になる[1]。本研究では、この 2 段階のプロセスを短縮するプロセスを目指し、酸化ニオブおよびニオブ酸ナトリウムに着目した。両材料とも光触媒活性を示すことが知られている[2,3]。酸化ニオブを板ガラスに直接コーティングし、そのナトリウム成分と反応させ、基板から連続したニオブ酸ナトリウムあるいは酸化ニオブの層を形成させることができれば、密着性の高いセルフクリーニング薄膜が 1 段階のプロセスで作製できるのではないかと考え、以下に記す手順により試料の作製を行い、得られた試料のセルフクリーニング特性を評価した。

【実験方法】

市販のソーダライムガラス板が基板に用いられた。UV/オゾンクリーナーおよび超音波洗浄器を用いて基板を洗浄した後、既報を参考に調整されたニオブエトキシド、酢酸、エタノールからなるニオブ系コーティング液をディップコートし（引き上げ速度：2.5 mm/s）、乾燥、焼成（500℃, 30 min）した[4]。得られた試料は、XRD、SEM 等により評価された。

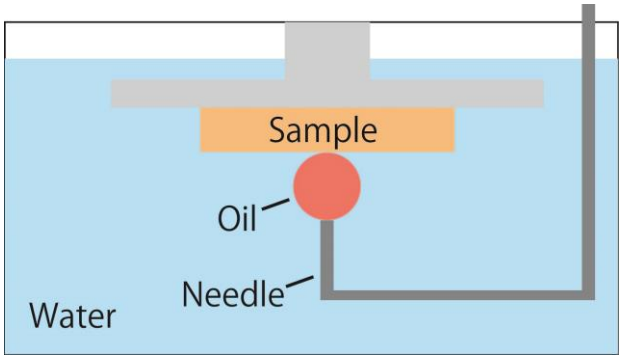


図１　水中における油接触角測定。

得られた試料のセルフクリーニング特性は下記のように評価された。まず、試料を 100℃ で所定時間乾燥させた。次に、キセノンランプにより、試料表面へ紫外線を所定時間照射し、照射部分の水接触角測定を行った。水接触角測定は、室温（18～25℃）下で、脱イオン水を用いて行われた。また、紫外線処理後の試料の防汚性は、水中における油（オレイン酸）の接触角を測定することにより評価された(図１)。各接触角測定において、一つの試料に対して、最低 5 か所の測定を行い、それらの平均値を用いて評価した。

【結果と考察】

図 2 に得られた試料概観写真を示すように､均一、無色透明なコーティング試料が得られた。また、得られた試料の XRD 分析により、試料表面にはペロブスカイト型構造を有するニオブ酸ナトリウム（$NaNbO_3$）層が形成されていることが分かった。本コーティング液にはナトリウムは含まれていないことから､表面に形成されたニオブ酸ナトリウム層は、コーティング液中のニオブ成分と板ガラス中のナトリウム成分との反応によると考えられた。この結果により、ニオブ酸ナトリウム層は板ガラス基板との高い密着性を有することが示唆された。

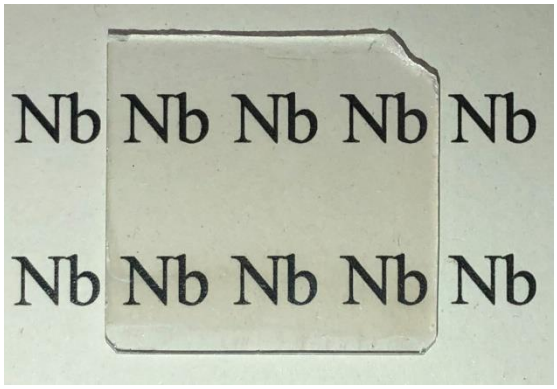


図 2　ニオブ系光触媒コーティング試料の写真。

100℃ で乾燥後の試料表面の水接触角は約 40º であった。この試料に紫外線を照射すると、水接触角は約 10º まで減少した。比較実験として、市販の酸化チタンコーティング液を用いて、保護膜のないソーダライムガラス板へ直接コーティングした試料を作製し、同様に 100℃ で乾燥させ、紫外線照射前後での水接触角測定を行ったところ、100℃ 乾燥後はニオブ系試料と同様に水接触角は約 40º であったが、紫外線照射後は約 30º までにしか減少しなかった。また、保護膜のあるソーダライムガラス板へ酸化チタンをコーティングした試料では、100℃ 乾燥後は同様に水接触角約 40º であったが、紫外線照射後は概ね 5～10º まで減少した。すなわち、既報で報告されているように、シリカ保護膜がない場合、酸化チタンコーティング試料では光触媒活性が大きく損なわれてしまうことが示された。また、ニオブ系コーティング液を用いた場合では保護膜の有無に対する親水化挙動に大きな差は見られなかった。

紫外線処理後の試料を水中に浸し、油滴（オレイン酸）を接触させたところ、油滴は試料表面に付着しなかった。この優れた撥油性により、本試料は油汚れに対する優れた防汚性を示すことが示唆された。

以上の結果から、ニオブ系コーティング液を用いてソーダライムガラス上へ直接成膜した試料が、1 段階のプロセスで作製できる高機能セルフクリーニング材料として期待できることが分かった。

【謝辞】

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、本研究実施にご協力頂きました岡山大学の影山和也氏、亀島欣一教授、三宅通博教授に感謝申し上げます。

【参考文献】

[1] A. Fujishima *et al.*, TiO_2 Photocatalysis Fundamentals and applications, BKC, Inc.

[2] K. Katsumata *et al., J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 3856-3857.

[3] S. Nishimoto *et al.*, Underwater Superoleophobicity of Nb_2O_5 phtocatalyst surface, *Chemical Physics Letters*, 726 (2019) 34-38.

[4] E. Pehlivan *et al., Solid State Ionics*, 165 (2003) 105-110.

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群である。半世紀以上、手つかずの山中から地域住民が新たに発見したこの砂留群は、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破損した箇所の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、2019 年度に実施した修復作業の手法や様子を記録するとともに、九番、十一番～十三番砂留の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

広島県福山市の別所砂留は，平成 21(2009)年から平成 26(2014)年にかけて、五入道川の流域で地域住民が発見した近世最大規模の砂留群である [1)]。発見されるまで、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。しかしながら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、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)]。しかも、現在のメンバーは 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、「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。今年度は十三番砂留でひびの入った土堰堤と崩落した石積の修復を行い、その作業を記録した。また、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、それを基に石積の図面を作成した。今年度は九番、十一番～十三番砂留で実施した。

２．十三番砂留の修復と作業の記録保存

平成 30 年 7 月豪雨によって、十三番砂留左岸側の土堰堤にひび割れが生じた。一方、右岸側はすでに水通し側壁の石材が一部抜け落ちていたが、さらにイノシシが土堰堤を掘り起こしたことにより、土や側壁の裏込が流出し、崩壊の危険性があった。現場は渓流の最奥部で 45 度を越える斜面のため重機が搬入できないことに加え、「別所砂留を守る会」では土堰堤を抜本的に改修する技術も予算もないため、被災後、ブルーシートで覆っていた。

「別所砂留を守る会」のメンバーでも施工できる工法として、木杭を打ち込み、横木を据え付けた土留工（**写真-1**）を採用し、令和 2（2020）年 3 月 14、15、18、22 日の 4 日間で修復作業を実施した。木材は周辺の樹木を伐採し、現地調達した。直径が 5～10cm 程度で、水に強く、硬いモロ木やスギを長さ約 1.5m の木杭に加工した。横木は直径 10～15cm、長さ 2～4m 程度を用意した。左岸側は、木杭を約 80cm 間



写真-1　木杭と横木の施工



写真-3　石材が崩落した石積



写真-5　修復後の石積



写真-2　木杭と横木を施工した土堰堤部分



写真-4　石材をウインチで引き上げた

隔で打ち込み、横木を渡して長さ 6～8m とし、約 80～90cm 間隔で 5 段施工した（**写真-2**）。足場を確保するため、下から施工し、地肌と横木の間に隙間が空いている箇所にはグリ石を詰め、土をかぶせた。最後に植生シートを敷いた。右岸側の土堰堤も同様の方法で、長さ 1.5～3m の横木を 12 段施工した。

一方、抜け落ちている石積（**写真-3**）の修復については、側壁はきれいに整形した石材が用いられているため、砂留の下に落ちている石材の中から抜けた箇所に合致しそうな石材を 2 個選んだ。ただし、かなりの重量のある石材を、足場の悪い斜面を人力で引き上げることは困難であるため、ウインチを使用した（**写真-4**）。結果的には、元々あった石材ではないかと思うほど違和感なく修復できた（**写真-5**）。最後に隙間を小石で埋めるとともに石材の裏側にグリ石を詰め込み、土を盛った。

３．３Ｄレーザースキャナ計測と図面の作成

令和 2（2020）年 2 月 20 日に九番、十一番～十三番砂留の 4 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。そして、石積のみの点群データをもとに図面を作成した（**図 1～4**）。なお、九番砂留は平成 30 年 7 月豪雨による洗掘で新たな石積が出現したため、以前に３Ｄレーザースキャナ計測を実施し、作成していた図面に、今回出現した部分を追加し、網掛け表示をした（**図-1**）。

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、十三番砂留の土堰堤と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、今年度は、水通し内部の裏込めが流出し、

表面の石材が陥没している八番砂留の修復を予定しているが、斜面の途中の石材のため取り外すことが難しい。助成金が引き続き採択されれば、伝統的な石積の修復を専門とする石工を招聘し、技術指導を受けて修復を行うとともに修復技術を向上させたい。

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記録保存（３Ｄレーザースキャナ計測と図面の作成）は、本研究助成等より 10 基が完了した。残る 4 基についても、今年度の助成金を獲得して実施したい。

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.

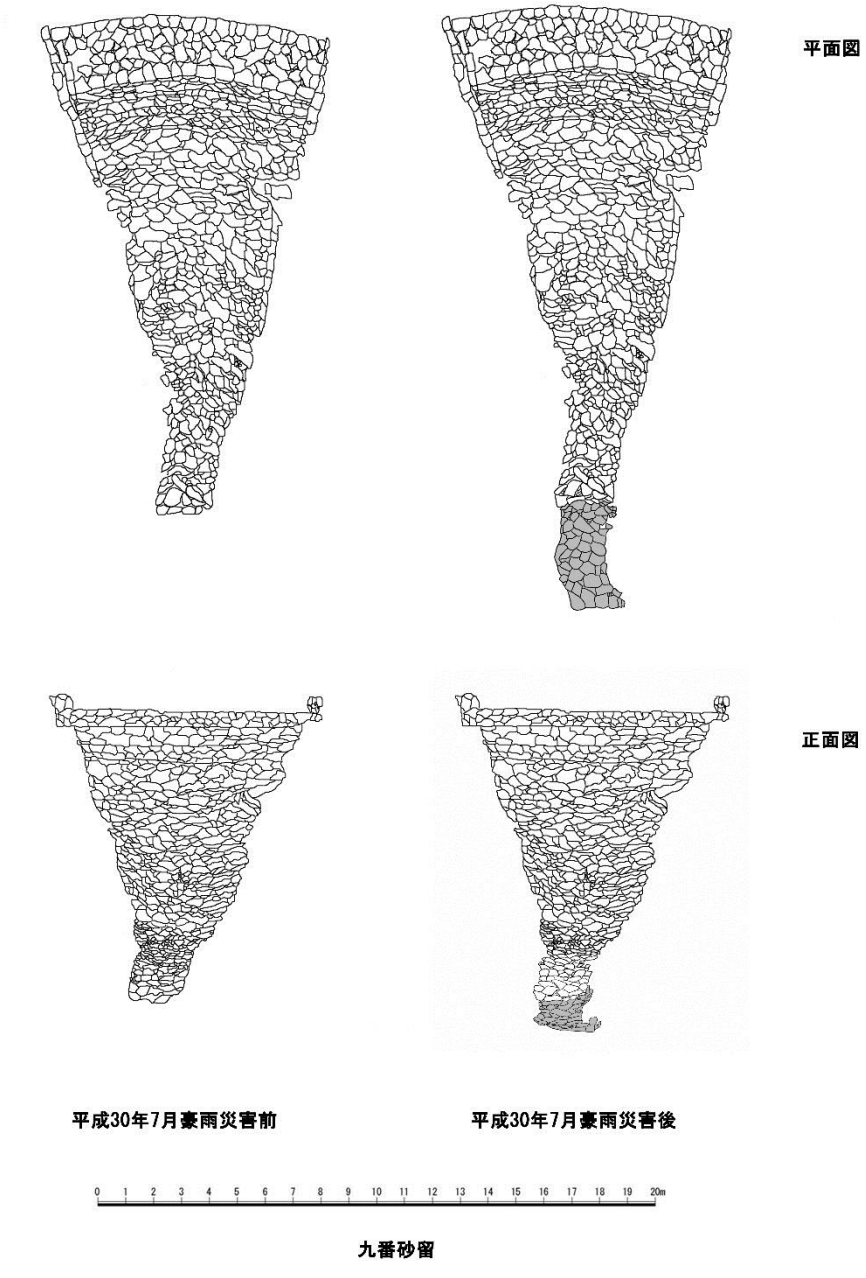
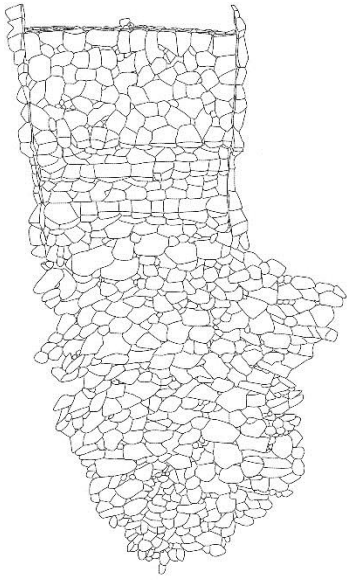


図-2　九番砂留の図面

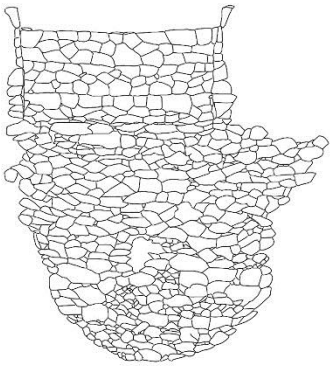
背面図

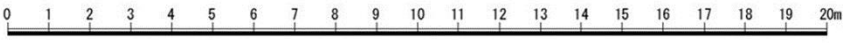


平面図



正面図

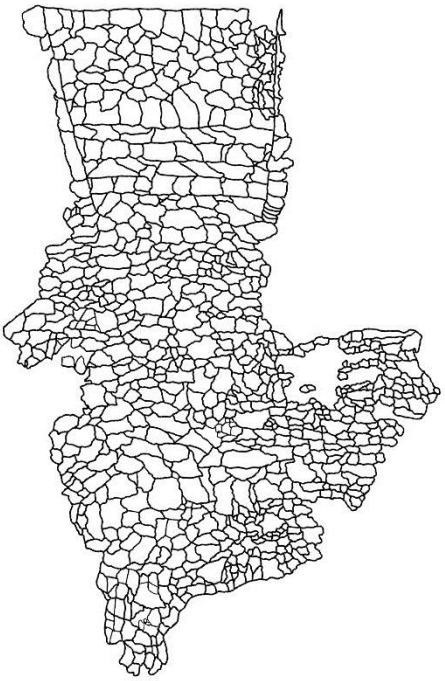




十一番砂留

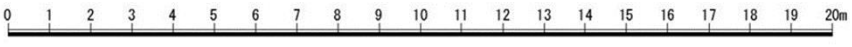
図-2　十一番砂留の図面

平面図



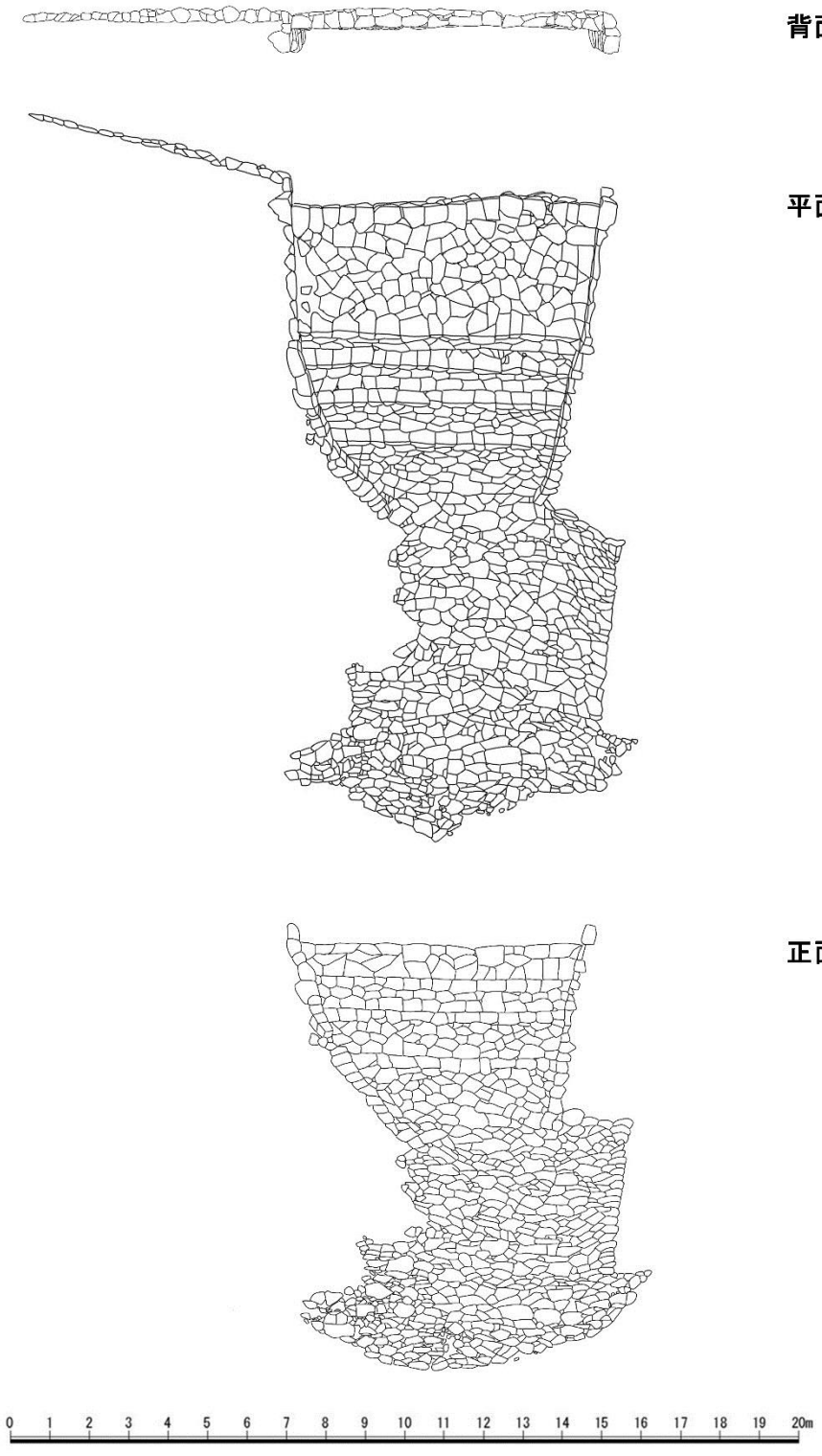
正面図





十二番砂留

図-3　十二番砂留の図面



十三番砂留

図-4　十三番砂留の図面

CNP/NPR2 シグナルを介した卵胞発育シグナルの解明

岡山大学大学院環境生命科学研究科

辻　岳人

（概　要）

ナトリウム利尿ペプチドファミリーの１つとして知られる C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)はその受容体である NPR2 に結合し、セカンドメッセンジャーである cGMP を合成して細胞内へシグナルを伝える。CNP/NPR2/cGMP は骨の成長における重要シグナルとして非常に注目されてきたが、近年は生殖機能のうち特に卵巣の卵胞での機能が明らかにされつつある。本研究では、生殖機能制御に非常に重要なホルモンの１つであるエストラジオールによる卵胞発育促進効果への CNP/NPR2 シグナルの関わりについて検討を行った。結果として、卵巣におけるエストラジオールの効果のうち、前期胞状卵胞を促進する過程で NPR2 が関与しており、特に閉鎖卵胞の抑制作用に重要であった。本研究の結果は、エストラジオールといった卵胞形成に最重要因子の効果に CNP/NPR2 シグナルが下流シグナルとして機能することを明らかにし、卵胞発育制御機構における新たな制御シグナルの解明が期待される。

「背　景」

ナトリウム利尿ペプチドファミリーの１つとして知られる C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は、受容体である NPR2 に結合し、cGMP を介して特定の細胞に作用する局所因子である。これまでに CNP のレセプターである NPR2 遺伝子の異常が雌マウスの不妊をもたらし(Tamura, 2004)、卵母細胞の減数分裂の停止状態を維持させることで正常な卵子を形成するために必須の因子であることが知られている(Zhang, 2010, Tsuji, 2012)。さらに、CNP が卵胞発育を促進する効果が示され(Sato, 2012)、CNP シグナルのもう一つの機能として注目されている。卵胞の発育は FSH とその効果により卵胞顆粒層細胞で合成されるエストロゲンの効果が重要になる。CNP の受容体である NPR2 は、卵胞の顆粒層細胞で発現しており、その遺伝子発現量はエストラジオールに反応して増加する(Zhang et al, 2011)。したがって、CNP シグナルは、エストラジオールに関連して卵胞発育を促進する役割を担うことが予想される。しかしながら、これまでにその関与を明確に個体レベルで検証した報告はこれまでにない。本研究では、マウス卵巣におけるエストラジオールの効果が CNP シグナルを介して機能するのかどうか解明することを試みた。

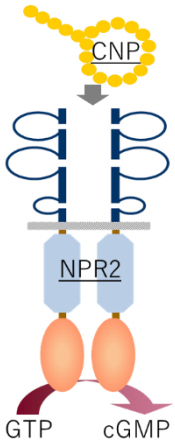


図１CNP と NPR2

「材料および方法」

マウス：21～22 日齢の *Npr2* 遺伝子の機能損失型突然変異(*Npr2*^{m})をホモ型にもつマウス（*Npr2* 変異マウス)および *Npr2* 突然変異ヘテロもしくは野生型のマウス（正常マウス）を用いた。

エストラジオール投与：21～22 日齢の変異マウスおよび正常マウスにコーン油に溶解した合成エストラジオールであるジエチルスチルベストロール(DES)250 μgを３日間皮下投与した。コントロール群は両マウスにコーン油を同様に投与した。各群に３～４匹のマウスを使用した。

卵巣組織学的解析：二酸化炭素により安楽死させた後、素早く解剖して卵巣を摘出し、４%パラホルムアルデヒドを用いて一晩固定した。パラフィン包埋した卵巣ブロックから連続切片を作製し、HE 染色をおこなった。卵巣の切片５枚おき計１０枚を用いて、二次卵胞、前胞状卵胞、胞状卵胞および閉鎖卵胞を特徴的形状より判別して各ステージの卵胞数を測定した。顆粒層細胞のアポトーシスの検出には、in situ 細胞死キット（ロシュ）による TUNEL 法を行っ

た。

「結果および考察」

Npr2 遺伝子変異をヘテロ型もしくは野生型の正常マウス群に DES を３日間投与したところ、顆粒層細胞が３層以上で卵胞腔のない前胞状卵胞については、顆粒層細胞層の厚みが増すとともに卵巣全体の各卵胞にしめる割合が２６％程度増加した。一方、二次卵胞の割合は有意な差が認められなかったが、卵胞腔を形成した胞状卵胞の割合は減少していた。また、発育途中段階で発育を止めて死滅に向かう閉鎖卵胞については、コントロール群では全体の１３％程度であったが、DES 処理により４％程度へ劇的に減少していた（図２）。これらの変化は、DES が前胞状卵胞の顆粒層細胞の増殖を促すとともに、卵胞閉鎖を抑制することで前胞状卵胞数が増加した結果であると予想される。一方、*Npr2* 遺伝子変異をホモ型にもつ変異マウス群に DES を投与した結果、二次卵胞、前胞状卵胞、胞状卵胞および閉鎖卵胞の割合にコントロール群と比較して有意な差は認められなかった（図３）。以上の結果より、幼弱マウスの卵巣において、エストラジオール投与によりもたらされる前胞状卵胞の増加効果は、NPR2 の機能が関わっていることが示唆された。次に、DES 処理により認められた効果のうち、閉鎖卵胞数についてさらに解析を行った。卵胞が閉鎖するにあたって、顆粒層細胞にアポトーシスが誘導されることが知られている。そこで、DES 処理群およびコントロール群の正常マウスおよび変異マウスの卵巣でアポトーシス陽性細胞を調べたところ、正常マウス群では DES 投与により明らかに TUNEL 陽性顆粒層細胞は減少するが、変異マウス群ではほとんど変化が認められなかった（図４）。したがって、エストラジオールによる卵胞閉鎖の抑制は顆粒層細胞のアポトーシスの誘導段階で NPR2 の機能が重要であることが明らかになった。

哺乳類の卵巣において FSH は卵胞の発育と成熟の促進を担う非常に重要な因子であり、その効果には FSH により顆粒層細胞において合成されるエストラジオールの働きが重要になる。したがって、FSH はエストラジオールを介して顆粒層細胞の増殖、分化、生存性に影響をおよぼすことが知られており（Quirk, 2004）、前胞状卵胞に対しての卵胞形成を促進し、顆粒層細胞のアポトーシスを抑制することが知られている（McGee, 1997）。このように FSH と共にエストラジオールは卵胞発育に非常に重要な因子であり、本研究からその下流にはこれまで関与が知られていなかった CNP/NPR2 シグナルが機能することが明らかになった。

現在、ヒトの生殖医療や家畜の生産効率の向上に向けて生殖細胞を積極的に利用する機会が増大している。通常、卵巣内に存在する卵胞のうち９９％は死滅するために、死滅予定の卵胞をいかに利用するかは重要な課題となっている。本研究の成果を踏まえて、FSH やエストラジオールへの反応性低下を補うなどの CNP を用いた卵子利用の新たな発展が期待される。

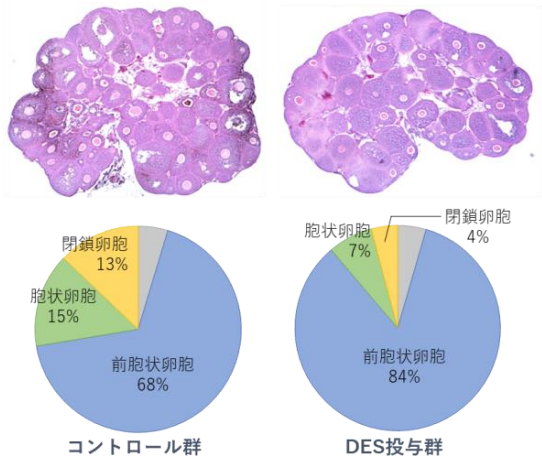


図２　正常マウスの DES 投与群（右）とコントロール群（左）の卵巣 HE 染色切片（上段）と各発育段階卵胞の割合（下段）

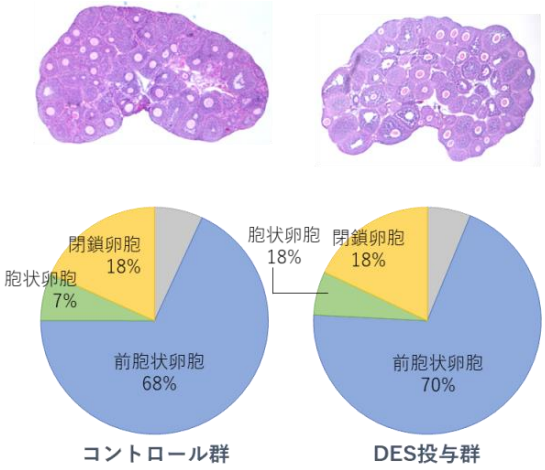


図３　*Npr2* 変異マウスの DES 投与群（右）とコントロール群（左）の卵巣 HE 染色切片（上段）と各発育段階卵胞の割合（下段）

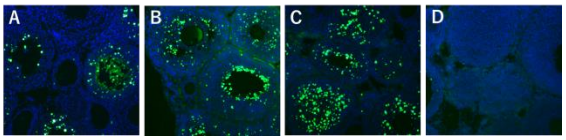


図４　正常マウス（A,B）と *Npr2* 変異マウス（C, D）卵巣の TUNEL 染色結果：コントロール群（A, C）DES 投与群（B, D）

「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. Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101, 17300-17305.
2. Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. Science. 2010 330, 366-369.
3. Tsuji T, Kiyosu C, Akiyama K, Kunieda T. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. Mol Reprod Dev. 2012, 79, 795-802.
4. Sato Y, Cheng Y, Kawamura K, Takae S, Hsueh AJ. C-type natriuretic peptide stimulates ovarian follicle development. Mol Endocrinol. 2012, 26, 1158-1166.
5. Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, Xia G, Eppig JJ. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. Endocrinology. 2011, 152, 4377-4385.
6. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. J Anim Sci. 2004, 82.
7. McGee E, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, Hsueh AJ. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. Endocrinology. 1997, 138, 2417-2424.

半田山南斜面で発生した土砂災害を事例とした
崩壊危険箇所と崩壊土砂量の詳細な推定法に関する研究

岡山大学自然科学研究科※1 岡山大学環境科学研究科※2 地盤工学会岡山県支部斜面・岩盤ワーキンググループ

鈴木 茂之※1　　西垣 誠※2

2018 年 7 月西日本豪雨時に、岡山大学演習林地内の半田山南側斜面中腹において斜面崩壊が 2 か所で発生した。この崩壊はこれまで認識されていなかったタイプであり、斜面崩壊危険箇所としてハザードマップに記されていなかった。なぜこの地点で発生したかを主な研究テーマとした。現地調査及び検討は、地盤工学会岡山地域セミナー斜面・岩盤ワーキンググループのメンバーとの共同研究としてなされた。航空レーザー測量による微地形調査を行った上で、サウンディングや表面波探査、室内土質試験等の各種地質調査を実施した。その結果、崩壊は斜面の傾斜が 30 度より緩くなって、斜面堆積物が堆積し始める箇所で発生したこと。表層が厚くなったところに長雨で地下水が十分に飽和し、その土には地盤地質由来のバーミキュライトが多く含まれ、それが膨潤して流動化を助けたためであることが明らかになった。斜面対策工事が施工される中、岡山大学施設企画部には調査に協力していただいた。公益財団法人ウエスコ学術振興財団からの助成なしには本研究は実現しなかった。ここに記して感謝申し上げる。

1.研究目的

図 1-1 に示す半田山南側斜面の 2 箇所で発生した土砂災害現場において、各種調査（物理探査、簡易貫入試験、振動式簡易貫入試験等）に関する技術および航空レーザー測量（以降、LP とする）技術をマッチングさせることで、自然斜面をターゲットとして、必要な基礎データを効率的かつ効果的に取得する調査方法の確立、および、崩壊危険箇所、崩壊可能土砂の分布状況や崩壊土砂量を評価する手法の確立を目的とする。



図 1-1 半田山位置図（国土地理院 HP　○崩壊箇所）

2. 半田山の自然斜面崩壊の概要

2.1 崩壊発生時の降雨状況

崩壊が発生した 7 月 6 日の降水量は、岡山地方気象台観測データによると、165mm/日、最大 26.5mm/時間で、この前後の中で最も日降水量が多かった。また 6 日までの累積降水量は 291.5mm であった。

2.2 自然斜面崩壊の状況

東側崩壊斜面は、斜面末端部の家屋手前に崩壊土砂が堆積し家屋への被害はない。西側崩壊斜面は、斜面末端部の家屋に崩壊土砂が流入し、住民が救出された。



図 2.2-1　東側崩壊斜面の状況



図 2.2-2　西側崩壊斜面の状況

2.3 崩壊前後の半田山 LP 図

LP データから作成した傾斜量図により微地形の判読を行った。崩壊後の傾斜量図に基づき地形判読した結果を崩壊前(2014 年 3 月計測)の傾斜量図に示す(図 2.3-1～図 2.3-4)。東側崩壊箇所は、崩壊前に北東―南西方向の小ミチが横断しており段差地形となる。西側崩壊箇所も崩壊上部に小ミチが横断し、管理道沿いには表層崩壊跡が認められる。

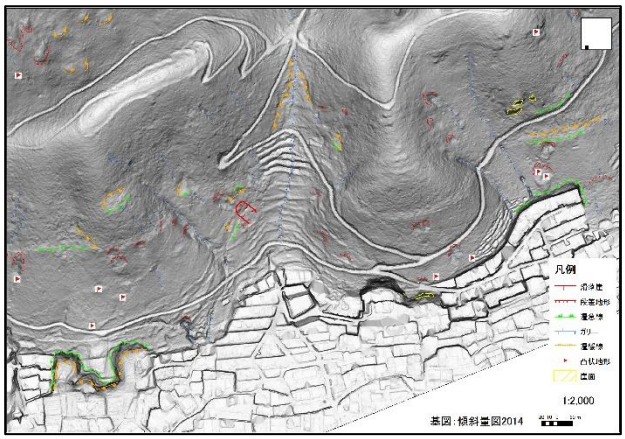


図 2.3-1 崩壊前の東側斜面(撮影 2014 年 3 月 22 日)

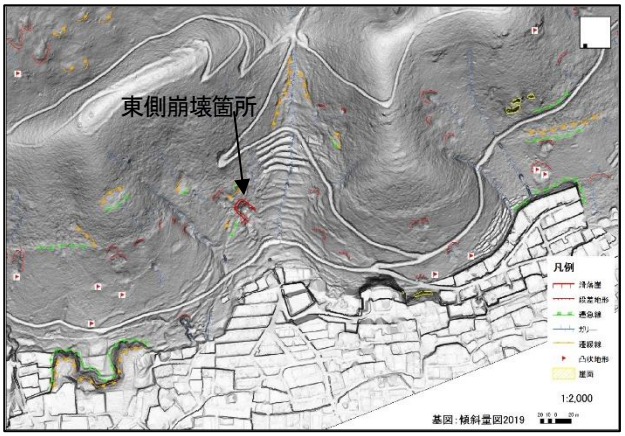


図 2.3-2 崩壊後の東側斜面(撮影 2019 年 4 月 5 日)

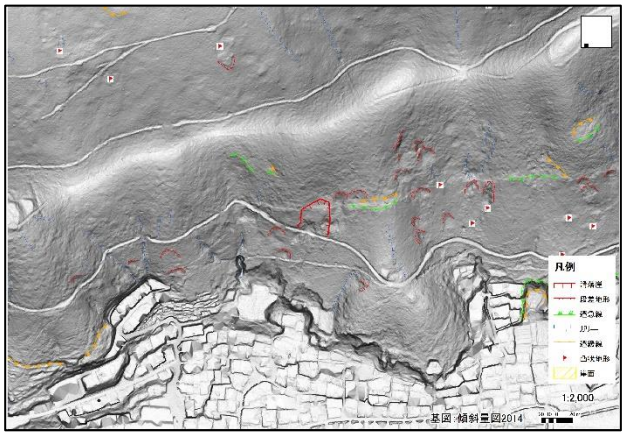


図 2.3-3 崩壊前の西側斜面(撮影 2014 年 3 月 22 日)

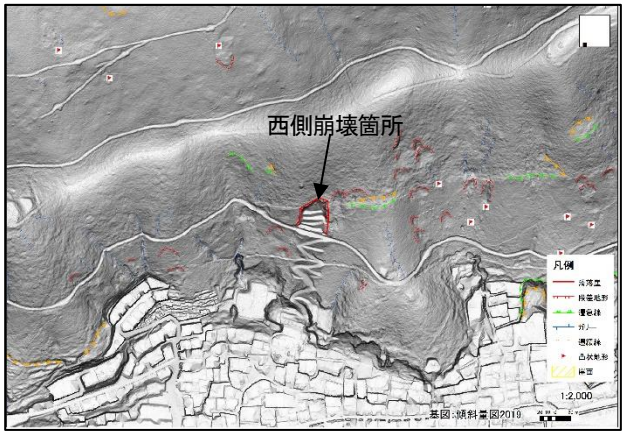


図 2.3-4 崩壊後の西側斜面(撮影 2019 年 4 月 5 日)

2.4 半田山の地形地質概要

半田山は、岡山大学北側に東北東―西南西方向に伸長する標高 140～160m 程度の丘陵地である。山林内には山頂部を囲んで普通車がなんとか通過できる程度の管理道がある。図 2.4-1 に示す既往地質図によると、調査地の地質は、白亜紀後期の粗粒花崗岩類(cGr)の上盤に古生代の泥岩(psl)その上位に砂岩(pss)が分布する。東部側には円礫からなる山砂利層(cg)が分布する。

崩壊地の岩石は深海で堆積したと推測される泥岩で、粘土にシルトの平行な葉理を伴っている(図 2.4-2、図 2.4-3)。花崗岩が貫入した際に受けた熱によって変成しホルンフェルス化している。そのため風化していない岩盤は堅硬である。顕微鏡下で観察すると熱変成によって黒雲母が多く形成されている(図 2.4-4)。しかしこの黒雲母は後述するように風化によってバーミキュライトに変質している。そのためこの泥岩が風化して形成した土には水を含むと膨張するバーミキュライトが多く含まれるため、変状や流動化しやすい傾向がある。

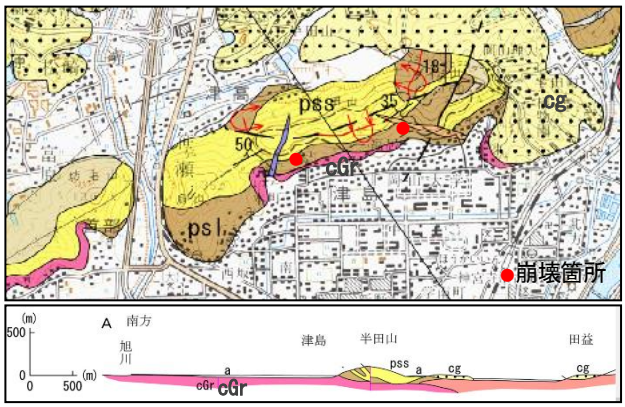


図 2.4-1　既往地質図「西部技術ｺﾝｻﾙﾀﾝﾄ(株) 地質図作成ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄﾁｰﾑ(2008.7)；岡山県内地質図 5 万分の 1・岡山北部」



図 2.4-2 崩壊地から採取された泥岩の研磨試料 横 9cm

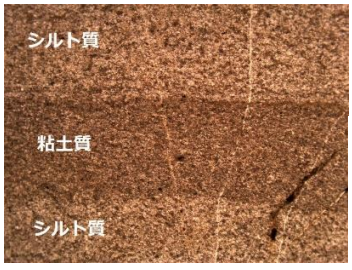


図 2.4-3 上図試料の薄片顕微鏡写真 横 3mm　粘土とシルトが葉理をなす



図 2.4-4 薄片顕微鏡写真 横 0.3mm 熱変成で形成された黒雲母は X 線回析の結果バーミキュライトに変質していることが判明

2.5 半田山の表面排水施設の状況

山林内の管理道沿いにはコンクリート側溝または土水路が確認された。側溝は、管理道の山側にあり、所々、管理道を横断してヒューム管で谷側に排水されている。斜面崩壊時には、横断暗渠の吐口の位置確認と堆積土砂の除去が行われている。管理道沿いの側溝の状況を図 2.5-1 に示す。

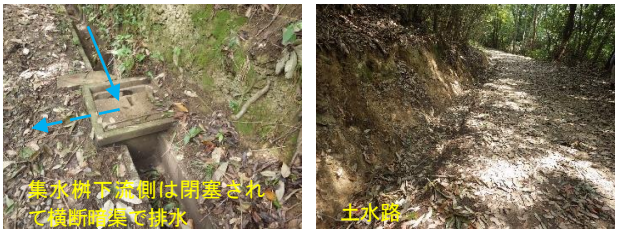


図 2.5-1 管理道の側溝の状況

2.6 半田山の過去の斜面崩壊実例

半田山の崩壊履歴は、東側の管理道入口付近の直下に、現場打ち法枠工とアンカー施工箇所が確認された(図 2.6-1、図 2.6-2)。

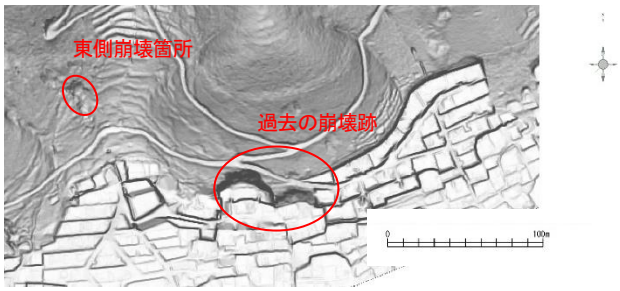


図 2.6-1 過去の崩壊跡位置図

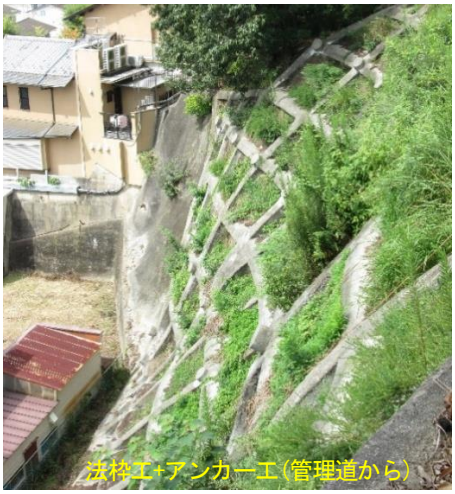


図 2.6-2 現地のり面対策工の状況

3. 半田山の崩壊メカニズムの推定

3.1 風化層の厚さの推定

ここでは東側崩壊箇所について述べる。

①崩壊斜面の滑落崖の状況

- 崩壊範囲は幅 20m、長さ 75m、深さ 2.5～3m 程度
- 管理道付近の表層には礫を含む崩積土が分布(P-1)
- 頭部滑落崖に岩級区分 CL～D 級の細粒砂岩が分布し、水平に淡灰色のアプライト脈が分布(P-2)
- 周辺斜面には崩壊による遷急線、線緩線が分布
- 管理道近傍には斜面崩壊時とは別の大雨時にできたボイリング跡がある(前述図 2.2-1)



図 3.1-1 東側崩壊斜面踏査写真

②表面波探査

表面波探査は、地表付近に沿って伝播する表面波の一つであるレイリー波を用いて、その伝播速度から地盤の速度構造を解析により求める手法である。レイリー波の伝播速度は一般に S 波速度 Vs の 0.9～0.95 倍とされ、Vs 構造を求めることができる。今回、地表部に分布する表土・風化土層の分布を推定する目的で、崩壊斜面頭部の既往ボーリング Bor.1 地点を中心に、測線長 100m で実施した。図 3.1-2 に測線位置と表面波探査結果を示し、既往 Bor.1 地点の速度分布を図 3.1-3 に示す。

既往 Bor.1 地点では硬軟の異なる表土と風化岩の地層境界が GL-2.1m にあり、速度分布も S 波速度 200～225m/s と 225m/s～250m/s の境界と概ね一致する。しかし、緩い表土が分布する地表の速度は、比較的速い 275m/s～300m/s であり整合しない。この理由として本探査測線上には、地表に崩壊跡の凹凸があることと、不均質に転石を混入する崩積土が分布し、解析前提条件の水平地層構造でないことが考えられる。

③簡易貫入試験結果

簡易貫入試験は、表土、風化土層の平面分布を推定するために、図 3.1-4 に示すように前述の探査測線上を中心に EK-1～EK-8 の全 8 地点で実施した。

各地点の試験結果を表 3.1-1 に示す。簡易貫入試験の深度と既往 Bor.1 地点を照合すると、当地の表層部には礫を多く混入した崩積土が分布するため、礫の影響により簡易貫入試験深度が浅く計測されることがわかった。

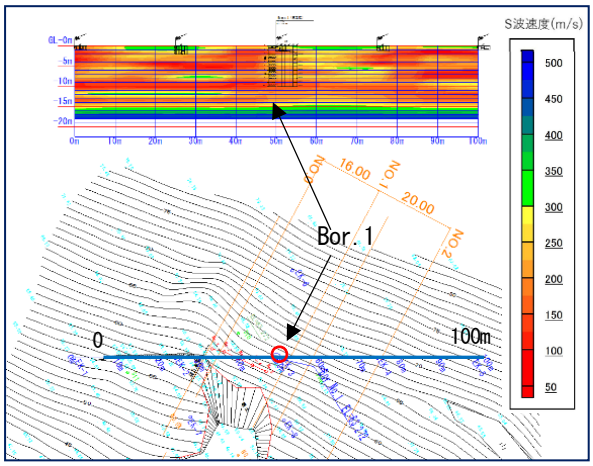


図 3.1-2　東側斜面崩壊頭部　表面波探査結果図

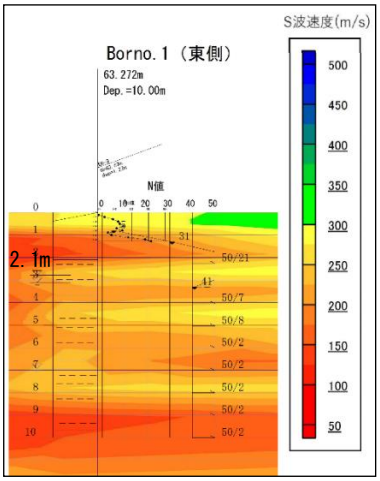


図 3.1-3　既往 Bor.1 地点　表面波探査結果図

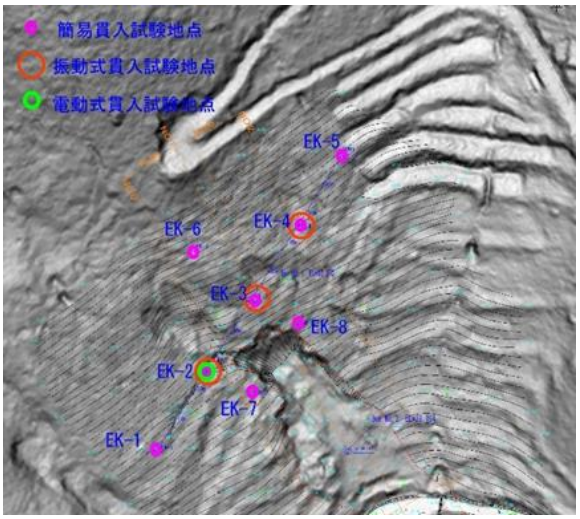


図 3.1-4　東側斜面　簡易貫入試験位置図

表 3.1-1　東側斜面　簡易貫入試験結果一覧表

東側崩壊箇所　　EK;簡易貫入試験　Bor；ボーリング　振動式；振動貫入試験

位置(測線)	0m	25m			50m			75m		100m
試験番号	EK-1	EK-2	振動式	電動式	EK-3	振動式	東Bor.1	EK-4	振動式	EK-5
試験深度	0.84m	2.07m	1.04	0.8	1.27m	0.63	表土 2.10m	1.12m	0.65	0.82m
Nd値(先端)	100	71	—	—	63	—	換算233	83	—	100
換算N値	31	23	(225)	—	20	(139)	N値71	26	(100)	31
備考			N値は換算式の限界超え	開発中による試行		N値は換算式の限界超え			N値は換算式の限界超え	

位置(測線)	滑落崖上部斜面	崩壊左側部			崩壊右側部		
試験番号	EK-6	EK-7	—	—	EK-8	—	—
試験深度	2.05m	2.44m	—	—	1.54m	—	—
Nd値(先端)	71	125	—	—	71	—	—
換算N値	23	39	—	—	23	—	—
備考			—	—		—	—

④振動貫入試験結果

振動式貫入試験は、草刈り機のエンジンを利用した機器であり、5000 回/分の振動打撃を与えて、コーンを貫入させる方法である。試験結果は、前述表 3.1-1 の「振動式」に示す通りであるが、実施した 3 地点の最終深度はいずれも簡易貫入試験深度より浅く、当地への適用はできないことがわかった。

⑤電動式貫入試験結果

電動式貫入試験は、電動削岩機を利用した貫入試験機であり、試作機により EK-2 地点と同一地点で実施した。簡易貫入試験では表土・風化土層を 2.07m 確認したが、電動式貫入試験の貫入深度は 0.8m であり、本試験も当地への適用はできないことがわかった。

⑥風化層の厚さの推定

崩壊箇所の縦断方向 3 地点で実施された既往ボーリング結果では、表土・風化土層厚は、上部から 2.1m (Bor.1)、2.7m (Bor.2)、5.2m (Bor.3) である。

今回、各種サウンディング試験を試行したが、いずれも既往ボーリング調査による表土・風化土の層厚 (Bor.1 地点 GL-2.1m) を確認することはできなかった。

表土・風化土層を 3 次元的に把握するに当たり、今後、斜面を効率よく移動でき、礫打ちの影響を低減できる打撃エネルギーが大きい機器の開発が課題である。

3.2 サンプリングおよび現場密度試験結果

崩壊機構を解明するに当たり、崩壊箇所近傍の表層部に分布する土の物理特性、力学特性、透水性を把握するために乱れの少ない試料を採取した。採取方法は、図 3.2-1 に示すように板に長さ 15cm 程度の釘を打ち込んで試料を切り出すネイルサンプリングとした。採取地点は、表土層が比較的厚い図 3.1-4 の EK-7 地点とし、試料は、岡山県土質試験センターへ持ち込んだ。

採取した試料には礫や木根の混入があり、整形が困難であったため、乱れた試料を密度調整して整形するために現場での密度を測定した。測定方法は、図 3.2-3 に示すように径 50mm 高さ 50mm のステンレス管を打ち込み、現地で電子ばかりで計測した。

現場密度測定の結果、東側の湿潤密度 ρ t=1.8g/cm^3 (西側 ρ t=1.9g/cm^3) であった。



図 3.2-1　ネイルサンプリング状況



図 3.2-3　現場密度測定状況

3.3 室内土質試験結果

東側および西側崩壊箇所の室内土質試験結果を表 3.3-1 に示す。

東側と西側の粒度特性は、礫の混入が西側の方が多いが、その他の物性値に大きな差異はないため、東側と西側の土の物理特性は、概ね等しいと評価し、東側試料を代表として力学試験と透水試験を実施した。

表 3.3-1　土質試験結果一覧表

試料番号			東側	西側
一般	土粒子の密度	ρs g/cm^3	2.651	2.634
	自然含水比	wh %	10.8	13.2
粒度	礫分	(%)	14	50
	砂分	(%)	16	10
	シルト分	(%)	36	27
	粘土分	(%)	34	13
	最大粒径	(mm)	26.50	19.00
コンシステンシー特性	液性限界 WL	%	34.4	38.5
	塑性限界 WP	%	11.5	11.7
	塑性指数 Ip		22.9	26.8
地盤材料の分類名			砂礫質粘土	砂混り粘土質礫
せん断	試験条件		CU－(三軸)	—
	全応力	c kN/m2	16	—
		ϕ°	16.0	—
	有効応力	c' kN/m2	0	—
		ϕ'°	36.0	—
	透水係数 k 15	cm/s	4.72E-7	—

3.4 X 線分析結果

西側崩壊地の直上箇所 Bor.1 の既往ボーリングコアを使用し、地盤を構成する鉱物を同定するために定方位および不定方位の X 線回折を実施した。その結果を図 3.4-1 の鉱物分布図に示す。

現地のコアは花崗岩の近接併入を受けてホルンフェルス化した泥質ホルンフェルスであり、熱変成で生成された黒雲母やセリサイト (白雲母類) が認められた。それらは高温の熱水で緑泥石に変質していた。また、更なる熱水変質で沸石類が形成され、温水変質によるスメクタイトが形成されていた。この変質は深部ほど鉱物量比が多い。その後、地表からの風化作用により、黒雲母はスメクタイトに類似したバーミキュライトに、長石類はカオリン鉱物に変化したことがわかった。

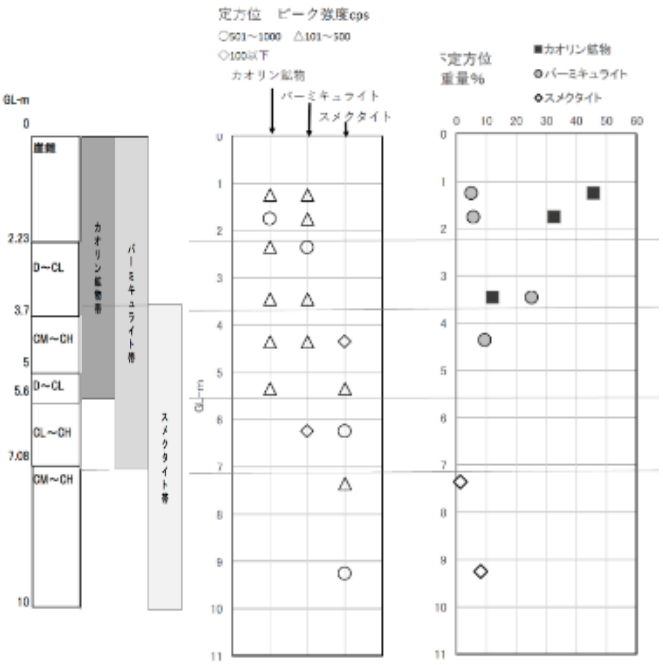


図 3.4-1　鉱物分布及び色彩分布図

風化岩の最上部はこのバーミキュライト化が最も進行しており、同時にカオリン鉱物化も進行していた。地表からの風化という点で、このバーミキュライト帯の最上部が崩壊し、斜面に崖錐帯を形成し、崖錐帯では更にカオリン鉱物化が進行している。

現地の斜面解体の視点からみた鉱物学的構造は、ホルンフェルス化で生成された黒雲母が風化過程で吸水膨潤性に富むバーミキュライトに変化することで、通常のカオリン鉱物主体の風化土より弱い強度の風化土が形成されたと考えられる。

現地は下位から、スメクタイト帯・バーミキュライ

ト帯・カオリン鉱物帯に区分され、崖錐直下がバーミキュライト化が顕著な箇所になり、地すべり性の崩壊が生じやすい素因があったと考えられる。

3.5 崩壊メカニズムの推定

崩壊前後の LP データから作成された断面図を比較した結果、崩壊層厚は東側で最大 2.7m、西側で 5.8m 程度であることがわかった。また、崩壊前の斜面勾配は、東側 24 度程度、西側 26 度程度である。表層部には既往ボーリング結果から、層厚 2m 程度の表土・風化土が分布する。「道路土工 切土工・斜面安定工指針（平成 21 年度版）（社団法人日本道路協会），平成 21 年 6 月」（以降,「道路土工」と記載）によると、図 3.5-1 に示すように、斜面崩壊全体の約 95%が勾配 30 度以上の斜面で発生しているとされている。しかし、半田山の崩壊は、斜面勾配 30 度以下で発生しており、2018 年 7 月豪雨の斜面崩壊の特徴と言える。

崩壊箇所周辺には、旧管理道と思われる人為的なミチや表層崩壊跡が分布し、地形の凹凸が認められる。崩壊箇所の下方には崩積土が比較的厚く堆積しており、これにより緩斜面が形成されていると推察される。

半田山の崩壊メカニズムについては、今後、地形、地質条件と、災害発生時の降雨状況等を解析条件として、浸透を考慮した崩壊シミュレーションにより、検証する計画である。

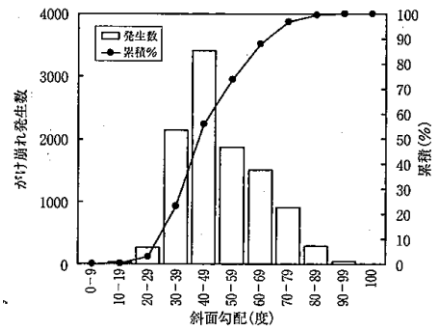


図 3.5-1 崩壊発生の勾配分布（「道路土工，p.314」）

4. 斜面安定対策について

4.1 崩壊斜面の対策工施工状況

崩壊斜面には、現場打法枠工が施工されている。



図 4.1-1 西側崩壊箇所の対策工(2020 年 4 月 15 日)

4.2 今後崩壊が生じると考えられる斜面の現状

東側と西側の崩壊斜面には、法面保護工が施工済みであるが、周辺斜面には古い表層崩壊跡や地形的に不連続となる小ミチが分布する。特に、東側崩壊箇所の左側(西側)には図 4.2-1 に示すように高さ 0.5m 程度の滑落崖が横方向に 20m 程度連続している。



図 4.2-1 東側崩壊箇所の左側に連続する滑落崖

4.3 今後崩壊が生じると考えられる斜面の対策案

本研究結果を踏まえ、岡山大学施設企画部へ以下の事を提言した。

①斜面内の地下水対策

東側斜面左側の滑落崖(前述図 4.2-1)は、雨水が浸透しやすく、豪雨や長雨時にはここから斜面内部へ雨水が供給され、表土・風化土が不安定となり表層崩壊が発生する恐れがある。崩壊箇所の対策と同様に整形してのり面保護工の施工が望ましいが、応急的に滑落崖からの浸透防止のため急勾配となる滑落崖を整形し、亀裂を埋めた方がよい。

②斜面の表流水排水対策

斜面の表流水は、管理道沿いの側溝および集水桝から排水されている。管理道沿いには側溝が敷設されてない箇所や土水路の箇所が認められる。現況の排水状況を確認し、必要に応じて側溝を整備することが望ましい。側溝、集水桝、横断暗渠は、土砂や落ち葉等で閉塞されやすいため、出水期前には定期的に埋設土砂等を除去することが望ましい。

5. 今後の研究課題

今後は以下の課題に取り組む。

○礫の影響を低減できる打撃エネルギーが大きく、斜面上の運搬も可能なサウンディング機械の開発

○表土・風化土層の 3 次元的分布を精度よく把握するための 3 次元弾性波探査等の物理探査の実施

○災害発生時の降雨条件と浸透を考慮したシミュレーション解析により 30 度以下の緩勾配の斜面が崩壊するメカニズムの解明　　以上

植物共生細菌のメタノール走化性の機構と重要性の解明

岡山大学資源植物科学研究所

谷　明生

植物は細胞壁分解によりメタノールを著量放出しており、その葉面にはメタノールを利用して生育出来る*Methylobacterium*属細菌が多く共生している。本属細菌はメタノールを酸化する酵素、メタノール脱水素酵素を二種類持ち、カルシウム依存の酵素 MxaF とランタノイド依存の酵素 XoxF を持つ。後者はランタノイド存在下でのみ発現する、ごく最近見つかった酵素である。本研究では本属細菌がメタノールに対して走化性を示すことを見いだし、そのセンサーとなる遺伝子を３つ同定し、ランタノイドの有無に応答して発現や細胞内局在が変化することを見いだした。さらに、メタノールの代謝で生ずるホルムアルデヒドへの走化性も示すこと、メタノールへの走化性に関わる３つの遺伝子の内２つがそれに関わることを見いだした。また、メタノールへの走化性を失うと、植物の根や葉に対する走化性も失われることから、植物由来のメタノールと、それを感知するセンサー及び走化性が、本属細菌と植物との共生開始に重要な因子であることを見いだした。

緒言

陸上植物は細胞壁に含まれるペクチンを分解してメタノールを放出している。その量は地球上で年間一億トンと見積もられている。植物の葉圏には*Methylobacterium*属細菌が総細菌のうち 10–20%を占めるほど優占化しており、植物由来のメタノールを栄養源として利用している。本属細菌には植物への接種によりその生育を促進する作用があることが多く報告されており、有益な共生菌であると考えられている。

本属細菌はメタノールをメタノール脱水素酵素（MDH）で酸化する。これまで、カルシウム依存の MxaF という酵素がメタノールの酸化には必須と考えられていたが、最近、ランタノイド依存の XoxF という酵素が見つかり、ランタノイドが存在すれば MxaF がなくてもメタノールに生育する事が分かった。ランタノイドは土壌には普遍的に含まれるが、これまで生物学的に重要な元素と考えられていなかった。また XoxF はこれまでメタノール資化性細菌とは考えられていなかった細菌ゲノムにもコードされており、ランタノイドが存在すればメタノールを利用する細菌が多く存在していること、ランタノイド存在下でメタノールのみ利用する細菌が存在することなどが分かってきた(1,2)。

本属細菌は両者の MDH を持ち、ランタノイドの有無で様々な遺伝子の発現が制御される。MxaF,XoxF はもとより、MDH の産物であるホルムアルデヒドの代謝系の遺伝子、走化性に関わる遺伝子の発現変動が起こる。

一方､本属細菌はメタノールへの走化性を示すことを見いだした（**図１**）。走化性とは栄養源など、好ましい物質の濃度が高くなる方向へ細菌が泳動して集まることを言う。一般に細菌の走化性は、MCP という細胞膜局在性センサータンパク質が誘因物質と結合し、細胞内の Che タンパク質群、及び最終的に鞭毛のモータータンパク質へとシグナル伝達され、鞭毛の回転方向を制御することでもたらされる。本属細菌のゲノムには約 50 個の MCP 遺伝子があり､どれがメタノールへの走化性に関わるのか不明であった。

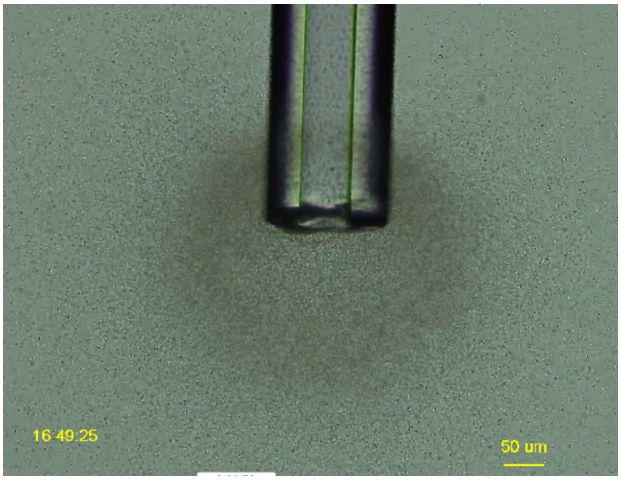


図 1. *M. aquaticum* 22A 株がキャピラリーに含まれたメタノールに走化性を示す様子。

本研究では､本属細菌におけるメタノールへの走化性に関わるセンサーMCP を同定し、植物由来のメタノールが本属細菌と植物との共生開始に関わる因子であることを証明すること、またメタノールの代謝と走化性の複雑な関係性を分子レベルで明らかにすることを目的として行った。

材料及び方法

本研究ではエゾスナゴケから分離され､様々な植物に対して生育促進作用を持つ *Methylobacterium aquaticum* 22A 株をモデルとして用いた(3)。ゲノム解析の結果､52 個の MCP 遺伝子を持つことが分かっている。また、カルシウム、ランタノイド存在下でのメタノールに生育した際のトランスクリプトームのデータも明らかになっている(4)｡遺伝子欠失株の作成は pK18mobSacB ベクターを用いた相同組み換えにより行った。走化性の定量は、キャピラリーに含まれた 2%寒天で固相化したメタノール、ホルムアルデヒドを用い、顕微鏡下で 22A 株の細胞の集まりを観察し、一分ごとに写真を撮影し、フレームに含まれる細胞数を計測した。

結果と考察

本研究では 22A 株をモデルとしたが､本属細菌の基準株について調べたところ、全ての株について強弱はあるもののメタノールへの走化性を示したことから、メタノールへの走化性は本属細菌に共通して備わっていると考えられた。次に走化性アッセイの最適化を行った。メタノールの濃度について検討し、0.2%が最も高かったため、0.2%を用いた。また培養は寒天培地で一晩行い、細胞を緩衝液に懸濁後、1.5-3 時間の間が最も活性が高いことから、菌体を懸濁し 2 時間後に活性測定を行った。

トランスクリプトームのデータから､メタノール生育時に発現量が高まる MCP の遺伝子を順次欠失させた株を作成した。MCP1,MCP2, MCP3 と名付けた遺伝子の 3 重遺伝子欠失株が全くメタノールに走化性を示さないこと、それらの内の２つの組み合わせの遺伝子欠失株はまだ走化性を失わないことから、これら３つの MCP は独立して機能することを見いだした。これら 2 重遺伝子欠失株の異なるメタノール濃度への走化性応答から､MCP1 は低濃度メタノール､MCP2､MCP3 は高濃度メタノールに応答することが分かった。さらにトランスクリプトームのデータでは、MCP1,3 はカルシウム存在下で発現量が高くなるが、MCP2 のみランタノイド存在下で発現量が高くなることが分かった。MCP の C 末端に GFP を融合させた遺伝子を発現させ、各 MCP の細胞内局在を観察したところ､MCP1 は細胞内､MCP2 は細胞の極に局在するがランタノイドが存在すると細胞膜､MCP3 は細胞の極に局在することが分かった。これらの結果から、22A 株においてメタノール走化性に関わる３つの MCP は、ランタノイドの有無により発現パターンや細胞内局在が異なること、メタノールに対する濃度応答性が異なることが分かった。

さらに 3 重遺伝子欠失株と野生株を用い、植物（シロイヌナズナ及びイネ）の根に対する集まりを定量したところ、3 重遺伝子欠失株は有意に集まりが弱くなることから、植物由来のメタノールが本属細菌を引き寄せ、走化性により植物と細菌が物理的に出会うことを証明した。

MDH の各種欠失株を用いて走化性を見たところ、MxaF および XoxF のどちらかが発現していれば走化性を発揮することを見いだした。すなわち、MDH が不活性だと走化性を示さないことから、いずれかの MDH によりメタノールの酸化が起こることが走化性に必要であることが分かった。しかしそれがどの MCP による走化性に必要なのかは現在不明である。なお、泳動能が失われても走化性を失うことになるが、これら MDH 欠失株は全て泳動能を失っていなかった。

MDH による反応産物はホルムアルデヒドである。メタノールへの走化性は、細菌がメタノールに集まり代謝することで発生するホルムアルデヒドが誘引物質となっている可能性が考えられた。現に本株はホルムアルデヒドへの走化性も示したが、2%-10%という高濃度で最も高い活性を示した。市販ホルムアルデヒドは安定化剤としてメタノールを含んでいるため使用できず、パラホルムアルデヒドの加水分解によって生じさせたホルムアルデヒドを用いている

が、高濃度のため、副産物としてメタノールを生じているかもしれない。この点は検討の余地がある。10%ホルムアルデヒドに対する各 MCP 欠失株の走化性を調べたところ、MCP1,3 の 2 重遺伝子欠失株が走化性を失っていた。今後、MCP1,3 の認識物質がメタノールなのかホルムアルデヒドなのか、後者ならばその濃度範囲等を明らかにする必要がある。また、ホルムアルデヒドへの走化性はランタノイド存在下で生育した菌体で高かった。このことは MCP の発現パターンと矛盾しており、この点についても検討の余地がある。

まとめと展望

本研究では、*M. aquaticum* 22A 株をモデルとして用い、メタノールへの走化性についての諸性質、関与するセンサーMCP、植物との共生開始に対する重要性を明らかにすることが出来た。またメタノール酸化産物であるホルムアルデヒドへも走化性を示すことから、メタノール脱水素酵素との関連を今後詰める必要がある。また、3 つの MCP の異なる細胞内局在の意味、ランタノイドの存在によっても細胞内局在が変化する意味、MCP が認識する物質は不明であり、これらの点についての検討を行うことで、本属細菌におけるメタノール走化性の分子メカニズムを明らかに出来ると考えている。

謝辞

本研究に多大な支援を頂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、多大なご助言を頂きました加藤純一博士（広島大学教授）に深謝いたします。

引用文献

(1) Lv H, Sahin N, Tani A, Isolation and genomic characterization of *Novimethylophilus kurashikiensis* gen. nov. sp. nov., a new lanthanide-dependent methylotrophic species of *Methylophilaceae*. Environ Microbiol 20, 1204-1223 (2018)

(2) Lv H, Sahin N, Tani A. Novel lanthanide-dependent methylotrophic bacteria isolated from rice field soil, *Methylotenera oryzisoli* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2020, in press.

(3) Tani A, Takai Y, Suzukawa I, Akita M, Murase H, Kimbara K. Practical application of methanol-mediated mutualistic symbiosis between *Methylobacterium* species and a roof greening moss, *Racomitrium japonicum*. PLoS ONE, 7, e33800 (2012)

(4) Masuda S, Suzuki Y, Fujitani Y, Mitsui R, Nakagawa T, Shintani M, Tani A, Lanthanide-dependent regulation of methylotrophy in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A. mSphere 3:e00462-17 (2018)

糖尿病によるつらい気もちの評価法の開発に関する研究

岡山大学大学院社会文化科学研究科

安藤　美華代

本研究では、糖尿病をもつ人が、日ごろの糖尿病治療をどのように感じているのかふり返り、担当医療者と協働して糖尿病治療に取り組んでいく手立てとなるツールを作成することをねらいとして、質問紙の作成を試みた。まず、糖尿病によるつらい気もちの実態を理解するための記述式の質問紙調査を実施した。協力の得られた糖尿病をもつ295人の回答について、探索的な検討を行った。その結果、17の糖尿病によるつらい気もち、24の糖尿病によるつらい気もちとつきあい乗り越える手立てのカテゴリが生成された(研究１)。これを手がかりに、糖尿病をもつ人は、糖尿病によるつらい気もちと対処について、どの領域でどの程度の状態だと認識しているのか理解するための質問紙を作成した。協力の得られた糖尿病をもつ237人の回答について、探索的因子分析を行った。その結果、糖尿病によるつらい気もちは、36項目7因子で構成された。対処については、46項目6因子で構成された。いずれの因子も信頼性は、保たれていた。つらい気もちと“自己決定目標達成努力”、“ストレスをためない自分に合った取組”といった手立てとの間で、有意な負の相関が見られた(研究2)。

はじめに

【問題と目的】

糖尿病は、強く疑われる者とその可能性を否定できない者が、それぞれ約１千万人(12%)と推計されている国民の健康を脅かす深刻な健康問題である。糖尿病は、慢性の進行性の病であることから、生涯にわたって治療を続けていくことになり、日常生活への負担が大きいことは想像に難くない。この負担感に着目したのが、糖尿病によるつらい気もち(diabetes distress)である。

糖尿病によるつらい気もちとは、延々と続く自己管理、賢明な努力にもかかわらず見込んだ成果が得られない苦悩、低血糖による怖い気もち、高血糖や合併症の不安、周囲からの理解や支援の少なさによる孤独感、医療者との不毛なコミュニケーション等によって生じ継続する感情の揺れとされている。糖尿病によるつらい気もちは、治療の中断、合併症の進行、自責・非難の循環につながる（Young-Hyman & Associates、 2016)。

米国では、糖尿病をもつ多くの人（18～45%）が、糖尿病によるつらい気もちを抱え、この気持ちが、糖尿病の治療行動、血糖値、自己効力感の障壁となることが明らかとなり（Young-Hyman & Associates, 2016)、心の健康についての配慮が喫緊の課題となった。この対処に向けて、米国糖尿病学会と米国心理学会が協働し、心の健康を支援する取り組みに乗り出している[注1)]。

日本においては、糖尿病によるつらい気もちを抱えている糖尿病をもつ人は、約70%と深刻な実態が報告されており(安藤、 2020)、対処に向けた心理支援は、喫緊の課題である。

本研究では、糖尿病をもつ人の糖尿病によるつらい気もちを理解し、つらい気もちの対処の一助するため、心理支援につながる評価法について検討することを目的とした。

【先行研究の概観】

まず、糖尿病によるつらい気もちを緩和したり、つらい気もちに対処したりすることを目的とした心理支援について理解するために、文献研究を行った。

糖尿病をもつ人の糖尿病によるつらい気もちの緩和、対処をねらいとした心理支援で、なんらかの肯定的な変化が報告されている実践研究に着目した。電子ジャーナルデータベース（American Psychological Association PsycINFO, PubMed）を使用し、キーワードとして、“diabetes distress”と“psychotherapy”、“psychological support”、

“intervention”、“prevention”のそれぞれをペアのキーワードとして用いた。SPSS Text Analytics for Surveys 4.01 を援用し、実践方法と成果等について検討した。

その結果、この 10 年で多様な構成での実践が行われ、認知行動的モデル、ストレスと対処、意思決定、マインドフルネスといった理論やモデルに基づき、自己効力感、自己受容、感情調整、セルフケア、コミュニケーション、自分をいたわるといった目的で、感情に着目し、認知に働きかけ、行動変容をめざす内容が、成果をあげていた。これらから、糖尿病によるつらい気もちを理解し対処していくにあたっては、感情・認知・行動面に働きかける支援をすることが大切だと考えられた(安藤、2019)。

さらに、米国糖尿病学会と米国心理学会が協働して行う心の健康を支援する取り組みの研修会[注1)]から、糖尿病によるつらい気もちを予防するためには、その人に寄りそった方法で、うつ状態や不安等の状態も踏まえて、半年毎を目安にした定期的な見立てが必要であることが示された。これらより、定期的に実施可能なできるだけ負担の少ない方法の開発が必要だと考えられた。

研究１

【目的】

糖尿病によるつらい気もちの実態および関連要因について理解し、評価内容の基礎資料とすることを目的とした。

【方法】

糖尿病によるつらい気もちとその対処に関する記述式の質問紙調査を行った。質問内容は、日ごろの糖尿病の自己管理でつらいこと・イライラや不快な気分を感じること(以下、つらい気もち)の具体的内容、どのように乗り越えた・まあまあやっていると感じているか、それらの体験をふまえて糖尿病治療でつらい気もちに直面した際に乗り越える・まあまあやっていくコツについて、であった。

回答については、KJ 法(川喜田、 1967)を用いてカテゴリを生成した。その際、糖尿病を専門とする医師１人とともに検討を行い、医療領域および心理臨床領域における臨床経験を踏まえかつ回答数を参考にして、糖尿病によるつらい気もちの理解と支援につながる質問項目になるかどうかを検討した。

質問紙は、外来診療の待合時間中に、医療事務員から目的等を説明してもらい、倫理的配慮を行い、同意が得られた協力者に対して行われた。回答した質問紙は、診察時に持参してもらった。そして、担当医が、質問内容に不明な点がないか、記入漏れがないかどうかを確認した。それらが見られた場合には、担当医が対話をとおして回答を得た。

調査協力者は、糖尿病をもつ 295 人。年齢　65.2 ±12.2 歳（26～90 歳)、1 型糖尿病 21 人（7.1%）・2 型糖尿病 274 人（92.9%)。治療方法は、食事療法と運動療法 32 人（10.8%）・経口血糖降下薬 160 人（54.2%）・GLP-1 受容体作動薬 28 人（9.5%）・インスリン療法 75 人（25.4%）であった。

【結果】

つらい気もちの内容として、17 のカテゴリが生成された（表１)。

表１　糖尿病によるつらい気もちの内容

カテゴリ	数	例
食事療法	38	好きなものが食べられない。
合併症がつらい	15	眼が見えない。
運動療法	12	運動の継続が難しい。
薬物療法（注射薬）	11	注射を打つのがいや。
薬物療法（内服薬）	7	薬を飲まなくてはいけない。
糖尿病の診断	8	糖尿病と言われた。
身体の不調	8	関節の痛み。
治療継続	7	仕事を休んで病院に来なくてはいけない。
治療困難さの負担	5	自分に腹が立つ。
合併症の不安	4	合併症が不安。
イライラ	4	よくイライラする。
血糖測定の負担	3	血糖測定がめんどう。
低血糖の負担	2	低血糖で腹が減ってつらかった。
採血の負担	2	針がダメ。
不眠	1	眠れない。
家族の問題の負担	1	息子からの暴力。
仕事選び	1	仕事の選択が難しくなった。

糖尿病によるつらい気もちとつきあい乗り越える手立てとして、24 のカテゴリが生成された（表 2)。

表 2 糖尿病によるつらい気もちとつきあい乗り越える手立て

カテゴリ	数	例
食事療法	28	食事の量に気をつけた。
運動療法	12	ウォーキンをした。
受け入れた	10	前向きに捉えた。
医療従事者による支援	8	医師に言われたことを続けた。
治療を継続する	8	治療を継続した。
くよくよしない	8	先のことはあまり考えないようにした。
がんばる	6	自分で気をつけた。
自分を大切にする	6	自分のことを考えた。
ストレスをためない	6	気分転換をした。
慣れた	5	習慣化した。
薬を継続する	5	薬を継続した。
数値目標	3	数値が良くなるのを励みにした。
血糖測定	3	血糖測定し血糖がよくわかった。
忍耐	3	我慢した。
覚悟	3	強い気もちを持ち継続した。
元気でいたい	3	それなりに元気で年を取りたいと思った。
規則正しい生活	3	毎日の健康管理をした。
興味を持つ	3	自分の病気についてよく知り理解した。
情報	3	情報を仕入れた。
家族の協力	3	家族に話した。
色々な人に相談	3	自分のことをなるべく言うようにした。
禁酒	2	酒をやめた。
体重コントロール	1	体重を保つため体重計にのった。
タバコを減らす	1	タバコを減らした。

【考察】

糖尿病によるつらい気もち、つらい気もちとつきあい乗り越える手立ては、多岐にわたることが示唆された。したがって、この心理的負担感を理解するためには、今回見出されたカテゴリを反映する内容を網羅した質問紙を作成することが必要だと考えられた。

研究２

【目的】

糖尿病をもつ人は、糖尿病によるつらい気もちと対処について、どの領域でどの程度の状態だと認識しているのか理解するための質問紙を作成することを目的とした。

【方法】

研究１で得られた結果に基づき、糖尿病をもつ人が、日ごろの糖尿病治療をどのように感じているのかふり返り、担当医療者と協働してその人に合った糖尿病治療に取り組んでいく手立てとなることをめざす質問内容の選定を行った。選定にあたっては、糖尿病を専門とする医師 1 人とともに検討を行い、医療領域および心理臨床領域における臨床経験を踏まえ、選択式からなる質問紙を作成した。

作成した質問を協力の得られた糖尿病をもつ人に実施した。実施に当たっては、研究１と同様の方法および倫理的配慮を行った。

調査協力者は、糖尿病をもつ 237 人。年齢　63.2±12.9 歳（19～90 歳)、1 型糖尿病 14 人（5.9%)・2 型糖尿病 223 人（94.1%)。治療方法は、食事療法と運動療法 24 人（10.1%)・経口血糖降下薬 115 人（48.5%)・GLP-1 受容体作動薬 30 人（12.7%)・インスリン療法 68 人（28.7%）であった。

【結果】

<u>糖尿病によるつらい気もち</u>

研究 1 に基づき、糖尿病によるつらい気もちに関する質問内容として、37 項目を抽出した。この 1 ヵ月間どのくらい糖尿病治療をつらいと感じているのか尋ね、「つらくない」から「とてもつらい」の 5 件法で回答を求めた。協力者に該当しない可能性がある項目については、「あてはまらない」と回答する

欄を設けた。

「とてもつらい」と回答した人が最も多かった内容は、合併症への不安(21.5%)であった。ついで、体力の低下(12.7%)、経済的負担(11.8%)、長い診療待ち時間(11.8%)が見られた。

探索的因子分析(主因子法、プロマックス回転、因子負荷が 0.4 に満たない項目の削除等)を行ったところ、36 項目 7 因子が見出された。各因子は、“食事療法のつらさ”(「好きなものがあまり食べられない」、「間食があまりできない」等8項目、α係数0.87)、“運動療法のつらさ”(「ストレッチやウォーキングなど運動する」、「運動に時間を費やす」といった 2 項目、α係数 0.89)、“治療継続のつらさ”(「定期的に通院する」、「糖尿病治療を続ける」等 4 項目、α係数 0.82)、“糖尿病治療の難しさ”(「他の人の食事を優先して自分の食事療法がうまくできない」、「糖尿病治療が思うようにいかない」等 7 項目、α係数 0.81)、“服薬のつらさ”(「薬の量や種類が多い」、「薬を飲む」等 3 項目、α係数 0.81)、“合併症・注射のつらさ”(「心臓病がある」、「脳梗塞の後遺症がある」等 7 項目、α係数 0.87)、“身体感覚のつらさ”(「足のしびれがある」、「足の痛みがある」等 5 項目、α係数 0.89) についてであった。いずれの因子においても、信頼性は保たれていた。

糖尿病によるつらい気もちとつきあい乗り越える手立て

研究 1 に基づき、糖尿病によるつらい気もちとつきあい乗り越える手立てついては、54 項目を抽出した。そして、糖尿病によるつらい気もちをもちながらも糖尿病とともに生きるのに役立つセルフケアの程度について尋ねた。回答は、「役立っていない」(0)から「とても役立っている」(4)の 5 件法で求めた。

各項目について平均点を算出したところ、最も高かったのは、「糖尿病に関わる医療者を信頼すること」(3.15)、次いで「野菜多めの食事をすること」(3.07)、「自分の病気について関心をもち理解すること」(3.01)であった。

探索的因子分析(主因子法、プロマックス回転、因子負荷が 0.4 に満たない項目の削除等)を行ったところ、46 項目 6 因子が抽出された。各因子は、“自己決定目標達成努力”(「自分の決めたことを続けること」、「日々努力すること」といった 2 項目、α係数 0.86)、“助言をもらう”(「糖尿病教室に参加すること」、「周囲の人からアドバイスをもらうこと」といった 2 項目、α係数 0.70)、“ストレスをためない自分に合った取組”(「あまり深刻に考えないこと」、「ストレスをためないこと」等27項目、α係数0.98)、“身体活動”(「ウォーキングをすること」、「ストレッチや筋トレをすること」等 4 項目、α係数 0.84)、“食事量”(「カロリー表示を見ること」、「なるべく家で料理をすること」等 3 項目、α係数 0.74)、“食事の仕方”(「野菜を先に食べること」、「野菜多めの食事をすること」等 8 項目、α係数 0.92) についてであった。いずれの因子においても、信頼性は保たれていた。

糖尿病によるつらい気もちとつらい気もちとつきあい乗り越える手立ての相関

各因子を構成する項目の合計を項目数で除したものをその因子の得点とした。そして、糖尿病によるつらい気もちを構成する 7 つの因子と糖尿病によるつらい気もちとつきあい乗り越える手立てを構成する 6 つの因子の相関を検討した。

その結果、自己決定目標達成努力、ストレスをためない自分に合った取組は、いずれのつらい気もちとも有意な負の相関がみられた(表 3)。

【考察】

糖尿病によるつらい気もちは、糖尿病治療に関する行動のみならず、感情や身体感覚にまで及んでいることが示唆された。

糖尿病によるつらい気もちとつきあい乗り越える手立てとしては、糖尿病をもつ人が、自分で決めたことを日々努力して続けること、あまり深刻に考えすぎたりクヨクヨしたりせず、ストレスをためない自分に合った取り組みをこころがけること等、個人個人に寄りそった支援が大切だと考えられた。

表3　糖尿病によるつらい気もちと糖尿病によるつらい気もちとつきあい乗り越える手立ての相関

		糖尿病によるつらい気もち						
		食事療法	運動療法	治療継続	糖尿病治療	服薬	合併症・注射	身体感覚
つらい気もちとつきあい乗り越える手立て	自己決定目標達成努力	−0.256**	−0.244**	−0.219**	−0.302**	−0.257**	−0.528**	−0.315**
	助言をもらう	0.027	−0.071	−0.211**	−0.038	−0.066	−0.154	−0.089
	ストレスをためない自分に合った取組	−0.232**	−0.222**	−0.289**	−0.291**	−0.243**	−0.506**	−0.286**
	身体活動	−0.171*	−0.346**	−0.115	−0.086	−0.114	−0.176	−0.309**
	食事量	−0.183**	−0.152*	−0.140*	−0.131	−0.047	−0.262	−0.154
	食事の仕方	−0.062	−0.114	−0.068	−0.065	−0.059	−0.269*	−0.099

注)表内の数値は、Pearson の相関係数。** 1% 水準で有意。* 5% 水準で有意。

結語

本研究では、糖尿病をもつ人が、日ごろの糖尿病治療をふり返り、担当医療者と協働してその人に合った糖尿病治療に取り組んでいく手立てとなることを目的とした評価法として質問紙の作成を試みた。

しかし、質問内容の選定が難しく、何度も検討を重ねたものの、質問項目を絞り切れておらず、個人個人に沿った内容は広く網羅していると考えられるが、それゆえ質問項目数が多くなっており、糖尿病をもつ人の負担になる可能性がある。

今後は、より簡便な質問紙になるように、質問内容の精選を行う必要がある。そして、見出された評価法を活用し、糖尿病によるつらい気もちの見立て、心理支援とその評価につなげることをめざす。

実用可能な質問紙となるよう、さらなる信頼性、妥当性の検討が必要だと考えられた。心理社会的支援にあたっては、行動、感情、身体感覚への支援について検討していく必要があると考えられた。

謝辞

本研究にご協力いただきました皆様に感謝いたします。

本研究は、A 倫理委員会の承認を得ています（受付番号第 30-21 号）（受付番号第 1-99 号）。

本研究は、公益財団法人ウエスコ学術振興財団令和元年度学術研究費助成を受けました。本研究にご支援賜りました公益財団法人ウエスコ学術振興財団に感謝いたします。

本発表に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業等はありません。

文献

安藤美華代. (2019). 糖尿病によるつらい気もち (diabetes distress)の緩和に向けた心理的支援に関する文献研究. 糖尿病 , 62(Suppl.1), S-339

安藤美華代. (2020). 糖尿病によるつらい気もち (diabetes distress) の理解と予防: 集団認知行動療法的視点を取り入れて. 認知療法研究, 13(1), 9-12

川喜田二郎. (1967). 発想法―創造性開発のために. 中央公論社

Young-Hyman, D., de Groot, M., Hill-Briggs, F., Gonzalez, J. S., Hood, K., & Peyrot, M.

(2016). Psychosocial care for people with diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. Diabetes Care 39, 2126-2140

注

注1) Mental Health Provider Diabetes Education Program
https://professional.diabetes.org/meeting/other/mental-health-provider-diabetes-education-program

難治性心不全患者に対する循環器看護師の意思決定支援モデルの開発

岡山県立大学保健福祉学部看護学科

名越恵美

（概要）

【目的】循環器疾患の最終的な病像としての心不全は、増悪と改善を繰り返すため予後予測が難しい疾患である。そこで慢性心不全認定看護師の意思決定支援への認識と介入を明らかにすることを目的とする。【方法】質的帰納的研究デザイン。研究参加者は慢性心不全認定看護師（以下認定看護師とする）とした。インタビューガイドを用いて半構造化面接を実施し、面接内容を逐語録とし、コード化、カテゴリー化した。【倫理的配慮】本研究は、A 大学および対象施設の倫理審査委員会の承認を得て実施した。【結果】研究参加者は 9 施設 10 名であった。認定看護師の意思決定の認識と介入は、＜生きたい気持ちを支え切る.＞＜医療者の価値観を押し付けない＞＜体の動きやペースをセルフマネジメント＞＜患者の苦悩に覚悟をもって対応＞＜患者の価値観を引き出す＞＜患者の死に関する考えを一緒に整理＞＜死に向かう患者の苦悩を理解＞＜患者の選択は否定しない＞＜末期になる前から継続した意思決定支援が重要＞＜病識が弱い患者に病状を意識づける＞＜望む未来を言語化する＞＜生命予後曲線を使用して今の状況・今後の見通しを伝える＞の１２カテゴリーであった。【考察】患者自身が病状を理解できるように生命予後曲線を使用しての見通しや死に対する考えを聞くことは、今後どうありたいかの言語化となり、普段意識していない認識を明確化することになる。それは、患者が認めたくない Bad News を伝えることでもあり、看護職の覚悟が必要となる。それに対し認定看護師は、厳しさと覚悟をもって患者と対峙していた。一方で、患者の価値観を引き出し、希望を明確化し「生きる」を支えていたと考える。また、一緒に考え苦悩する行為は、患者を孤独にしない関わりであり、尊厳を守っていると考える。

（本文）

はじめに

心不全は、循環器疾患の最終的な病像であり、増悪と改善に伴い入退院を繰り返す心不全は、予後予測が難しい疾患である。心不全は、生活習慣の欧米化による虚血性心疾患の増加と高齢化であり、超高齢社会を、迎えている我が国において団塊の世代が 75 歳以上の後期高齢者になる 2025 年に向けて心不全が急増することは確かである。心不全は、薬物療法や、植え込み型除細動器によって予後改善効果が確立されているものの、循環器疾患の終末像であり、5 年生存率は 6 割程度と言われている。そのため、2017 年には「心臓が悪いために、息切れやむくみが起こり、だんだん悪くなり、生命を縮める病気である」と心不全の定義は慢性疾患から悪性疾患に変更になった。

しかし、病院においては、心不全患者の再入院率を減少させるためのケアを重要課題としており、教育介入が中心となるため、死についての説明や症状緩和、死に向かう準備・意思決定など介入を医療従事者がどのように実施しているか明らかになっていない。したがって、避けることのできない死に向かう準備をいつの時期から行うべきか、家族が悔いのない看取りを行い、患者本人が人生を生ききるための準備をいつごろから行うべきか、専門的に介入するための基礎資料を得ることは重要である。また、岡山県重点施策「地域包括ケアの推進」及び「地域医療を支える医療従事者の育成」にもつながる。また、難治性心不全患者が死に向かう際の看取りの場所や治療中断に関する意思決定支援などのアドバンスディレクティブが促進され、患者・家族の緩和ケア導入の一助となると期待できる。

心不全患者に関する研究を概観すると、患者の療養生活の体験（梅田 2012)、心不全患者の多職種チームの教育入院の有用性（鍵山 2016)、社会的孤立と再入院の関係（齋藤 2017）のように急性増悪を予防し、再入院のリスクを下げるための研究が主流である。一方、心不全患者を対象とした終末期や緩和ケアに関しては、心不全終末期の家族のニーズ（岡部 2013)、在宅医療の実態（小澤 2015）など事例研究を中心に研究がなされてきた。また、量的研究として末期心不全患者への満足度調査（佐藤 2012)、心不全患者への緩和ケアの認識（猪口 2013）はあるものの、看護職のみを対象に実施しており、患者の意思決定を支援する研究は見当たらない。

国外においては、心不全患者への緩和ケアへの態度を明らかにした研究（J.Zliehm 2016)があり、職種別の教育の必要性を示唆していた。さらに、患者の症状緩和とQOLの視点から職種間連携に関する示唆を与えている研究（David.B 2014)、末期心不全患者におけるジレンマと患者を支えるケアギバーとヘルスケアチーム、社会支援の視点から明らかにした研究（Carol.C 2015)があった。このように海外の研究では、心不全の緩和ケアの認識や介入がすでに行われている。しかし、日本では、人生の最終段階の話は、緩和ケア病棟の看護師においても困難感を感じている（名越 2012）現状がある。これらは、日本の文化として死の話を避ける傾向が影響していることが推察される。このように心不全患者への緩和ケアに関する研究は少なく、今後研究の累積が必要である。

そこで、心不全患者及び家族に対する認定看護師の意思決定支援の実態から意思決定支援モデルの開発に向けて、先ずは質的に認定看護師の認識と看護介入を明らかにすることを目的とする。

目的と意義

目的：意思決定支援モデルの構築にむけて慢性心不全認定看護師の緩和ケアに関する意思決定の認識と看護介入を明らかにすることを目的とする。

意義：本調査により専門性を生かした患者・家族へのより良い意思決定支援への示唆を得ることができる。それは、一般看護師にとっての看護モデルとなりうる。

２．方法

１)研究対参加者:研究参加者は病院で働いており、難治性心不全患者の看護に携わった慢性心不全認定看護師とする。

２）研究方法

1）デザイン：質的帰納的研究デザイン

2）データ収集方法：

対象施設に対して院長もしくは看護部長に対し、病院の管理者に研究の趣旨を説明した文書を送付後、電話もしくはメールにて研究対象者の紹介の許可が得られるかどうか確認した。紹介の許可が得られた場合、対象者へ説明書を送付した。対象者に対しては、研究者が連絡することの許可を確認後、対象者に研究の内容について説明書を用いて文書と口頭で説明し、同意書に記入をもらい承諾を得た。

研究の同意が得られた参加者に対して、インタビューガイドを用いて半構造化面接を行う。インタビューは個室でインタビューガイドに沿って自由に語ってもらう。インタビュー内容は承諾を得てICレコーダーに録音した。

3)調査内容：年齢・性別・看護師歴・認定看護師歴とした。また、インタビュー内容は、先行研究を参考に「心不全患者と家族へ意思決定に関する話をするときにどのように行ったか」「その時に気になったことや言いづらいこととそれをどのように説明したか」「今後の生活への見通し」「構築したい教育体制」「他の職種へ依頼したいこと」などであった。

4）分析方法：分析は、面接内容を逐語録にデータ化とし、Krippendorffの内容分析の手法（Krippendorff K, 三上他訳, 1989）に基づき、個別分析・全体分析の2段階の手順で行なった。Krippendorffの内容分析は得られた質的データの文脈を重視しながら意味を解釈していく方法であり、そこに何があるのかを明らかにする方法として有用である。

①逐語録を熟読し、心不全の見通しや意思決定に関

する記述部分を、参加者の言葉のまま抽出した。
②①で抽出した記述部分の意味を損なわず、内容が明確になるよう書き表し、整理した文とした。
③できるだけ参加者の言葉を用いて簡潔に表現し一次コード化し、簡潔に表現された記述のそれぞれの文脈に還りながら、文脈における参加者の本質的な意味を表す表現を二次コード化した。
④集めた二次コードの意味内容が同類のものを集め、その意味を表すように表現しサブカテゴリ―化、カテゴリー化した。
5)倫理的配慮
研究の目的、方法、個人情報の遵守等を研究参加者に文書および口頭で説明し同意を文書で得た。なお、本研究は、研究者の所属する施設の研究倫理委員会の承認（受付番号 19-28）及び対象施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

3. 結果

研究参加者は 9 施設 10 名、平均年齢 41.1（±6.3）歳、全員女性であった。看護師の臨床経験は、19.1（±5.6）年、認定看護師の活動年数は、5.2（±2.2）年であった。配属は、循環器病棟 4 名、循環器外来（クリニック含む）3 名、混合病棟 2 名、ICU が 1 名であった。（表 1）

表１：研究参加者の属性

No	年齢	臨床	認定	配属
A	40	19	5	混合
B	43	21	3	循環器
C	41	20	3	循環器内科・外科
D	45	24	2	ICU
E	39	19	7	混合
F	37	14	7	循環器
G	48	18	7	クリニック
H	36	14	4	循環器
I	31	12	7	循環器外来
J	51	30	7	循環器外来
平均	41.1	19.1	5.2	

心不全認定看護師の意思決定支援は、＜生きたい気持ちを支え切る＞＜医療者の価値観を押し付けない＞＜体の動きやペースをセルフマネジメント＞＜患者の苦悩に覚悟をもって対応＞＜患者の価値観を引き出す＞＜患者の死に関する考えを一緒に整理＞＜死に向かう患者の苦悩を理解＞＜患者の選択は否定しない＞＜末期になる前から継続した意思決定支援が重要＞＜病識が弱い患者に病状を意識づける＞＜望む未来を言語化＞＜生命予後曲線を使用して今の状況・今後の見通しを伝える＞の 12 カテゴリーであった。看護師の語りを以下に示す。

「患者さんに関わるときに気を付けていることは、すごく難しいんですけど、末期になるほど、この人がほんと何をしたいかっていうのを知っておきたいというか、何を大切にして生きられるかっていうところですかね。でも、そういう話をすると、『本当に最期みたい』みたいなところがあるじゃないですか。なので、その辺を自然に聞き出すことは大切にしています。」（I）

「意思決定によって、救命を選ぶのも、延命を望まない選択もどちらも意味があると感じます。患者さんが知った上で支えないといけないし、自分がどう生きるかっていうのは、本人が決めますから、生活は変えたくないとか、『仕事は私の命より大事』とか、いろんな方がいらっしゃるから、その中で発作が起きて、それが最後だったって方は、若い方でも何人もいます。その生き方は、決して否定はできないです。」（J）

「ベースになるところかなと思うんですけど、患者さんに真摯に向かってっていうことが一つあるのと、人が取りにくい役割を取っているっていう、どうしても認定っていうところがあるんですけど、それこそ『あなたにそう言われたら、もうほんまにだめなんやな』って、どきってすると思う。本当に何回もどきっとしました。」（G）

「ずっと付き添ってる家族だから、『もしかしたら分かってるかもしれないよね』とか、スタッフの視点の転換になるような言葉かけをしたりとか、全然違うことを。『もしかして分かってるんじゃないかな』とか、それは聞いてみないと、接してみないと分かんないけど。」（A）

４．考察

＜病識が弱い患者に病状を意識づける＞＜生命予後曲線を使用して今の状況・今後の見通しを伝える＞に示されるように、患者自身が病状を理解できる

ように生命予後曲線を使用しての見通しや死に対する考えを聞くことは、＜望む未来を言語化＞に示される患者自身の今後どうありたいかという希望が明確となる。そして、普段意識していない患者自身の認識を明確化することになると考える。終末期における希望の明確化は、悔いのない人生を送る上で重要であり、患者本人だけでなく、家族の満足する看取りに繋がると考える。

また、＜末期になる前から継続した意思決定支援が重要＞といった意思決定の時期を見据えながら認定看護師が介入しようとする認識が、あった。心不全が慢性疾患であり、予後予測が難しい中でも先を見通して介入していると考える。それは、患者が認めたくない Bad News を伝えることでもあり、医療職の覚悟が必要である。それに対し＜患者の苦悩に覚悟をもって対応＞と認定看護師は、厳しさと覚悟をもって患者と対峙していた。

さらに＜患者の価値観を引き出す＞＜患者の死に関する考えを一緒に整理＞すると患者・家族共にいることを保証している介入がみられた。これは、患者の価値観を引き出し、希望を明確化することで患者自身の「生きる」を支えていたと考える。また、一緒に考え、苦悩する行為は、患者を 1 人にしない関わりであり、相手の尊厳を守っていると考える。

認定看護師という立場から＜医療者の価値観を押し付けない＞ように、患者・家族だけでなくスタッフへの指導的立場にある認定看護師の役割を活かしスタッフの視野を広げる関りも行っていた。これらは、患者・家族を中心に看護が同職種・多職種協働で行われるために実践されていることであるが、その中で自らリーダーシップをとっていたと考えられる。

以上のことから、慢性心不全認定看護師の意思決定に対する認識と介入を明らかにした。今後は、モデル構築に向けて内容を精選し一般化を目指す。

所属病院機能の違いにより、意思決定支援内容は異なることが本研究の限界である。これにより、今後意思決定モデルを作成には、まず、循環器病棟のモデルを作成する必要があると考える。さらに、意思決定支援モデルの作成とともに所属病院の機能や配属先の病棟機能別の意思決定支援との関連を明らかにすることが必要である。

引用文献

・梅田亜矢、井上智子（2012）：植込み型心臓危機の遠隔モニタリングを受ける患者の療養生活と看護支援の検討、お茶の水看護学雑誌 Vol.7,No1,30-41

・齋藤泰子、川南公代（2017）：高齢者の社会的孤立と健康に関する文献研究、武蔵野大学看護学研究所紀要 11 号 21-29

・鍵山暢之、林田晃寛、永野範子他（2016）：心不全教育入院の有用性,心臓病センター榊原病院雑誌 20 巻 34-37

・岡部陽子、外川圭樹、須栗裕子他（2013）：慢性心不全終末期における家族のニーズ、第 43 回日本看護学会論文集　成人看護Ⅱ　107-110

・小澤 幸子, 永井 香代子, 菊地 雅,他８2015）：在宅療養を支える訪問看護師の役割　事例からの振り返り,Best Nurse 26 巻 7 号 68-66

・佐藤 寛子, 高務 藍, 田中 瑞奈,他（2012）：末期心不全患者に関わる看護師の患者ケアに対する満足度調査　末期心不全患者と末期がん患者の看護を比較して、第 42 回日本看護学会論文集　成人看護Ⅱ 226-228

・猪口沙織、甲あかね、北川里香（2013）：循環器病棟看護師の心不全患者への緩和ケアの現状,第 43 回日本看護学会論文集　成人看護Ⅱ　103-106

・Jeanette Ziehm, Erik Farin, Katharina Seibel, et,al. （2016）: Health care professionals' attitudes regarding palliative care for patients with chronic heart failure: an interview study, BMC Palliative Care, August 2016. 15,76 1-8

・ Carol Chen-Scarabelli, Louis Saravolatz et,al.(2015):Dilemmas in end-stage heart failure, Journal of Geriatric Cardiology(2015)12:57-63

・David. Bekelman, Stephanie Hooker, et, al. (2014): Feasibility and Acceptability of Collaborative Care Intervention To Improve

Symptoms and Quality of Life un Chronic Heart Failure: Mixed Methods Pilot Trial. Journal of Palliative Medicine Vol.17, No.2 145-151.
・名越恵美、石川真帆、小野静香他 (2012) : 開設初年度の緩和ケア病棟看護師の End of Life Care に関する困難感の分析、インターナショナル Nursing Care Research、11 巻 4 号 Page145-151

超音波を用いた看護師による爪のアセスメント方法の開発

岡山県立大学 保健福祉学部 看護学科

佐々木　新介

（概要）超音波診断装置を用いて，足趾の爪のアセスメント方法について検討した．足趾の爪の観察は主に目視により行われているが，水中に足趾を浸漬した状態で超音波診断装置を用いることで爪甲の厚さや爪甲下の組織も観察可能であった．超音波診断装置を用いることで，視診や触診では評価が困難な巻き爪等の詳細の情報をアセスメントすることが可能であること示唆された．これらは，糖尿病患者のフットケアや爪切り指導にも応用可能ではないかと推察しており，看護師が超音波診断装置を用いて爪をアセスメントする観察方法を構築していく予定である．

【はじめに】

2007 年 6 月，看護師が高齢入院患者の爪をはがし虐待を行ったという報道がなされた．これに対して，日本看護協会は 2007 年 10 月に「虐待ではなく看護ケアである」という見解を公表した（日本看護協会，2011）．その後の裁判では，看護師の無罪が確定したものの（2010 年 9 月），一連の報道は社会に大きな影響を与えたと推察される．このような背景もあり，看護ケアの実施者である看護師には十分な知識と適切なアセスメントと技術が求められている．

本来，爪は手足それぞれの指尖を保護し，指腹に加える力を支えている．特に，足趾の爪は安定して身体を支え，歩行にも関係している．さらに，足趾の観察やアセスメントは爪切りのみならず，糖尿病患者のフットケア指導など看護援助としても重要である．現在，この足趾の観察には目視による視診や触診が行われている．しかしながら，陥入爪や弯曲爪等（いわゆる巻き爪）の場合，外観のみでは十分な観察が行えない場合も存在し，爪のケアに苦慮する場面もある．そこで我々は，超音波診断装置を用いることで，非侵襲的に，目視では判断が困難な爪の情報を可視化することが可能ではないかと推察した．超音波診断装置は，非侵襲的であるにも関わらず，外観からは判断が困難な生体内の情報を可視化することが可能である．特に，近年ではベッドサイドで実施される point of care ultrasound（POCUS）が注目されている（清島ら，2018）．そして，看護においても既存の視診や触診に加えて POCUS を併用することで，より正確かつ高度なアセスメントが可能になると考えられる．

超音波診断装置を用いた爪に関する先行研究としては，国内での研究成果は乏しく，海外では爪甲，爪母，爪郭，爪床など超音波画像が示された文献等は存在していたが，爪甲の厚さなど，基準となる数値も示されていなかった．このような背景を踏まえ，本研究では看護師のアセスメントツールとして超音波を活用した爪のアセスメント方法の構想に至った．本研究では，その第一段階として，健常人で爪の観察方法と爪甲等の参考値を明らかにする．

【目的】

超音波診断装置を用いた爪の観察方法，健常人の足趾の爪における爪甲の厚さなどの参考値を明らかにする．

【方法】

1. 対象者と実験期間

同意の得られた健常人 40 名を対象に 2019 年 9～10 月に実験を実施した．

2. 実験機器

超音波診断装置は LOGIQ e（GE Health Care）を用いた．プローブは，16 MHz の設定でリニアプローブ（L8-18i-RS，GE Health care）を使用した．

3. 実験手順

1) 対象者の性別, 年齢, 身長, 体重, 足のサイズ, 本人の足趾や爪に対する認識等について質問用紙に記入を依頼した.

2) 体位は椅子を用いて座位とした. 足趾の爪を露出し, 実験前に目視にて, 爪の異常について観察し, 上方と正面からの写真を撮影した (図1). また, フットケアの専門知識と技術を身に付けたフットケア指導士（日本フットケア・足病医学会 認定資格）である看護師が巻き爪の有無について判断した.



図1 目視で観察した足趾の爪（正面）

3) 予備実験の結果, 超音波診断装置での観察は, 足趾を水中に浸漬した状態で観察することとした（図2).



図2 本研究で用いた水中での爪の描出方法

4) 超音波診断装置での観察は, 左右の足趾を片足ずつ順に短軸断面(図3), 長軸断面（図4）を撮影した.

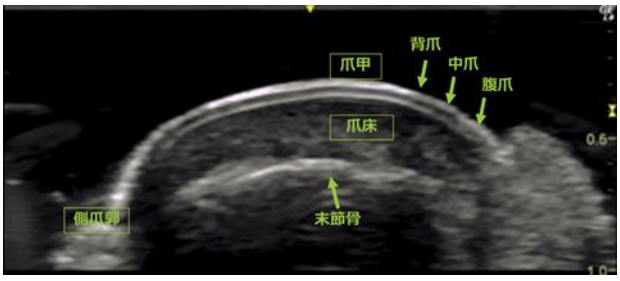


図3 超音波診断装置で観察した足趾の爪の短軸像

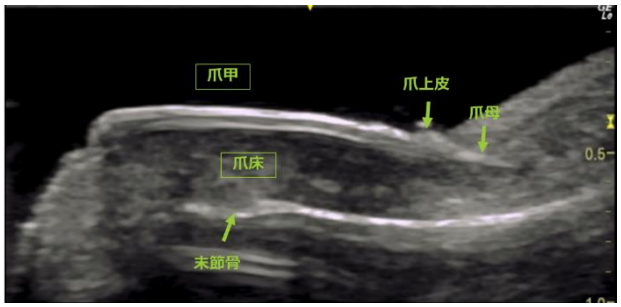


図4 超音波診断装置で観察した足趾の爪の長軸像

4. 分析方法

データは平均値±標準偏差で示した. また, 撮影した超音波画像の解析には画像処理ソフト Image J を用いて計測した. 計測値の比較には, 対応のある t 検定を用いて有意水準は5%とした.

5. 倫理的配慮

対象者には研究目的, 参加の有無は自由意志であり, 参加の有無により不利益等は一切生じないこと, 研究途中であっても辞退等が可能であることを説明した. データは, 研究目的以外に使用せず, 書面にて同意を得た. 本研究は, 岡山県立大学倫理委員会の承認を得て実施した(受付番号:19-08).

【結果】

1. 対象者の概要について

対象者は39名(男性15名, 女性24名)であった. 全対象者の平均年齢は20.8±1.5歳, BMIは20.6±2.9であった. 男性15名の平均年齢は21.4±2.1歳, 身長は170.2±0.1 cm, 体重は60.9±7.8 kg, BMIは21.0±2.4であった. 女性24名の平均年齢は20.4±0.9歳, 身長は157.4±0.1 cm, 体重は50.7±9.5 kg, BMIは20.4±3.1であった. ネイルアートをしている者は7名(そのうち爪の先端のみのネイルアートは2名)であった. フットケア指導士資格を有する看護師により巻き爪と判断されたものは, 12人(そのうち片足のみの巻き爪は2名)であった.

2. 超音波診断装置での計測結果について

超音波診断装置での爪の計測は, 全対象者(39名)

のうち，ネイルアート等を施していた者及び，計測が困難であった者を除いた 28 名を分析対象とした．超音波診断装置を用いて計測した右足の爪の幅は 15.8±1.5 ㎜, 高さは 3.7±0.7 ㎜, 爪の厚さは 0.7±0.1 ㎜ であった．同様に，左足の爪の幅は 15.5±1.4 ㎜, 高さは 3.7±0.7 ㎜, 爪の厚さは 0.7±0.1 ㎜ であり，左右の計測値に有意差は認められなかった．

3. 足趾の形状について

足趾の形状は 3 パターンに分類されているため (東, 2016), 目視および上方から撮影した足趾の写真にて分類した．その結果，全対象者 39 名の足趾の分類は，母趾が最も長い「エジプト型」は 24 名 (61.5 %) 第 2 趾が最も長い「ギリシャ型」は 11 名 (28.2 %)，母趾から第 3 趾が平行に並ぶ「スクエア型」は 4 名 (10.3 %) であった．

5. 足趾や爪に関する認識につい

対象者 39 名に対して, 足趾や爪に関する認識について調査した．質問①締め付けの強い靴やハイヒールを履く頻度については「ほとんど履かない」が 24 名 (61.5 %)，「月 1 回」が 8 名 (20.5 %)，「週 1 回」は 6 名 (15.4 %)，「ほぼ毎日」は 1 名 (2.6 %) であった．質問②自身が爪を切る時に深く切りすぎているかという認識については，「はい」が 12 名 (30.8 %)，「いいえ」は 27 名 (69.2 %) であった．質問③足の爪を切る頻度については，「1 週間」が 3 名 (7.7 %)，「2 週間」が 21 名 (53.8 %)，「3 週間」は 14 名 (35.9 %)，不明が 1 名であった．質問④足趾の痛みの有無については，「はい」は 0 名 (0 %)，「いいえ」は 39 名 (100 %) であった．

【考察】

1. 研究方法と対象者の特徴について

超音波診断装置を用いた爪の観察については先行研究などの報告数も少ない．そこで本研究においても最初に描出方法の検討に着手した．一般的に，超音波診断装置で組織を観察する場合，超音波用のゲルを使用する．本研究でも超音波ゲルを足趾に塗布して観察を試みたが，爪の場合，観察範囲が狭いことに加え，プローブと接する爪を描出対象としているため，明瞭な画像を得ることが困難であった．これらを解決するために本研究では，水中に足趾を浸漬した状態で爪を観察することを試みた (図 2)．その結果，超音波ゲルを使用せずに明瞭な画像を得ることに成功した (図 3-4)．

本研究の対象者は, 平均年齢が 20.8±1.5 歳であった. 対象者は若年者であったことから, 超音波画像を比較的容易に撮影することが可能であった. また, 研究実施中に辞退・疼痛などの訴えは聴取しなかったため，本研究は非侵襲的かつ安全に実施できたと考えられる．

2. 超音波診断装置を用いた爪の観察について

超音波診断装置で観察した足趾の爪の画像の特徴としては，目視では観察できない爪甲の厚さや爪床の状態，さらには爪母の観察も可能であった．本研究では，左右の爪の幅や爪甲の厚さ，爪の高さを計測し比較したが，健常人を対象としたため，左右差は認められなかった．また，ネイルアート等を実施していない若年者の爪甲の厚さは 0.7±0.1 ㎜ であった．対象者数が少ないものの，これらの結果は今後研究を進める上において爪の厚さの参考になると考えられる．加齢に伴い，爪も変化することが報告されているため (安永, 1961)，爪甲の厚さも，年代で変化することが推察されるため今後は対象者を増やしていく予定である．

超音波診断装置を用いることで，目視では観察困難な部位も観察できると推察している．特に，陥入爪など爪甲遠位遊離縁が軟部組織に深く埋没している場合, 測定が困難かつ不正確になりやすいと報告されている (崎山ら，2016)．このような場合も爪の層構造や末節骨, 爪母が観察可能な, 超音波診断装置を用いることで，爪甲遠位部も観察が可能になるのではないかと推察している．爪母で増殖した細胞は角化して爪甲となり, 遠位へ伸び, 爪を形成するため, 超音波診断装置で爪母を観察することは, 爪の状態をアセスメントすることに有用ではないかと我々は期待している．

山下らは,爪の異常である,肥厚爪や痛みを伴う陥入爪は触覚を著しく低下させ,足趾の動作範囲を制限,長期間にわたり適切な筋発揮の機能阻害,筋力の低下が足趾間圧力低下につながり,転倒のリスクが高まることを報告している(山下ら，2004)．そのため,足趾の爪の異常をアセスメントすることは転倒のリスク評価にもつながり,転倒予防のためにもフットケアが重要だと考えられる．そして，非侵襲的な超音診断装置を併用して活用することで,リアルタイムに詳細な観察が可能となることが推察された.

3. 足趾の形状と靴の選択

目視によって観察された足趾の形状は，母趾が一番長い「エジプト型」,第 2 趾が一番長い「ギリシャ型」,母趾から第3趾が平行に並ぶ「スクエア型」と報告されている(東，2016)．足趾の形状と適切な靴の選択についても報告されており，日本人に最も多い「エジプト型」では,母趾の力は他の指より強く,重心が外に傾きやすい特徴があるため,母趾先が一番長く,小趾につれて短くなるオブリークトゥ型の靴が適しているとされている(高山，2019)．一方，「ギリシャ型」では第 2 趾が長いため,靴の中で指が折れ,ハンマートゥを引き起こしやすいため,つま先がやや長めであるポインテッドトゥやラウンドトゥ,アーモンドトゥなどと相性が良いとされている(高山，2019)．そして,「スクエア型」は,「エジプト型」や「ギリシャ型」と比較すると,体重が全趾に対し均等にかかるため,指への負担は少ないが,幅の細い靴やポインテッドトゥなどつま先が細くなっている靴などを履くと,足趾が靴と接触し胼胝や鶏眼の原因に成り得るため,「スクエアトゥ」が望ましいと述べられている(高山，2019)．巻き爪の原因には，形の合わない靴を履くことが原因ともいわれており,爪のみならず，足趾全体の観察が重要である．そして，自身の足の形を意識して靴を選ぶことは,巻き爪の予防,足のトラブルの回避につながると考えられるため,予防や指導が重要だと考えられる.

4. 足趾の観察に超音波診断装置を用いることの有用性と今後の研究の発展について

爪は指趾先端を保護し,指趾の腹側から加わる力を受け止め，適度な力が加わることでやや凸に彎曲した正常な状態になるとされている．このため，寝たきりになって歩行しなくなった人の足趾が巻き爪に変化してくるという現象があるとも報告されている(是枝，2018)．このような対象者らに対する爪のケアは，専門的知識に基づき，詳細なアセスメントが重要でると考えられる．このため，超音波診断装置を用いて足趾や爪のアセスメントが可能になった場合,ケアの安全性や爪切り事故の防止につながると推察される.

本研究では超音波診断装置を用いて，足趾を水中に浸漬した状態での観察方法を検討し，明瞭な画像を得ることが可能であった．このため将来的には,看護援助としての足浴時に超音波診断装置を用いた観察を行うことも可能ではないかと期待している.

5. 本研究の限界と課題

本研究の限界としては,若年健常人を対象としていることである．このため，今後の様々な年代での比較を行う必要があると考えられる．そして，爪の肥厚や皮膚疾患等を有している場合，ネイルアート等を施している場合にも画像の描出が困難となることも推測されるため，描出方法の工夫も必要かもしれない．そのため，今後は様々な事例を通して本研究の有用性を明らかにしていく必要があり，研究を継続し，発展させていく予定である.

謝辞

本研究は，公益財団法人ウエスコ学術振興財団の令和元年度研究活動費助成事業を受けて実施することができました．研究代表者ならびに共同研究者一同，心より御礼申し上げます.

引用文献

・ 東禹彦（2016）．爪−基礎から臨床まで−改訂第 2 版，p150．金原出版.
・ 清島真理子（2018）他.【聴診・触診×エコーで診断推論!-Point-of-Care 超音波(POCUS)の底力】体表触診とエコー 触感覚をエコーで確認しよ

う!, 総合診療, 28 (6) : 810-814.
- 是枝哲(2018). 外来で役立つ爪診療ハンドブック, pp. 1-6. 中外医学社.
- 日本看護協会(2011).「爪のケア」に関する刑事事件 経緯と支援の実際, pp. 2-19. 日本看護協会出版会.
- 崎山とも (2016) 他. 簡便かつ有用な巻き爪の評価法, 日本皮膚科学会雑誌, 126(12) : 2275-2280.
- 高山かおる (2019) . 足育学 外来でみるフットケア・フットヘルスウェア, pp. 182-216. 全日本病院出版会.
- 山下和彦 (2004) 他. 高齢者の足部・足爪異常による転倒への影響. 電気学会論文誌C (電子・情報・システム部門誌), 124 (10) : 2057-2063.
- 安永朋喜(1961). 爪の正常な成長に關する研究, 人類學輯報, 33 : 51-75.

災害時における生活困窮者への情報提供と避難行動～2018 年岡山県豪雨災害の経験から～

岡山県立大学　保健福祉学部

岩満　賢次

（概要）本研究の目的は，2018 年度西日本豪雨災害において，生活困窮者がどのように情報取得を行い，避難行動を行ったのかを検討することにある．本研究では，第一に，岡山県の実施した「平成 30 年 7 月豪雨災害での対応行動に関するアンケート」結果の分析を行った．第二に，①浸水被害のあったＡ自治体Ｂ地区自治会の集会での調査及び所管行政の担当者に対する調査，②重度の身体障害者 4 名に対する調査，③被害の大きかったＣ自治体に所在する高齢者福祉施設の管理者（2 か所）に対する調査を実施した．結果，「要介護・介助者のいる世帯，高齢者世帯では，情報入手が遅い傾向があること」，「市町村による避難を誘導する情報発信は伝わっていない可能性が高いこと」，「情報取得の中心はテレビ等の気象庁の発表とエリア防災メールなどの携帯電話を通じたものが主であったが，避難行動には繋がりにくい傾向があったこと」，「災害時要援護者台帳はほぼ機能しなかったこと」，「要支援者の避難は福祉事業所が関わっていたこと」，「要介護者など移動に困難を有する人は，避難自体ができないこと」，また「福祉避難所には直接避難できない実態があったこと」が明らかとなった．

1.　研究の背景及び目的

本研究の目的は，2018 年西日本豪雨災害において，生活困窮者に対して，どのように情報が提供され，避難行動が行われたのかを明らかにすることにある．

日本では，近年大規模災害が連続して発生しており，その情報提供や避難行動は大きな課題となっている．その中でも，障害児者や高齢者，低所得者，ひきこもり状態にある人，生活保護受給世帯などの生活困窮者は，情報弱者であったり，避難行動に困難を有する場合が多かったりと，被災時にはより多くの支援が必要となる．政策としては，社会福祉法上の市町村地域福祉計画に災害時などの緊急事態の際の迅速かつ的確な要援護者支援を行う方策を盛り込む通知（平成 19 年 8 月 10 日，各都道府県知事宛，「市町村地域福祉計画の策定について」）があったり，福祉避難所の設置などが各地方自治体で行われている．

しかしながら，実際に生活困窮者が被災時にどのように情報を得て，どのように避難行動を起こしているのかについては，未だ十分な検証が行われていない．障害者や高齢者などの要介護者については福祉避難所の設置が進められているものの，介護を要しないような生活困窮者については十分な考慮はなされていない．

大門による既存の福祉避難所に関する研究をまとめた文献によると，これまでの研究による福祉避難所の課題は，①入所するまでの経路の問題，②施設の設備・備蓄，③開所施設の人員不足，④事前の周知・想定の不足，⑤個人情報保護・名簿作成，⑥避難の長期化・通常業務への影響，⑦多様な要配慮者への対応，⑧収容定員の過多，⑨指定外避難所への対応，の 9 点を挙げている（大門　2020：34）．福祉避難所は災害時要援護者が利用するものであると考えられるが，既存の研究・分析には，被災時の彼らへの情報提供の視点が十分ではない．生活困窮者は，単に収入の問題のみならず，社会的孤立がテーマになっていることを考えると，社会的孤立により，情報を入手できない，避難できない人たちは多く存在すると考えられる．

以上のことから，本研究では，被災時に生活困窮者がどうように情報を得て，どのように避難行動を起こしたのかを把握していきたい．

2.　研究の方法

本研究では，第一に，岡山県の実施した「平成 30 年 7 月豪雨災害での対応行動に関するアンケート」（以下，岡山県調査）結果に基づき，豪雨災害時の情報取得に関する分析を行った．第二に，西日本豪雨災害時に岡山県にいた方々のヒアリング調査を実

施した．具体的には，3 つの調査を行った．①浸水被害のあったＡ自治体Ｂ地区自治会の集会での調査，②重度の身体障害者 4 名に対する調査，③被害の大きかったＣ自治体に所在する高齢者福祉施設の管理者（2 か所）に対する調査を実施した．なお，それぞれの所管自治体の動向も資料等により確認した．

3.　倫理的配慮

岡山県立大学倫理委員会にて承認を得て上で，実施している．

4.　研究の結果及び考察

4-1　岡山県調査の分析

岡山県調査では，「大雨特別警報」を初めて聞いた日時について問うており，それを世帯類型別に比較した．岡山県の調査報告書では，「災害が発生した７月時点で，あなたを含めた同居家族の中に，以下のような方々はいらっしゃいましたか」と問い，選択肢に，乳幼児，小学生，中学生，高校生，65 歳以上の方，介護・介助が必要な方，妊産婦を挙げている（複数回答）．他方で，「「大雨特別警報」を，あなたはいつ聞いたように記憶していますか．だいたいでよいので，一番最初に聞いた時１つに○をつけてください」と問い，選択肢に，「1．7 月 6 日(金)夜（夕方以降，雨が再び強く降り出してきたころ)」「2．7 月 6 日(金)深夜～7 日(土)未明（河川氾濫のころ)」「3．それ以降」「4．覚えていない・わからない」を挙げている．

その結果，「2．7 月 6 日(金)深夜～7 日(土)未明（河川氾濫のころ)」までに大雨洪水警報の情報を獲得できていない「3.それ以降」を選択した人たちが 173 名（0.6%）おり，要介護者・要支援の必要な方のいる世帯では 11 人（３.0%），65 歳以上の方のいる世帯では 75 人（3.4%）の人が 7 月 7 日の明け方まで情報を得ていないことが明らかである（表 1)．

結果，要介護・介助者のいる世帯，高齢者世帯では，他の世帯と比較して，情報入手が遅い傾向にあることが明らかとなった．

表１：大雨特別警報を初めて聞いた時間と世帯類型

	1.7月6日(金)夜	2.7月6日(金)深夜～7日(土)未明	3.それ以降	4.覚えていない・わからない	合　計
乳幼児	245	72	8	45	370
	66.2%	19.5%	2.2%	12.2%	100.0%
小学生	307	66	8	55	436
	70.4%	15.1%	1.8%	12.6%	100.0%
中学生	216	48	3	39	306
	70.6%	15.7%	1.0%	12.7%	100.0%
高校生	221	47	8	41	317
	69.7%	14.8%	2.5%	12.9%	100.0%
妊産婦	36	11	0	10	57
	63.2%	19.3%	0.0%	17.5%	100.0%
介護・介助	210	93	11	56	370
	56.8%	25.1%	3.0%	15.1%	100.0%
65歳以上	1312	544	75	272	2203
	59.6%	24.7%	3.4%	12.3%	100.0%
該当なし	408	170	4	72	654
	62.4%	26.0%	0.6%	11.0%	100.0%

出典：岡山県調査結果より，筆者作成

4-2　ヒアリング調査の分析

ヒアリング調査の結果は，当時を思い出しながら聞いているため，時間帯など誤差があることが想定される．

①Ａ自治体Ｂ地区のヒアリング調査

7 月 2 日から 3 日にかけ台風が接近し，A 自治体は警戒本部体制を敷き，結果としてその台風は逸れる．その後，7 月 5 日に改めて，今回の豪雨災害に関わる警戒本部体制が敷かれることとなる．同日 21 時 25 分に A 自治体内の X 地区で土砂崩れが起き，X 地区の一部に避難指示（緊急）が出されている．

B 地区は，元来，低い土地にあり，7 月 6 日の夜の大雨により，床下浸水が発生している．その 7 月 6 日の流れを見ていく．行政は，同日のお昼ぐらいから，避難誘導を行っていた．A 自治体の登録メール（防災メール）を 20 通送信，SNS（Facebook）による発信，防災無線による連絡，広報車による連絡（2 台，2 時間程度）を行っている（この時，エリアメールは別，隣接自治体メールも混在しており，受信者はどこから発信されているかは明確には理解していない)．しかしながら，雨が強かったためか，防災無線や広報車の連絡を聞いた人はいなかった．また，ほぼすべての人がメールでの連絡は受信していたが，それにより避難行動を起こした人はいなかった．

避難行動が見られたのは，7 月 6 日 18 時ごろであった．雨が強くなり，車を移動する人が現れ始めた．また，満潮・干潮の看板を点検する人もいた．しかしながら，自宅から避難する人はいなかった．

21 時 25 分に土砂災害警戒情報が発令され，22 時 57 分には，A 自治体内の山沿いに避難勧告（大雨特別警報による土砂災害警戒のため)が出されている．23 時頃には地区の消防団に集合がかけられている．しかしながら，この時点でも自宅から避難する人はいなかった．

本格的な自宅からの避難行動が始まったのは，23時 30 分ごろであった．総社市のアルミニウム工場の爆発があり，A 自治体でもその音が響き，家が揺れるなどの影響があった．そのことを土砂崩れだと感じた人たちが地域のコミュニティセンターに避難を行っている．また，要介護者のＹさんの避難も行われている．風水害前には，福祉事業所（介護支援専門員，訪問介護員など）が利用者宅を回ることが通例であったが，当日は雨が強く，福祉事業所も動ける状況ではなかった．Ｙさん本人より，A 自治体の窓口に電話があり，自治体職員が現場に駆け付け，避難誘導を行っていた．

その後，雨が強くなり，夜間には床下浸水や車 2 台の水没，コミュニティセンター周辺地区の浸水があった．多くの人たちは，夜が明けるまで，浸水の状況が把握できないままであった．

また，災害時要援護者台帳は事前にＡ自治体が作成したが，地区にはその情報はなく，誰が要支援者か分からない状況であった．ヒアリング調査の結果を表 2 に示す．

②重度身体障害者 4 名に対するヒアリング調査

０さん夫妻は，2 階建て一軒家の 1 階部分のほぼすべてに浸水した．夫妻共に重度の身体障害があり，歩行などはできない状況にあった．通常，介護サービスを受け，生活を行っている．０さんの経過をたどると，7 月 5 日から行政の防災行政無線の屋外スピーカー，緊急速報メール（エリアメール），コミュニティ FM の屋内受信機，自治体広報車等，SNS，ツイッター，Facebook 等，ホームページ，L アラート，登録制メール，消防団による呼びかけ，自主防災組織による呼びかけなどといった幅広い呼びかけが行われていた．他方で，０さん夫妻が認知した行政からの連絡はメールのみであり，その他はテレビによる気象庁の発表であった．また，22 時頃に民生委員さん（隣に住む）が訪問してきたが，特に避難の話にはならなかった．

翌日 7 月 6 日には，15 時ごろから警報の発表等をテレビで見ていたが，警報の種類などは把握されていなかった．夜は 1 階でテレビの視聴を続けていた．7 月 7 日の朝 3 時頃，同居している息子さんが外の異変に気づき，「そこまで水が見え出したから 2 階へ上がった方が良い」と，夫妻共に起こして，車椅子へ移乗し，奥さんは昇降機で 2 階へ，ご主人は浸水の結果途中で停電し，昇降機が止まったことから，息子さんが引っ張り上げた（既に 1 階は浸水，30 分程で 1 階はエアコンの下ぐらいまで浸水）．

翌朝には，外は駐車場の屋根ぐらいまで浸水（２ｍぐらい）した．救助を求め，ご主人が窓から布を振るなど，色々と救助要請を行った．119 番にも何度も電話したが，「順番ですから，まっていてください，必ず行きますから」との返事の繰り返しであった（一度，利用している訪問介護員へ連絡をしているが，対応は特になかった）．16 時頃に岡山県警が救助に来，ストレッチャーを持参し，2 人ともボートで避難場所となっている公園まで救助された（息子さん同伴）．その後，救急車で病院へ移動した（18 時前ごろに病院到着）．

その他，別の市に居住する二人の重度身体障害者Ｐさん，Ｑさんの動きをみた．一人は通常，介護サービスを受け，一人暮らしで生活を行っている．もう一人は，家族と同居し，生活を行っている．

二人ともに，０さん夫妻と同様に，携帯電話への警報等に関するメール連絡を頻繁に受信していた．Ｐさんは，自身の利用する訪問介護事業所より，安否確認の電話を受けている．共に避難行動にはつながっていない．

また，4 名共に，災害時要援護者台帳に登録をした記憶があったが，その情報をもとに連絡がきたことはなかった．ヒアリング調査の結果を表 3 に示す．

③C 自治体の高齢者福祉施設へのヒアリング調査

Ｃ自治体では，河川の氾濫により，大きな被害があった．そのうち，2 つの高齢者福祉施設の動きをみた．C 自治体では，7 月 5 日から大雨，洪水の警報が出ており，行政は，警戒体制に入っていた．7 月 6 日には，Ｃ自治体内で警戒が続き，午前中から一部の地区において避難準備情報や高齢者等避難開始が始まっていた．

両法人が動き出したのは，7 月 6 日の夜になってからであった．Ｈ施設では，21 時 35 分頃に法人内施設の状況の確認を電話等により行っている．Ｉ施

設では，21 時頃に地域包括支援センターが一人暮らし高齢者（2 名）の施設への誘導を行っている．同時に，施設職員から施設長（当時施設に不在）との電話による確認作業が始まっている．夜間には両施設に避難者が到着したり，問い合わせがあったりしている．I 施設には，一般の避難場所から要介護の高齢者 1 名の受け入れの連絡を C 自治体から受け，受け入れを行っている．なお，H 施設の施設入居者並びに I 施設の短期入所利用者の避難行動はなかった．

7 月 7 日の朝には，H 施設では，一般の避難所として受け入れを開始し，Facebook で情報発信を行っている．I 施設においても，訪問介護員が利用者の安否確認，地域包括支援センターの高齢者宅訪問や近隣の避難場所訪問が始まっている．

7 月 8 日には，H 施設では，地域包括支援センターは，登録者全員の安否確認を行い，被害の大きかった隣接地域の現地確認も行っている．H 施設へ避難所開設の要請が C 自治体から行われたのは，7 月 10 日のことであった．

ヒアリング調査の結果を表 4 に示す．

表 2：A 自治体 B 地区の動き　※言葉をそのまま起こしている．

	気象庁	行政（A自治体）	B地区の動き	その他の情報
7月 5日 （木）	7/4　20：26　雷注意報 10：33　大雨注意報 洪水注意報 18：30大雨警報（土砂災害）	 警戒本部体制 21：25　X地区の一部に避難指示（緊急）：1世帯（4名）		 21：25土砂崩れ（X地区）
7月 6日 （金）	 22：40大雨特別警報（土砂災害） 洪水警報	（金曜日のお昼ぐらいから） ・自治体の登録メール（防災メール：20通） （エリアメールは別，近隣自治体メールも混在） ・SNS（Facebook） ・防災無線 ・広報車（2台，2時間程度） 21：25土砂災害警戒情報 22：57自治体内の山沿いに避難勧告（大雨特別警報による土砂災害警戒のため） 自治体窓口（福祉課），要介護者の避難誘導⇒ ※本人（Yさん）から連絡， 事業所動けず，自治体が対応	18：00　雨強くなる 車の移動した人有 満潮・干潮の看板を点検した人有 19：00（暗くなってから）河川上昇 20：00以降川溢れる 23：00前：消防団集合 （雲が低かった） 23：30　家が揺れる 裏山確認した人有 一部住民避難（10人，コミュニティセンター） 車2台水没（別々の場所） （夜中に1台，早朝に1台） 長靴で歩けないレベル	 23：30総社市工場爆発
7月 7日 （土）	15：10大雨特別警報（土砂災害）解除 洪水警報から注意報へ	17：40自治体全域に避難勧告解除	夜明け：市中水浸し 7時から8時：水がひく	
7月8日 （日）	22：41大雨警報から大雨注意報へ			

表 3：重度身体障害者の動き　※言葉をそのまま起こしている．

	気象庁	C自治体（行政）　※岡山県調査報告書より抜粋	Qさん夫婦の動き	その他の情報	Pさん，Qさん
7月 5日 （木）	7/4　20：26　雷注意報 10：33大雨注意報 洪水注意報 18：30大雨警報（土砂災害） 19：40大雨警報（土砂災害・浸水害） 洪水警報	活用された伝達手段：防災行政無線の屋外スピーカー，緊急速報メール（エリアメール），コミュニティFMの屋内受信機 自治体広報車等，SNS，ツイッター，FB等， ホームページ，Lアラート，登録制メール，消防団による呼びかけ，自主防災組織による呼びかけ 17：00注意体制 19：00警戒態勢 23：00災害対策本部設置	メールはしょっちゅう来ていた． 2 22：00民生委員訪問 「どうされます？」（避難されるかという意味） 「ここは2階があるけぇ，大丈夫かな」 「息子さんがおられるから大丈夫でしょう」 ご主人：もうええわ，と		メールはしょっちゅう来ていたが，内容は覚えていない．
7月 6日 （金）	22：40大雨特別警報（土砂災害） 23：10大雨特別警報（土砂災害・浸水害）	9：30災害対策本部会議開催 11：30山沿いに避難準備・高齢者等避難開始を発令（土砂災害警戒） 第一次非常配備態勢へ移行 18：30倉敷川・吉岡川に避難準備・高齢者等避難開始を発令（洪水警戒） 19：30山沿いに避難勧告を発令（土砂災害警戒） 22：00真備地域全域に避難勧告を発令（洪水警戒） 第二次非常配備態勢へ移行 22：40大雨特別警戒発表（浸水害）発表 23：45真備地区の小田川南側に避難指示（緊急）を発令（洪水警戒）	15：00ごろから警報が出ていることを認知 （警報の種類は理解できておらず） （夜） 1階でTV観戦 22：00ごろ警報を確認，でも，そのときは，雨ぜーぜー降ってるし，もこの家にある以外ないなと思いました．逃げる気もなかったです． 23：30総社市工場爆発 屋根へ何か落ちたか思った トイレがボコボコと音がする	（総社市工場爆発） 爆発音で起きた人も． 避難した人も （避難所の様子） 運動公園に避難した人が多数． 最初に行った人は，「ここは避難場所でないから，車の中におってください」と言われ，建物に入れず．	Pさん 時間不明：訪問介護事業所から確認の電話，大丈夫と返答 二人とも自宅にとどまる（避難できないと感じていた）
7月 7日 （土）	15：10大雨警報（土砂災害のみへ）	0：00高梁川左岸地域に避難勧告を発令（洪水警戒） 01：30足守川に避難勧告を発令（洪水警戒） 04：00広江地区の一部に避難指示（緊急）を発令（土砂災害警戒）	03：00 同居の息子が2階から1階へ 「そこまで水が見え出したから2階へ上がった方が良い」 ⇒夫妻を起こして，車椅子へ乗せ，昇降機で2階へ 奥さん：2階へ ご主人：途中で停電，昇降機止まる 息子が引っ張り上げる （既に1階は浸水，30分程で1階はエアコンの下ぐらいまで浸水） 重いものからひっくり返る（洗濯機など，漏電の危険性） ツバメは避難していた． （朝，明るくなって） 外：駐車場の屋根ぐらいまで浸水（2mぐらい） ご主人が窓から布を振ったり，色々と． 119番も何回も電話して「順番ですから，待っていてください，必ず行きますから」 （一度，訪問介護事業所へ連絡をしているが，対応は特にない） 16：00岡山県警が救助 2階の窓から上がってきて，「横になっているのなら，ストレッチャー要りますね」とストレッチャーを取りに帰る． その後，ストレッチャーを持参し，2人ともボートで避難場所の公園まで （奥さん，ボートの中で酔う，食べてないから胃液しか出ない） 息子さん，同伴 その後，救急車で病院へ（18：00前ごろに病院到着） 奥さんと息子さんが先，2台目でご主人	（避難所の様子） 夜が明けてから，人が多くなりすぎて，開放せざるを得なくなった様子． 水が引くまでおられた方多数． 老人の方が2階に上がれなかった． 精神障害のある親子が亡くなった（周りは障害があることを知らなかった）	
7月8日 （日）	22：41大雨注意報へ				

表４：C 自治体の高齢者福祉施設の動き　※言葉をそのまま起こしている．

	気象庁	C自治体（行政）※岡山県調査報告書より抜粋	H施設 （入所，短期入所，通所，包括など）	I施設 （通所，短期入所，訪問，包括）	その他の情報
7月 5日 （木）	7/4　20：26　雷注意報 10：33大雨注意報 洪水注意報 15：39大雨警報（土砂災害） 18：30洪水警報 19：13大雨警報（土砂災害・浸水害）	 15：39：大雨警報（警戒体制） 18：30：洪水警報			
7月 6日 （金）	21：35大雨特別警報（土砂災害）	9：25：土砂災害警戒情報 9：45：災害対策本部設置（非常体制） 10：00：D地区など一部地域に避難準備・高齢者等避難開始 13：00：D地区など一部地域に避難勧告 21：30：市内全域に避難勧告（全職員招集） 21：35：大雨特別警報 22：15：市内全域に避難指示（緊急） 避難所開設 I施設へ80歳女性の福祉避難所受入をI施設へ依頼，送迎（長寿福祉課）	（テレビなどの気象情報を確認） 21：35前 （法人内での電話，訪問による現状把握） 夜：一世帯（7人）から電話 「駐車場貸してください」⇒中に入ってください	（山の上の方に，ため池があり，ぎりぎりの推移のところや少し溢れているところも） （メール（県の防災情報登録）で防災情報受信） 21：00ごろ：包括から一人暮らしの方（2名）の誘導（2～3日施設に滞在） ショートの当直職員から施設長に受入確認の電話 21：30前後：利用者等の避難の必要性を検討 23：00施設長，施設に到着 時間不明：高齢女性受入 一般の方（夫婦）が来る（ここに避難できるか聞いてきた）	 23：30総社市アルミ工場爆発
7月 7日 （土）	15：10大雨警報へ（土砂災害）	 15：10：大雨特別警報解除	朝：避難者受入開始 （Facebookで情報発信：避難所開設） デイサービスのホールにて，最大20人（一般の方，移動困難者，要介護者，要支援者，障害者）	訪問介護員が利用者の安否確認の巡回 包括：高齢者宅，近隣の避難所訪問 デイ休業（10日再開） 近隣被害施設から1名受入（施設職員が迎えに行く） ※ショートステイは2階を使用しているため，避難行動無し お風呂（通所介護）開放（午後，近隣の公民館避難者向け）	近隣被害施設浸水（100人施設外避難） 近隣の公民館に最大130人 スポーツセンター（多数）
7月 8日 （日）	22：41大雨注意報へ	 19：00：市内全域の避難指示（緊急）解除 22：41：大雨特別警報解除	避難所本格受け入れ開始 デイサービスのホールにて，最大20人（一般の方，移動困難者，要介護者，要支援者，障害者） 包括：登録要支援者全員確認，被害の大きかった近隣地区現地確認	その後，短期入所（定員20人）が，日中平均25人の状態が続く（相談員，介護主任が調整）	
7月 9日 （月）			朝：近隣被害施設Jの利用者の受入開始（約20人，ショートステイ） ※合計40名規模の要介護者		
7月 10日 （火）		（昼頃） H施設へ避難所開設の要請 （時期不明） 福祉避難所へ物資提供（パン，飲み物）	（それ以降） 7/12～お風呂開放	（それ以降） 14日，28日に各1名ずつ福祉避難，14日の方はケアマネから連絡あり，準避難者対応，28日の人は包括を通じた自主避難（雨が怖いため）	

※地域包括支援センターを包括，居宅介護支援員をケアマネと表記

5.　まとめ

岡山県調査の分析では，要介護・介助者のいる世帯，高齢者世帯では，情報入手が遅い傾向があることが明らかとなった．

また，各ヒアリング調査では，次のことが明らかとなった．第一に，市町村は，住民に対して避難を誘導する情報発信を行っていたが，残念ながら，その行政からの情報発信は伝わっていない可能性が高い．第二に，情報取得の中心は，テレビ等の気象庁の発表（警報や河川水位情報）と，エリア防災メールなどの携帯電話を通じたものが主であったが，避難行動には繋がりにくい傾向があった．第三に，災害時要援護者台帳はほぼ機能しなかった．第四に，要支援者の避難は，福祉事業所が関わっていた．しかし，その対応は事業所ごとに差があった．第五に，要介護者など移動に困難を有する人は，避難自体ができないこと，また福祉避難所には直接避難できない（一般の避難場所を経由する必要）実態があった．

今回の災害において，次の点は特徴的であった．第一に，豪雨は突発的ではないことである．地震のように，突発的な災害は，五感を刺激し，恐怖を感じる．しかしながら，豪雨災害は，徐々に雨が降り積もってくることから，その脅威に気づきにくい．

既存の調査では，岡山県総社市下原地区（今回の豪雨災害では，総社市の下原地区が大きな被害があったにもかかわらず，犠牲者がいなかったことが注目された）においても，近くのアルミ工場の爆発の後に，避難行動が開始されている（谷山　2019:75）．今回の調査では，A 自治体 B 地区においても，同様の爆発の後に，避難行動を起こした人がいる．五感を揺さぶるような音は，避難行動につながると考えられる．

第二に，見えないことである．雨は強く降っていることは皆理解していた．しかしながら，河川が氾濫したり，道路が水没するまでには時間がかかり，特に自宅にいた人は，庭などの周囲が何ともなければ，その先の河川が氾濫している状況などは見えず，気が付けば，水はそこまでやってきていたという状況であった．夜間であったことが，その状況をさらに悪化させたと考えられる．高齢者が朝まで状況に

気づかなかった人が多かった要因は，このような見えないことと，深夜であったために寝ておられた方も多かったのではないかと推測される．

特に今回は豪雨災害という特性があったと考えられる．「雨」というと，私たちは「上」から降ってくると考え，「上」の雨の様子を見る．しかしながら，「上」からの雨ではなく，水害は，どちらかというと「下」から浸水してくる（河川が氾濫し，流れてくる）．このことも，見えにくいことを誘発していると考えられる．

また，見えないという点について付け加えると，全ての人が，自宅にいたわけではなく，県外にいた人もいれば，職場で外が見えない場所に居た人もいた．災害時にどこに居たのかも大きな影響をもたらすと考えられる．

第三に，外が水没すれば，外に避難できないことである．自然災害では，地域に避難場所や避難所が設置されるが，地域が水没された場合，外に避難ができないうえに，外からの救助もできなくなる．そもそも，自然災害は，点（個人）ではなく，面（地域）を襲ってくるものであり，周囲の地域住民や支援者たちも被災者となる．地震などのように，一部が崩れるのではなく，水害の場合は，全面的に身動きがとれなくなってしまう．そのことから，支援者たちも動きをとりづらかったことが影響していると考えられる．

障害者たちは，まず一人では逃げられない．事前に避難場所に行ったとしても，多くは公園や公民館，学校などであり，そこではハードの面から生活できない．すなわち，逃げられない人たちである．現に，今回の重度身体障害者に対するヒアリング調査でも，逃げる場所がないということが強調されていた．そのために，災害時要援護者台帳があるが，その活用も円滑ではない実態があった．

他方で，テレビなどにより事前に警報を受け取り，事前に避難しようと思えばできた人たちも大勢いたと思われる．被害があったかなかったかは別として，多くの人たちは，避難行動に移らなかった．他方で，自治体は多くの手段を用いて，避難行動を促していた．このギャップをどのように考えるべきか，今後の課題であろう．

今回の豪雨災害では，総社市の下原地区が大きな被害があったにもかかわらず，犠牲者がいなかったことが注目された．その背景には，地域の自主防災組織の存在や日頃の助け合いのシステムがあったことが分析されている（谷山　2019：143-148）．しかしながら，全ての地域がそのような体制になることは現時点では難しいであろう．現に，その後の続く各地の豪雨災害においても，避難行動が見られないケースも多い．今後は，既存の災害対策の抜本的な見直しが必要となるであろう．

このようなことから，結果として「避難しなかった人たち」，「避難できない人たち」（情報が入手できなかった人，入手できても身体的等で行動できなかった人）の両者が存在したが，いずれにしても避難することを前提とした災害対策には限界があり，抜本的な災害対策の見直しが必要と考えられる．

最後に，今回，生活困窮者というテーマを掲げて研究を開始した．多くの方からお話をお伺いしたが，災害対策の中で「生活困窮者」という用語はほとんど聞かれず，途中からヒアリング調査の用語を「要支援者」に変更し，ヒアリング調査を実施した．このことは，一つの発見でもあった．すなわち，災害対策における「生活困窮者」というカテゴリーはほぼないという事である．

しかしながら，生活困窮者の中核に「社会的孤立」があると考えると，高齢者福祉施設での聞き取りで挙がってきた地域包括支援センターの地域の高齢者訪問は，その社会的孤立を災害時に克服する一つの手法であると考えられる．また，避難誘導などの際に社会福祉施設が大きな役割を果たしていたことを考えると，社会福祉施設の充実は，災害対策の基本ともなることから，平時からの社会福祉施設の整備は重要と考えられる．

【文献】

- 谷山宏典（2019）『ドキュメント豪雨災害：西日本豪雨の被災地を訪ねて』山と渓谷社．
- 大門大朗（2020）「近年の福祉避難所に関する動向について：阪神・淡路大震災から西日本豪雨にかけて」『災害と共生』3(2)，27-40 頁．

妊娠期から育児期の両親の睡眠と抑うつ･愛着の関連

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、母親の愛着に睡眠が影響すると明らかにした。本報告は海外との妊娠期から育児期の両親の睡眠と愛着に関する比較の事前調査として行い特に父親の愛着と睡眠の関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】対象は里帰り出産等の影響の少ない生後 6 か月の子を持つ父親を対象とした。調査方法は自記式質問紙を用いて対象者の属性や家事，育児時間，産後うつ（EPDS），睡眠障害（PSQI），睡眠に影響する因子，児への愛着（PBQ）を調査した。平成 29 年 8 月から平成 30 年 3 月に A 病院にて 1 か月健診のため母親に同行していた父親に調査主旨を説明し，調査協力の同意を得た。生後 6 か月時に対象者に対して再度質問票を郵送した。

【倫理的配慮】本研究は岡山県立大学の倫理委員会で承認を得たうえで実施した。（受付番号 17-11）

【結果】質問票の配布数は 31 名であった。回収数 22 名(回収率 70.9%)であり，22 名(有効回答率 100%)を分析対象とした。平均年齢は 32.4±3.73 歳，全員が職病を有していた。EPDS（産後うつ）の平均得点は 2.2±2.7 点で，9 点以上の産後うつ疑いを示したのは 1 名(4.5%)であった。父親の育児時間は 1 時間以内が 7 割，家事時間は 1 時間以内が 82%だった。EPDS と家事時間に強い正の相関が認められた。PSQI による睡眠障害ありは 3 名(13.6%)，なし 19 名(86.4%)で，PSQI と EPDS においてやや強い正の相関がみられた。PSQI と児への愛着(PBQ)は Factor1（愛着不全），Factor2(拒否と怒り），Factor3(児への不安)で正の相関がみられ，睡眠が愛着に響を及ぼす可能性が示唆された。Factor1(愛着不全)と家事時間に相関がみられた。

【考察】生後 6 か月児の父親の睡眠障害に支援を行うことで，愛着形成の促進，育児不安の軽減やうつの予防につながる可能性が示唆された。睡眠のためには仕事，家事，育児負担のバランスが重要で，父親学級等の育児準備教育，育児休暇取得の促進，睡眠不足や疲労に対する生活指導など父親役割獲得の段階に応じた支援を行う必要がある。

1. はじめに

佐藤ら(2013)は、乳児健診時に母親の愛着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、愛着障害は、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。Klaus&Kenell(1982)は、愛着とは、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) 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愛着障害(bonding disorder)、あるいは愛着不全(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。

愛着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。

本研究は父親の産後うつと父親の負担を反映する指標として睡眠障害，疲労に着目した。産後うつがリスクファクターとなる愛着障害の実態について確認し，今後の育児支援のための基礎資料にしたいと考え、里帰り出産等の影響の少ない生後 6 か月の子を持つ父親を対象とすることとした

2. 目的

生後 6 か月の児をもつ父親の産後うつと睡眠障害，疲労，児への愛着の実態を明らかにする。

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) 対象

里帰り出産等の影響の少ない生後 6 か月の子を持つ父親を対象とした。

3) 調査方法

自記式質問紙を用いて対象者の属性や家事，育児時間，産後うつ，睡眠障害，睡眠に影響する因子，児への愛着を調査した。平成 29 年 8 月から平成 30 年 3 月に A 病院にて 1 か月健診のため母親に同行していた父親に研究者から調査主旨を説明し，調査協力の同意を得た。生後 6 か月時に対象者に対して再度質問票を郵送した。1 か月健診時に父親が同行していない場合，母親に対し父親へ調査票を渡してもらうよう依頼して郵送で回収した。

質問内容は，対象者の基本属性(年齢，職業の有無，育児休業取得の有無，配偶者の有無，家族構成，うつ病の既往の有無，妻の産後うつの既往の有無，世帯収入，経済的ゆとり，家族の精神疾患の既往の有無等)，産後うつ(EPDS)，睡眠障害(PSQI)，愛着障害(PBQ；全項目を 4 個の Factor に分けて評価)，疲労度についてである。

4)倫理的配慮

対象者には「調査への協力は，自由意志であり，不参加による不利益を被ることがない」，「データは統計的に処理される」，「質問紙は研究終了後にシュレッダーにかけて処分する」等を書面で説明したうえで，調査への協力を依頼した。本研究は、郵送で行うため同意を得た上で氏名・住所を記入してもらった。本研究は岡山県立大学倫理委員会の承認を得て行った（受付番号 17-11)。

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。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する。

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。ISQI、PBQ、EPDS、家事や育児に費やす時間について相関があるか確認した。

6. 結果

1)対象者　配布数は 31 名、回収数 22 名(回収率 70.9%)であり,22 名(有効回答率 100%)を分析対象とした。

平均年齢は 32.4±3.73(平均±SD)歳で、職業は 22 名全員ありと回答していた。世帯年収は「200～400 万」が 3 名(13.6%),「400 万円以上」が 19 名(86.4%)であった。家族形態では,「核家族」が 21 名(95.5%)であった。精神疾患の有無に関しては,「なし」と回答した人が 22 名(100%)であった。夫婦関係に関しては,「とても満足している」が 17 名(77.3%),「少し満足している」が 5 名(22.7%),「あまり満足していない」が 0 名(0%),「満足していない」が 0 名(0%)であった。

生後 6 ヶ月の児をもつ父親の育児時間は 1 時間以内が 7 割であった。家事時間は 1 時間以内が 82%だった。

2)EPDS 得点

(1) 22 名の概要

EPDS による産後うつの平均得点は 2.2±2.7(平均±SD)点でそのうち cutoff 値 9 点以上を示す人は 1 名(4.5%)であった。

(2) 産後うつの疑いのある対象者の特性

EPDS 得点　9 点以上の対象者に特異的な特徴は認められなかった。

(3) EPDS と産後 6 か月の家事時間・育児時間・疲労度

EPDS と家事時間の相関は r=0.547 で 0.4＜｜r｜≦0.7 の範囲内であるため，正のやや強い相関が認められた。EPDS と育児時間の相関は r=0.031 で 0.2＜｜r｜≦0.4 の範囲外であるため，相関は認められなかった。疲労度は r=0.122 であり，相関は認められなかった。

3)PSQI 得点

(1) 22 名の概要

PSQI 得点の平均は 3.5±2.2 (平均±SD)点で，cutoff 値 5.5 点以上(睡眠障害あり)の対象者は 3 名(13.6%)，5.5 点未満(睡眠障害なし)の対象者は 19 名(86.4%)であった。夜間睡眠中の中途覚醒の理由は「児の世話のため」8 名(36.4%),「トイレのため」8 名(36.4%)であった。

(2) 睡眠障害の有無と睡眠関連因子

PSQI 得点が cutoff 値 5.5 点以上で添い寝をしている対象者は 3 名(13.6%)，していない対象者は 0 名(0%)であった。cutoff 値 5.5 点未満で添い寝をしている対象者は 10 名(45.5%)，していない対象者は 9 名(40.9%)であった。cutoff 値 5.5 点以上で児の夜泣きがある対象者は 2 名(9.1%)，ない対象者は 1 名(4.5%)であった。cutoff 値 5.5 点未満で児の夜泣きがある対象者は 8 名(36.3%)，ない対象者は 11 名(50%)であった。cutoff 値 5.5 以上で睡眠の質が良いと回答している対象者は 1 名(4.5%)，悪いと回答している対象者は 2 名(9.1%)，cutoff 値 5.5 点未満で睡眠の質が良いと回答している対象者は 15 名(68.2%)，悪いと回答している対象者は 4 名(18.2%)であった。cutoff 値 5.5 点以上で疲労度が平均 6.1 点以上の対象者は 2 名(9.1%)，平均 6.1 未満の対象者は 1 名(4.5%)であった。cutoff 値 5.5 点未満で平均 6.1 点以上の対象者は 9 名(40.9%)，平均 6.1 点未満の対象者は 10 名(45.5%)であった。cutoff 値 5.5 点以上で EPDS が cutoff 値 9 点以上の対象者は 0 名(0%)，9 点未満の対象者は 3 名(13.6%)であった。cutoff 値 5.5 点未満で EPDS が 9 点以上の対象者は 1 名(4.5%)，9 点未満の対象者は 18 名(81.8%) であった。cutoff 値 5.5 点以上で Factor1 が cutoff 値 12 点以上の対象者は 3 名(10.3%)，12 点未満の対象者は 9 名(31.0%)であった。cutoff 値 5.5 点未満で 12 点以上の対象者は 2 名(6.9%)，12 点未満の対象者は 11 名(37.9%)であった。cutoff 値 5.5 点以上で Factor2 が cutoff 値 13 点以上の対象者は 0 名(0%)，13 点未満の対象者は 12 名(41.4%)であった。cutoff 値 5.5 点未満で 13 点以上の対象者は 1 名(3.5%)，13 点未満の対象者は 12 名(41.4%)であった。cutoff 値 5.5 点以上で Factor3 が cutoff 値 10 点以上の対象者は 0 名(0%),10 点未満の対象者は 12 名(41.4%)であった。cutoff 値 5.5 点未満で 10 点以上の対象者は 0 名(0%),10 点未満の対象者は 13 名(44.8%)であった。cutoff 値 5.5 点以上で Factor4 が cutoff 値 3 点以上の対象者は 0 名(0%)，3 点未満の対象者は 12 名

(41.4%)であった。cutoff 値 5.5 点未満で 3 点以上の対象者は 0 名(0%)，12 点未満の対象者は 13 名(44.8%)であった。

4) 疲労

(1) 22 名の特性

疲労度の平均は 6.1±2.8(平均±SD)点であった。VAS には cutoff 値が制定されていないため，平均値 6.1 点を cutoff 値とした。cutoff 値 6.1 点以上の対象者は 11 名(50%)，6.1 点未満の対象者 11 名(50%)であった。

(2) 疲労度と産後 6 か月の家事時間・育児時間

疲労度と，産後 6 か月の家事時間・育児時間について分析した。疲労度が平均 6.1 点未満の対象者で家事時間が「0 分」が 0(0%)，「3 分以内」が 6 名(27.2%)，「30 分から 1 時間」が 4 名(18.1%)，「1 から 2 時間以内」が 1 名(4.5%)，「2 時間以上」が 0 名(0%)であった。6.1 点以上の対象者で家事時間が「0 分」が 2 名(9.1%)，「30 分以内」が 6 名(27.2%)，「30 分から 1 時間」が 2 名(9.1%)，「1 から 2 時間以内」が 1 名(4.5%)，「2 時間以上」が 0 名(0%)であった。疲労度が平均 6.1 点未満の対象者で育児時間が「0 分」が 0 名(0%)，「30 分以内」が 2 名(9.1%)，「30 分から 1 時間」が 7 名(31.8%)，「1 から 2 時間以内」が 2 名(9.1%)，「2 時間以上」が 0 名(0%)であった。6.1 点以上の対象者で育児時間が「0 分」が 1 名(4.5%)，「30 分以内」が 1 名(4.5%)，「30 分から 1 時間」が 5 名(22.7%)，「1 から 2 時間以内」が 3(13.6%)，「2 時間以上」が 1 名(4.5%)であった。

5) PBQ 得点

(1) 22 名の概要

Factor1(impaired bonding: 愛着不全)，Factor2(rejection and anger: 拒否と怒り)，Factor3(anxiety about care: 児への不安)，Factor4(risk of abuse: 虐待リスク)のいづれの cutoff 値を上回った者はいなかった。

(2) PBQ と産後 6 か月の家事時間・育児時間

Factor1 と家事時間の相関は r =0.252 で 0.2<｜r｜≦0.4 の範囲内であるため低い正の相関が認められた。Factor3 と育児時間の相関は r=−0.229 で 0.2<｜r｜≦0.4 の範囲内であるため低い負の相関が認められた。Factor2、Factor3 と家事時間の相関は認められなかった。Factor1、Factor2 と育児時間の相関は認められなかった。

6) 睡眠障害(PSQI 得点)と疲労，EPDS 得点，PBQ 得点

(1) PSQI と疲労の相関

PSQI と疲労に相関は見られなかった。

(2) PSQI と EPDS の相関

PSQI と EPDS の相関係数は r=0.429 であり，0.4<｜r｜≦0.7 の範囲内であるためやや強い正の相関が認められた。

(3) PSQI と PBQ の相関

PSQI と Factor1 から Factor4 の相関を検討した。相関が認められたのは，Factor1(愛着不全) r=0.429，Factor2(拒否と怒り) r=0.392，Factor3(児への不安) r=0.365 であり弱い正の相関が認められた。

7. 考察

1) 対象者の特性

対象者の職業の有無に着目すると，対象者全員が「あり」と答え，世帯収入「200 万円未満」に該当する者はいなかった。厚生労働省調べ[1]によると，日本の 2019 年の世帯年収平均額は 560.2 万円であり，中央値は 442 万円である。周(2019)[2]によると児童虐待が発生する背景には母親の病理的要因のみならず，経済環境と社会環境も影響しているが、今回の調査対象者の中に貧困層に該当する者はいなかった。このことは本研究の対象者のバイアスとして意識しなければならない。

育児休業は 1 名(4.5%)が取得しており，日本における平成 30 年度の男性の育児休業取得率は 6.16%であった[1]。中村ら(2016)[3]の報告では，63 名中育児休業を取得したい父親は 29 名いたが，実際取得した父親は 16 名であった。取得した休暇期間で最も多かったのは「出産当日」6 名，「出産から 1 週間」「出産から 1 カ月」が各 5 名で，自営業で休暇が取れた父親は 1 名であった。育児休業を取得しやすいと答えた父親は 19 名，その理由は「会社の理解がある」「上司の理解がある」，取得しにくいは 41 名，

「会社の理解がない」「代わりがいない」「仕事への支障」が理由であった。このように，現在，日本では育児休業取得を推奨しているが，実際には上記の理由により取得できない環境があり，伴って育児時間も十分に確保できていないと考えられる。さらに，千葉(1996)[4]によると日本の父親の子育てへの関わりは韓国，タイ，アメリカ，イギリス，スウェーデンの6か国の中で最も弱いとされている。本研究でも，育児時間，家事時間ともに1時間以内であり，父親の関わりが少ない傾向があった。

対象者は全員核家族であった。板東ら(2012)[5]は，核家族では子どもが多くても親に頼ることが少なく育児に負担がかかっていると述べている。本研究の対象者も同様に，両親にかかる育児時間や親役割が増大している可能性がある。

2)EPDS 得点

EPDS9 点以上に該当する者は 1 名(4.5%)であった。対象者数は22名と数は少ないが，4.5%が産後うつ疑いの状態にあることは，母親の約 10%に産後うつが見られること[6]と比較し，母親と同様に、父親にうつ症状があり、父親にも産後うつのリスクが存在することが裏付けられた。産後うつ疑いの父親に特異的な背景は見当たらず，産後うつのリスク要因だけに着目していては父親の産後うつを見落とす可能性がある。父親の精神的支援の一環として外来での産後うつスクリーニングを父親対象に使用することや，母親への問診で夫・家族に精神疾患の既往の有無を調査するなど父親に対する支援策を検討する必要がある。

EPDS 得点と家事時間・育児時間・疲労度を分析した結果，EPDS と家事時間は r=0.547 であり，やや強い相関が認められた。保野ら(1995)[7]によると熱中性，徹底性，几帳面などを特徴とするうつ親和性性格と，達成動機が極めて高い，時間的な切迫感が強いなどを行動特性とするタイプA行動者・これと逆の行動特性であるタイプBとの関連を検討した結果，タイプA行動者の方がうつ親和性性格得点は有意に高い値を示した。本研究では家事時間が長い人ほど，EPDS 得点が高く，家事をおざなりにせず，時間をかける人ほど，抑うつのリスクが高まるのではないかと考えた。家事に多くの時間を費やしている父親には，父親の頑張りを認め，労うとともに，精神的健康や家族関係について観察する必要がある。

3)PSQI 得点

PSQI 得点 cutoff 値 5.5 点以上の睡眠障害と疑われる者が3名(13.6%)であり，阿倍野ら(2019)によると生後 3～4 カ月の児をもつ父親で睡眠障害が疑われる者は23名中10名であり 43.5%であった。3，4か月児の父親に比べ，6 か月児の父親は睡眠障害の者が減少している。乳児は生後4か月を越えると，授乳間隔が3時間から4時間に伸び，深夜は熟睡するようになる。本研究においても中途覚醒の理由は児の世話が多く，父親の睡眠障害が改善されたのは，夜間の乳児の世話の頻度が少なくなったためと考えられる。

4)疲労

疲労得点 cutoff 値 6.1 点以上の者が 11 名(50.0%)と，半数を占めた。

5)PBQ

Factor 間の相関関係はなく，Factor1(愛着不全)が高値の人が，Factor2(拒否と怒り)，Factor3(児への不安)，Factor4(虐待リスク)が高いわけではなかった。

6)睡眠障害と疲労，EPDS，PBQ

(1) PSQI と疲労

PSQI と疲労には相関は認められなかった。児の成長とともに夜間睡眠時間が増え，父親の睡眠障害も改善されたが，疲労はいまだ，5 割の者が強く感じていた。

(2) PSQI と EPDS

PSQI 得点と EPDS 得点の間には，やや強い正の相関が認められたため，睡眠障害と父親の産後うつには関連があると考えられる。睡眠不足や睡眠障害が長期間持続すると，生活習慣病やうつ病などになりやすくなることが知られており，本研究の結果も，先行研究の結果と一致していた。6 か月の児を持つ父親の睡眠障害は軽減していたが，4 か月までは43.5%が睡眠障害であったという報告もあり，乳児期の早い時期には，父親の睡眠障害へのアプローチが産後うつ防止に効果がある可能性がある。

(3) PSQI と PBQ

睡眠障害である人ほど愛着不全であるというやや強い正の相関があった。夜間睡眠中の中途覚醒の理由として「児の世話のため」「トイレのため」を挙げている人が多く，睡眠障害の一因となっている可能性がある。児に関わることは児への愛着を高めると考えられるが，夜間の睡眠が障害されることは愛着不全に関係していた。睡眠障害が 6 か月になっても改善しない場合は，睡眠改善のための保健指導を実施することを考慮する。

(4) 育児期の父親への支援

PSQI と EPDS，PBQ にそれぞれ相関がみられた。睡眠障害のある人ほどうつ傾向になりやすく，睡眠障害のある人ほど愛着不全になりやすい。また高橋ら(2011)は，産後の児への愛着形成に関連する要因は変化するが，各時期に適切なケアや支援を行うことが先に続く児への愛着に繋がると述べている。仕事，家事，育児負担のバランスが重要であり，父親学級等の育児準備教育，育児休暇取得の促進，睡眠不足や疲労に対する生活指導など父親役割獲得の段階に応じた支援を行う必要があると考える。

8. 結論

本研究は，育児期の父親の産後うつと睡眠障害，疲労，児への愛着の実態を明らかにすることを目的に，生後 6 か月の子どもをもつ父親を対象に産後うつと睡眠障害，疲労，児への愛着を測定する自記式質問紙法を実施した。得られた結果は以下である。

1)産後うつ疑いのある対象者は 1 名(4.5%)で，その背景に特別な要因は認められなかった。

2)EPDS と家事時間に強い正の相関が認められた。

3)PSQI で睡眠障害あり 3 名(13.6%)，なし 19 名(86.4%)であった。

4)PSQI と疲労において相関はみられなかった。

5)PSQI と EPDS においてやや強い正の相関がみられた。

6)PSQI と PBQ における Facyor1(愛着不全)においてやや強い、Factor2(拒否と怒り) 、Factor3(児への不安)において低い正の相関がみられた。愛着形成において睡眠が影響を及ぼす可能性が示唆された。

7)睡眠障害に対して支援を行うことで，愛着形成の促進，育児不安の軽減やうつの予防につながると考える。

8)対象者の半数が強くが疲労を感じていた。

9)Factor1(愛着不全)と家事時間に相関がみられた。

10)仕事，家事，育児負担のバランスが重要であり，父親学級等の育児準備教育，育児休暇取得の促進，睡眠不足や疲労に対する生活指導など父親役割獲得の段階に応じた支援を行う必要がある。

文献

1) 厚生労働省，国民生活基礎調査の概況 https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa17/dl/03.pdf (2019 年 12 月 5 日)

2)周燕飛(2019)．母親による児童虐待の発生要因に関する実証分析．医療と社会，29(1)，119-133.

3)中村朋子，斎藤充子，田邊康恵ら(2016)．男性が考える父親の育児支援の研究.母性衛生,57(3),266.

4)千葉聡子(1996)．国際比較調査からみた日本の父親の子育ての現状と問題点．教育学部紀要 文教大学教育学部，30，139-150.

5)板東正己,平澤久一,田中静枝,津島和美(2012)．パタニティーブルーの精神的・心理的視点 我が児の誕生に伴う父親の心理的動揺と変化に関する実態調査．関西医療大学紀要，6，139-146.

6)岡野禎治(2009)．産後うつ病と育児支援．精神経誌，111(4)，432-439.

7)保野孝弘，島田修，宮田洋(1995)．大学生における TypeA・B 行動特性とうつ状態との関連．川崎医療福祉学会誌，5(2)，187-190.

機械学習を用いた熱可塑性炭素繊維強化プラスチック溶着接合の強度・品質予測

岡山県立大学

金崎真人

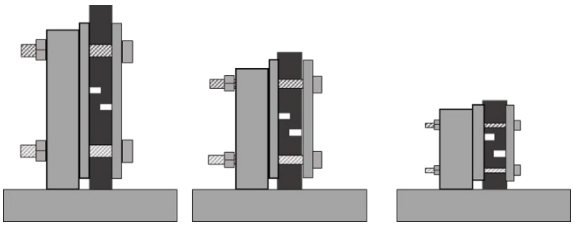
本研究ではプロセス後の強度・品質評価の難しい炭素繊維強化熱可塑性樹脂の溶着接合において，使用する材料や寸法，成形条件などを説明変数とし，成形した試験片の強度あるいは品質（試験片からの樹脂流出などの不整の量）を目的変数とした，多変量解析や機械学習といった統計的な整理手法での品質予測方法の模索・構築を目的とする．初年度では，機械学習の予測に用いる試験片を作製するための環境の構築，小型の試験片を用いて従来手法と同様の結果を得られるような試験方法の模索を行なった．これらの検討を通して、少ない材料で大量に試験片を作製でき，機械学習のデータ取得を容易にする実験手法の確立を目指した．この結果，試験片長手寸法を従来試験法の半分としても従来通りの実験結果が得られることが明らかとなった．また，試験片を作製するための環境を構築できた．

1. 緒言

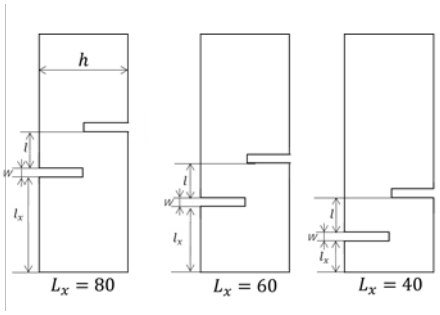
炭素繊維強化熱可塑性樹脂複合材料（以下 CFRTP）は，熱融着が可能という利点があるが，繊維と樹脂の組み合わせが多様であり．よって最適な条件も異なる．そこで，新しい系においても強度・品質予測ができる可能性のある方法として機械学習の適用が考えられる．しかし，機械学習の為には試験片を多く作製する必要がある．その解決策として，試験片長さの短い試験片の作製が考えられる．

比較的小さな試験片で CFRTP の熱融着を行った面の強度できる評価方法に，目違い切欠き圧縮試験という手法がある [1,2]．短冊形状試験片の中央部に，両表面から並行で互い違いに厚さの半分以上の深さとなる切込みを入れた試験片を用いる（Fig.1（a）左）ことで試験片の層間せん断強さを試験片の圧縮により求める方法である．圧縮試験を行う際は，試験片の面外変形を防ぐため治具を用いる．この試験の標準試験片長さは 78mm である．ここで，より短い試験片長さで既存試験法と同様の結果を得ることができれば，より大量の試験片を作製し，データ数を増やすことができると考えられる．一方，短くした試験片長さに合わせて治具の寸法も変更する必要があり，適した全長が不明な段階で個々に治具を準備するのは難しい（Fig.1(a)）．

そこで，本試験では切欠き位置を変えることで短い試験片を模擬する方法を考えた（Fig.1(b)）．この方法を用いて既存試験法の試験治具を使用しつつ試験片長さと強度・破壊形態の変化を評価した．そのうえで，短い試験片を模擬した試験片でも規格と同等の試験が実施可能か検討した．



(a) In order to perform tests using short test specimen and evaluate its validity in test method for interlaminar shear strength by double-notch specimen, it is necessary to prepare fixtures corresponding to the length.



(b) To model the short specimen, authors changed double-notch position.

Fig.1 Schematic diagram of double-notch position to model short specimen

2. 材料および実験方法

2.1 目違い切欠き圧縮試験片の作製方法　一方向セミプレグシートを積層することで 2 種類の積層板（$[0]_{96}$および$[0/90]_{24S}$）を作製した．ここで，このセミプレグシートは炭素繊維（㈱東レ T700SC）ならびにポリアミド 6（polyamide 6，以降 PA6）から成り，繊維体積含有率は 54%である．また，積層板の成形にはホットプレスを用い，圧力 1.5 MPa，温度 240 ℃で 30 min 保持したのち徐冷した．このとき，Fig.2 に示すシアエッジ金型を用いて繊維体積含有率の変化を可能な限り抑えた．試験片寸法は長さ 80 mm，幅約 13 mm となるように切り出し，自作治具を用いて板厚 $h/2$となるよう切欠きを導入した．板厚は約 4mm，切欠き間隔は約 6.6 mm，切欠き幅は約 0.9mm とした．

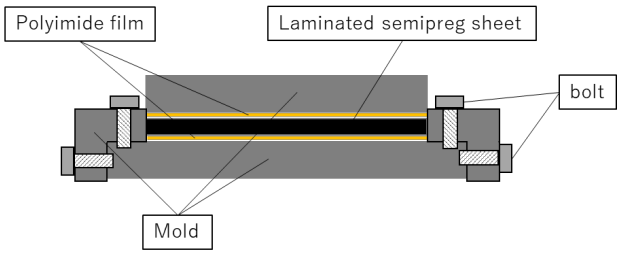


Fig.2 Schematic diagram of shear-edge mold prepared to mold CFRTP laminates without washing out the fibers

2.2　短い試験片の模擬　1 章に述べたように，本検討では試験片長さを変えずに短い試験片を模擬するために，切り欠き位置を移動させる．試験片下端から切欠き位置までの距離l_xは式(1)により求めた．

$$l_x = \frac{L_x}{2} - \frac{l}{2} - w \qquad (1)$$

ここで，L_xは模擬する試験片長さ，lは切欠き間隔，wは切欠き幅を表す．L_xは 40 mm，60 mm，80 mm の 3 通りとした．

2.3 目違い切欠き圧縮試験　JIS K 7076 に規定する A 法用のジグおよびL 形台座を用いて，油圧サーボ式強度試験機（EHF-EB50KN-10L，(株)島津製作所）により試験を行った．試験速度は 1 mm/min，試験治具のボルトの締め付けトルクは 0.1 Nm とした．試験片本数は 1 条件あたり 5 本とした．層間せん断強さτ_cは以下の式(2)を用いて計算した．

$$\tau_c = \frac{F_{max}}{bl} \qquad (2)$$

ここでF_{max}は最大荷重，bは試験片の幅，lは切欠き間隔を表す．

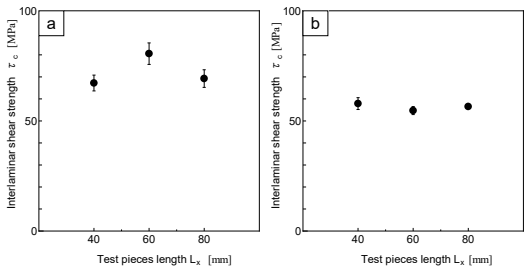
3. 実験結果及び考察

Fig.2 に式(2)により得られた各積層構成における各試験片長さの層間せん断強さを示す．Fig.2 より，各積層構成において，層間せん断強さはL_xによらずほぼ一定であった．

Fig.4 および Fig.5 に代表するように，$[0]_{96}$の積層構成を持つ試験片では，上下切欠き底部からき裂が始まり，それぞれのき裂が直線的に進展した．その後，それぞれのき裂の先端が近づいた時，その付近にある炭素繊維がせん断力により破断しき裂が繋がったと考えられる．以上の破壊形態はL_xにかかわらず，どの試験片も同様であった．

Fig.6 および Fig.7 に代表するように，$[0/90]_{24S}$の積層構成を持つ試験片では，上下切欠き底部からき裂が始まっていることがわかった．また，き裂起点部の炭素繊維に樹脂が付着していなかったことから，き裂は中央の樹脂層と炭素繊維層の層間から始まったと考えられる．き裂には炭素繊維層に沿って直線的に進むものと，樹脂層内を斜めに進んでいるものがあり，上下切欠き底部から入ったき裂は中央の樹脂層内で繋がっていた．以上の破壊形態はL_xにかかわらず，どの試験片も同様であった．

以上から，どの試験片でも本試験法における層間せん断強さが得られたと言える．また，同じ積層構成であれば層間せん断強さ，破壊形態はどちらもL_xによらずほぼ同じ値，形態を示した．



(a) $[0]_{96}$　(b) $[0/90]_{24S}$

Fig.3 Relationship between interlaminar shear strength and test peace length L_x

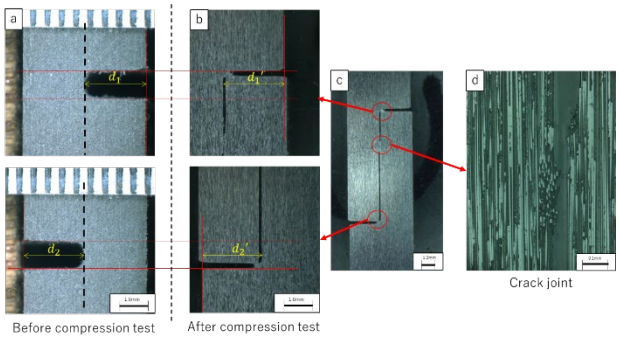


Fig.4 Cross section of L_{x80} in $[0]_{96}$

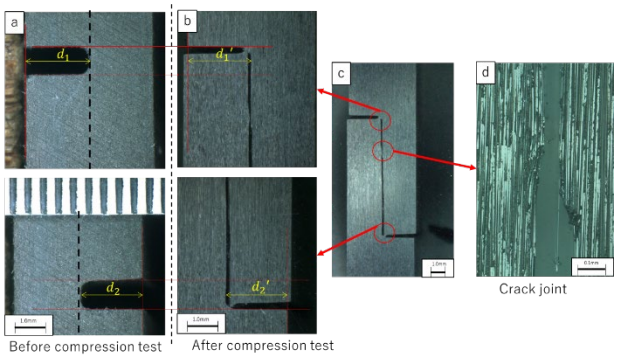


Fig.5 Cross section of L_{x40} in $[0]_{96}$

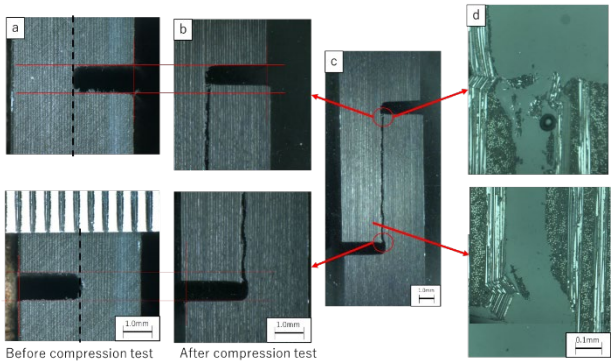


Fig.6 Cross section of L_{x80} in $[0/90]_{24S}$

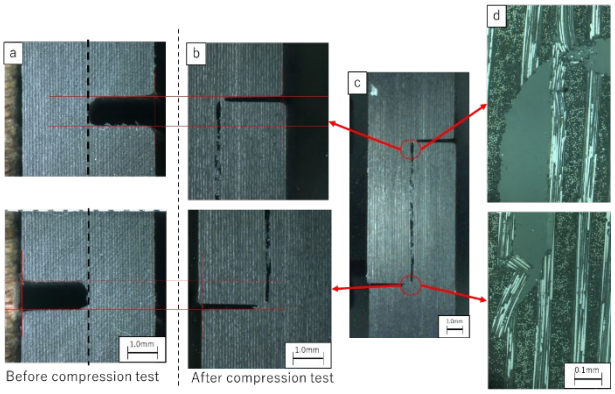


Fig.7 Cross section of L_{x40} in $[0/90]_{24S}$

4. 結言

本試験では, 試験片を大量に作製することを目標に試験片長さの短縮を模擬するため，試験片下端から切欠き位置までの距離を変えて目違い切り欠き圧縮試験を行い，層間せん断強度と破面観察による比較を行った．$[0]_{96}$，$[0/90]_{24S}$ どちらの積層構成においても L_{x40} と L_{x80} の層間せん断強さに大きな差異がなかった．さらに，破断部の断面観察により，すべての積層構成の試験片で層間から破壊が始まっていることが分かり，L_x の違いによらず$[0]_{96}$，$[0/90]_{24S}$ ごとに破壊形態が同様であったので，本試験法における層間せん断強さを得ることができた．

以上の結果から，少なくとも本研究に用いた CF/PA6 積層板においては, 機械学習に用いるための多くの試験片を作製するのに適した全長 40mm の試験片を作製し，試験を行っても問題ないということが実験的に示された．

謝辞

本研究を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．

参考文献

1) JIS K 7092 (2005).
2) CF/PA6 積層板内の熱融着による層間はく離修復部に対する実験的強度評価手法の提案，金崎真人，田中基嗣，斉藤博嗣，鵜澤潔，北條正樹，金原勲，材料システム，34，pp.29-33，2016.
3) Effects of Repair Temperature and Duration in Thermal Fusion Bonding on Interlaminar Shear Strength of Delaminated CF/PA6 Laminates，T. Ueda, T. Matsumoto, M. Kanesaki, H. Saito, K. Uzawa, I. Kimpa , Advanced Experimental Mechanics，3，pp.147-151，2018.

電力システムに対するスケーラブル制御器の開発

岡山県立大学 情報工学部 情報システム工学科

泉 晋作

（**概要**）本研究では，電力システムのスケーラブル制御（システムの規模に依存しないような制御）について検討する．具体的には，すべての発電機の制御器が「同じ」であるという制約のもとでの制御を考える．スケーラブル制御においては，1 つの制御器を設計するだけで全発電機の制御器が設計できるため，大規模な電力システムの制御器設計を効率よく行うことが可能となる．本研究では，フィードバック系の安定性を保証し，かつ良好な時間応答を実現するスケーラブル制御器の開発に取り組んだ．そして，発電機の制動力に着目したスケーラブル制御器を提案するとともに，結果として得られるフィードバック系の安定性を証明した．加えて，フィードバック系の時間応答に関する性能を向上させるための制御ゲインの設計法を提案した．これらの結果の有効性は，計算機シミュレーションにより示した．

1 はじめに

電力システムの制御は，制御工学や電力工学の分野において古くから盛んに研究されている．これは，電力が我々の生活に欠かせないものであり，その安定供給が強く望まれているためである．また，最近では，環境問題への対応として再生可能エネルギーの導入が急速に進められているが，こうしたエネルギーの導入は電力システムの運用を困難にすることが知られている．この問題を解決するための鍵として，電力システムの制御は今後ますます重要な研究課題になると予想される．

電力システムの制御に関するこれまでの研究の多くは，各発電機の制御器を「個別に」設計することを前提としていた．しかし，この方法では，対象の電力システムが大規模な場合，制御器設計に多大な時間と労力が必要となる．たとえば，[Dysko et al., IEEE Trans. Power Syst., 2010] で提案された方法を 100 台の発電機（すなわち，100 個の制御器）を持つ電力システムに適用すると，1）制御器 1 を設計する，2）制御器 1 を考慮して制御器 2 を設計する，3)…100）制御器1～99を考慮して制御器100を設計する，という 100 もの手順が必要になってしまう．電力システムは一般に大規模であることに加え，再生可能エネルギーの導入によって今後その規模はさらに拡大すると予想されるため，このことは大きな問題になると考えられる．

そこで本研究では，電力システムの「スケーラブル制御」を考える．具体的には，すべての発電機の制御器が「同じ」であるという制約のもとで，電力システムの制御を考える．このスケーラブル制御においては，1 つの制御器を設計するだけで全発電機の制御器が設計できるため，制御器設計に要する時間と労力を大幅に削減できる．

本研究では，フィードバック系の安定性の保証と良好な時間応答の実現を目的としたスケーラブル制御器の開発に取り組んだ．そして，そのようなスケーラブル制御器の 1 つを明らかにするとともに，その制御ゲインの設計法を考案した．この成果は，国際会議 [1),2)] に採択されるとともに国内学会 [3)] で発表している（文献番号は 5 のものに対応）．

2 問題設定

n台の発電機で構成される電力システムを考える．ただし，各発電機には制御器が備えられているとし，制御器の構造は全発電機で同じであると仮定する．このような制御器をスケーラブル制御器とよぶ．

このとき，本研究では，つぎの問題を考える．

問題 1 以下の(a)，(b)を満たすスケーラブル制御器を求めよ．

(a) フィードバック系の安定性を保証する．

(b) 元の（すなわち，制御していない）システムに比べて良好な時間応答を実現する．

この問題の解法として，よく知られた線形状態フィードバック制御を直接用いることが考えられるが，この方法で解を得ることはできない．実際，n台の発電機すべてを1つの制御対象と考えてフィードバックゲインを設計すると，得られるゲイン行列の要素は一般にすべて異なるため，全制御器が同じという制約は満たされない．この点に，スケーラブル制御の難しさがある．

3 研究成果

本研究では，問題 1 を検討することにより以下の成果を得た．ここで，3.1，3.2 の内容はそれぞれ問題 1 の(a)，(b)に対応する．

3.1 スケーラブル制御器の提案

2 で述べたように，線形状態フィードバック制御による単純な方法では，問題 1 を解くことはできない．そこで本研究では，発電機の特性として知られる制動力（発電機の動揺を抑える力）に着目し，それを活かす制御器を考えた．具体的には，

（正の制御ゲイン）×（発電機電圧の位相角速度）

を出力する制御器を提案した．これは，各発電機の制動力を強化する働きを持ち，制御ゲインをすべての制御器で共通にすることにより，スケーラブル制御器となる．

提案制御器によるフィードバック系の安定性を示すために，電力システムのエネルギーと非線形制御理論に基づく安定性解析を行った．その結果，すべての（正の）制御ゲインの値に対して，元の電力システムの安定性が保存されることを証明した．すなわち，元の電力システムが安定であれば，提案制御器によって，その安定性が保持される．

この結果の有効性を検証するために，$n := 3$のある電力システムに対して計算機シミュレーションを行った．結果の一例として，発電機 1 から 3 に対する位相角$\delta_i(t)$ $(i = 1,2,3)$の時間応答を示したものが図 1 である．ここで，制御ゲインの値は 0.1 とした．制御器がすべて同じであるにもかかわらず，$\delta_i(t)$ $(i = 1,2,3)$はある値に収束しており，フィードバック系が安定化されていることがわかる．

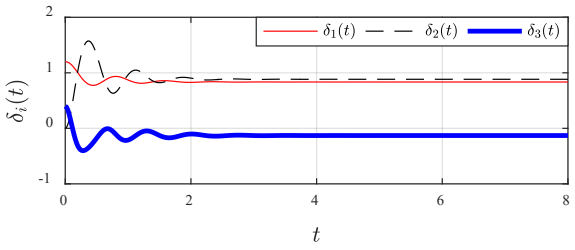


図 1　発電機 1 から 3 に対する位相角の時間応答

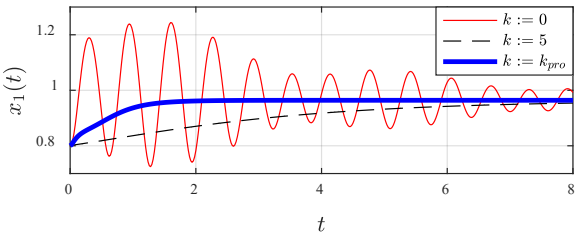


図 2　ある状態変数の時間応答

3.2 制御ゲインの設計

つぎに，フィードバック系の時間応答に関する性能を向上させるための制御ゲインの設計法を検討した．このために，時間応答と制御にかかるコストを評価する指標として，フィードバック系の安定状態からの偏差と制御入力の二次形式で表される評価関数を考え，評価関数と制御ゲインの関係式を導出した．そして，得られた関係式に基づき，評価関数の値を小さくする制御ゲインの設計法を提案した．

提案した設計法の有効性を検証するために，3.1 で扱ったものと同じ電力システムに対して計算機シミュレーションを行った．結果の一例として，ある状態変数$x_1(t)$の時間応答を示したものが図 2 である．ここで，kが制御ゲインを表しており，$k := 0$が制御を行わない場合，$k := 5$が時間応答を考慮せずにゲインを設定した場合，$k := k_{pro}$が提案法によってゲインを設計した場合（この例では，$k := 0.91$）に対応する．図 2 より，提案法を用いたときの$x_1(t)$が最も早く収束していることが確認できる．

4 おわりに

本研究では，電力システムを対象に，スケーラブ

ル制御器の開発に取り組んだ．各発電機の制動力を強化するというアイデアによって，スケーラブル制御器の１つを提案するとともに，フィードバック系の安定性に対する理論的保証を与えた．さらに，時間応答と制御にかかるコストに基づく評価関数を導入し，それを小さくするような制御ゲインの設計法を与えた．これらの結果の有効性は，計算機シミュレーションにより検証した．本研究の成果は，大規模な電力システムの制御器設計にかかる時間と労力の削減につながると期待される．

5 発表論文

1) S. Izumi, K. Nishijima, and X. Xin: Design of Scalable Controllers for Power Systems, Proceedings of the 21st World Congress of International Federation of Automatic Control (IFAC2020), to appear

2) S. Izumi, K. Nishijima, and X. Xin: Scalable Control of Power Networks, Proceedings of the 2019 International Symposium on Nonlinear Theory and Its Applications (NOLTA2019), pp. 517-518 (2019)

3) 泉晋作, 西島健祐, 忻欣：電力システムのスケーラブル制御, 第 62 回自動制御連合講演会予稿集, 2A2-02 (2019)

バグ報告の記述及びソースコードの表現方法が自動不具合箇所特定手法の性能に及ぼす影響についての比較評価

岡山県立大学　情報工学部　情報システム工学科

天嵜　聡介

ソフトウェアのデバッグ作業は労働集約的で非常に時間がかかる．作業に要する時間の削減を目的として，バグ報告からその原因となる部分を自動で特定する手法が研究されている．その多くは情報検索技術を用いており，入力されたバグ報告とモジュールの記述の類似度に基づいてモジュールを疑わしい順に整列する．類似度の計算では記述をベクトル化する必要がある.多くの手法ではベクトル化に数種類の TF-IDF が用いられているのみであり，どのベクトル化手法が不具合箇所の特定手法にとって有用であるか明らかでない．本報告はこの点について行った研究調査について述べる．研究調査では，データが公開された 46 のソフトウェア開発プロジェクトのデータに対して 6 種類のベクトル化手法を適用した．自動不具合箇所特定手法として BugLocator を用いた．その結果，BugLocator で元々用いられていたベクトル化手法でも十分であるケース観察された．しかしながら，より良いベクトル化手法も存在するケースも存在することが明らかとなった.

1. はじめに

ソフトウェアのデバッグ作業は労働集約的で非常に時間がかかる．ユーザから報告されたバグは課題管理システムに登録される．デバッグ作業の第一歩は課題管理システムに登録されたバグ報告を読んで不具合の原因となる箇所を特定するタスク（bug localization）である．ソフトウェアが大規模であるほどこのタスクの負荷は大きい．そこで，多くの研究者が自動で不具合箇所を特定する手法の開発に取り組んできた.

多くの不具合箇所特定手法では情報検索（information retrieval, IR）の技術が利用されている[1].情報検索に基づいた不具合箇所推定手法では，バグ報告はクエリとして，また，ソフトウェアの個々のモジュールはコーパスを構成する要素とみなされる．そして，バグ報告の記述との類似性に基づいてモジュールは順序づけされる.

類似度を計算するためにはバグ報告とモジュールを数値で表す手法が必要となる．多くの不具合箇所特定手法ではベクトル化に TF-IDF[3]を用いる．TF-IDF には様々な派生があり，また，どの派生を用いるかによって情報検索の性能が変化することが知られている[4],[5].多くの不具合箇所特定手法が提案されているが,TF-IDF の派生の一部が用いられているのみである．ベクトル化手法の違いが性能に及ぼす影響についてもほとんど調査されていない.

本報告ではベクトル化手法の違いが不具合箇所特定手法の性能に及ぼす影響について調査した結果を示す．調査項目は以下の２つである.

項目１:ベクトル化手法の違いはバグ報告同士の類似度計算を通じて性能に影響を及ぼすか？

項目２:ベクトル化手法の違いはバグ報告とモジュールの類似度計算を通じて性能に影響を及ぼすか？

調査では，不具合箇所特定手法として BugLocator[2]を用いた.ベクトル化手法としてソフトウェア工学分野で利用されたことがある６つの手法を採用した．性能比較の一般性を考慮して，46 のソフトウェア開発プロジェクトで収集されたデータを用いた．同じ条件における不具合箇所特定の性能を比較することでベクトル化手法を評価した.

本報告の以降の構成は次のとおりである．まず，次節では情報検索技術に基づいた自動不具合箇所特定手法の先行研究について紹介する．続いて第３節では調査に採用されたベクトル化手法について解説する．性能評価のための実験設定は続く第４節で説明

する.第５節で比較評価の結果および考察を述べる.最後に第６節でまとめおよび今後の展望を記す.

2. 関連研究

情報検索技術に基づいた不具合箇所特定手法は数多く提案されている．バグ報告とモジュール間の類似度だけでなく，スタックトレースなどの情報も活用されている.

本報告で実験に用いたBugLocator [2] は過去に修正済みのバグ報告のうち対象となるバグ報告と類似したものを探し，そこで修正されたモジュールはより疑わしいとみなす．また，モジュールとの類似度の計算ではモジュールの規模に応じた補正が行われている.

BRTracer [6] はソフトウェア実行時に発生した例外によって生成されたスタックトレースがバグ報告に記載されていた場合に効果を発揮する手法である.スタックトレースにはメソッド呼び出しの系列が記されており，そこに現れたモジュールはより疑わしいとみなす.BRTracer ではさらにモジュールをより小さい片に分割してそれぞれとの類似度を計算し，最も高い値を代表値とする．バグ報告に記載された不具合がモジュールの一部の動作のみに関連する場合が多いとの仮定に基づいている.

BLUiR [7] はモジュールの中身を種類別に分割することが特徴の手法である．具体的には，モジュールの名前や使用されている変数名などそれぞれとバグ報告との類似度を計算してその合計値を類似度とみなす.

AmaLgam [8] はバグ報告が作成された日付の直近で編集されたモジュールは不具合を含む可能性が高いとみなして順位付けに反映する．また，文献[2],[7]と同様の補正も行なっている.

BLIA [9], [10] は先行手法で提案されたスタックトレース[6], 種類による分割[7], 直近での編集[8]を組み合わせて性能向上を実現している.

Locus [11] は類似度を計算する単位をモジュールの編集差分と差分に添えられたメモにした手法である.

バグ報告とモジュール間の類似度を計算する方法についても様々な改良が提案されている．一般にバグ報告には不要な情報が含まれている．もしくは，十分な情報が含まれていない．そこでバグ報告の内容を前処理で改善する方法が研究されている[12], [13]．例えば，BLIZZARD [12] はバグ報告に含まれる単語の関連性からグラフを作成し PageRank アルゴリズムを用いて重要な単語を抽出する手法である.類似度の計算にはOkapi BM25 [14] が用いられている．バグ報告とモジュールで使用されている単語のミスマッチについても昨今は研究がなされている[15], [16]．例えば，DNNLOC [15]では深層学習を用いてミスマッチを解決しようとしている．この際，TF-IDF に基づいた類似度の値が入力として用いられている.

以上のように数多くの不具合箇所特定手法が提案されているが，そこで用いられているベクトル化手法の種類は一部に限られている．どのベクトル化手法を用いるか検討している研究はほぼ存在しない.不具合箇所特定手法を構成する要素に関する比較研究はいくつか存在するが[17], [18]，ベクトル化手法に関しては種類が少ないため影響の度合いが不明なのが現状である.

3. ベクトル化手法

文献[1]で示されるように，TF-IDF に数多くの派生がある．本研究調査を行うにあたり，ソフトウェア工学分野の文献を調査して，過去の文献で適用されたことのある６つの手法を評価対象に定めた.また，ベクトル化手法と一緒に適用された類似度計算の方法も同時に採用した．以下にベクトル化手法および類似度計算の方法を示す.

3.1. BugLocator で採用された TF-IDF

BugLocator で使用された TF-IDF は以下のとおりである.

$$\begin{aligned} \mathrm{tf}_{i,j} &= \log f_{i,j} + 1, \\ \mathrm{idf}_i &= \log \frac{N}{n_i}, \\ w_{i,j} &= \mathrm{norm}(\mathrm{tf}_{i,j} \cdot \mathrm{idf}_i). \end{aligned}$$

ここで $f_{i,j}$ は単語 t_i が文書（バグ報告やモジュー

ル）d_j に出現する頻度を表す．N はコーパスに含まれるモジュールの総数，n_i は単語 t_i を含むモジュールの数を表す．$w_{i,j}$ は正規化された単語 t_i の重みを表す．類似度の計算にはコサイン類似度が使用された．

3.2. Scikit-learn で採用された TF-IDF

機械学習ライブラリ Scikit-learn で使用されている定義は以下のとおりである．

$$\begin{aligned} \mathrm{tf}_{i,j} &= f_{i,j}, \\ \mathrm{idf}_i &= \log \frac{1+N}{1+n_i} + 1, \\ w_{i,j} &= \mathrm{norm}(\mathrm{tf}_{i,j} \cdot \mathrm{idf}_i). \end{aligned}$$

類似度の計算にはコサイン類似度が使用された．

3.3. Saha らが採用した TF-IDF

BLUiR[7]で使用された定義はオープンソースの情報検索システムである Indri で定義された TF-IDF である[19]．以下に示すように文書 d_j とクエリ q に異なる定義を与えている．

$$\begin{aligned} \mathrm{tf}_{i,j} &= \log \frac{k_1 \cdot f_{i,j}}{f_{i,j} + k1(1 - b + b\frac{\|d_j\|}{\mathrm{ave\_len}})}, \\ \mathrm{tf}_{i,q} &= \frac{k_3 \cdot f_{i,j}}{k_3 + f_{i,j}}, \\ \mathrm{idf}_i &= \log \frac{1+N}{0.5+n_i}, \\ w_{i,j} &= \mathrm{tf}_{i,j} \cdot \mathrm{idf}_i, \\ w_{i,q} &= \mathrm{tf}_{i,q} \cdot \mathrm{idf}_i. \end{aligned}$$

ここで ave_len はコーパス中のモジュールの単語数の平均値を表す．また k_1, k_3, b は調整可能なパラメータを示す．文献[7]と同じくそれぞれを 1, 1000, 0.3 とした．類似度の計算にはコサイン類似度が使用された．

3.4. Binkley らが採用した TF-IDF

文献[2]では Okapi BM25[14]の TF と InQuery formulation[21]の IDF を用いた定義が利用されていた．

$$\begin{aligned} \mathrm{tf}_{i,j} &= \log \frac{f_{i,j}}{f_{i,j} + 0.5 + 1.5 \cdot \frac{\|d_j\|}{\mathrm{ave\_len}}}, \\ \mathrm{idf}_i &= \log \frac{\frac{(0.5+N)}{n_i}}{1+N}, \\ w_{i,j} &= 0.4 + 0.6 \cdot \mathrm{tf}_{i,j} \cdot \mathrm{idf}_i. \end{aligned}$$

類似度の計算にはコサイン類似度が使用された．

3.5. Vale らが採用した TF-IDF

文献［22］で用いられた TF-IDF も Okapi BM25 に基づいたものであった．

$$\begin{aligned} \mathrm{tf}_{i,j} &= \log \frac{(k_1+1) \cdot f_{i,j}}{f_{i,j} + k1(1 - b + b\frac{\|d_j\|}{\mathrm{ave\_len}})}, \\ \mathrm{idf}_i &= \log \frac{N}{n_i}, \\ w_{i,j} &= \mathrm{tf}_{i,j} \cdot \mathrm{idf}_i. \end{aligned}$$

類似度の計算にはコサイン類似度が使用された．

3.6. Extended Boolean

Extended Boolean[23]は文献[22]で触れられていたベクトル化手法である．古典的なモデルを拡張したものであり，部分一致を扱うことができる．その定義は以下のとおりである．

$$\begin{aligned} \mathrm{tf}_{i,j} &= f_{i,j}, \\ \mathrm{idf}_i &= \log \frac{N}{n_i}, \\ w_{i,j} &= \frac{\mathrm{tf}_{i,j}}{\max \mathrm{tf}_{i,j}} \times \frac{\mathrm{idf}}{\max_i \mathrm{idf}_i}. \end{aligned}$$

他のベクトル化手法と異なり，類似度の計算には p-norm 類似度が用いられる．

$$\mathrm{sim}(d_j, q) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{m} w_{i,j}^p}{m}}$$

ここで m は単語数を表す．p は 3 を使用した．

4. 実験

第 1 節に挙げた項目を調査するため，実際の開発プロジェクトから収集されたデータを用いた実験を行った．以下に実験の詳細を示す．

4.1. BugLocator

実験に使用する不具合箇所特定手法として BugLocator[2]を用いた．スタックトレースなどの情報を利用しないため，ベクトル化手法の違いを観察しやすいと考えられたためである．

BugLocator はバグ報告の記述をクエリ，モジュールの集合をコーパスとみなす．また，過去のバグ報告に対応するため修正したモジュールも利用する．新しいバグが報告されるとコーパス内の各モジュールに得点が与えられる．得点は SimiScore および rVSMScore の 2 要素に分けることができる．

表 1：実験に使用したデータセット

Group	Project	# of files (Max)	Major versions	Bug reports
Apache	CAMEL	14,522	60	1,469
	HBASE	2,714	70	836
	HIVE	4,651	21	1,241
Commons	CODEC	115	9	42
	COLLECTIONS	525	7	92
	COMPRESS	254	15	113
	CONFIGURATION	447	11	133
	CRYPTO	82	1	8
	CSV	29	3	14
	IO	227	13	91
	LANG	305	16	217
	MATH	1,617	15	245
	WEAVER	113	1	2
JBoss	ENTESB	252	3	47
	JBMETA	858	5	26
Wildfly	ELY	68	3	25
	SWARM	727	6	58
	WFARQ	126	1	1
	WFCORE	3,598	16	361
	WFLY	8,990	11	984
	WFMP	80	1	3
Spring	AMQP	408	33	108
	ANDROID	305	2	11
	BATCH	1,732	33	432
	BATCHADM	243	4	20
	DATACMNS	604	33	158
	DATAGRAPH	848	4	60
	DATAJPA	330	38	147
	DATAMONGO	622	40	271
	DATAREDIS	551	17	49
	DATAREST	414	23	132
	LDAP	566	5	53
	MOBILE	64	3	11
	ROO	1,109	15	714
	SEC	1,618	42	541
	SECOAUTH	726	7	101
	SGF	695	19	107
	SHDP	1,102	9	45
	SHL	151	3	11
	SOCIAL	212	4	15
	SOCIALFB	253	5	15
	SOCIALLI	180	1	4
	SOCIALTW	153	5	8
	SPR	6,512	12	130
	SWF	808	20	134
	SWS	925	25	174
	Sub-total	61,431	690	9,459

SimiScore はモジュールの修正履歴から過去のバグ報告を探しだし，その内容と新しいバグ報告の内容との類似度を計算することで求められる．合致する過去のバグ報告が複数ある場合は類似度の平均値が用いられる． rVSMScore はバグ報告とモジュールの記述の類似度を表す．TF-IDF に基づいているが記述の長さに応じて一定のペナルティが与えられる．SimiScore と rVSMScore は以下の式で統合される．

$$(1-\alpha)\cdot N(\text{rVSMScore}) + \alpha \cdot N(\text{SimiScore})$$

それぞれ正規化された後に重みαで結合される．この値は 0.3 とした．

4.2. 実験手順

本研究では不具合箇所特定手法の比較評価フレームワークである Bench4BL[24]を用いた．実験では時系列上の前後関係を明確にすること，およびバグ報告内の情報を活用することとした．具体的には，バグ報告は対象ソフトウェアのどのバージョンでバグが発生したか記載してあるものを選択した．また，不具箇所は該当バージョンのモジュールの中から探すこととした．

4.3. データセット

本研究で使用したデータセットは Bench4BL と一緒に配布されているものである．プロジェクト名などの基礎情報を表 1 に示す．データセットは 5 つのレポジトリから収集したものである．プロジェクトの数は 46 である．プロジェクトによってバージョンの数は 1 から 70 と大きく異なっている．また，バグ報告の数，モジュールの数も大きく異なっており，ベクトル化手法の違いによる性能の変化を観察するには適している．

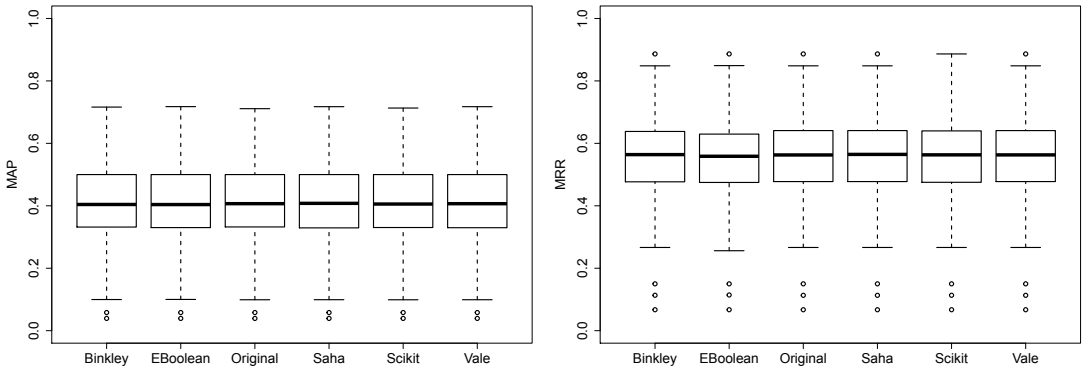
4.4. 性能評価の指標

情報検索に基づいた不具合箇所特定手法の性能は情報検索技術の性能評価と同じ指標を用いることが一般的である．つまり，バグ報告の原因となるモジュールが上位に位置付けられているときに不具合箇所特定手法の性能が高いと言える．先行研究（例えば[2],[6],[7]）などで用いられた MAP (Mean Average Precision)および MRR (Mean Reciprocal Rank)を性能評価に用いた．

5. 結果

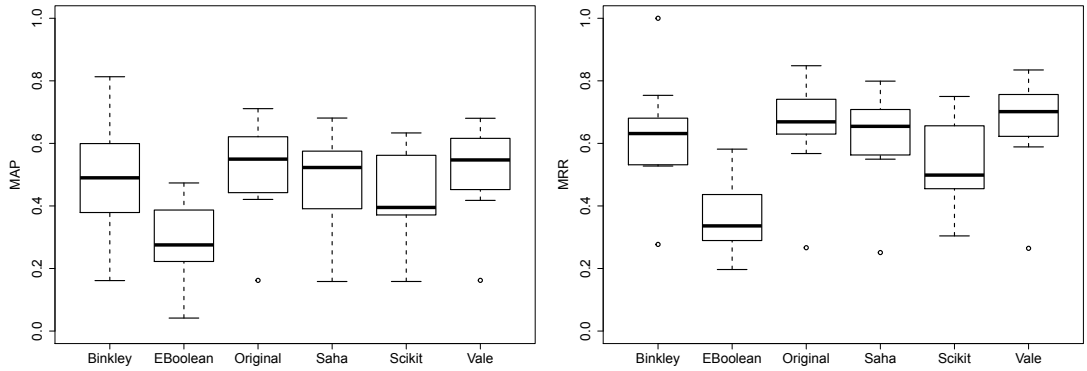
5.1. バグ報告間の類似度計算におけるベクトル化手法の影響

バグ報告間の類似度計算において異なるベクトル化手法を用いた場合の性能の違いを図 1 に示す．図はそれぞれ MAP と MRR の値をプロジェクト毎に計算した結果の箱ひげ図である．図から明らかなように，ベクトル化手法の違いは不具合箇所特定の性能に影響を及ぼしていなかった．つまり，調査項目 1 の結論は，「性能への影響は認められない」となる．SimiScore の計算は従来通りで十分である．



(a) MAP (b) MRR

図 1：バグ報告間の類似度計算におけるベクトル化手法の違いが性能に及ぼす影響



(a) MAP (b) MRR

図 2：バグ報告とモジュール間の類似度計算におけるベクトル化手法の違いが性能に及ぼす影響(Commons)

5.2. バグ報告とモジュール間の類似度計算におけるベクトル化手法の影響

バグ報告とモジュールの類似度計算において異なるベクトル化手法を用いた場合の性能の違いを図 2 に示す．ここでは表 1 の Commons グループの結果のみ示す．図から明らかなように，ベクトル化手法の違いが不具合箇所特定の性能の違いとして現れている．他のグループでも同様の傾向が観察された．

全体の結果を観察すると，Vale らが採用したベクトル化手法が BugLocator で採用したベクトル化手法(Original)より多少ながら高い性能を示した．統計的検定により，この差は有意水準 5%において有意であった．したがって，調査項目２の結論は，「性能への影響は認められる．BugLocator においては本来のものより高い性能を示すベクトル化手法が存在した」となる．

２つの調査項目の結果は，ベクトル化手法を選別することは性能向上に必要であることを示す．

6. まとめ

本報告ではベクトル化手法の違いが不具合箇所特定手法の性能に及ぼす影響について述べた．ベクトル化手法は調整が必要なパラメータの一つであることが明らかとなった．

今後は BugLocator 以外の手法における影響を調査する必要がある．特にモジュールを分割して類似度を計算する BLUiR などでの調査が必要である．

参考文献

[1] C. D. Manning, P. Raghavan, and H. Schütze, Introduction to Information Retrieval. Cambridge University Press, 2008.

[2] J. Zhou, H. Zhang, and D. Lo, “Where should the bugs be fixed?” in Proc. of International Conference on Software Engineering. IEEE, 2012, pp. 14-24.

[3] G. Salton and C. S. Yang, “On the specification of term values in automatic indexing,” Journal of Documentation, vol. 29, no. 4, pp. 351- 372, 1973.

[4] S. E. Robertson, S. Walker, and M. Beaulieu,

"Experimentation as a way of life: Okapi at TREC," Information Processing Management, vol. 36, no. 1, pp. 95-108, 2000.

[5] A. Singhal, "Modern information retrieval: A brief overview," Bulletin of the IEEE Computer Society Technical Committee on Data Engineering, vol. 24, no. 4, pp. 35-43, 2001.

[6] C.-P. Wong, Y. Xiong, H. Zhang, D. Hao, L. Zhang, and H. Mei, "Boosting Bug-Report-Oriented Fault Localization with Segmentation and Stack-Trace Analysis," in Proc. of International Conference on Software Maintenance and Evolution (ICSME). IEEE, 2014, pp. 181- 190.

[7] R. K. Saha, M. Lease, S. Khurshid, and D. E. Perry, "Improving bug localization using structured information retrieval," in Proc. of International Conference on Automated Software Engineering. IEEE, 2013, pp. 345-355.

[8] S. Wang and D. Lo, "Version history, similar report, and structure: putting them together for improved bug localization," in Proc. of International Conference on Program Comprehension. ACM, 2014, pp. 53-63.

[9] K. C. Youm, J. Ahn, J. Kim, and E. Lee, "Bug Localization Based on Code Change Histories and Bug Reports," in Proc. of 2015 Asia-Pacific Software Engineering Conference (APSEC). IEEE, 2015, pp. 190-197.

[10] K. C. Youm, J. Ahn, and E. Lee, "Improved bug localization based on code change histories and bug reports," Information and Software Technology, vol. 82, no. C, pp. 177-192, 2017.

[11] M. Wen, R. Wu, and S.-C. Cheung, "Locus: locating bugs from software changes," in Proc. of International Conference on Automated Software Engineering. ACM, 2016, pp. 262-273.

[12] M. M. Rahman and C. K. Roy, "Improving IR-based bug localization with context-aware query reformulation," in Proc. of ACM Joint Meeting on European Software Engineering Conference and Symposium on the Foundations of Software Engineering. New York, New York, USA: ACM Press, 2018, pp. 621-632.

[13] B. Sisman, S. A. Akbar, and A. C. Kak, "Exploiting spatial code proximity and order for improved source code retrieval for bug localization," Journal of Software: Evolution and Process, vol. 29, no. 1, pp. e1805- 24, 2017.

[14] S. Robertson, H. Zaragoza, and M. Taylor, "Simple bm25 extension to multiple weighted fields," in Proc. of International Conference on Information and Knowledge Management. New York, NY, USA: ACM, 2004, pp. 42-49.

[15] A. N. Lam, A. T. Nguyen, H. A. Nguyen, and T. N. Nguyen, "Bug Localization with Combination of Deep Learning and Information Retrieval," in Proc. of International Conference on Program Comprehension. IEEE, 2017, pp. 218-229.

[16] S. Khatiwada, M. Tushev, and A. Mahmoud, "Just enough semantics: An information theoretic approach for IR-based software bug localization," Information and Software Technology, vol. 93, pp. 45-57, 2018.

[17] S. W. Thomas, M. Nagappan, D. Blostein, and A. E. Hassan, "The Impact of Classifier Configuration and Classifier Combination on Bug Localization," IEEE Transactions on Software Engineering, vol. 39, no. 10, pp. 1427-1443, 2013.

[18] C. Tantithamthavorn, S. L. Abebe, E. A. Hassan, A. Ihara, and K. Matsumoto, "The impact of IR-based classifier configuration on the performance and the effort of method-level bug localization," Information and Software Technology, vol. 102, pp. 160-174, 2018.

[19] C. Zhai, "Notes on the Lemur TFIDF model," Carnegie Mellon University, Tech. Rep., 2001, available as http://www.lemurproject.org/lemur/ tfidf.pdf.

[20] D. W. Binkley, D. J. Lawrie, and C. Morrell, "The need for software specific natural language techniques," Empirical Software Engineering, vol. 23, no. 4, pp. 2398-2425, 2017.

[21] J. Callan, W. B. Croft, and S. M. Harding, "The inquiry retrieval system," in Proc. of International Conference on Database and Expert Systems Applications. Springer-Verlag, 1992, pp. 78-83.

[22] T. F. Vale and E. S. Almeida, "Experimenting with information retrieval methods in the recovery of feature-code SPL traces," Empirical Software Engineering, vol. 39, no. 1, pp. 1-41, 2018.

[23] G. Salton, E. A. Fox, and H. Wu, "Extended Boolean information retrieval," Communications of the ACM, vol. 26, no. 11, pp. 1022-1036, 1983.

[24] J. Lee, D. Kim, T. F. Bissyande, W. Jung, and Y. Le Traon, "Bench4BL: reproducibility study on the performance of IR-based bug localization," in Proc. of International Symposium on Software Testing and Analysis. New York, New York, USA: ACM Press, 2018, pp. 61-72.

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）本研究では，これまでに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を示してきた．しかしアバタ影については，聞き手に対しては必ずしも期待通りの効果が得られない場合もあることが報告されており，アバタ影が対話者とアバタ実体との関係にマイナスの作用をするとき，その作用を和らげる方法を検討する必要がある．そこで，主に聞き手側がアバタ影から受ける違和感を軽減することを目的に，音声入力に基づいて身体引き込み反応を行う植物型オブジェクトを加えたアバタ影システムを開発した．植物型オブジェクトとアバタ影の身体引き込み反応が与えるコミュニケーション効果について，自由対話と役割対話の 2 種類の実験を行い，官能評価から検討を行った．またより影の効果を活用するためにアバタと影による役割を入れ替えて，影を主体的に扱った影アバタシステムを開発している．

1. はじめに

影は普段の生活において強く気にかけることは無いが，実体と切り離すことは不可能な存在であり分身ともいえる．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[1]．このことから仮想空間での影の描画は演出としての役割に加え，対象となるキャラクタやオブジェクトに立体感を与え，仮想空間全体のリアリティの向上の役割を果たしている．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．

著者らは対話者の身体的情報を反映したアバタを身体的アバタと表現し，これまでにこの身体的アバタを介したコミュニケーションにおいて，より効果的な支援システムの開発を目的に検討を行ってきた[2],[3]．また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，有効性を確認してきた[4]．しかし，対話者のアバタ影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，話し手から聞き手に対して童話の語り聞かせを行う役割対話において聞き手側では期待されるほどの効果が得られなかったことが報告されている[4]．これはアバタ実体に対して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と同様な傾向であり，アバタ影がアバタ実体と切り離せない非分離的な関係にあることを示している．

また，先行研究において，仮想空間での対話者の語り掛けに対して効果的なうなずきや身体引き込み反応を行う絵画型オブジェクトや植物型オブジェクトの観客システムが開発されており，様々なコミュニケーション実験によって有効性が示されている[3]．アバタ影については聞き手に対しては必ずしも期待通りの効果が得られない場合もあることが報告されている通り，アバタ影が対話者とアバタ実体との関係にマイナスの作用をするとき，その作用を和らげる方法を検討する必要がある．本研究では，主に聞き手側がアバタ影から受ける違和感を軽減することを目的に，アバタ影と植物型オブジェクトを同一空間で身体引き込み反応させることで，アバタ影と植物型オブジェクトがどのような相互作用を持つのか検討を行った．

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．また，植物型オブジェクトはそれぞれのアバタのそばに一つずつ向かい合う形で配置されており，対話者間のインタラクションを生成・制御し，より効果的なコミュニケーションを実現する．

著者らは従来より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]．アバタ影と植物型オブジェクトは，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．

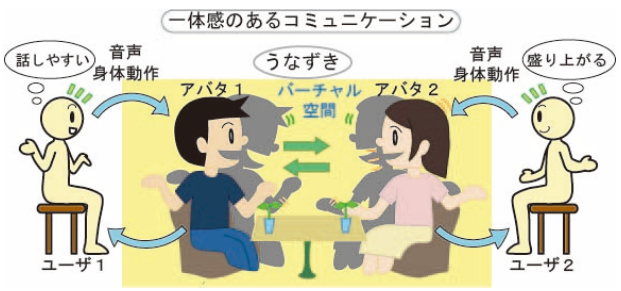


図 1 身体的引き込みアバタ影システムのコンセプト

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

システムを用いて自由対話と役割対話で評価実験を行った．実験の様子を図 2 に示す．実験では以下に示す A～D の 4 つのモードを用意し，それぞれのモードで対話を行うことで評価を行った．

A 従来システム

B アバタ影が反応動作を行う

C 植物型オブジェクトが反応動作を行う

D アバタ影と植物型オブジェクトが反応動作を行う

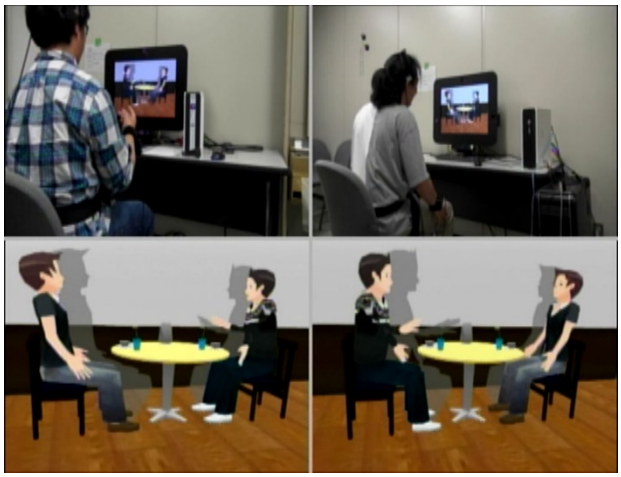


図 2　システムを使用した実験の様子

実験協力者には最初に社会的スキルの計測のため事前調査として kiss-18[7]を実施した．その後各モードの違いの説明を行った．最初に自由対話実験を行い，A～D の 4 モードを 2 分ずつ使用させた．モード終了毎に「楽しさ」「好み」「対話しやすさ」「一体感」「場の盛り上がり」「安心感」の 6 項目について 7 段階評価アンケートを行った．

次に，話し手と聞き手に分かれた役割対話実験を行い，自由対話実験と同じく A～D の 4 モードを 2 分ずつ使用させた．こちらもモード終了毎に 7 段階評価アンケートを行い，上記の 6 項目の他に，話し手側には「相手に話が伝わったと感じたか」，聞き手側には「相手の話を理解できたか」という項目を加え計 7 項目を調査した．本実験では話し手の話す内容についての指示は出していない．また，話し手・聞き手の役割交代は行っていない．

その後，どのモードが総合的に良いと感じるか評価させるために，一対比較を行った．実験者が選択した 2 モードについて自由に切り替えを行いながら使用させ，計 6 回（$={}_4C_2$）比較した．本実験では，対話時の視線を非接触センサにより計測しており，計測を行うことは事前に実験協力者に説明を行った．本実験は友人関係の同性 2 人 1 組で対話を行っており，実験協力者は男性 12 名，女性 12 名の計 24 名である．また，モードの提示順は順序効果を考慮して組ごとにカウンタバランスをとった．

3.2 実験結果

まずモードの総合的な評価としての一対比較の結果表及び Bradley-Terry モデルを想定して好ましさ π を最ゆう推定した結果を図 3 に示す．アバタ影のみ動く B モードと植物型オブジェクトのみ動く C

	A	B	C	D	total
A		10	4	3	17
B	14		11	6	31
C	20	13		11	44
D	21	18	13		52

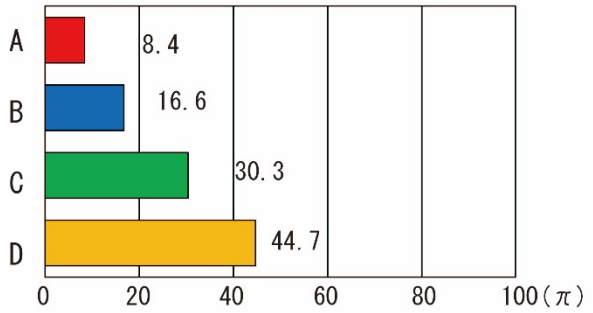


図 3　一対比較評価結果 Bradley-Terry モデルに基づく好ましさ π

	A	B	C	D	total
A		1	1	1	3
B	11		7	2	20
C	11	5		5	21
D	11	10	7		28

	A	B	C	D	total
A		9	3	2	14
B	3		4	4	11
C	9	8		6	23
D	10	8	6		24

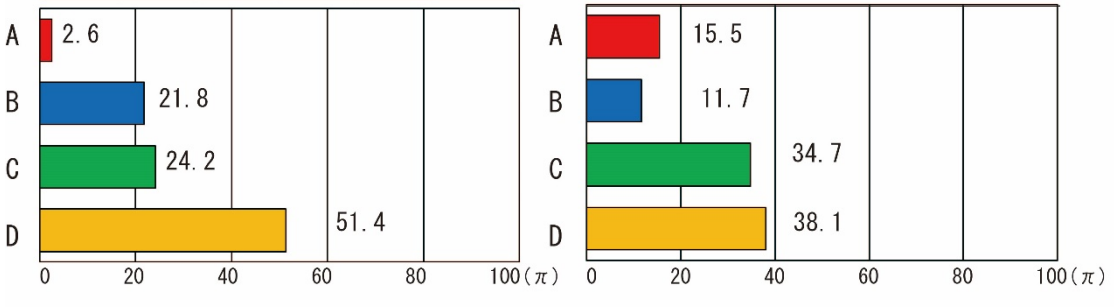


図 4　男女別一対比較評価結果 Bradley-Terry モデルに基づく好ましさ π

	A	B	C	D	total
A		3	1	0	4
B	9		5	3	17
C	11	7		7	25
D	12	9	5		26

	A	B	C	D	total
A		7	3	3	13
B	5		6	3	14
C	9	6		4	19
D	9	9	8		26

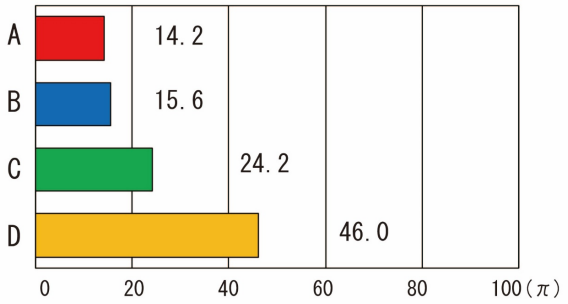


図 5　役割別（話し手・聞き手）一対比較評価結果 Bradley-Terry モデルに基づく好ましさπ

モードを比較すると C モードが高く評価され, 全体ではアバタ影と植物型オブジェクト両方が反応動作を行う D モードが最も高く評価された. 男女別・役割別で見た時のそれぞれの結果と Bradley-Terry モデルによる好ましさπを最ゆう推定した結果を図 4, 図 5 に示す. 女性の一対比較結果では B モードより A モードが高く評価された. 男性の一対比較結果では B モードと C モードの好ましさに大きな差は見られなかった. また, 役割別で見たとき先行研究[3] で報告されていた,「アバタ影が反応動作を行った場合, 聞き手側の好ましさが下がる」という結果は示されなかった. 自由対話実験の 7 段階官能評価の二要因分散分析結果と 7 段階官能評価の結果を図 6 に示す. 因子:植物型オブジェクトは「好み」の項目において有意水準 0.1%で有意差が認められ,「楽しさ」の項目に有意水準 1%で有意差が認められた. また,「対話しやすさ」「場の盛り上がり」の項目に有意水準 5 %で有意差が認められた.

また, 役割対話の 7 段階官能評価の二要因分散分析結果と 7 段階官能評価の結果を図 7 と図 8 に示す. 話し手側の 7 段階官能評価において二要因分散分析を行った結果, 因子 : アバタ影の「相手に話が伝わったと感じたか」の項目において有意水準 0.1 %で有意差が認められた. 聞き手側の 7 段階評価において二要因分散分析で有意差は示されなかったが, 因子:植物型オブジェクトは「対話しやすさ」の項目に p=0.057 で有意傾向がみられた.

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

	①	②	③	④	⑤	⑥
アバタ影	0.901	0.562	0.188	0.836	0.839	0.246
植物型ｵﾌﾞｼﾞｪｸﾄ	0.002**	0.000***	0.035*	0.065†	0.016*	0.438
交互作用	0.710	0.908	0.477	0.303	0.070†	0.698

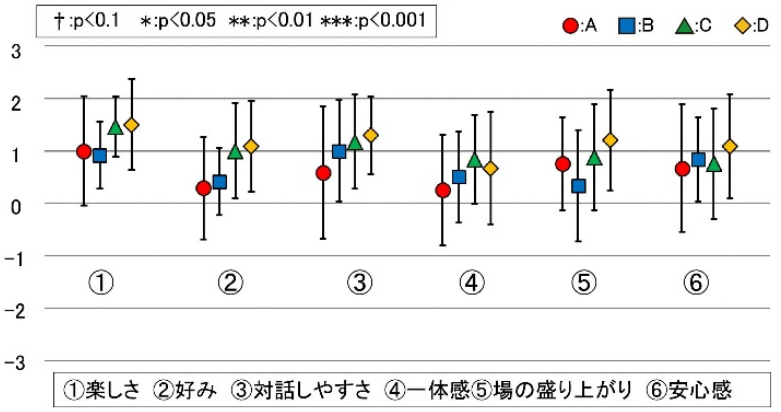


図 6　自由対話における 7 段階評価結果

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
アバタ影	0.258	1.000	0.259	0.219	0.216	0.237	0.001***
植物型ｵﾌﾞｼﾞｪｸﾄ	0.258	0.324	0.093†	0.219	0.755	0.079†	0.243
交互作用	1.000	0.741	0.776	0.378	0.216	0.374	0.615

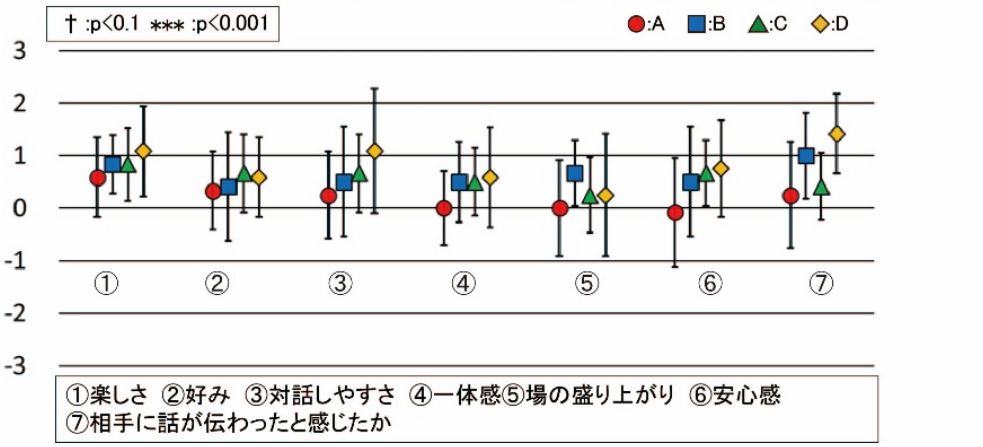


図 7　話し手側 7 段階評価結果

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
アバタ影	0.893	0.411	1.000	1.000	1.000	0.895	0.756
植物型ｵﾌﾞｼﾞｪｸﾄ	0.687	0.173	0.057†	0.250	0.620	0.693	0.535
交互作用	0.503	0.583	0.829	0.643	0.219	0.895	0.756

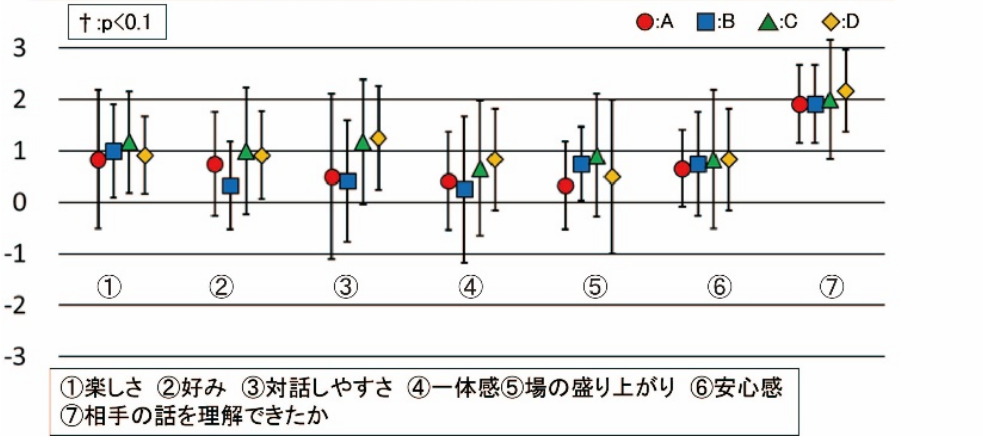


図 8　聞き手側 7 段階評価結果

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. 影アバタコミュニケーションシステム

4.1 コンセプト

本研究では，外見的特徴を表すアバタが対話者の動作では反応せず，影が対話者の動作に連動することで，あたかも影こそが主体であるかのように対話者に感じさせるシステムを提案する．影アバタコミュニケーションシステムのコンセプトを図 9 に示す．この主体となる VA の役割を担う影を影アバタと呼称する．影アバタが主体となることで，対話者に強く影の存在を意識させる．仮想空間におけるアバタ

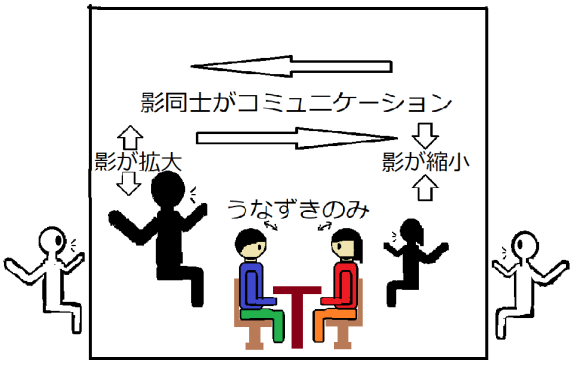


図 9　影アバタシステムのコンセプト

は，一般的に外見的特徴を自由に変更可能であり，そのキャラクタになりきってコミュニケーションが行われる場面が多くみられるが，逆に外見的特徴が制約となる可能性がある．アバタ自体の外見を変化させず，影アバタに変化を加えることで，対話者自身が変化したかの様に錯覚させることができ，主体としての影にアバタでは表現できない特徴的な変化を加えることで，コミュニケーション環境に影響を与えることが可能である．

4.2 アバタと影の主客転倒

主客転倒とは，主体と客体を逆転させることである．先行研究でのアバタと影の関係を図 2 に示す．先行研究では，アバタが主体，影が客体として扱われていた．これは，アバタにうなずき動作を重畳合成させたときに違和感が生じた点を，アバタには変化を加えず，影にうなずき動作を重畳合成することで違和感の軽減を目的として開発されたものである．

4.3 影アバタシステム

本研究で開発したシステムを図 10 に示す．影アバタシステムにおいて，アバタ自体は音声駆動型身体引き込みキャラクタとして動作させ，影アバタは磁気センサ計測によって対話者の動作を連動させる．また，影アバタはアバタから影が切り離されており，アバタよりも外側に配置されている．

本研究では，影に表現させるコミュニケーション特徴量として，対話者の発話量に応じて，影アバタの大きさを変化させる機能を有する．話し手の発話量が多くなるにつれて相手の影アバタを大きくすることで，話し手の発話が抑制される効果が期待される．



図 10　影アバタシステム

5 おわりに

本研究では，音声入力に基づいて身体引き込み反応を行う植物型オブジェクトを加えたアバタ影システムを開発した．植物型オブジェクトとアバタ影の身体引き込み反応が与えるコミュニケーション効果について，自由対話と役割対話の 2 種類の実験を行い，官能評価から検討を行った．また，より影の効果を活用するためにアバタと影による役割を入れ替えて，影を主体的に扱った影アバタシステムの開発を行った．

参考文献

[1] 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).

[2] 瀬島吉裕, 渡辺富夫, 山本倫也 : VirtualActor にうなずき反応モデルを付加した身体的バーチャルコミュニケーションシステム, 日本機械学会論文集（C 編）, Vol.75, No.758, pp.9-16 (2009).

[3] 石井裕, 井上翔太, 渡辺富夫 : 身体的引き込み観客システムを用いたアバタを介した合意形成対話支援，ヒューマンインタフェース学会論文誌, Vol.16, No.4 (2014)

[4] 石井裕, 江崎敬三, 渡辺富夫 : アバタを介したコミュニケーションを支援する身体的引き込みアバタ影システム, ヒューマンインタフェース学会論文誌,Vol.18 No.3 (2016)

[5] 渡辺富夫, 大久保雅史, 石井裕, 中林慶一 : バーチャルアクターとバーチャルウェーブを用いた身体的バーチャルコミュニケーションシステム, ヒューマンインタフェース学会論文誌, Vol.2, No.2, pp.1-10 (2000).

[6] 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).

[7] 菊池章夫 : kiSS-18 研究ノート，岩手県立大学社会福祉学部紀要，Vol.6, No.2, pp.41-51 (2004).

陶芸制作で共鳴する日米文化交流

岡山県立大学デザイン学部造形デザイン学科

作元朋子

西洋から日本の文化の見解を再確認し、グローバル化における現代の陶芸とアートの在り方を再考するため、アメリカ在住の作家３名を招きセラミックの公開制作を行った。また、本大学の教員や学生との交流をもち、滞在制作作品は岡山県立大学関係者の作品と併せて展示公開を行った。滞在作家とのトークイベントやお茶会、地域住民とのクロージングパーティなど、様々な交流事業を通して、地域の文化資源を活用した地域づくりに取り組んだ。

１　参加アーティスト

・Gail Busch

アメリカ在住の陶芸家。多くの作品が美術館に収蔵されている。また、客員教授やゲストアーティストとしても活動している。



図１、２　Gail Busch 作品

・Louis Katz

アメリカ在住、Texas A&M Corpus Christi 大学教授。制作の傍ら論文を多くの陶芸専門誌に寄稿している。



図３　Louis Katz 作品

・石村まなみ

東京出身。アメリカ在住アーティスト。様々な素材を使って彫刻的作品し、国内外で発表している。Texas A&M Corpus Christi 大学を修士修了。



図４　石村まなみ作品

・作元朋子

岡山県在住。岡山県立大学講師。陶磁器の新たな表現を求めて立体造形を制作している。



図５　作元朋子作品

・真世土マウ

岡山県在住。岡山県立大学准教授。古代中南米土器の分析を行い、これらを日本の陶磁器技法によって再創造する研究を行っている。



図６　真世土マウ作品

２　滞在制作

（１）期間　令和元年６月１日(土)～６月２０日(木)

（２）場所　岡山県立大学アトリエ棟（総社市窪木111）及び一鱗（倉敷市玉島中央町１－６－２１）

（３）内容

６月２日（日）:岡山県立大学見学。備前粘土の工場見学、粘土購入。

６月３日～7 日：岡山県立大学にて公開制作。

６月８日：ワークショップ

６月 8～12 日：乾燥、素焼き。

６月 13～18 日：釉がけと本焼き。

６月 20 日：窯出し、展示会場へ搬入設置。



図７　滞在制作、玉島テレビ取材の様子



図８　電気炉への窯づめの様子



図９　様々な焼成を体験（ミニ登り窯）

（４）滞在制作での交流を通して

令和元年６月の１ヶ月間､アメリカテキサス州からルイスカッツ氏、ゲルボッシュ氏、石村まなみ氏が岡山に滞在し、岡山県立大学の教員や学生と制作の日々を共にした。

３名の作品は事前にメールでのやりとりの中で作風を見ていたのだが、例えばルイス氏はプログラミングでろくろの回転をリズミカルに変化させる道具を使ったりするなど、その制作過程そのものがアートのようであり大変興味深かった。完成した作品だ

けでなくその工程を間近で見ることができ、粘土からやきものへ出来上がっていくたくさんの変化の中で起こっているハプニングや深く考えたことが作品に大きく影響していくのは、日本の工芸と共通するものがあった。

備前の粘土を購入するため訪れた工場見学では、採掘し粘土をねかせておく期間が 10 年間も必要だと知り、じっくり待つことで粘り気のある独特の質感をもった素材となることが分かった。日本では、我々が昔から存在しているものの良さを見出し、それを最大限に引き出す能力を持っていることがそのことからも分かる。一方ルイス氏、ゲル氏のアメリカでの様子はどうかというと、粘土も粉末から調合して自分の使い勝手に合うように、練ってすぐ使える状態に作っているそうだ。DIY の精神であり、ないものを自分で生み出す力強さ、そしてそれを楽しむ文化があると感じた。

どちらが良い悪いではなく、そのような違いを感じ尊敬し合えたのは、我々が陶芸という共通点を持っていたからであり、そこからお互いの人間性やその背景にある国、文化を知るきっかけになったと考える。

3　作品展示

（1）期間　令和元年６月２１日(金)～６月２８日(金)、その後規模を縮小して 11 月まで展示

（2）場所　遊美工房（倉敷市玉島中央町１－６－２１）



図 10　展示会場の様子。１階吹き抜け部分



図 11　展示会場の様子。１階窓際

（3）展示作品について

・Gail Busch

瀬戸内の海を見学した体験をもとに、穏やかな色合いを作るテラスジェラータ（化粧土）の技法を用いて表面に装飾を行った大きなポットを滞在にて制作し、出品した。

・Louis Katz

備前粘土を使い、ろくろの回転をプログラミングにより変化させる自作の機械を持ち込み制作した。初めての備前粘土は使い心地や乾燥具合、備前独特の色の変化（藁を巻くことによる緋襷など）に苦戦しながらも多数の器を完成させ展示した。

・石村まなみ

備前粘土を泥漿（粘土を水とケイ酸ソーダで溶いた液状の粘土）にし、折り鶴を浸して電気炉で藁や籾殻に埋めて焼成した。展示ではギャラリー２階の一部屋床一面を何百羽ものやきものの折り鶴で埋め尽くした。

・作元朋子

石膏型を用いて粘土のパーツを作り、それを積層させるオリジナルの技法で磁器の造形作品を制作した。柔らかい粘土であっても出来る限り正確なストライプ模様を作り出すことができた。

・真世土マウ

古代中南米の笛吹きボトルを研究し、音の鳴る土器を制作した。２つの空洞が繋がった形をしており、傾けることによって空気の圧力がかかり内部にある笛がなる仕組みになっている。実演を行い、ギャラリーに美しい音色が鳴り響いた。

（4）展示を通した大学での教育効果について

ギャラリーでの展示は、岡山県立大学デザイン学部造形デザイン学科４年生の卒業研究制作の中間発表としても位置付け、５名の学生（小橋みのり、寺内聖子、菖蒲谷将、田邉由梨、武本牧子）が出品した。

アメリカ在住の作家、教員とギャラリー会場で一同に展示をする試みは、学生にとって貴重であった。公の場で作品をみてもらう経験は、完成度を高くするよう技術を磨くことにつながり、鑑賞者とのコミュニケーションは自分の作品への新たな視点を与えてくれた。作品を制作するだけでなく、展示してみてもらうには広報や展示計画など様々なことが必要であり、それを実践することで教育効果が高まった。また、客観的に自分の作品をみることや、他者との意見交換を通して、卒業までの半年にやるべきことがそれぞれ明確になったと感じた。

４　交流事業

（１）ワークショップ

①日時　令和元年６月８日（土）

②場所　岡山県立大学デザイン学部アトリエ棟

③内容　岡山県立大学の学生とともに西洋の視点を取り込んだ日本の陶芸作品の公開制作を行う。外部からの参加者もおり、体験した作品は後日焼成して郵送した。



図 12　公開制作の様子



図 13　プログラミングろくろの実演

（２）大学での特別講義および意見交換

①日時　令和元年６月 12 日（水）

②場所　岡山県立大学デザイン学部

③内容　Gail Busch、Louis Katz による作家の作品を通してそれぞれの陶芸家の思想を知る。



図 14　特別講義の様子

（３）滞在作家交流イベント

①日時　令和元年６月２３日（日）

②場所　遊美工房（倉敷市玉島中央町１－６－２１）

③内容　参加アーティストとの交流を通じ、考えや作品に込められた思い、コンセプトなどを実際に聞きながら、作品を体感する。県内作家とのお茶会も実施した。



図 14　観覧の様子

（4）地域交流イベント（クロージングパーティ）

①日時　令和元年６月２８日（金）17:00～

②場所　遊美工房(倉敷市玉島中央町１－６－２１)

③内容　地域の住民の方を交え、アーティスト滞在・交流事業を振り返りながら、地域の文化の活性化に向けて交流を深めた。

5　資料

展覧会のチラシや、ポスター、大学内での広報物等も作家同士でやりとりを行いながら制作した。

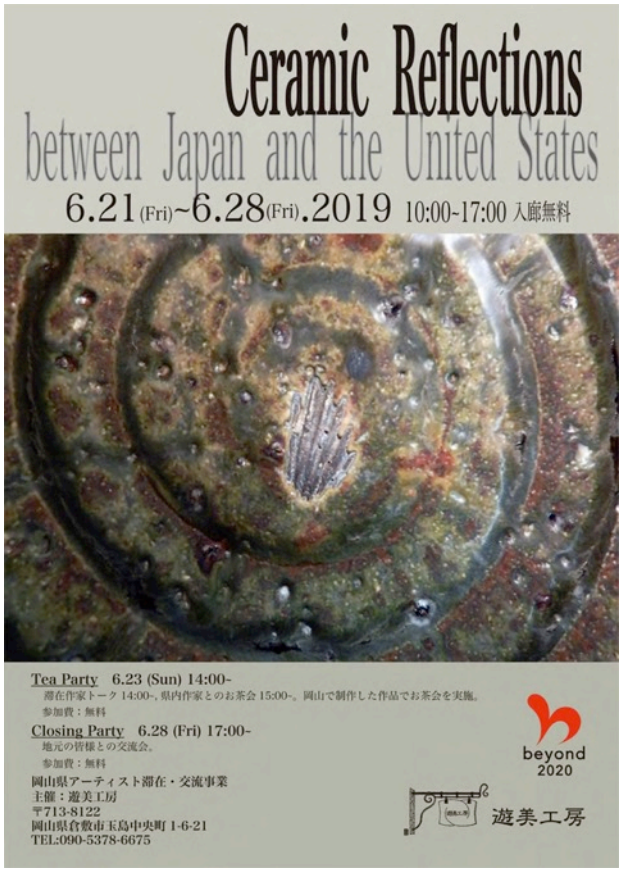


図 15　展覧会チラシ、ポスターデザイン



図 16　展覧会チラシ（裏面）

5　まとめ

日本の「民芸」は近現代のアメリカの陶芸に大きな影響を与え、その精神や美学を取り入れた陶芸が独自に発達している。

日本美学､わびさびをコンセプトに器などを制作する Louis Katz とコップやポットなどの実用品をモチーフに非実用的な陶芸作品を制作する Gail Busch、アメリカにて日本文化をコンセプトに制作する石村まなみの３名をアメリカから招き、西洋から日本の文化の見解を再確認するとともに、グローバル化における現代の陶芸とアートの在り方を再考する機会となり、作品同士が海を超えて呼応し合う場になったのではないだろうか。

本研究での一部様子は、2019 年 8 月 31 日放送、玉島テレビ制作「Ceramic Reflections ～アメリカからやってきた陽気な陶芸家夫婦の滞在記」としてまとめられている。

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

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 月に岡山県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、昨年度行った天神山文化プラザをデザインした前川國男設計事務所による建築物の調査内容に基づき、天神山文化プラザに対するテキスタイルデザインの提案および成果発表として展覧会を実施した。

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、様々な芸術文化活動の発信拠点として活用されている。岡山県ゆかりの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。天神山文化プラザは、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。所在地は、かつて岡山県庁や日米文化センターが存在しており、市民と文化をつなぐ場所として長らく活用されてきた。以上により本研究は、展覧会会場そのものを制作（筆者の専門分野：テキスタイルデザイン）のテーマとして取り上げ、展覧会の開催を通して鑑賞者がその「場所」の文化的価値を再確認するきっかけを与えることをねらいとした。

2. 方法

昨年度は、天神山文化プラザ他全国各地に点在する前川國男設計事務所による建築作品を視察した。本年度は、まず調査内容を分析し、テキスタイルデザインを提案・制作、展覧会にて調査内容および制作物を成果物として総合的に展示する。展覧会名は『Process: play with the site』とし、会場に対する理解に加えて制作背景・経緯に対する理解を促し、在廊する作者（筆者）との対話の機会創出を図る。

3. 調査分析

主題である天神山文化プラザへの見解を深めるために、現存する前川建築設計事務所による作品、主に公共文化施設（美術館・市民会館等）に焦点を当て、訪問調査した。各施設の建築デザインに地域差があるかどうか確認するために各地方に対象を分散させ、次の 23 箇所の施設を対象とした。

- 東北：弘前市民会館[1964]、弘前市博物館[1976]、弘前市緑の相談所[1980]
- 関東：埼玉会館[1966]、埼玉県立博物館[1971]、国際文化会館[1955]、世田谷区民会館[1959]、東京文化会館[1961]、国立国会図書館[1961]、世田谷郷土資料博物館[1964]、学習院大学図書館[1964]、東京都美術館[1975]、国立西洋美術館新館[1979]、学習院女子大学戸山図書館[1982]、神奈川県立図書館[1954]、神奈川県青少年センター[1962]
- 関西：京都会館[1960]
- 中国：天神山文化プラザ[1962]、林原美術館[1963]
- 九州：熊本県立美術館[1976]、福岡市美術館[1979]、熊本県立劇場[1982]、石垣市民会館[1986]

23 施設について、A.地域差と外観意匠、B.周囲環境、C.現在と過去の比較、D.開口部、E.色彩の 5 項目でそれぞれの施設を比較分析し、前川建築および天神山文化プラザの特徴を明らかにした。

A. 地域差と外観意匠

前川建築設計事務所は東京を拠点にしており、圧倒的に関東に件数が多いが、その他地域へも進出している。有孔ブロックや朱色の塗装などの沖縄らしさが反映された石垣市民会館を除き、地域の独自文化が意匠に濃厚反映されている例は少なかった。外観意匠に関してはむしろ、コンクリートから打ち込みタイルへと変遷する前川建築の地域を超えたスタイルの明瞭さが顕著であった。埼玉会館では打込みタイルの外観に完全に移行し、以降このスタイルは確立された方法論として全国各地遍在的である。代表作である東京文化会館と同時期の天神山文化プラザは、翌年の林原美術館と比較して外観意匠の過渡期だといえる。弘前市民会館（写真 1.）と弘前博物館（写真 2.）は隣接して所在し、スタイルの変遷を比較することができる。



写真 1.



写真 2.

B. 周囲環境

公共文化施設を中心に選定した結果、各施設の周囲環境に共通して確認できる要素のうちの一つが「緑」との関係であった。「緑」の例としては、敷地に公園や庭園を含んでいる、史跡等モニュメントに隣接していること等である。前川建築が、崇高なモニュメントの存在を際立たせ、鎮座する領域を市民へ開放させる役割を担っていると窺い知れた。天神山文化プラザは独自に小緑地を所有するだけでなく、岡山城等史跡や他文化施設と隣接しており、前川建築に特徴的な周囲環境形成要件を網羅していた。多数の場所で、敷地内庭園や周辺の植林も設計に含まれ、ケヤキが多用される傾向にあった。（写真 3.）一方、密集住宅地において小緑地はオアシスの役割を果たすが、熊本県立劇場は近隣に「緑」を持たないのが印象的であった。



写真 3（埼玉県立博物館）

C. 過去と現在の比較

天神山文化プラザは、1962 年～2004 年まで岡山県総合文化センターとして図書館を主とする施設であり、現在の第 3・4 展示室はかつて閲覧室であった。この経緯に着眼し、他施設についても竣工当時の雑誌記事と視察調査による現状とを比較した。結果、単純経年ではなく、耐震・老朽化対策・バリアフリー化を目的とした改装や増築が目立った。京都会館や神奈川県青少年センター等は内部の変化があまりにも著しく、東京都美術館や福岡市美術館等は意匠を尊重した復元改装として、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・大幅な増改築がない天神山文化プラザは比較的維持状態が良く、独自の変遷を辿っている。第 3・4 展示室における開口部の封鎖は建築構造への介入はないとはいえ大胆な手法である。（写真 4.、5.）

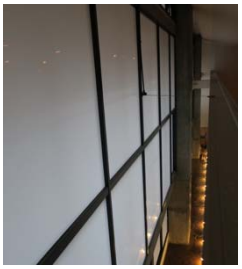


写真 4.



写真 5.

D. 開口部

前川建築では、入場して先に進むと印象的な開口部に遭遇するケースが多数あり、その多くはガラス窓越しにみる中庭や周囲環境などの「緑」に臨む。複数のエントランスをもち、複雑な経路を提案する天神山文化プラザは、西側 2 階外階段から入館して展示室(旧閲覧室)に入室するまでに、まずロビーの開口部(光庭・東)とエントランス上部の開口部(西)の光を同時体験する。現在閉ざされている展示室の北側開口部からは、ロビー部分で経験する光の印象と質が異なり、入り口

通過時に受けるひらかれた体験は印象的であったと考えられる。この手法は、神奈川県立図書館をはじめ多くの類似例があり、入館時とは異なる性質の光と空間を体感させるものである。その他の場所で特徴的なのは熊本県立劇場で、ここではエントランスである西側の開口部を背後に出口まで直進すると、人は建物内部を貫くことようにして動作することになる。

E. 色彩

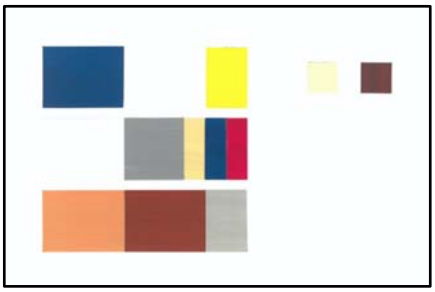


図 1.（天神山文化プラザ）

テキスタイルデザインに取り組むにあたり不可欠である色彩に関して、各施設の主たる空間で用いられている色彩を図 1. のようにそれぞれ取りまとめた。天井・床・壁の各部位毎に分別して使用分量を抽象化することにより、全ての施設を俯瞰することを可能とし、前川建築における色彩使用傾向が明らかになった。特徴的な極彩色使用は東京文化会館が発端だと考えられ、つづく天神山文化プラザは弘前市民会館と類似した。以降、打込タイルの外観に移行するに伴い内部空間にも赤茶タイルが侵入し、より素材感を強調させた意匠が外観との境界を曖昧にする効果をもたらしている傾向があった。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。

それぞれの色彩群を俯瞰すると、天井に多用されているブルーは、外観の変遷に関わらず、東京文化会館から最晩年まで出現しつづけており、最も象徴的なカラーといえる。壁面（垂直面）は、ペールカラーを含み彩度・明度ともに網羅されている。アクセントカラーに関しては、壁面の色彩群をフォローしつつも、鮮明な赤・黄・青（緑）の使用が顕著であった。コンクリートや打ち込みタイルの外観から受ける前川建築のモノトーンな印象と異なり、内部空間から豊かな色彩を抽出することができた。これらの中から天神山文化プラザけでなく前川建築全体に調和する色彩を厳選し、制作で使用するカラーとした。（写真 6.）



写真 6.

以上により、天神山文化プラザの特徴が以下のようにまとまった。

A. 地域差と外観意匠：外観意匠の過渡期
B. 周囲環境：史跡・公園と隣接した前川建築の模範
C. 現在と過去の比較：良好状態だが機能変化が大胆
D. 開口部：入り口と利用空間で光の質が異なる
E. 色彩：東京文化会館系譜の多色使用

F. 内・外の関係

天神山文化プラザのみに対して構造を確認し、内部空間と外部空間の繋がりについて考察を追加する。

改装や使用途が変化しても、「つくり」が大幅に変更されていないことが判明したため、当初の平面図を確認した。典型的なモダニズム建築としてラーメン構造が採用されており、建物中心に貫かれた「穴」が目立っている。この側面には、地上（1 階）から屋上まで聳え立つレリーフ作品『鳥柱』（写真 7.）が施されている。無機質なコンクリートマッスの心臓部に存在するアートワークは、建築そのものを象徴しているように見えるが、全体像を真正面から視界に収めることができるポジションはない。2〜3 階の北側半分は 2 階分の吹き抜けであり、展示室北側は外壁のブレーズ・ソレイユとガラス窓のグリッドが、床から天井まで水平連続窓として覆っている。ルーバーが直射日光を遮りながら、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が、外界とのリンクが弱く感じられる。



写真 7.

4. 制作①

「意匠は窓まわりにある」と前川は述べている。（中田,2006）天神山文化プラザへ提案できるテキスタイルデザインとして、過去と現在で大きく変化を遂げた第 3・4 展示室北面ファサードに着目した。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）だと述べられており、テキスタイルデザインによって空間の印象をソフトにさせることができると考えた。表 2.のように、代表的なモダニズム建築家の自邸では、空間の構成要素としてカーテンが用いられている。幾何学的なデザインを緩和させるかのように、効果的に空間へ落ち着いた雰囲気を導入することに成功しているといえる。布は柔らかい素材であるが、ドレープによって生じる垂直の陰影が空間へ秩序を与えることができると考えられる。

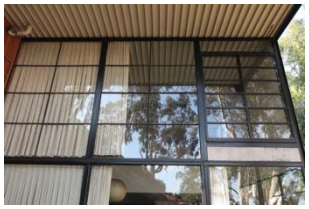
 東京文化会館	 世田谷郷土資料博物館
 イームズ自邸	 ノイトラ自邸
 ファンズワース邸	 トゥーゲンハット邸

表 2.

以上により、モダニズム建築空間でのカーテンの効果が明らかとなった。そこで、現第 3・4 展示室の後付けの壁面パネルを取り払い、かつてのように閲覧室としての機能を携えた空間に戻すことを前提として、２種類のカーテンテキスタイル考案することとした。１つ目は、竣工当時を想定したデザイン、２つ目は現代に対するデザインを提案している。

a. 竣工当時に対する提案

前川建築では、色彩や使用素材等の意匠において、全国の各施設で共通するか、応用されている傾向があった。竣工当初の写真と表記から、国際文化会館の２階分吹き抜けラウンジ空間では、淡オリーブ色と白色の横縞が用いられていたことがわかった。（国際建築,1955）横縞は埼玉会館でも共通していたようである。このことから、当時カーテンを設置されていた場合も横縞が検討される可能性があると想定し、E.での壁面（垂直面）で使用されていた色彩から緑系２色を選出、暖色系とモノトーン系からそれぞれ２色を加えて、合計４色展開のストライプのカーテンをデザインした。設置の際は、ファサードからの自然光の入り方に合わせるように色彩を分散配置し、光の効果で空間利用を明確化した。西陽が入り込むことによって明るくなる東側（学生閲覧室）から、陰になる西側の空間（一般閲覧室）は落ち着いた空間を演出した。（画像 1.）



画像 1.（イメージ）

b. 現在に対する提案

閉ざされた北面ファサードを蘇らせ、かつてのように自然光が入り込む空間として機能することを想定し、２種類のカーテン（スクリーンタイプ・ドレープタイプ）を提案した。新規に導入する要素であっても既存空間と協調するために、天神山文化プラザのデティール部分に既に用いられている幾何パターン（写真 8.）を引用した。岡山県総合文化センター時代から役割を引き継いだ 2004 年開館の岡山県立図書館では、薄手のスクリーンカーテンが用いられている。（写真 9.）これは、現代の窓ガラス機能性向上により、ただ光を遮断するだけではなく内と外のつながりを残したカーテン・ブラインドであるといえるのではないか。

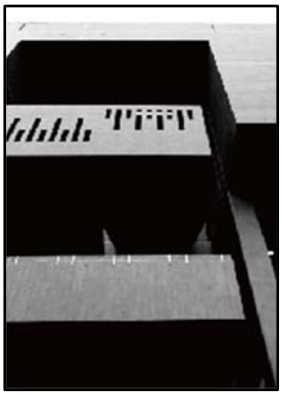


写真 8.



写真 9.

中 2 階部分と、窓枠ユニットの幅が狭い箇所にはドレープタイプを導入し、利用者が容易に光を操作できる機会を設けた。透け感のあるテキスタイルを用いることで、昼・夜で異なる光の効果が期待でき、いつ訪問しても開放的で暗さを感じることがない空間づくりを提案した。（画像 2.）



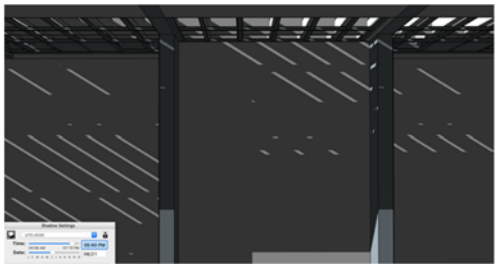
画像 2.（イメージ）

5. 制作②

天神山文化プラザで唯一の個展形式をとる「天プラ・セレクション」において、出展作家は表現の可能性を広げることが求められる。（花田, 2012）そこで、デザインの提案だけでなく、筆者（作者）が主として用いるシルクスクリーンプリント技法による表現としてプリントテキスタイルを制作することとした。これらの作品も 4. の調査分析より前川建築と天神山文化プラザの特徴や要素をインスピレーションとして制作し、展覧会の構成要素としている。それぞれ、I. 天神山文化プラザ第 3・4 展示室、II. ケヤキの木、III. レリーフ作品『鳥柱』をモチーフとした。

I. 天神山文化プラザ第 3・4 展示室

シュミレーションモデルで北面ファサードから入り込む自然光を確認すると、夏至頃夕刻に量が多くなることがわかった。（画像 3.）ブレーズ・ソレイユ自体が差し込む光をかたちづくるため、シュミレーションとはいえ複雑に移り変わる光が床面・壁面へ投影される様子はこの場所でしか起こりえない現象であると考え、プリントテキスタイルのパターンの構成要素とした。投影された光の線を重ね合わせて図案とし、モノクロームの色彩で 3 種作成した。（写真 10.）



画像 3.



写真 10.

II. ケヤキの木

欅（けやき）は、前川建築において顕著な植林のひとつであったことから、必ずモチーフとしてとり上げた作品を制作したいと考えた。このプリントテキスタイルのパターンは、プリント生地そのものが吊るされた時、欅が林立しているかのように見えるように構成している。カラーは、空間で強いアクセントとなる緑と赤を選択し、曲線による描写、直線による描写は異なる色彩利用で展開した。並置することで、林立しているように見える（写真 11.）



写真 11.

III. レリーフ作品『鳥柱』

天神山文化プラザ建物の中心部に設置され、地上から屋上までを貫く『鳥柱』は、この場所を象徴しているといえる。作品の躍動感は、外観で使用されているコンクリートの佇まいと対照的であり、その対比表現を一連のプリントテキスタイルとした。（写真 12.）



写真 12.

6. 成果発表の手法

会場である天神山文化プラザ第 3 展示室は、作品展示用に改装された 6.93m x 31m の空間である。3.調査分析、4.～5.の制作の成果物を同一空間に存在させ、鑑賞者に概要を理解してもらうために、3.調査分析の内容 A.～F.および 4.～5.の制作の成果物 5 種の制作過程をそれぞれの机上に配置することとした。図 2.のように、エントランスを起点として反時計回りに成果物を順に並べ、最奥部分にプリント作品を配置した。（写真 13.）加えて、中二階部分 6.93m x 7.5m の空間へは、文献調査での参考書類を配置することにより、鑑賞者への理解を促進させるようにした。

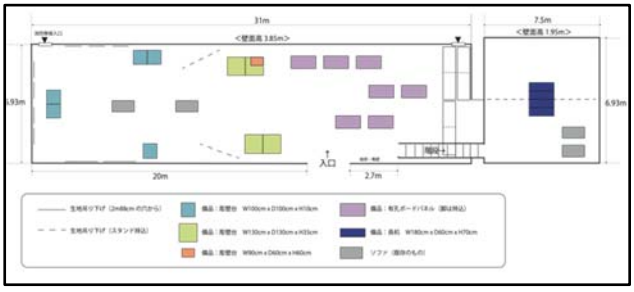


図 2.展示プラン

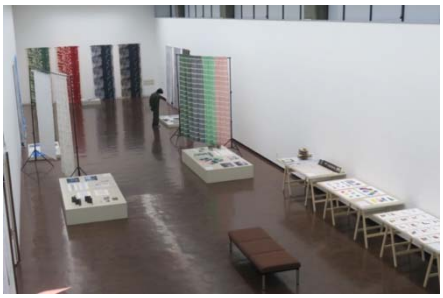


写真 13. 展示の様子

7. 結語

「天プラ・セレクション vol.90 岡本汐加展 Process-play with the site-」は、岡山県天神山文化プラザにおいて 2020 年 3 月 17 日～22 日まで開催された。展覧会来場者との対話においては、素材・技法についてや制作経緯についての質問が多数寄せられ、素材選定の経緯や背景を話す機会に恵まれた。会場の天神山文化プラザでは年間を通じて絵画や書の展覧会が多く、一般来場者の多数は岡山市在住者でデザイン関連業界外であったが、作家の思考プロセスを展覧会内で大々的に扱う行為が受け入れられたことに成果があった。期間中は施設内での同時開催展示やイベントは無かったが、1 日につき 1～2 名程度は本展覧会を事前に知らない建築視察訪問者であり、会場の建築作品としての価値を再認識することとなり情報交換ができた。一方、テキスタイルデザインそのものの認知度が低いことが明らかとなり、今後の成果発表の機会には専門分野の基本的情報の説明準備が必要と考える。会期中はコロナウイルス感染症問題が社会に蔓延しており、本展示だけではなく天神山文化プラザそのものへの来館者数が減少しているとのことであった。未曾有の社会変動の渦中において、展覧会などの成果発表・発信方法の検討が課題となった。

8. 謝辞

ご支援いただいた、公益財団法人ウエスコ学術振興財団、岡山県立大学、天神山文化プラザ関係者各位、展覧会開催にご推薦いただいた岡山県立大学デザイン学部島田清徳准教授、そして会場へお越しいただきました皆様、心より感謝申し上げます。

文献

能(1962)「岡山県総合文化センター」，『建築』1962 年 8 月号，p17，中外出版

「国際文化会館」，『国際建築』1995 年 8 月号，p29，美術出版社

花田洋通(2012)「天プラ・セレクションの役割」，『50 周年記念誌』，p53，岡山県天神山文化プラザ

中田準一(2006)「前川國男の最晩年の思考」，『建築家・前川國男の仕事』，p250，美術出版社

木育玩具による遊びと子どもの発達の対応分析

岡山県立大学　デザイン学部

林　秀紀

概要

木育とは，幼児期から原体験としての木材の関わりを深め，豊かなくらしづくり，社会づくり，そして森づくりに貢献する市民の育成を目指す教育活動であり，木育玩具は，幼児の知的成長を促す効果がある教育玩具のことを言う．筆者らの先行研究，「木育玩具の分類とその教育効果の調査分析」では，木の玩具が子どもの成長にもたらす効果が確認されたが，発達段階との関係性についてさらに深堀りした研究の必要性が明らかとなった．そこで，本研究では，子どもの発達段階の能力と木の玩具による遊びとの関係を考察し体系的に整理した．研究方法は，木の玩具のレンタル事業を営む，有限会社レインディアの保有する 0 歳から 3 歳までを対象とした 154 点の木製玩具の解説書を，多変量解析法，テキストマイニング分析法を用い，子どもの成長に効果的な遊びと木製玩具の年齢別対応表を明示した．

1.　はじめに

木育玩具の代表である積み木は，ドイツの児童教育学者，フリードリッヒ・フレーベル(1782-1852)が創案した，「恩物」が基礎となっている．この木育玩具と教育的効果との関連性について既往研究を調査したところ，具体的に分析した事例が多く見られなかった．そこで筆者らは，「木育玩具の分類とその教育効果の調査分析[1]」において，「遊びの種類と教育効果の関係指標」を作成した．そしてこれをもとに制作した木育玩具のプロトタイプを保育園の年齢別の 4 つのクラスで指標の有効性を検証した結果，創造力や発育を促す効果が確認された．一方，子どもの発達段階との関連性には不足した問題点が見られた．自立歩行や言葉を話し始める段階から，他人とコミュニケーションをとり社会性が備わる段階まで，急速に成長する様子が観察でき，身体や知的能力の発達と遊びには密接な関係性があることが分かった．こうしたことから，さらに研究の必要性が確認でき，継続の意義があると思われた．

2.　研究目的

子どもの成長と木育玩具の関係について，篠田らの「教育玩具のデザイン解析に関する研究[2]」では，フレーベルの恩物より着想した組合せ積み木を考案し，児童の自発性，好奇心を満足させ，数理感覚，論理的思考力，創造力，美的感情を養うことを目指したが，玩具のデザインと実際の子どもの遊戯の間に差が感じられたと述べられ，積み木以外の木育玩具の考察はない．この他，過去の研究やおもちゃ販売の専門家の情報は，子どもの発達段階の能力と木育玩具との関係について具体的に解説されているものは少なく，保護者視点では，子どもの知性や身体の成長を促す，一歩先を行く教育的なお勧めの玩具を求めていると思われた．そこで本研究では，木育玩具による子どもの遊びと発達の対応を明らかにすることを目的とした．

3.　事業者への訪問調査

有限会社レインディア（鳥取県米子市）へ 2018 年 2 月に訪問調査を実施し，木のおもちゃのレンタルサービス「もくレン[3]」の内容と，子どもの成長と玩具との対応関係についての知見を聞くことができた．「もくレン」は，子どもの成長段階に合わせて適切なおもちゃを選び，3 か月に 3 個～5 個のおもちゃをレンタルするサービスである．これまで 120 件以上の契約実績がある．（有）レインディアでは，保護者から送られてくる，「成長確認アンケート（図 1)」で，子どもの成長とおもちゃによる遊びに関する相談事項を把握している．それをもとに，子どもの成長に最適なおもちゃを選定し，遊びの解説書「おもちゃファイル（図 2)」を一緒に送付するサービスを通じて，子ども一人ひとりのカルテをデータベース化している．この成長確認アンケートによって，3 ヶ月ごとという短期間で保護者に送付したおもちゃが，幼児の年齢の遊び方に合ったもの

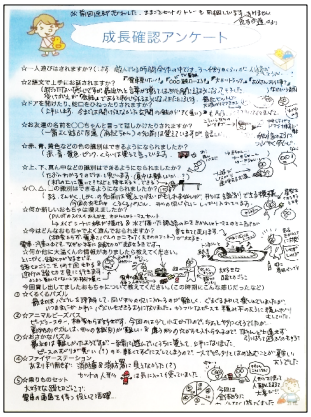


図 1.　成長確認アンケート



図 2.　おもちゃファイル

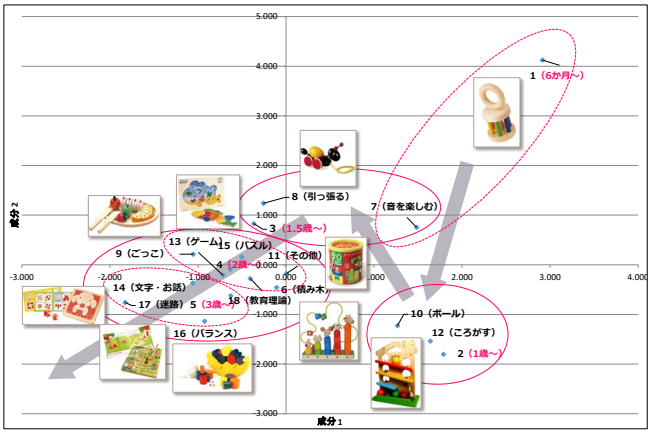


図 3.　玩具の対象年齢と遊びの種類の分析結果の散布図

かどうかを実証的に確認することができる．そしてそのアンケート結果の内容が年齢ごとにおもちゃファイルに反映されている．したがって，本研究の年齢ごとの分析資料としては十分なものであると考えた．そこで，本稿では，有限会社レインディアのおもちゃファイルを詳しく調査することにより，遊びと成長の対応関係を分析する方法を試みた．

4.　おもちゃファイル 154 点の分類と分析

最初に，(有) レインディアが保有する，154 点の木育玩具のおもちゃファイル (図 3) の対象年齢を参考に分類し，次に，おもちゃファイルのワンポイントアドバイスの記述内容をもとにスコアをつけた．その後，数量化理論Ⅲ類を用いて，年齢と玩具の対応を分析した．カテゴリーは，年齢 (6 か月～，1 歳～，1.5 歳～，2 歳～，3 歳～の 5 段階) と，遊びに関する分類用語 (積み木，音を楽しむ遊び，くるま・引っ張る遊び，ごっこ遊び，ボール遊び，その他，ころがす遊び，ゲーム，文字・お話し遊び，パズル，バランス遊び，迷路，教育理論の玩具) とした．次に数量化理論Ⅲ類の計算を行い，そのカテゴリースコアを用いてクラスター分析を行った．その結果を散布図に視覚化した図 3 から分かるように，年齢と遊びの種類がまとまった 5 つのクラスターが求められた．各年齢クラスターの特徴は，6 か月～は，音を楽しむ遊びが大多数を占めた．1 歳～は，ころがす遊びと音を楽しむ遊び，1.5 歳～は，パズル，くるま・引っ張る遊び，2 歳～は，パズル，積み木，3 歳～は，文字・お話し遊び，パズルが多数を占めた．そして，クラスターに含まれる代表的な玩具を散布図上にプロットした．音を楽しむ遊びは，6 か月～の単独のクラスターをはじめ，すべての対象年齢のクラスターにも含まれていることや，年齢が上がるにつれ，考えながら体を動かす遊びへ，徐々に変化していることが分かった．また，数量化理論Ⅲ類の散布図の特徴として，各項目 (おもちゃの種類) が満遍なく入っている場合原点付近に集まる．この特徴を考察すると，2 歳～の幼児は主要なおもちゃで遊ぶことができることが示されている．そして，図 3 に年齢上昇の矢印を各年齢のクラスターから入れると，多くのおもちゃと遊べる方向である原点に向かう矢印が，3 歳～からは，左下の知育の方向に離れて行くことが読み取れる．

5.　おもちゃファイルの分析

5.1　文章データの解析と考察

前章では，(有) レインディアのおもちゃファイルから，数量化理論Ⅲ類とクラスター分析により，各年齢と遊び，玩具との対応関係について大きな傾向を把握できた．生後 6 か月から 3 歳までのわずか 2 年半の間にも，成長に合わせて遊び方が大きく変化する．赤ちゃんから幼児へと成長していく段階で，単純な遊びから社会性のある遊びを体験し徐々に能力を獲得して行くが，玩具の役割は極めて重要であると言える．おもちゃファイルのワンポイントアドバイスには，おもちゃの特徴や，おもちゃの専門家が勧める子どもの発達段階の遊び方など，教育的に有用な情報が数多く含まれている．これを詳細に解析し，それぞれの対応関係を明らかにすることを試みた．方法は，テキストマイニング解析法を用いた．おもちゃファイル 154 点のワンポイントアドバイスの文章データを，対象年齢ごとに区切り，文章中の単語の出現頻度，同時出現 (共起)

する単語の相関，出現傾向など有用な情報を抽出し，玩具の教育効果と子どもの発達段階（年齢）との対応関係について考察を行った．なお，解析には，ユーザーローカル テキストマイニングツール[4]を使用した．

5.2　対象年齢 6 か月～の解析

図 4 および表 1 は，対象年齢 6 か月～の解析結果である．表 1 は文章中に出現する単語の頻出度と，文章の中でどれだけ特徴的であるかをスコアにより表している．ワードクラウド（図 4）は，スコアが高い単語を複数選び，その値に応じた大きさで図示している．

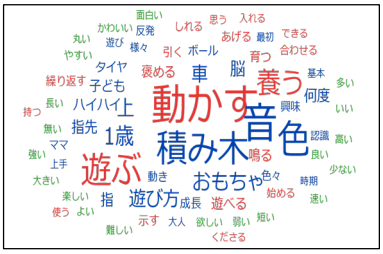


図 4.　ワードクラウド（6 か月～）



図 6.　ハンドルラトル

表 1.　単語出現頻度（6 か月～：スコア上位 10 語）

名詞	スコア	出現頻度
色	34.59	10
音	25.36	8
赤ちゃん	20.35	24
ラトル	9.29	4
聴覚	9.29	4
生後	8.84	7
座り	6.00	6
左右	4.35	7
ハイハイ	4.00	4
両手	2.51	5

動詞	スコア	出現頻度
転がす	5.36	7
振る	1.49	7
遊ぶ	1.40	12
動かす	1.32	5
握る	0.80	4
鳴る	0.53	4
渡す	0.46	5
喜ぶ	0.45	10
持つ	0.15	11
ください	0.11	6

形容詞	スコア	出現頻度
見やすい	0.58	1
厚い	0.22	1
弱い	0.19	3
優しい	0.11	3
太い	0.09	1
にくい	0.07	2
楽しい	0.04	3
やすい	0.03	2
高い	0.02	2
軽い	0.02	1

出現数が多い語ほど大きく，共起の程度が強いほど太い線で描画されている．解析結果を見ると，単語出現頻度でスコアの高い語は，名詞では，「色」，「音」，「ラトル」，「赤ちゃん」，「聴覚」であった．動詞では，「転がす」，「振る」，「遊ぶ」，「動かす」，「握る」，「鳴る」，形容詞では，「見やすい」，「厚い」，「弱い」であった．ワードクラウド（図 4）では，その結果が視覚的に表され，スコアが高い語が中心部に集中し重要度を読み取ることができる．この分析から生後 6 か月ごろの赤ちゃんは視力や聴力がまだ発達していないため，ラトル（図 6）のような音の鳴る玩具を振ったり，鳴らしたり，転がしたりという遊びを通じて，能力を養うことが効果的であると示唆されている．

5.3　対象年齢 1 歳～の解析

図 7 および表 2 は，対象年齢 1 歳～の解析結果である．単語出現頻度でスコアの高い語は，名詞では，「色」，「音」，「積み木」であった．動詞では，「転がす」，「遊ぶ」，「養う」，「遊べる」，「鳴る」，形容詞では，「やすい」，「楽しい」，「良い」，「面白い」であった．ワードクラウド（図 7）では，「積み木」，「音」，「色」，「動かす」，「遊ぶ」，「養う」が中心に大きく出現した．この分析から，1 歳からは指を動かして遊ぶことにより，脳に刺激を与えることが大切であることが分かった．

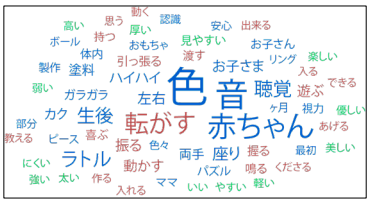


図 7.　ワードクラウド（1 歳～）



図 8.　カラー積み木

表 2.　単語出現頻度（1 歳～：スコア上位 10 語）

名詞	スコア	出現頻度
音	117.51	25
色	105.45	23
積み木	99.52	22
1 歳	44.41	12
おもちゃ	42.89	37
上	39.43	11
遊び方	37.15	16
子ども	35.83	31
成長	23.30	20
色々	15.43	11

動詞	スコア	出現頻度
動かす	42.12	34
遊ぶ	33.37	63
養う	24.45	11
遊べる	5.52	9
鳴る	4.29	9
褒める	3.32	10
あげる	2.60	22
引く	2.10	12
繰り返す	1.81	9
始める	1.12	14

形容詞	スコア	出現頻度
やすい	0.92	12
楽しい	0.31	9
良い	0.17	10
面白い	0.17	5
少ない	0.17	4
難しい	0.15	4
かわいい	0.13	2
いい	0.11	13
無い	0.10	5
弱い	0.08	2

積み木は手先を使うので，創造力を育み脳の発育への有効性が同時に示唆された．「色」，「音」については 6 か月に続き玩具での遊びにより視覚と聴覚を養う効果があると思われる．代表的な玩具を図 8 に示す．

5.4　対象年齢 1.5 歳～の解析

図 10 および表 3 は，対象年齢 1.5 歳～の解析結果である．単語出現頻度でスコアの高い語は，名詞では，「ヒモ」，「お子さま」，「色」，「プルトイ」，「音」，「指先」，「パズル」であった．動詞では，「養う」，「遊ぶ」，「遊べる」，「拾う」，「引く」，「歩く」など，形容詞では，「細い」，「微笑ましい」，「やすい」，「楽しい」などであった．ワードクラウド（図 10）では，「ヒモ」，「プルトイ」，「パズル」，「積み木」，「何度」，「音」，「色」，「養う」，「遊ぶ」といった語が中心に大きく位置した．

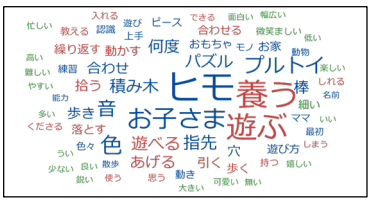


図 10.　ワードクラウド（1.5 歳

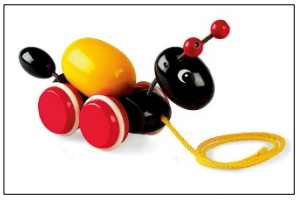


図 11.　プルトイ

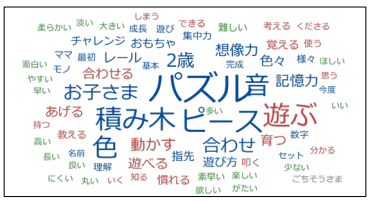


図 12.　ワードクラウド（2 歳～）



図 13.　どうぶつ親子

表 3.　単語出現頻度（1.5 歳～：スコア上位 10 語）

名詞	スコア	出現頻度
ヒモ	305.01	53
色	155.0	31
お子さま	152.93	36
プルトイ	142.30	29
音	129.80	27
指先	101.44	32
パズル	90.00	45
歩き	62.93	33
おもちゃ	28.30	29
動き	22.66	31

動詞	スコア	出現頻度
養う	94.34	28
遊ぶ	89.58	109
遊べる	32.62	25
あげる	28.31	76
拾う	19.85	24
引く	16.99	36
歩く	14.15	40
繰り返す	12.56	25
落とす	10.75	27
教える	4.51	30

形容詞	スコア	出現頻度
細い	9.95	14
微笑ましい	3.50	5
やすい	1.08	13
楽しい	0.87	15
可愛い	0.80	10
良い	0.48	17
いい	0.40	25
難しい	0.23	5
大きい	0.14	4
うい	0.11	4

表 4.　単語出現頻度（2 歳～：スコア上位 10 語）

名詞	スコア	出現頻度
パズル	115.57	53
ピース	87.40	42
積み木	82.12	19
色	76.46	18
音	76.46	18
お子さま	42.00	14
合わせ	33.69	14
色々	22.00	22
おもちゃ	12.21	18
チャレンジ	11.07	16

動詞	スコア	出現頻度
遊ぶ	29.58	59
動かす	10.17	15
遊べる	7.92	11
あげる	7.15	37
育つ	6.95	13
合わせる	6.93	19
慣れる	3.66	12
覚える	3.61	20
教える	1.84	19
できる	1.14	35

形容詞	スコア	出現頻度
難しい	2.27	16
素早い	0.97	2
丸い	0.53	2
やすい	0.41	8
多い	0.36	11
淡い	0.26	1
楽しい	0.14	6
大きい	0.14	4
良い	0.13	9
いい	0.04	8

プルトイとは，図 11 のようにヒモを引っ張って遊ぶ玩具である．細いヒモを持つこと，そのヒモを握りながら歩くことの 2 つの複合動作の練習になる．最初は歩くとすぐにヒモを落としてしまうこともあるが，何度も繰り返し拾っては歩くことにより指や手の力を養う効果があると考えられている．それに続くパズルは形の認識力を養う効果がある．小さなつまみのついたパズルは掴むことで指先を使うことも覚え，大脳を刺激し成長を促すと考えられている．

5.5　対象年齢 2 歳～の解析

図 12 および表 4 は，対象年齢 2 歳～の解析結果である．単語出現頻度でスコアの高く特徴的な語句は，名詞では，「パズル」，「ピース」，「積み木」，「色」，「音」，「チャレンジ」であった．動詞では，「遊ぶ」，「動かす」，「育つ」，「合わせる」，「慣れる」，「覚える」など，形容詞では，「難しい」，「素早い」，「やすい」，「丸い」などであった．ワードクラウド（図 15）では，「パズル」，「ピース」，「積み木」，が最も大きく目立ち，「音」，「色」が続いた．この年齢より新たに「想像力」，「記憶力」という語句も新たに出現した．もくレンで扱う玩具は対象年齢 2 歳以上からパズルと積み木の割合が増加する．図 13 のような，動物の絵などが描かれたピースを合わせる形となり，両手の指で数えられる 9 ピースになる．これが上手にできるようになると 30 ピース，

50 ピースと難しいパズルにもチャレンジして達成感を得られるようになる．積み木は重ねて遊ぶものが登場する．指先を使い棒へリングを入れたりすることで達成感を感じる．穴の数も 1 つ，2 つ，3 つと増え，形と穴との整合性や構造を考えるようになっている．これまでよりも少し複雑に，そして難しくなったパズルや積み木にチャレンジすることにより，想像力や記憶力，集中力を育てることがワンポイントアドバイスにより示唆されている．

5.6　対象年齢 3 歳～の解析

図 14 および表 5 は対象年齢 3 歳～の解析結果である．単語出現頻度でスコアの高い特徴的な語句は，名詞では，「車」，「色」，「ごっこ遊び」，「パズル」，「数字」であった．動詞では，「遊ぶ」，「組合わせる」，「動かす」，「覚える」，「慣れる」，「覚える」など，形容詞では，「素早い」，「可愛い」，「難しい」などであった．ワードクラウド（図 14）では，「車」，「色」，「ごっこ遊び」が最も大きく，「パズル」，「数字」，「積み木」，「ままごと」が続いた．図 15 のままごとセットは絵本を読みながら木のおもちゃで料理ごっこが楽しめる．絵を見ながら実際の行動をすることで，「調べる」，「理解する」，「覚える」と段階を経た遊びを自然に取り入れることができる．野菜やフルーツを切る事と絵本を一緒に遊べる工夫がされている．普段母親の行動をしっかりと見てそ

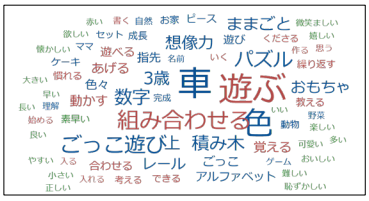


図 14.　ワードクラウド（3 歳～）



図 15.　チーズ君のおいしいスープ

表 5.　単語出現頻度（3 歳～：スコア上位 10 語）

名詞	スコア	出現頻度
車	111.45	24
色	99.52	22
ごっこ遊び	54.70	14
パズル	47.55	30
数字	41.32	36
おもちゃ	28.30	29
色々	15.52	18
遊び	9.48	27
動物	6.84	19
成長	4.83	15

動詞	スコア	出現頻度
遊ぶ	38.39	68
組み合わせる	21.15	10
動かす	6.79	12
あげる	6.07	34
覚える	6.00	26
合わせる	3.89	14
繰り返す	2.22	10
教える	1.84	19
いく	1.22	27
できる	1.21	36

形容詞	スコア	出現頻度
素早い	2.03	3
可愛い	0.39	7
難しい	0.23	5
楽しい	0.19	7
赤い	0.14	2
早い	0.12	6
いい	0.09	12
おいしい	0.09	3
良い	0.08	7
やすい	0.06	3

れを真似することによって学習ができるように考えられている．ままごとは，色々な場面を想像することで，脳も活性化され社会性も育ち人間としての基本が身につくと言われている．男女どちらにも成長の要素が詰まっていると考えられている．

6.　成長段階での遊びと玩具による教育効果のまとめ

第 4 章と第 5 章の分析結果より，子どもの成長段階で獲得できる能力に対応した玩具とその教育効果が理解できた．その結果を骨格として，さらに関連する詳細内容を，おもちゃファイルから抽出して盛り込み，一覧にまとめたものが表 6 である．対象年齢 6 か月から，3 歳まで，5 段階に区分し，それぞれに，子どもの成長段階での遊び，身体的な特徴，教育効果，デザイン的な対応アイデア，代表的なおもちゃ，遊びの種類について整理した．この一覧表により，木育玩具の教育効果と年齢対応が容易に理解でき，玩具のデザインや購入選択が容易になるものと思われる．

7.　結論と今後の展開

本研究では，有限会社レインディアの木のおもちゃレンタル事業である，「もくレン」の過去 10 年間，120 件以上の顧客記録である成長記録アンケート，および，おもちゃファイル 154 点を詳細に調査分析したものである．おもちゃファイル 154 点の記述内容から，数量化理論Ⅲ類，クラスター分析を用いて，玩具の対象年齢と遊びの種類の分類を行い，5 つの成長段階ごとに最適な玩具について把握した．次に，おもちゃの専門家から保護者に宛てた，ワンポイントアドバイスの内容（文章データ）をテキストマイニング分析し，文章中の単語の出現頻度，共出現の相関，出現傾向など有用な情報を抽出し，玩具による遊びの教育効果と子どもの発達段階（年齢）との対応関係について考察を行った．そして，2 つの調査分析から得られた結果を軸として，文章データの詳細内容でさらに補足し，子どもの成長に効果的な遊びと木育玩具の年齢別対応表を作成した．本研究の範囲および目的は，乳幼児を対象とした木育玩具について，成長に合わせた遊びと教育効果を明示し，木育玩具のデザインガイドを新たに提案することであった．既往研究，および，筆者らの先行研究では，成長段階との対応に不足した点がありこれを補完することが目的であった．本研究の成果により，保護者が木育玩具を購入するガイドとして，従来のものよりもさらに具体的な内容を参照できる他，玩具メーカー，木工作家，デザイナー，学生などがデザインの根拠として有効活用が期待できる．今後は，この資料をもとに，木育玩具のプロトタイプにより有効性や妥当性を検証し，その結果を反映した木育玩具のデザインガイドライン資料として完成を目指す予定である．

参考文献

1）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

2）篠田守夫，天野孝雄，松原貞嗣，菊池季比古：教育玩具のデザイン解析に関する研究（I），産業工芸試験所報告，通商産業省 産業工芸試験所，No. 55，1968.

3）木のおもちゃのレンタルプログラム「もくレン」：http://www.reindeer.co.jp/mokuren.htm (2020.03.17 最終閲覧)．

4）ユーザーローカル テキストマイニングツール：https://textmining.userlocal.jp/ (2020.03.17 最終閲覧)．

表 6.　子どもの成長に効果的な遊びと木製玩具の年齢別対応表

内容 / 年齢	発達段階ごとの能力	発達段階ごとの特徴的な行動や遊び	デザイン的な対応アイデア	代表的な木の玩具	遊びの種類
6か月～	座る	お座りが安定しだす			
	運動	ハイハイが始まれば転がして追っかける	転がす遊び、円柱、ボール	ラトル（がらがら）	音を楽しむ:7
	視力	生後5ヶ月頃の赤ちゃんはまだ視力が弱く白黒のぼんやりとした世界	濃淡のはっきりとした構成		パズル:2
	視力+色認識	原色や黒などハッキリと分かる色に興味を示す	原色でカラフルに色分けする		くるま、引っ張る:1
	動体視力	目の前30cm位の距離で左右に振ってスムーズに目で追うことができる	振り子、くるまなど、動きが見える		ころがす:1
	形状認識	○△□を認識する	基本的な幾何形体や簡単な抽象形態のパズル	パズル、ソーティングトイ	（※数字は
	聴力	生後8ヶ月未満はまだ聴覚も育っていない	やや小さめのやさしい音が鳴る	ラトル（がらがら）シロフォン	レインディアの
	握力	左右の手で持ち替えて遊べる．左右の手でリングを持って引っ張る	赤ちゃんの手に持ちやすいかたち	オルゴール	おもちゃファイル
	動くものへの興味	音や動くものに興味を示す	自分で振りながら音を鳴らす	リングラトル（がらがら）	で確認された
	認知	歯も少しずつ生えてきて何でも口に入れられる	無害な塗料、無垢の木、無塗装	歯固め	遊びの種類数を
	言葉	言葉がすこしづつ出始める			表す）
	神経	赤ちゃんの肌は敏感だが神経が末端まで育っていない	表面の手触り感に変化をつける		
1歳～	色認識	色の識別が1才前から育ってくる．色と形の識別能力が養われる	明確に判別できる色と形	積み木	音を楽しむ:9
	手と目の協調	穴の形に合せてはめ込む事で手と目の協調が養われる	大小様々な穴の開いた箱と中に入れる積み木や	形合わせパズル	ころがす遊び:9
	+形状認識		棒を通す	ボールトイ	積み木:7
	動体視力	動きを目で追う事で視力を鍛え動きを推測する能力が養われる	ボールなどが音をたてジグザグに転がり落ちる	シロフォン（木製）	パズル:4
	聴力	音を出す事で空間認知力、聴覚の発達が養われる．音の違いを認識できる	人形が音を鳴らして降りる	カタカタ遊び、ボールトイ	ルーピング:2
	動くものへの興味	動く物を目で捉えて手で捕まえようとする	たたく場所によって音の高さや響きが違う	もぐらたたき	ごっこ遊び:1
	手先の動き□	手や指先、手首の動きを活発にし、字や絵を描く時に必要な力を鍛える□	細い棒をつかってものを動かす	ルーピング	
	手先の動き	指を動かして大脳を刺激する	押す、引く、回す、などさまざまな動きの複合	パズル、ソーティングトイ	
	手先の動き	創造力を育み手先を動かす．脳の発育を促す	細かく小さい部品を組み立てる	木のブロック	
	運動能力	丁寧におもちゃを動かす事が出来ない時期	微妙な力加減が必要が必要とされるもの		
	物まね	大人が遊ぶ姿を見て同じ事をしたいと思い始める．大人のする事を真似する	大人が日常に使用する製品の模型	ままごとセット、くるま、電車	
	興味・関心	1才後半頃から性別の差も見え始める		着せ替えセット	
	興味・関心	男の子は車に興味が出てくる．男の子の脳は構造物に興味を示す特徴	タイヤが回る、動く構造を見せる	くるま	
	興味・関心	構造体に興味のある男の子、想像力旺盛な女の子			
	創造力	女の子は他のおもちゃと組み合わたりして様々なストーリーを考える	日常のできごとをおもちゃにする	お医者さんセットなど	
	集中力	組み立てたりばらしたりの繰り返しで集中力を養う	抽象形態のブロック遊び、積み木に磁石	マグネット積み木	
1.5歳～	動体視力	車の動きをしっかりと目で追う事で視覚の発達を促す	カラフルな色や、動く速度に変化をつける		パズル:15
	聴力	聴覚が育ち、音の違いを認識できる様に成長してくる時期	木の素材を変える（広葉樹、針葉樹）	ドラム	くるま、引張る:14
	握力	細いヒモを持つことヒモを握りながら歩くことの複合の動きを練習する	紐を引っ張って転がす	動物のプルトイ	積み木:11
	手先の動き	指先の動きは大脳を刺激し成長を促す	鍵穴に鍵を入れて、回し、ドアを開ける	鍵まわし	ごっこ遊び:10
	+集中力	見て行動する動作を繰返し集中力や腕・指先のコントロール力を育む	ピースにつまみを付ける	形合わせパズル、絵柄パズル	音を楽しむ:9
	+形状認識	指先の感覚でつみ木の形状を理解する能力が養われる	様々な形態が入った積み木	木のねじ込みやはめ込み	ゲーム:5
	手と目の協調	目と指先で確かめ穴に合せてはめ込む、手と目の協調、推測力がつく	組立てて様々な角度に可動する	ルーピング+ソーティング	ルーピング:5
	+推測力	一本の棒に通す練習は両目でモノを立体的に捉えて位置を考えながら、手を動かす	木を紐で結ぶ	知恵の輪	文字・お話遊び:4
	+立体把握	能力が養われる	棒に積み木を指していく遊び	棒にさして重ねる積み木	
	運動能力	身体を動かしたいという欲求が出てくる	ハンマーで力づよくたたく	スタッキングトイ	
	運動能力	跳ねる動きによる驚きが脳への刺激になる	ばねの力を利用して飛び出す	ハンマートイ	
	興味・関心	様々な応用や構造に対する理解が深まる	タイヤやプロペラが回転する	タワートイ	
	興味・関心	男の子は構造に好奇心が膨らむ．女の子は、想像力豊かな遊び	スプーンで食事、靴を履く生活動作の訓練	ままごとセット	
	物まね	大人の行動の観察も鋭くなり物まねも上手になる	ごっこ遊び、家事の物まねができる		
	協調性	他人と一緒に遊ぶ事で少しずつ社会性も育っていく	いっしょに遊ぶゲーム	カメラ、家電、キッチン用品	
	記憶力	記憶力の回路構築を促す	実際の乗り物とパズルの絵を繋げる	ゲーム	
	見立て+思考力	見立て遊びや複数の形を応用して作る中で「考える力」を養う事が大切	複雑な形の積み木	くるま、かたちパズル	
2歳～	聴力	聴覚や音を理解する脳が育つ．金属の高音等の情報量が多い楽器でも遊べる	木と金属を組み合わせて音を聞き分ける	鉄琴+木琴	パズル:11
	聴力	音の大小が理解出来る様になる．力加減で音の大きさや音質の変化を体験	叩く場所によって音が違う	樹種が違う木琴	積み木:11
	手と目の協調	棒に通すために目で遠近感を意識し位置を考えながら手を動かす	細い棒をさしたり、穴に引っかけたりする	木のねじ込みやフック	ごっこ遊び:
	+遠近感+色認識	色と形の識別能力などが養われる	色と形の微妙な違いを認識できる	数字、文字積み木	音を楽しむ:6
	運動能力	身体全体を使って表現が始まる	全身をつかって遊べる遊具のようなもの	玩具と遊具の組合せ	くるま、引張る:4
	立体把握	形を認識し組合わせる中で立体的なモノの形を理解する	積み木を高く積み上げる	スタッキング積み木	ゲーム:3
	形状認識	形を理解し構造を考える基本的なモノの捉え方を学ぶ．数の概念を学ぶ	抽象的で幾何学的な形状の積み木		ころがす遊び:2
	好奇心	動きを知りたいという気持ちが繰り返し動作につながる	動きに変化やおどろきのあるおもちゃ	歯車、からくり、構造玩具	ボール遊び:1
	物まね	音楽を耳で聞いた事やテレビで見た動きをすぐ真似する事が出来る様になる	音とリズムを覚えて遊べるおもちゃ	木の楽器	迷路:1
	達成感+創造力	ものごとを完成させる達成感、想像力、記憶力、集中力が育つ	基本形状を繰り返し重ねたり組み合わせたり	パズル30ピース	
	+記憶力+集中力		して、目標となる大きな立体物をつくる	パズル50ピース、立体パズル	
	理解力+記憶力	「調べる」「理解する」「覚える」と段階を経た遊びを自然に取入れる	複雑で物語性のあるパズル	絵本と積み木など他の玩具	
	創造力	家にあるおもちゃと組み合わせて遊びながら創造力を鍛える	絵本を読みながら数と触れ合う遊び	とのセット	
	創造力	ストーリーを考え遊び方は成長と共に発展	日常生活の体験ができる	本格お仕事セット	
	読解力	数字（10種類）、アルファベット（26種類）を読める様になる	食器やまな板で料理と食事の体験	調理セット	
	社会性	ごっこ遊びの内容もより複雑に社会性をもった遊びに変わって行く	遊びの中で自分と他人の役割がある		
3歳～	動体視力	動体視力、推測する能力の発達	車が走る動きを目で追うような仕組み	カータワー、玉落とし	文字・お話遊び:14
	目的意識	複雑な形を認識して方向や全体を考えながら完成形を目差して組み立てる	目標とする形をつくって遊ぶ	裏表面パズル	パズル:11
	形状認識	3才の脳は左右の識別能力が育っていない．「さ」と「ち」をあべこべに書く	数字やアルファベットの外形のパズル	数字パズルなど	積み木:8
	形状認識	幾何学的積み木で複雑な形を認識し組み合わせて遊びながら創造力を育む	パズルのような積み木	幾何学形状パズル	ごっこ遊び:8
	空間把握力+構成力	構造を理解して遊ぶ能力が鍛えられる	複雑な凹凸形状の積み木を合体して	立体パズル	ゲーム:8
	平衡感覚	バランスを推測する能力を発達させる	不安定な状態を創り出せる	シーソー、棒倒し	音を楽しむ:4
	想像力	色々な場面を想像したり思い出したりする事で脳が活性化され社会性が育つ	ストーリー性のある要素を加える	絵本と積み木のセット	くるま、引っ張る:5
	記憶力	何度も繰り返す事で記憶力を発達させる	失敗を繰返しながら成功する	メモリーゲーム、迷路	ルーピング:5
	集中力+チャレンジ力	集中できるおもちゃへの挑戦で精神的安定や忍耐力を強化	脳トレができるパズル	アルファベットパズル	
	忍耐力+達成感+思考力	完成させて達成感。集中力を鍛えたり戦略を練ったり思考力が育つ	ピースの数が多い平面、立体パズル		
	言語力+記憶力	手で数字の形を確認しながら「数字」を自然と頭に入れる	そろばん、電卓のような数えられるもの	レジスター	
		数字は指で数えながら声で出しながら覚える	他人と会話を楽しみながら遊ぶ		
	意思疎通	コミュニケーション能力が育つ	たくさんの人と遊べるゲーム性のあるもの		
	社会性	より複雑に社会性をもった遊びに変わる	家事の工程を見て覚える遊び	レールセット	
	遊びの発展	道具を使い分けたり順番を考えたりひとつの目的から次の動作を考える遊びへ発展	手持ちの玩具と混ぜて遊べる	キッチンセット、バンセット	

宇宙から飛来する暗黒物質による散乱過程の理論的研究

岡山理科大学理学部応用物理学科

長尾　桂子

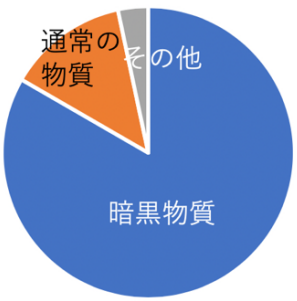
（概要）

宇宙の物質の約５分の４を占める暗黒物質は、未発見の素粒子であると考えられている。その性質を調べるため、宇宙から飛来する暗黒物質粒子の検出実験が行われている。検出実験では、暗黒物質粒子と標的原子の散乱過程を正確に理論計算をしておくことが、暗黒物質の性質を引き出す上で非常に重要である。本研究では、暗黒物質粒子と原子の散乱で起こりうる共鳴状態について考察するとともに、現在研究開発が進んでいる次世代の暗黒物質粒子検出において期待できる暗黒物質の性質の検証条件をシミュレーションから調べた。次世代の暗黒物質粒子検出実験では、従来の検出実験で可能であった暗黒物質粒子と標的原子の散乱エネルギーだけでなく、暗黒物質粒子の到来方向も検出可能である。そのため、従来の実験に比べてより多くの情報を得られると期待できる。特に検証が期待できるのが、暗黒物質粒子の速度の分布である。本研究では、方向を検出できる実験での暗黒物質粒子と原子の散乱をシミュレーションし、暗黒物質の速度分布の非等方性を検証するために 10^3〜10^4 回程度の暗黒物質粒子の信号検出が必要であることを明らかにした。また、その非等方性と暗黒物質の質量を検出実験の結果から同時に取り出す手法についても検討を行い、方向情報を利用することの重要性を示した。特に、暗黒物質粒子に対して検出感度が高いと期待できる固体型検出器について、速度分布や質量などの情報がどの程度取り出せるかを本研究では初めて定量的に評価し、従来から研究されてきた気体型検出器と比較することによって、今後の開発方針に関する示唆を与えた。

（本文）

研究の背景と目的　近年の宇宙観測から、宇宙全体のエネルギーのうち、物質の占める割合の約５分の４が、正体不明の物質によって構成されていることが明らかになった（図１）。この物質は暗黒物質と呼ばれ、現在の宇宙の構造を形成する上でも重要な役割を果たしたと考えられている。また、暗黒物質の正体は、これまでに知られてない未発見の素粒子である可能性が高く、宇宙の物質の起源を研究する素粒子物理学の観点からも重要視されている。多くの実験が暗黒物質を検出し、その性質を調べようと試みているが、いまだに明確な検出には至っていない。本研究では、暗黒物質粒子を検出する主要な実験である「暗黒物質の直接検出実験」についての理論的な計算や考察、シミュレーションから、暗黒物質の性質をより正確に、より多く実験から取り出すことを目標とした。暗黒物質の直接検出実験の基本的な原理は、図２に示すように、宇宙から飛来する暗黒物質粒子と標的原子が散乱し、放出されるエネルギーを測ることによって暗黒物質を検出するというものである。本研究ではこの直接検出実験について、（１）暗黒物質粒子と原子の散乱で起こりうる多体共鳴状態の定量的計算（２）次世代型の暗黒物質直接検出実験で期待できる暗黒物質の性質解明と、その必要条件　の２点の研究を行った。

図1. 宇宙の物質の構成比



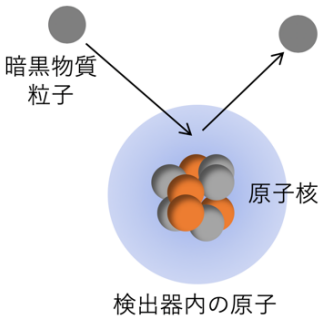


図2. 直接検出実験における暗黒物質と原子核の散乱

研究の詳細および研究成果

（1）暗黒物質粒子と原子の散乱で起こりうる多体共鳴状態の定量的計算

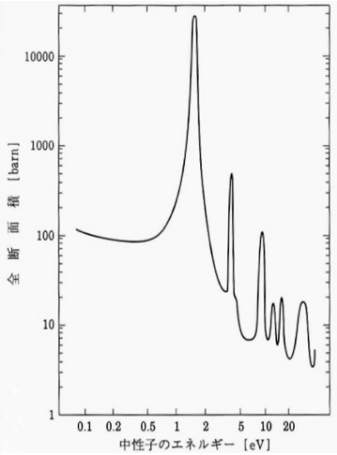


図 3. 中性子と原子核の散乱しやすさが共鳴現象で増大する様子（「原子核物理入門」鷲見義雄）。

暗黒物質粒子と原子の散乱では、原子核の複雑な構造のために、理論計算に伴う不定性が大きいことが指摘されている。その例として、本研究では原子核が多体状態であることに由来する共鳴が直接検出実験での散乱でも起こりうるのかを検討した。

中性子と原子の散乱では、1-10 eV 程度の低エネルギーの散乱で、中性子が原子中の原子核と共鳴することによって散乱しやすさ（散乱振幅）が増大する現象が実際に実験で測定されている（図３）。暗黒物質粒子は中性子と同様に電気的に中性の粒子であると考えられることから、直接検出実験で原子と散乱する際に同様の共鳴現象を起こす可能性があると考えられた。現在、直接検出実験の結果から暗黒物質粒子の散乱しやすさや質量などに対して制限を与える際には、この共鳴散乱の影響は考慮されていない。より正確に、暗黒物質粒子の性質を直接検出実験の結果から引き出すためには、共鳴散乱の影響を理論計算で考慮する必要がある。本研究では、場の理論という理論体系を用いて共鳴状態の影響を計算するとともに、原子核物理学の実験・理論研究者複数名と議論を行った。その結果、原子核は複数の核子から構成されており、原子核と中性子の共鳴散乱は、中性子がこの複数の核子と散乱を繰り返すことによって擬似的な共鳴状態を構成していることがわかった。一方で、暗黒物質粒子と原子核の核子の散乱しやすさは直接検出実験から厳しい制限がついており、最も一般的な 100GeV 程度の質量を持つ暗黒物質粒子ではその散乱断面積が 10^{-45}cm^2 以下でなくてはならない。このように**散乱しにくい粒子の場合、原子核中の核子と複数回の散乱を起こす可能性が非常に低いため、一般に共鳴散乱は起こりにくい**と考えられる。一方で、本研究の遂行時期と並行して、一般的な 100 GeV 程度の質量を持つ暗黒物質よりも非常に軽い、1〜10 GeV 程度の質量を持つ暗黒物質粒子が存在するのではないかという可能性が有望視されるようになった。このように**低質量の暗黒物質粒子に対しては直接検出実験からの制限は非常に緩いため、暗黒物質粒子が散乱しやすく、共鳴散乱現象が起こる可能性がある**。今後はこのような軽い暗黒物質粒子の共鳴散乱現象についてその影響を評価し、より正確な理論計算を行えるよう理論を修正していく予定である。

（2）次世代型の暗黒物質直接検出実験で期待できる暗黒物質の性質解明と、その必要条件

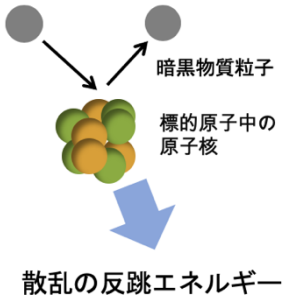


図 4. 直接検出実験で暗黒物質の検出を行う原理。

従来行われてきた暗黒物質検出実験の検出の原理は、宇宙から飛来する暗黒物質粒子が地上の実験室に設置された標的原子と散乱し、その際に放出されるエネルギーを検出するというものである（図 4）。これに続き、散乱のエネルギーだけでなく、散乱される原子核の方向を検出できる検出器を用いた実験の研究開発が進んでいる。このような実験は世界で主張な実験プロジェクトだけで６つあり、理論的な研究が待たれている。宇宙の暗黒物質は、太陽系の運動に伴い、はくちょう座の方向から多く飛来すると考えられるため、それによって散乱される原子核の方向情報を含めて検証することによって、より正確に暗黒物質粒子の検出を行うことができる。一方で、暗黒物質粒子の飛来方向を検出できることから、方向情報を利用して、従来よりも多くの暗黒物質粒子の性質を引き出すことができるとも期待できる。例えば、暗黒物質の飛来方向の情報は、宇宙の暗黒物質がどのような速度で分布しているかを反映していると考えられる。宇宙の暗黒物質は、銀河系ではどの方向にも同じような速度（図５(A)）で分布してい

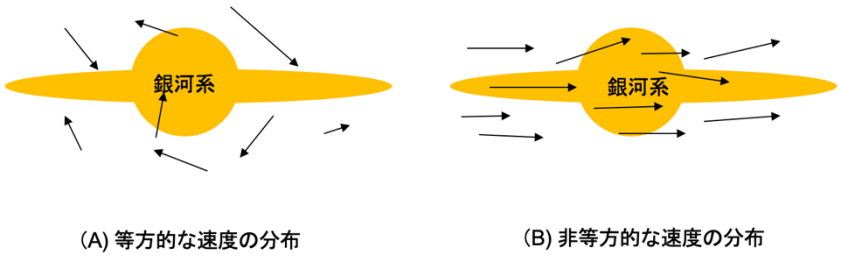


図 5. 暗黒物質粒子の速度の分布が等方的な場合（左）と、非等方的な場合（右）の概念図。

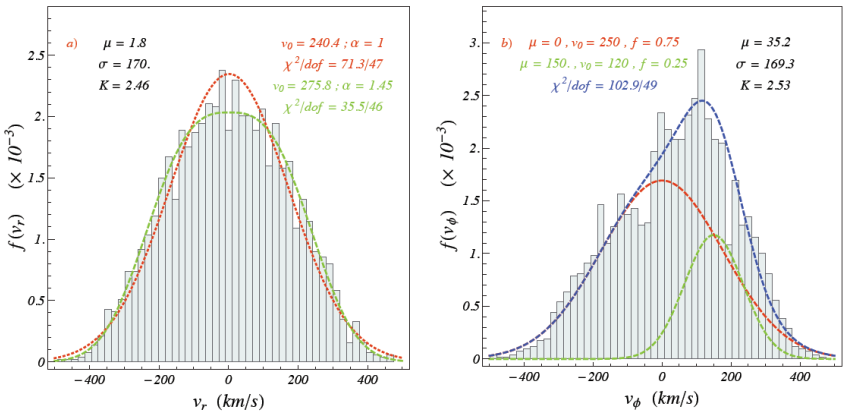


図 6. 暗黒物質の速度の分布が、銀河系の中を太陽系が進む方向（右図）と、それに対して垂直な方向（左図）であることを示唆する N 体シミュレーションの結果（Ling, Nezri, Athanassoula and Teyssier (2009)）。

ると一般には考えられている。しかし、宇宙の歴史の中での暗黒物質の時間発展を追う N 体シミュレーションからは、速度の分布が非等方的（図 5(B)は一例）であることが示唆されている。これは、銀河系の伴銀河から流入する暗黒物質の流れがあることや、銀河系の中の普通の物質の回転に暗黒物質が引きずられることに起因すると考えられる。本研究では、(A)等方的な分布として、最も一般的な等方的マクスウェル分布、(B)非等方的な分布として普通の物質と暗黒物質粒子の重力による相互作用が考慮された N 体シミュレーションから示唆されるモデル（図 6）を用い、飛来方向が検出できる直接検出実験でこの２つのモデルを判別することができるかを調べた。また、速度の分布を判別するとともに暗黒物質粒子の質量に対する制限も精査した。

本研究では、モンテカルロ・シミュレーションを用いて方向を検出できる直接検出実験での検出結果をシミュレーションした。検出結果として、暗黒物質粒子と原子の散乱の反跳エネルギーと散乱角（方向）の２つのデータが得られる。複数回の検出結果をシミュレーションすることによって、その統計的な傾向を見ることができるようになる。図７はその２つのデータの分布を示した一例である。条件によって異なる分布の傾向があることから、その判別のため、本研究では２種類のデータを作成した。１つ目は豊富な統計量を持つ検出結果で、これは多くの暗黒物質粒子の検出データが得られた場合の理想的な検出データと想定できる。しかし、実際の実験で暗黒物質粒子を検出するのは非常に難しいため、検出できる信号数はそれほど多いとは期待できない。そのため、１つ目のデータよりも統計量が少ない、擬似的な実験の検出結果のデータも作成した。図７は、立方体グラフは１つ目の理想的なデータを、白抜きの赤点が擬似的な実験データを示したものである。図７に見られるように、擬似的な実験データは、理想的なデータに非常によく似た傾向を持っているが、統計的な揺らぎのため２つのデータの間には多少の差異が生じる。速度の分布などが異なる条件のもとで生成した疑似的な実験データと理想的なデータの類似性を本研究で検定しておくことによって、実際の実験でデータが得られたときにも、その結果が示唆する速度の分布の等方性・非等方性や、質量への制限などの情報を得るこ

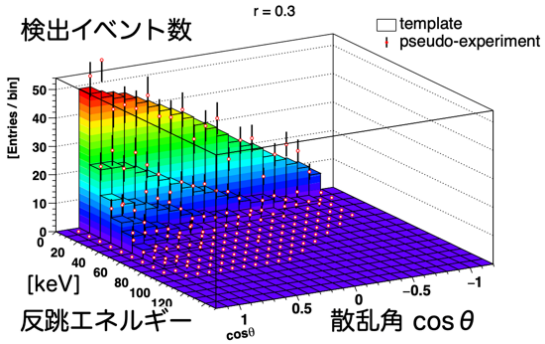


図 7. 方向検出実験において検出されるエネルギーと方向の分布例 [業績 1]

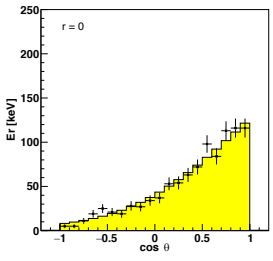


図８．方向情報（散乱角の cos θ）のヒストグラムの例。[業績 1]

とができる。また、検出器の解像度によっては、エネルギー分解能が低く方向情報だけしかわからないことも想定される。そのような場合、図８に示すような方向情報のみのヒストグラムが得られる。本研究では、エネルギーと方向の２つの情報を検出できた場合と、方向情報のみ検出できた場合をそれぞれ調べ、速度の分布の非等方性の判別を行った。

暗黒物質粒子の質量はまだ実験からほとんどわかっておらず、質量をどのように想定するかは本研究の統計的な検定に大きく影響する。そのため、【１】暗黒物質粒子の質量が他の実験でわかったと仮定した場合、【２】暗黒物質粒子の質量について情報がないと仮定した場合 の２つの場合を想定した。以下ではそれぞれについて、想定の背景と結果を述べる。

【１】暗黒物質粒子の質量が他の実験でわかったと仮定した場合

直接検出実験の他に、粒子加速器実験や宇宙線観測等他の実験でも暗黒物質粒子が検出される可能性がある。特に、現在欧州で稼働している粒子加速器実験である大型ハドロン衝突型加速器（LHC）は人類史上最高の 13TeV という高いエネルギーで新粒子を生み出す期待を背負って稼働中である。このような実験から暗黒物質粒子の質量に対する示唆が近い将来得られた場合、その情報を利用してより精度良く暗黒物質粒子の速度の分布についての情報を得ることが可能となる。本研究ではサンプル点として、

・方向を検出できるガス検出器で使われる典型的な標的原子であるフッ素に対して 60 GeV

・方向を検出できる固体検出器で使われる典型的な標的原子である銀に対して 300GeV

の質量をもつ暗黒物質粒子が飛来するとそれぞれ仮定した。**特に固体型検出器に関しては、本研究が初めて定量的な評価を行い、気体型検出器との比較を行った。**

図９は、暗黒物質粒子の分布が完全に等方な場合

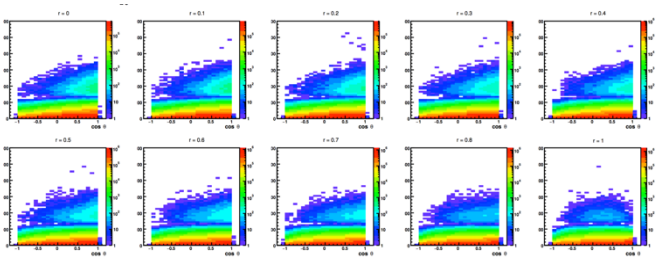


図９.直接検出実験のシミュレーション結果を、エネルギーと方向の分布として表示した [業績 1]。左上から右下まで、完全に等方的なものから非等方性を徐々に増した速度の分布を仮定して生じた結果を示す。暗黒物質粒子の検出が十分な回数発生する理想的な場合のデータを用いた。

から非等方性を増した場合の（左上→右上→左下→右下）エネルギーと散乱方向の理想的な分布を示したものである。図９に示す通り、暗黒物質粒子の速度の分布の非等方性によって検出結果のシミュレーション分布の形状が変わっていくことがわかる。疑似実験的なデータは、このような理想的な場合より少ない信号数を持つため、まばらな分布となる。図９はエネルギーと散乱方向の分布だが、検出器のエネルギー分解能が低く散乱方向のヒストグラムを用いた場合も同様に、理想的なヒストグラムと疑似実験的なヒストグラムを作成することができる。理想的なヒストグラムと、疑似実験的なデータから生成したまばらなヒストグラムの類似度をカイ２乗検定で判定した結果を図１０に示す。図１０ではＮ体シミュレーションから示唆される非等方的な分布が横軸 r_{tmp}=0.3 に対応しており、左図は非等方的な分布が実現していた場合、直感的にも予想できるようにそこから離れるほど排除されやすいことを示している。また同様に、右図は完全に等方的な速度の分布

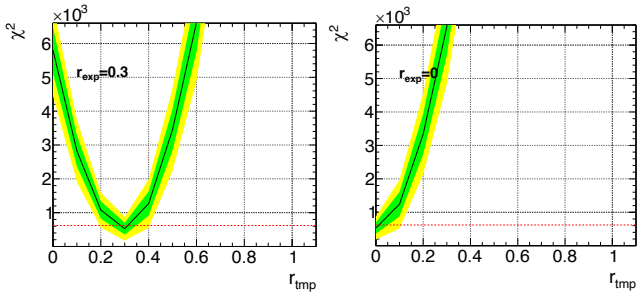


図１０．暗黒物質が非等方的な速度の分布をしている場合に、等方的な分布を 95%の信頼度で排除できることを示した図(左)と、反対に完全に等方的な分布が実現していた場合にＮ体シミュレーションから示唆される非等方的な分布が排除できることを示した図（右） [業績 1]。標的原子として銀原子を想定し、暗黒物質と原子の散乱が 20000 回起こったと仮定した。

(r_{tmp}=0) が実現していた場合にそこから離れるほど排除されやすく、95%の信頼度で非等方的な速度の分布が排除できることを示している。このように、等方的・非等方的な速度の分布を判別するためには、フッ素を標的とした場合 5000 回、銀原子を標的とした場合 20000 回の暗黒物質粒子の検出が必要である。図１０は検出実験の結果として方向情報のヒストグラムのみ得られた場合の結果であるが、検出器の分解能がよく、エネルギーと方向の２つの情報で分布を作成した場合は、フッ素を標的とした場合 6000 回、銀原子を標的とした場合 60000 回の暗黒物質粒子の検出が必要であることも明らかになった。これは方向情報のみを用いたヒストグラムを利用した判別に比べ厳しい条件で、１種類より２種類の情報を利用した方がより判定が難しくなることを示しており、直感に反する非自明な結果を得ることができたと言える。そのような現象が生じることに対して、妥当と考えられる理由も論文中[業績 1]で考察した。また、いずれの場合も、標的原子として銀原子を用いた場合の方が、フッ素原子を用いた場合よりもより多くの暗黒物質粒子の検出数が必要であることも明らかになった。これは、暗黒物質と散乱する原子が重いほど、原子核の形状因子の影響で散乱が起きにくくなるためである。**本論文は、固体検出器で典型的に用いられる銀原子を標的原子と想定した検出を計算した初めての成果であり、標的原子の質量による条件の変化、そこから類推される気体検出器と固体検出器の比較なども本論文で初めて議論された成果である。**

【２】暗黒物質粒子の質量について情報がないと仮定した場合

もし大型ハドロン衝突型加速器等の他の実験から暗黒物質粒子の質量に関する示唆を得られなかった場合、方向を検出できる直接検出実験で暗黒物質の質量と速度の分布の非等方性を同時に判別できるだろうか。図１１は、暗黒物質粒子の質量と速度の分布の非等方性という２つの性質を、最尤法を用いて同時に判別した結果である。【１】の場合と異なり、エネルギーのみ、あるいは方向情報のみを利用した場合に比べて、その両方の情報を利用した場合は２つの性質をより高精度で求めることができることが定量的に明らかになった。この傾向は、標的原子がフッ素の場合でも銀の場合でも同じである。**固体検出器で典型的に用いられる重い原子の場合に、質量と非等方性を同時に判別することを試みたのは本論文が初めてであり、その結果を用いて標的原子がフッ素の場合との比較を行ったこと**も本論文の主要な結果の１つである。

謝辞

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。

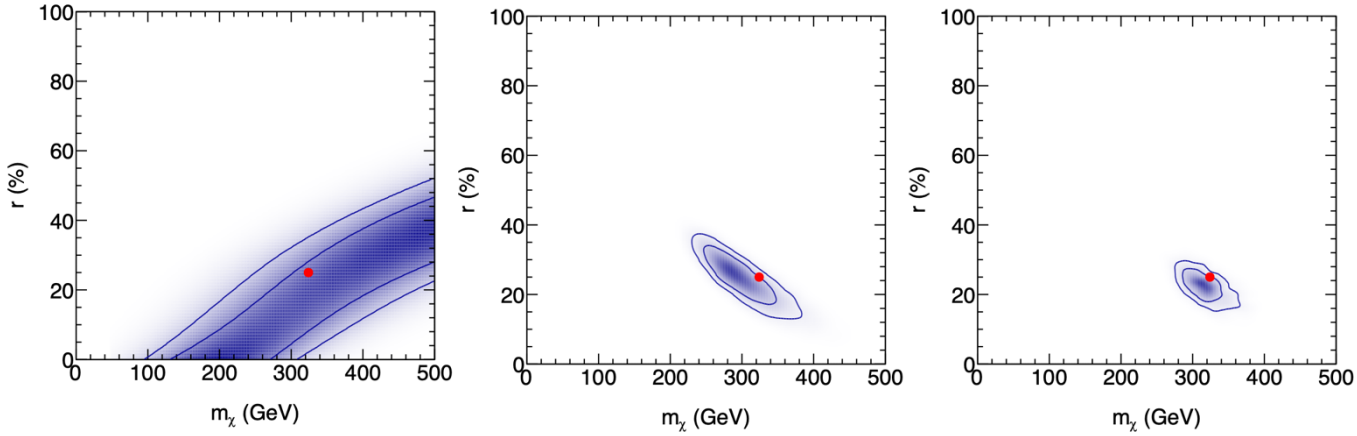


図１１．暗黒物質粒子の質量（横軸）と速度の分布の非等方性（縦軸）のもっともらしさを、最尤法により判定した結果。従来の直接検出実験のようにエネルギー情報だけで判定した結果（左図）、方向情報だけで判定した結果（中央）、エネルギーと方向情報の両方を利用して判定した結果（右図）。真の値は赤点で示されており、青い分布円の中央がこの点に近いほどより正確な判定であると言える。標的原子として銀を仮定した [業績 1]。

本研究助成による研究業績

（学術論文等）

1.“Discrimination of anisotropy in dark matter velocity distribution with directional detectors”、Keiko I. Nagao, Tomonori Ikeda, Ryota Yakabe, Tatsuhiro Naka, Kentaro Miuchi、Physics of the Dark Universe、 Volume 27, January 2020, 100426, 2020年(論文、査読有)

2. “Discrimination of Dark Matter Mass and Velocity Distribution by Directional Detection”、Keiko I. Nagao, Journal of Physics: Conference Series, Volume 1468, 16th International Conference on Topics in Astroparticle and Underground Physics (TAUP 2019), 012067、2020年（会議録、査読有）

3. “Discrimination of Dark Matter Mass and Velocity Distribution by Directional Detection”、Keiko I. Nagao、Proceedings of International Conference on Neutrinos and Dark Matter 2020、印刷中、2020年（会議録、査読有）

4. “Dark Matter Mass and Anisotropy in Directional Detector”、Keiko I. Nagao、Proceedings of the 1st Workshop on Phenomenology for Particle and Anti-Particle, 2018 (PPAP2018)、素粒子論研究電子版 Vol.28(2019), No.3, pp.6-10、2019年(会議録、査読無)

（国際会議招待講演）

1. “Anisotropy of dark matter velocity distribution and directional detection”、Keiko I. Nagao、NCTS Dark Physics Workshop、National Dong Hua University（中華民国)、2020年1月

（国際会議・国内学会一般講演）

1.“Discrimination of Dark Matter Mass and Velocity Distribution by Directional Detection”、Keiko Nagao、16th International Conference on Topics in Astroparticle and Underground Physics(TAUP2019), 富山、2019年9月10日（国際会議、ポスター発表)

2.“Discriminating WIMP Mass and Anisotropy with Directional Detector”、Keiko Nagao、NCTS Annual Theory Meeting 2019: Particles, Cosmology and Strings、台湾、2019年12月13日（国際会議、一般講演)

3. “Discrimination of Dark Matter Mass and Velocity Distribution by Directional Detection”、International Conference on Neutrinos and Dark Matter 2020 (NDM-2020)、Keiko Nagao、エジプト、2020年1月14日（国際会議、一般講演)

4.「方向感度をもつ暗黒物質の直接検出実験による軽い暗黒物質の検証」、長尾桂子、日本物理学会第75回年次大会、名古屋大学（一般講演、現地開催中止に伴い発表資料提出にて講演成立の扱い）

スピン反転を利用した長寿命光電荷分離システムの創製

岡山理科大学　理学部　化学科

満身　稔

電子ドナーとアクセプターから構成された系を光励起することによって生じる光電荷分離状態は高いエネルギーを持つため，電気あるいは化学エネルギーとしての利用が可能であると期待される．我々は，光捕集機能を持つ金属ポルフィリン錯体が形成する結晶格子内にアクセプターを導入したアクセプター内包多孔性金属ポルフィリン錯体に基づく光電荷分離システムの開発を行っている．本研究では，光電荷分離の長寿命化のために項間交差によるスピン反転が利用できるかどうかを検討するために，項間交差を示す金属ポルフィリン錯体として二種類の白金テトラアリールポルフィリン錯体 [Pt(TPP)] (**2**), [Pt(F_{20}TPP)] (**3**)を選び，アクセプターであるフラーレン C_{60} とナフタレンジイミド誘導体 NDI-Et を用いて共結晶化を行った．得られた共結晶 [Pt(TPP)]･NDI-Et (**2**･NDI-Et)と[Pt(F_{20}TPP)]$_3$･2C_{60}･12PhMe (**3**$_3$･2C_{60}) について，X 線結晶構造解析と分光化学的性質などの評価を行ったので報告する．

1．はじめに

金属－有機構造体（MOFs）や多孔性配位高分子（PCPs）とよばれる多孔性金属錯体では，光捕集を担う色素が高秩序で配列することによって高効率の光捕集と励起エネルギーの輸送が期待でき，近年，新たな光捕集システムとして注目されている[1]．しかしながら，光励起によって生じた励起子はすぐに失活するので，光エネルギーを電気や化学エネルギーに変換するには特別の工夫が必要である．そこで我々は，その工夫として光電荷分離状態を利用している．励起状態にある光電荷分離状態から，電気エネルギーを取り出せば光電変換システム（図１）となり，化学エネルギーを取り出せば人工光合成や様々な電子移動触媒となる．したがって，多孔性金属錯体に基づく光電荷分離システムは様々な用途で利用可能な光エネルギー変換材料を創製でき，エネルギー問題の軽減に貢献できると期待される．そこで我々は，多孔性金属錯体に基づく光電荷分離システムの開発を目指して，光励起状態にある金属ポルフィリン錯体から電子を受け取ることができるアクセプターを細孔内に内包したアクセプター内包多孔性金属ポルフィリン錯体の開発を行っている．これまで，フラーレン内包多孔性亜鉛ポルフィリン錯体

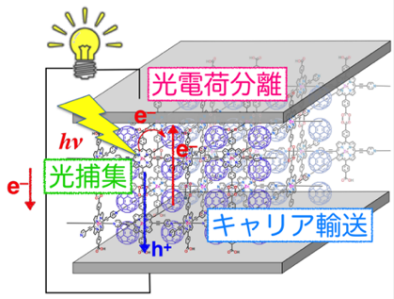


図1．光電変換システム．

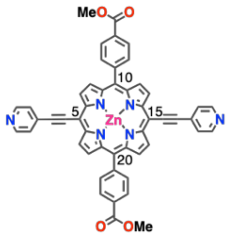


図2．亜鉛ポルフィリン錯体 **1**．

の初めての例となる錯体 **1**·C_{60} の結晶化と X 線結晶構造解析に成功している（図２）．また，過渡吸収分光法により，光電荷分離の生成を確認し，その寿命が 0.25 ns であることを明らかにしている[2]．しかしながら，このような系からエネルギーを取り出すには電荷分離の長寿命化が必要である．

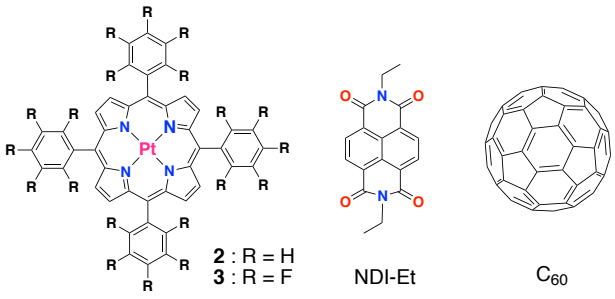


図 3．白金ポルフィリン錯体とアクセプター分子．

白金やパラジウムなどの重原子を含む金属ポルフィリン錯体では，項間交差によるスピン反転によって励起寿命が長寿命となることが知られている．本研究では，項間交差によるスピン反転を利用して光電荷分離の長寿命化を図れるかどうかを検討するために，項間交差を示す金属ポルフィリン錯体として二種類の白金テトラアリールポルフィリン錯体 [Pt(TPP)] (**2**), [Pt(F_{20}TPP)] (**3**)（図３）を選び，アクセプターであるフラーレン C_{60} とナフタレンジイミド誘導体 NDI-Et を用いて共結晶化を行った．得られた共結晶 [Pt(TPP)]・NDI-Et (**2**・NDI-Et) と [Pt(F_{20}TPP)]$_3$･2C_{60}･12PhMe (**3**$_3$･2C_{60}) について，X 線結晶構造解析と分光化学的性質等の評価を行った．

２．結果と考察

（１）共結晶化

[Pt(TPP)] (**2**)と NDI-Et を DMF に加熱して溶かし，除冷することにより[Pt(TPP)]･NDI-Et (**2**･NDI-Et)の暗赤色結晶を得た．一方，[Pt(F_{20}TPP)] (**3**)と C_{60} をトルエン–2-プロパノールから共結晶化を行い，[Pt(F_{20}TPP)]$_3$･2C_{60}･12PhMe (**3**$_3$･2C_{60}) の黒色六角柱状晶を得た．[Pt(TPP)] (**2**)と C_{60} の組み合わせでは，除冷法と拡散法のいずれの方法でも共結晶は得られなかった．

（２）X 線結晶構造解析

得られた共結晶[Pt(TPP)]･NDI-Et (**2**･NDI-Et)について 120K における結晶構造解析を行った（図４）．

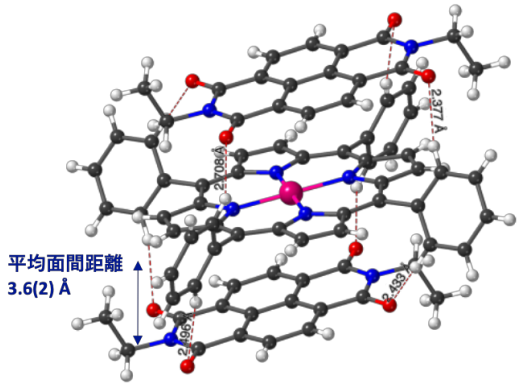


図 4. 共結晶 **2**･NDI-Et の結晶構造．

共結晶 **2**･NDI-Et は，錯体 **2** と NDI-Et が交互積層したカラム構造から形成されている．原子間距離から，積層方向に隣接した錯体 **2** のフェニル基の *o*-位の水素原子と NDI-Et の酸素原子との間に C–H···O 水素結合が働いていると考えられる．錯体 **2** のポルフィリン骨格と NDI-Et の間の平均面間距離が 3.6 (2)Å であることから，交互積層構造において π スタックの寄与は少なく，主に水素結合に起因していることがわかった．

[Pt(F_{20}TPP)] (**3**)と C_{60} の共結晶化によって得られた黒色六角柱状晶について，結晶構造解析を行なったところ，[Pt(F_{20}TPP)]$_3$･2C_{60}･12PhMe (**3**$_3$･2C_{60})であることがわかった．この共結晶の 150K における結晶構造を図５示す．Pt 原子は対称心上に，C_{60} は 3 回軸上にそれぞれ存在する．隣接するポルフィリン骨格と C_{60} 分子の間の距離は 2.9676 Å であり，π–π 相互作用が存在している．C_{60} は 3 分子の錯体 **3** と，錯体 **3** は 2 分子の C_{60} と接触しており，ハニカムシート状の二次元相互作用を形成していることがわかった．

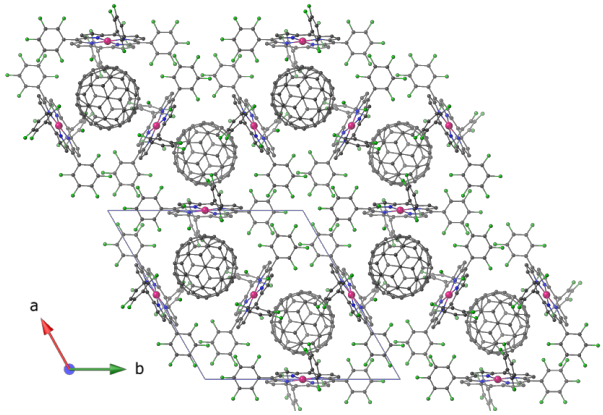


図５．共結晶 **3**$_3$･2C_{60} の結晶構造．

（３）紫外－可視吸収スペクトル

KBr 錠剤法で測定した **2**･NDI-Et の固体状態での紫外－可視吸収スペクトルを **2** と NDI-Et のスペクトルとともに図６に示す．**2**･NDI-Et の吸収スペクトルにおいて 420 nm 付近に観測される **2**･NDI-Et の Soret 帯は，錯体 **2** のみのときに比べてシャープに，520 nm 付近の Q 帯は比較的ブロードになっている．一方，錯体 **2** に比べ NDI-Et のモル吸光係数が非常に小さいためか，**2**･NDI-Et のスペクトルに NDI-Et

由来と考えられる吸収の特徴は見られない．一方，**3**$_3$･2C$_{60}$ の紫外・可視吸収スペクトルは，試料が足りず測定を行えていない．今後，測定を行なっていく予定である．

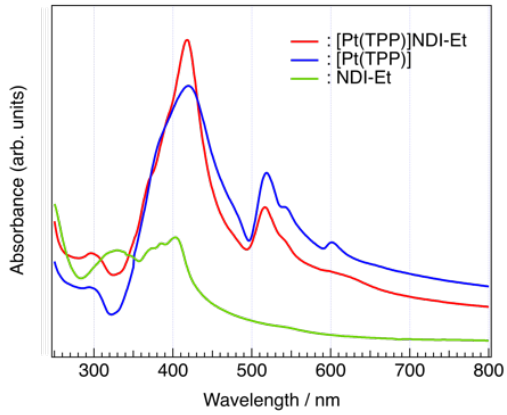


図６　**2**･NDI-Et の紫外－可視吸収スペクトル

（４）紫外－可視吸収スペクトル・発光スペクトル

[Pt(F$_{20}$TPP)] (**3**)の CH_2Cl_2 溶液における吸収スペクトルでは，Soret 帯が 391 nm，Q 帯が 507 nm と 540 nm に観測された（図７）．この Soret 帯は錯体 **2** の値 (401 nm) に比べ，高エネルギー側へシフトしている．これは，フッ素の導入によるポルフィリン環の電子密度の変化に起因していると考えられる．一方，発光バンドは 647 nm に観測された．

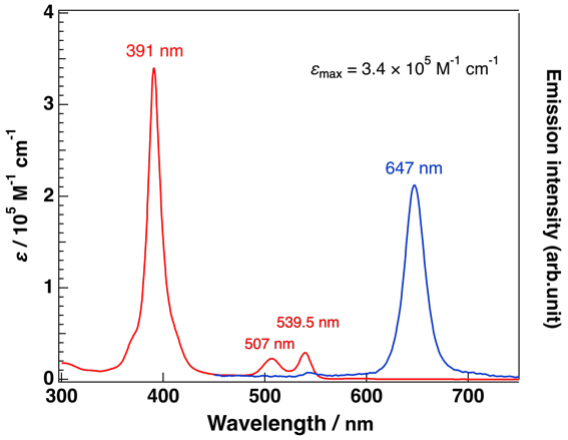


図７　錯体 **3** の CH_2Cl_2 溶液における紫外－可視吸収スペクトル・発光スペクトル

（５）過渡吸収スペクトル

図８に 400 nm の励起光で測定した **2**･NDI-Et の過渡吸収スペクトルを示す．光励起 292ps 後のスペクトルでは，420, 520 nm 付近に錯体 **2** の Soret 帯と Q 帯のブリーチングが観測され，錯体 **2** が励起種に変化していることが確認できた．17.1ns 後では，600～900 nm の領域に新たな吸収が現れている．報告されている *n*-pentyl 基をもつ NDI-n-Pen のアニオンラジカル種の吸収と比較すると，この吸収は NDI-Et$^{\bullet-}$アニオンラジカルが生成しているのではないかと考えられ，励起状態の錯体 **2** から NDI-Et に電子が移動し，電荷分離状態が発生している可能性がある．7.41μs 後では，目立った過渡吸収は確認されないものの，850 nm 付近に弱い吸収が確認され，マイクロ秒スケールの寿命を持つ何らかの励起種の存在が示唆される．しかしながら，これらの挙動の再現性を検討したがうまく再現できていない．今回の測定では，励起光が NDI-Et を直接励起している可能性があることなどから，NDI-Et の吸光強度が小さいポルフィリンQ帯付近の波長での励起による過渡吸収分光測定を行う予定である．一方，**3**$_3$･2C$_{60}$ の過渡吸収スペクトルは今後，測定を行う予定である．

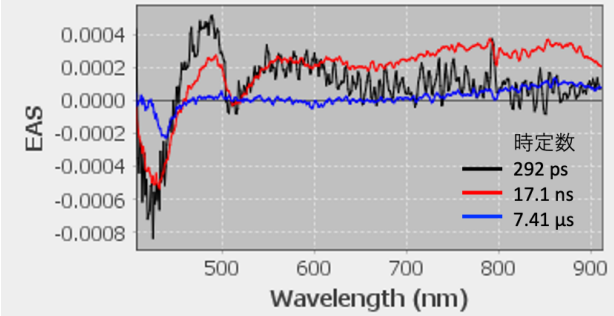


図８　**2**･NDI-Et の過渡吸収スペクトル（KBr 透過法）

（６）電気化学と分光電気化学測定

共結晶 **3**$_3$･2C$_{60}$ の過渡吸収スペクトルを測定し，電荷分離状態の帰属を行うにあたり，生じる錯体 **3** の一電子酸化体の吸収スペクトルを知る必要がある．そこで，サイクリックボルタンメトリー(CV)により錯体 **3** のジクロロメタン溶液での酸化電位を調べ，分光電気化学測定によって[Pt(F$_{20}$TPP･)]$^+$ の吸収スペクトル測定を行った．カソード側では二つの可逆な還元波，アノード側では三つの酸化波がそれぞれ観測された．$E_{1/2}$ = +1.30 V の酸化波のみが可逆であり，ピーク電位 1.64, 1.85 V の酸化波はともに非可逆的である．

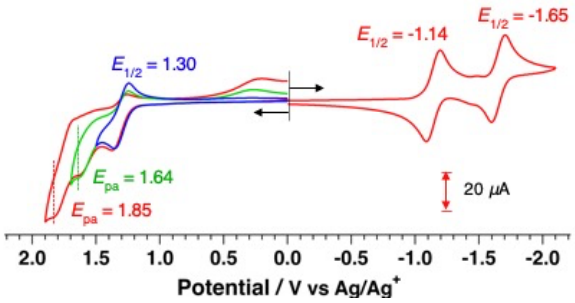


図９　錯体 **3** のサイクリックボルタモグラム

白金テトラアリールポルフィリン錯体では，第一波目の酸化反応においてポルフィリンπ-カチオンラジカルが生成することが報告されている[3]．このことから，$E_{1/2}$＝1.30 V の可逆な酸化反応においてポルフィリンのカチオンラジカル種 $[Pt(F_{20}TPP\cdot)]^+$ が発生していると予想される．

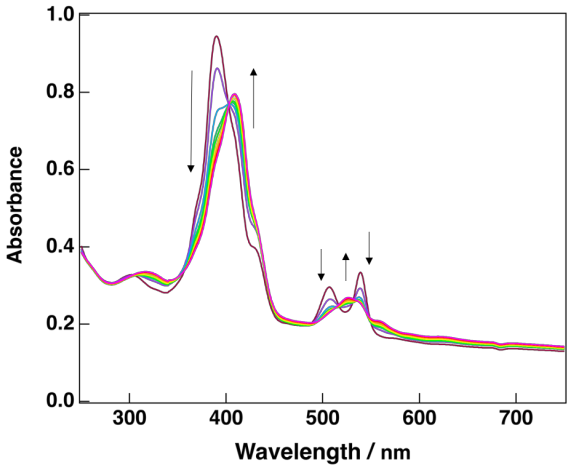


図 10　錯体 **3** の電解酸化吸収スペクトル

そこで，$[Pt(F_{20}TPP\cdot)]^+$が生成する 1.44～1.45 V で電解しながら錯体 **3** の分光電気化学測定を行なった．一電子酸化によって，Soret 帯は長波長側にシフトしながら吸光度が減少している．また，Q 帯の二つのピークはそれぞれ減衰し，その間の谷が盛り上がることによって一つのピークとなることがわかった．

３．まとめ

本研究では，項間交差によるスピン反転を利用して光電荷分離の長寿命化を図れるかどうかを検討するために，二種類の白金テトラアリールポルフィリン錯体 [Pt(TPP)] (**2**), $[Pt(F_{20}TPP)]$ (**3**)を選び，アクセプターであるフラーレン C_{60} とナフタレンジイミドとの共結晶化を中心に研究を行い，共結晶 **2**･NDI-Et と $\mathbf{3}_3\cdot 2C_{60}$ を得ることができ，X 線結晶構造を明らかにした．特に $\mathbf{3}_3\cdot 2C_{60}$ では，錯体 **3** と C_{60} がπスタックにより興味深いハニカムシート構造を形成していた．**2**･NDI-Et では，光励起 7.41 μs 後でも何らかの励起種の存在が示唆される．今後は，**2**･NDI-Et とともに $\mathbf{3}_3\cdot 2C_{60}$ の過渡吸収スペクトルを詳細に調べ，項間交差によるスピン反転を利用して光電荷分離の長寿命化を図れるかどうかを検証する予定である．

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による学術研究費助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます．また，本研究における過渡吸収分光測定は関西学院大学大学院理工学研究科 橋本秀樹教授, 浦上千藍紗博士にお世話になりました．御礼申し上げます．

５．文献

1. H.-J. Son et al., |*J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 862−869.
2. 堀内ら， 錯体化学会第65回討論会, 3Fa-03, **2015**.
3. P. Chen et al., *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 6200−6210.

６．研究成果

「アクセプター包接白金ポルフィリン錯体の合成，構造，光物性」，岡本大輝，松原壮志，満身稔，浦上千藍紗，橋本秀樹，錯体化学会第69回討論会，3PB-014，2019年9月23日，名古屋大学東山キャンパス

備前焼模様の材料科学的研究

岡山理科大学 工学部

草野 圭弘

登り窯で焼成した備前焼表面に現れる光沢ある黒色の呈色メカニズムを検討した。光沢ある黒色は、稲わらに含まれるカリウムと鉄分を多く含む粘土(備前粘土)が反応して呈色することがわかった。炭酸カリウム(K_2CO_3)を稲わらの代替物質とし、備前粘土とともに電気炉を用いて大気中にて1230℃まで昇温した後、電気炉内に一酸化炭素(CO)とアルゴン(Ar)が10 : 90 (vol%)の混合ガスを導入し、同温度で5h焼成した。その後、混合ガス雰囲気下で900℃まで冷却した後、電気炉内を大気圧とし、同温度で2hアニールを行った。得られた試料表面は光沢ある黒色となり、電気炉による焼成により再現することに成功した。また、アニール温度により試料表面の色調は著しく変化することが明らかとなった。

緒言

備前焼は岡山を代表する伝統工芸の一つである。釉薬を施さず、絵付けも行わないにも関わらず、焼成後の作品の表面には赤、オレンジ、黒、グレー、赤紫、金、銀色など様々な色模様が現れる。これらは、備前市周辺で採掘された鉄分を多く含む粘土(備前粘土)と、作品の間に挟まれる稲わらや燃料として用いられる赤松の成分が反応して現れると考えられている。

備前焼表面に現れる色調の中でも、金彩備前と称される金属光沢模様は極めて稀にしか現れない。赤松を燃料として登り窯で焼成された作品の表面に現れやすいことから、赤松に含まれる炭素が燃焼して作品の表面に薄膜状に付着し、その膜厚により金色や銀色の色調が現れると考えられていた[1]。我々は、金彩備前焼の微構造と呈色メカニズムについて検討した結果、金色の要因となる物質は炭素ではなく、備前粘土と稲わらの反応により生成した液相表面に、少量のアルミニウムが置換した、厚さが約100nmのアルファ酸化鉄(Ⅲ)(ヘマタイト, α-$Fe_{1.9}Al_{0.1}O_3$)が生成することにより金色となることを明らかにした[2]。また、稲わらの代替物質として試薬の炭酸カリウム(K_2CO_3)を用い、電気炉にて金彩備前焼の再現に成功した。

本研究では、金色の周囲に現れる光沢ある黒色の要因となる物質を特定し、その生成メカニズムを解明することを目的として検討した。

実験方法

表1に、本研究で用いた備前市内で採掘された備前粘土の成分分析結果を示す。SiO_2やAl_2O_3などの主要成分量は、磁器などに用いられる粘土とほぼ同じであるが、鉄分量は約7倍の3.82 wt%(Fe_2O_3換算)含んでいる。この鉄分が備前焼の様々な色調の要因となる。

金彩備前焼は、アルミナルツボの中央に備前粘土のペレットを配置し、その周囲にK_2CO_3をペレットに接触しないように散布し、電気炉を用い大気中にて1230℃まで昇温した後、電気炉内にCO : Ar = 10 : 90 (vol%)の混合ガスを導入して同温度で5h焼成し、混合ガス雰囲気下で900℃まで冷却した後、電気炉内を大気圧として同温度で2hアニールを行うと得られる[2]。光沢ある黒色は、金彩備前の周囲に現れることから、熱処理条件は同じであると考えられ、金彩備前の再現実験と同じ熱処理条件で試料を焼成した。

表 1　本研究で用いた備前粘土の成分分析結果(wt%)

SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	K_2O	TiO_2	MgO	CaO	Na_2O	MnO	Total
67.89	22.73	3.82	2.80	0.67	0.76	0.50	0.56	0.06	99.79

本研究では、散布するK_2CO_3量、アニール温度および時間と色調の関連について検討した。

得られた試料について、粉末X線回折(XRD)により試料表面の生成相を同定し、透過電子顕微鏡(TEM)により試料表面に生成した結晶相の微構造観察を行った。試料表面の色調は分光測色計により評価した。

結果と考察

金彩備前は、約2gの備前粘土ペレットおよび30 mgのK_2CO_3を焼成すると得られる。光沢ある黒色は金彩備前の周囲に現れることから、焼成条件は同じと考えられた。しかし、備前粘土と反応するK_2CO_3量は少ないと考えられ、少量のK_2CO_3と備前粘土の反応について検討した。得られた焼成体を図1に示す。K_2CO_3量が5.0 mg以下の試料において黒色の試料が得られ、K_2CO_3量が5.0mgの試料表面に光沢ある黒色が現れた。7.5 mg以上では金属光沢が現れることがわかった。これらの試料表面のXRDパターンを図2に示す。主な生成相は、石英(SiO_2)、ムライト($Al_6Si_2O_{13}$)およびクリストバライト(SiO_2)であった。K_2CO_3量が多くなると、ムライト、クリストバライトおよび石英の生成量が減少し、非晶質相の生成が顕著となっている。K_2CO_3量が5.0mg(c)および7.5mg(d)の試料表面にはコランダム(α-Al_2O_3)が生成している。K_2CO_3量が10mgの試料表面には、金色の要因となるヘマタイト(α-Fe_2O_3)が生成することがわかった。コランダムは無色の結晶(Fe置換材は赤味を帯びる)であり、ヘマタイトは赤色(Al置換材は黄色味を帯びる)であるため、黒色の要因となる物質ではない。

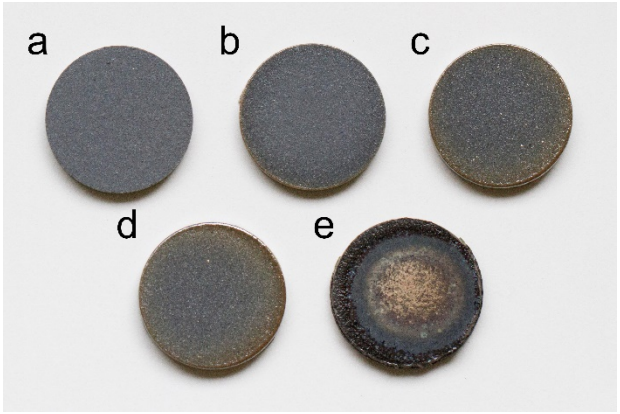


図1　備前粘土と(a) 0、(b) 2.5mg、(c) 5.0mg、(d) 7.5mgおよび(d) 10mg の K_2CO_3 を焼成して得られた焼成体の表面写真。

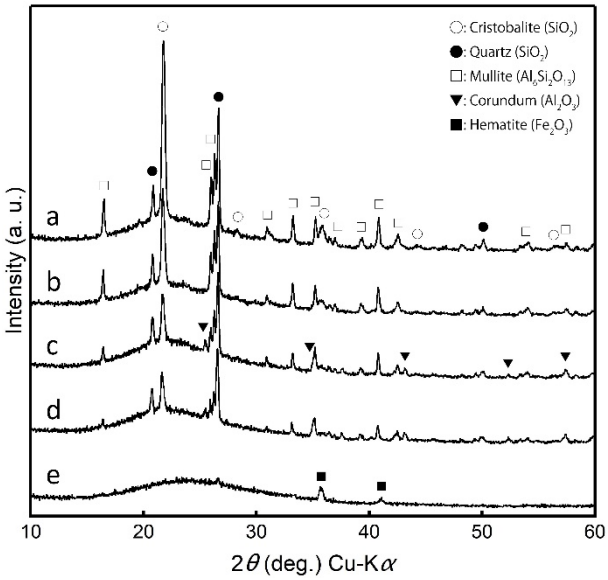


図2　図1の試料表面のXRDパターン。

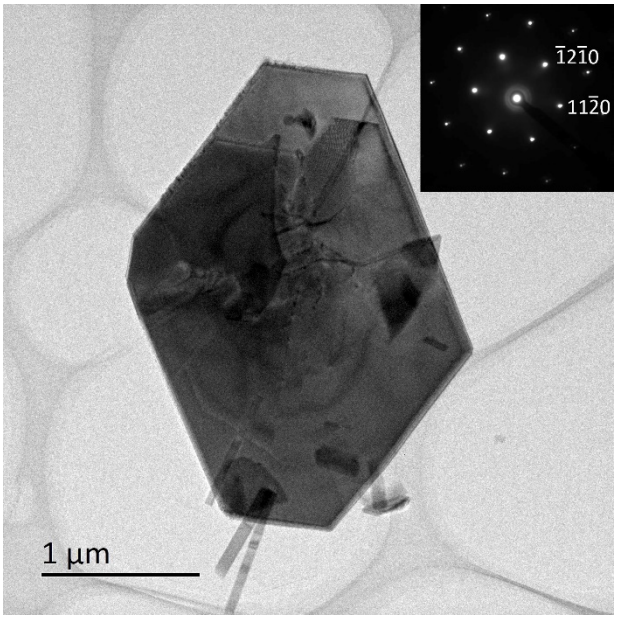


図3　図1(c)の試料表面に生成したコランダム粒子のTEM像。

図3に、図1(c)の試料表面に生成した結晶相のTEM像および電子回折(ED)パターンを示す。結晶相はガラス相中に埋まっているため、酸処理によりガラス相を除去した後、結晶相を超音波により四塩化炭素(CCl_4)に分散させ、マイクログリッドに滴下して観察を行った。主にスティック状のムライト粒子と図

3に示す六角板状の粒子が観察され、元素分析およびEDパターン(挿入図)から、板状粒子はFe置換コランダム(α-$(Al,Fe)_2O_3$)であることがわかった。この結果は、XRDの結果と一致している。

XRDおよびTEM観察から黒色の要因となる物質を特定することはできなかった。今後、メスバウアー分光測定、電子顕微鏡観察などを行い検討する予定である。

図4に、アニール温度の影響について検討した結果を示す。1100℃(a)でアニールした試料は、備前焼を代表する赤色の緋襷模様となり、1000℃(b)でアニールした試料表面は金属光沢が現れた。900℃(c)でアニールした試料表面は光沢ある黒色となり、800℃(d)でアニールした試料表面の色調は、混合ガス雰囲気下で室温まで冷却した試料表面と同じグレーであった。

このように、アニール温度により試料表面の色調は著しく変化することが明らかとなった。

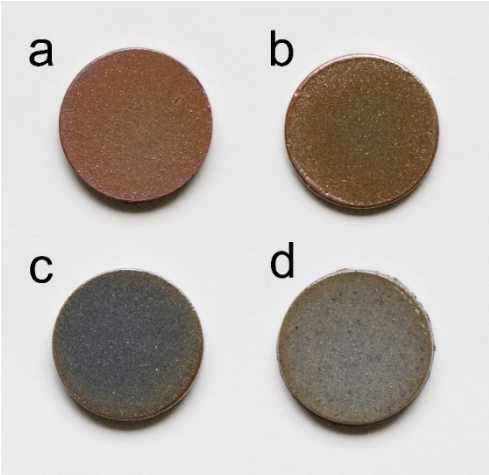


図 4　備前粘土ペレットおよび 5.0 mg の K_2CO_3 を混合ガス中で 1230 ℃で 5 h 焼成した後、大気中にて(a)1100℃、(b)1000°C、(c)900°Cおよび(d)800°Cで 2h アニールして得られた焼成体の表面写真。

まとめ

光沢を有する黒色は、金彩備前と同じ熱処理により現れるが、備前粘土と反応するカリウム量が金色部よりも少ないことがわかった。本研究では、5.0 mg のK_2CO_3と備前粘土を熱処理することにより、光沢がある黒色の焼成体の作製に成功した。更に、アニール温度により、試料表面の色調は著しく変化することを明らかにした。

謝辞

本研究をご支援くださいました公益社団法人ウエスコ学術振興財団に深く感謝申し上げます。

文献

1. 山口ら, 岡山理科大学紀要, **31**, 147-153, 1995.
2. Y. Kusano et al., Cryst. Growth Des., **18**, 4017-4021, 2018.

AIによるLPデータを用いた定量的な危険度評価手法の開発

岡山理科大学　生物地球学部　生物地球学科

佐藤丈晴

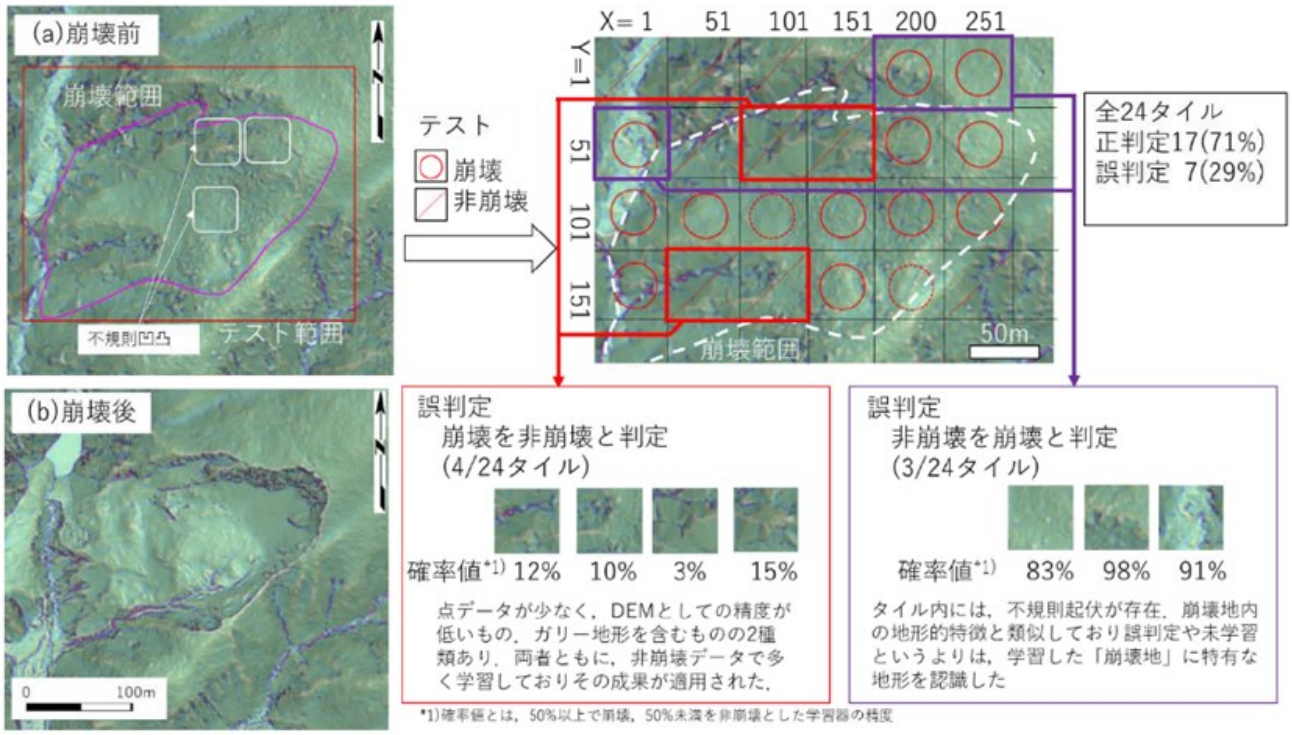
近年航空測量データの整備が急速に行われており、このデータの活用方法の開発が進んでいる。その中で、LPデータから地形解析図を作成し、危険箇所を評価する技術が数多く紹介されてきた。しかし、これらの方法はAIを用いた画像認識に基づいて行われている。このため、画像を跨ぐ崩壊箇所の表現の問題や画像そのものの解像度による評価精度の課題、そして大量の画像データの作成など様々な課題がある。さらに根本となる定量的なデジタルデータを画像データ（RBGなど）で表現しており、測量データを有効に活用できていない。本研究では、定量的な測量データであるLPデータをそのまま用いてAIに学習させることによる危険度評価手法の開発を試みた。LPデータは、細密な測量データであるものの、土砂災害に寄与する地形量の算出には細密すぎることから周辺メッシュを用いて平滑化を行い、ノイズの消去を行った。平滑化したLPデータは、標高のみであるので、危険性を表現する地形量（ここでは、傾斜量とラプラシアン）の算出をメッシュごとに実施した。目的変数は、航空測量データと災害前後のLPデータの差分を用いて詳細な崩壊箇所の特定を行い、メッシュごとに評価した。この災害データを学習したAIモデルによって、テストを行ったところ、地質調査技術者の評価と同等の危険度評価ができる可能性を示したことを確認した。

１．研究の背景

近年航空測量による測量データ（以下LPと記す）の活用が進んでいる。航空測量は上空から地上に向けて膨大な量（数百万発/秒）のレーザーを照射することで山林の木々をすり抜け地表の標高を誤差15cm以内の精度で面的に測量できる技術である。この詳細な測量データを活用して地形解析図を作成し、地質技術者による専門的な視点から斜面や堤防などの危険度評価を行っている。

さらにAIを用いて評価を行っている事例も散見されるが、準備段階においてさまざまな地形解析図などの画像を準備し、細かい画像分割を行うなど従前準備段階において、膨大な作業を要する方法であるため、研究としては非常に興味深いが、現時点では実用的とはいいがたい。例えば、菊池他（2019）では、地形解析図をタイル状に分割し、各画像をAIによって災害発生箇所と非発生箇所の分類を行った（図－1）。その結果崩壊地はおよそ9割、非崩壊地は8割の正答率を返した。しかしながら、この研究で使用したデータは、50m四方のタイルの単位で判定したものであり、50m四方より小さな複数斜面を一つと判定したものである。また規模の大きな斜面の場合は、複数タイルにまたがるので、その判定の意味する評価が難しい。道財他(2019),川上他(2019),古木（2019）なども、地形解析図をタイル状の画像に分割し、画像認識による崩壊地や目的とする地形の抽出を試みている。しかしいずれも、タイルの大きさや解像度などに影響を受け、LPデータを効果的に利用できているとはいいがたい。国土交通省の基盤地図情報で公開されている5mメッシュデータでも十分に事足りる精度となっている。

現時点でLPの使用方法は、地形解析図を作図することに留まっている。この作図方法は各研究者、各企業によってさまざまであり統一した地形要因や評価が定まっていないのが実情である。また、地形解析図の作図は、見栄え重視の定性的な評価に留まっている。本研究では、各社の特許技術である地形解析図の作図を除いた視点から危険箇所を簡易にかつ定量的に評価するという方法を考えることにある。



図－1　菊池他（2019）における解析結果の一例

2．研究の方法

本研究は、以下の研究項目ごとに遂行した。今年度の成果は、4 の危険度評価システムを開発し、5 の評価を行ったところである。第 6 章の今後の課題でも述べるが、項目 4 と 5 を繰り返し実施し、最適なシステムの確立を今後目指す必要がある。

項目 1．災害箇所の特定および LP の収集

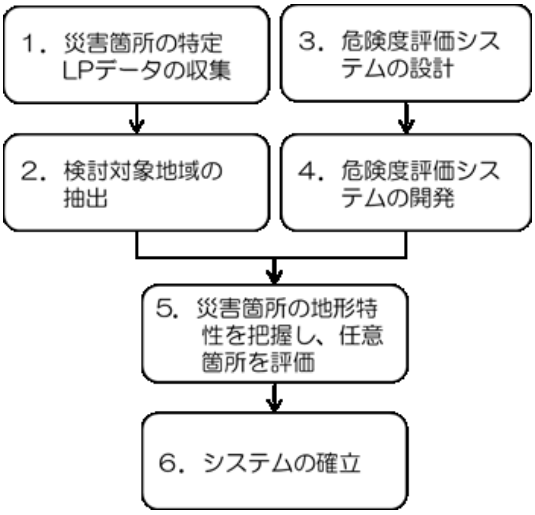
近年の豪雨災害で災害が発生した箇所の範囲について調査する。また、LP の有無についても調査する。

項目 2．検討対象地域の抽出

LP 計測範囲と既往の被災箇所を重ねあわせて、災害前後で LP がある地域を絞り込む。災害前後の LP の必要性として、その差分を取ることで崩壊範囲を明確に絞り込むことができる。

項目 3．危険度評価システムの設計

評価に用いる AI のシステム設計を行う。現状の LP の保存状況から、簡易に評価できる方法を考慮し、運用妥当性の高い構成を考える。



図－2　研究手順のフロー

項目 4．危険度評価システムの開発

設計どおりにシステムを構築する。

項目 5．災害箇所の地形特性を把握し、任意箇所を評価

整理したデータをシステムに入力・学習させ被災箇所の地形特性を AI に認識する。

項目 6．システムの確立

学習結果を検証し、4、5、6 の作業を繰り返す。検証を重ねて正しく評価できるシステムを構築する。

0.000335463	0.018315639	0.000335463
0.018315639	1	0.018315639
0.000335463	0.018315639	0.000335463

3メッシュ近傍の平滑化における重み付けの数値例

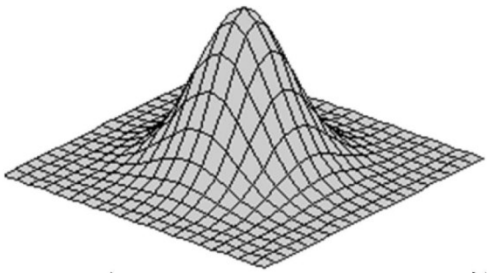
0.000335463	0.006737947	0.018315639	0.006737947	0.000335463
0.006737947	0.135335283	0.367879441	0.135335283	0.006737947
0.018315639	0.367879441	1	0.367879441	0.018315639
0.006737947	0.135335283	0.367879441	0.135335283	0.006737947
0.000335463	0.006737947	0.018315639	0.006737947	0.000335463

5メッシュ近傍の平滑化における重み付けの数値例

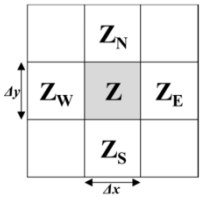
0.000335463	0.003095587	0.011743628	0.018315639	0.011743628	0.003095587	0.000335463
0.003095587	0.028565501	0.108368023	0.169013315	0.108368023	0.028565501	0.003095587
0.011743628	0.108368023	0.411112291	0.641180388	0.411112291	0.108368023	0.011743628
0.018315639	0.169013315	0.641180388	1	0.641180388	0.169013315	0.018315639
0.011743628	0.108368023	0.411112291	0.641180388	0.411112291	0.108368023	0.011743628
0.003095587	0.028565501	0.108368023	0.169013315	0.108368023	0.028565501	0.003095587
0.000335463	0.003095587	0.011743628	0.018315639	0.011743628	0.003095587	0.000335463

7メッシュ近傍の平滑化における重み付けの数値例

図－3　平滑化メッシュの範囲

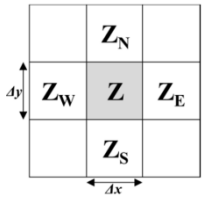


図－4　ガウス関数



$$Slope = \frac{360}{2\pi} \cdot arctan\left[\sqrt{\left(\frac{Z_E - Z_W}{2\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{Z_N - Z_S}{2\Delta y}\right)^2}\right]$$

図－5　傾斜量の算定式



$$lap = \left(\frac{Z_E - 2Z + Z_W}{\Delta x^2}\right) + \left(\frac{Z_N - 2Z + Z_S}{\Delta y^2}\right)$$

図－6　ラプラシアンの算定式

３．入力データの作成

3.1 データの平滑化

LP データは大変細密であるため、災害には影響のない非常に微細な地形変状を捉えていることから、解析時にノイズとして検出されるため、周辺メッシュの標高値を用いて平滑化を行う。今回は、gauss 関数を用いた lowpassfilter を採用した。

このフィルターは、テレビなどの画像でノイズを取る代表的手法であり、神原・佐藤（2014）で用いた方法。上図と同様に周辺メッシュの標高値を用いて距離に応じた重み付けを行い平滑化する方法である（図－3）。

図－3 の重みづけの数値は灰色のメッシュを中心とし、釣鐘型のガウス関数（図－4）を設置する。このガウス関数の中心の重みを 1 とすると、メッシュ間の距離に応じて周辺メッシュの重み付けされる。

3.2 地形量の算定

土砂災害が発生する素因（地形）はある程度の傾向があることが知られている。神原、佐藤（2014）、佐藤、中島（2016）、神原他（2017）では、傾斜量とラプラシアンの二指標を用いて評価を行い、斜面のリスク評価を行っている。

傾斜量は、土砂災害を語る上で最も基本的な数値であり、DEM を用いると一次微分で算定することが可能である（図－5）。例えば、傾斜量は 25 度～45 度付近で最も発生しており、大きくなるほど（例えば 60 度や 80 度等）災害が発生しやすいものでもない。地すべりと崩壊では、その角度の分布も大きく変化する。したがって、細密 DEM から様々な地形量を算定し、それらの状況から評価する必要がある。

また地形の凹凸を示すラプラシアンも重要な指標である。斜面上部が張り出しており、末端が急傾斜となっている斜面は安定度が低いとされる。また、地形的な欠陥（キレツや断層、リニアメント）といった微地形要素もラプラシアンによって抽出することができる。ラプラシアンは二回微分値であり斜面の凹凸を表現する指標である。ラプラシアンが正となった場合は、周辺よりも低いことを意味しており谷部を示す。負となった場合は周辺よりも高いということより尾根を示すこととなる。斜面の小さな凹凸を抽出することができることから、斜面のキレツ、段差地形、二重山稜といった微細な地形変化を捉え

ID	x	y	標高	傾斜量	ラプラシアン	崩壊地
1000001	-57499	-210501	105.12	0.30	0.0069	0
1000002	-57498	-210501	105.13	0.34	0.0022	0
1000003	-57497	-210501	105.13	0.24	-0.0053	0
1000004	-57496	-210501	105.14	0.11	-0.0117	0
1000005	-57495	-210501	105.14	0.31	-0.0148	0
1000006	-57494	-210501	105.13	0.55	-0.0087	0
1000007	-57493	-210501	105.12	0.52	0.0044	0
1000008	-57492	-210501	105.11	0.16	0.0102	0
1000009	-57491	-210501	105.11	0.34	0.0025	0
1000010	-57490	-210501	105.12	0.32	-0.0049	0
1000011	-57489	-210501	105.12	0.20	-0.0028	0
1000012	-57488	-210501	105.12	0.20	0.0017	0
1000013	-57487	-210501	105.13	0.31	-0.0029	0
1000014	-57486	-210501	105.13	0.62	0.0076	0
1000015	-57485	-210501	105.15	2.15	0.0512	0
1000016	-57484	-210501	105.20	4.59	0.0524	0

図－7　LP データと崩壊地データの結合

られる。DEM を用いた算出式は図－6 のとおりである。

3.3 崩壊地データの結合

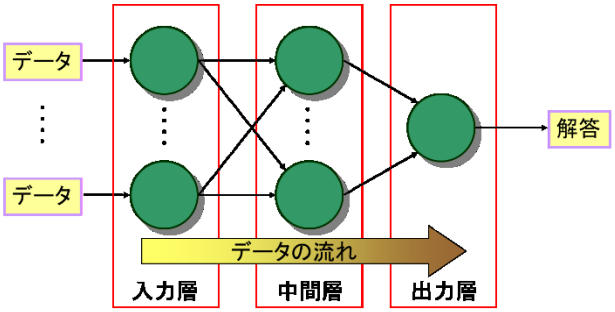
AI に学習させるデータについて、本研究では、平成 21 年防府災害の被災地の LP データを採用した。この地域では、災害前後に LP 計測を実施しており、災害前と災害後の地形変化から学習する崩壊箇所のデータが明確に定義できることが採用理由である。

山中の LP データの誤差がおよそ 15 cmであることを考慮して 50 cmの差分が災害前後であれば、被災地として着色した。

図－7 に入力データの例を示した。座標ごとに標高、傾斜量、ラプラシアン、崩壊地（0 が非崩壊、1 が崩壊）を整理した。このデータを入力データとして採用した。

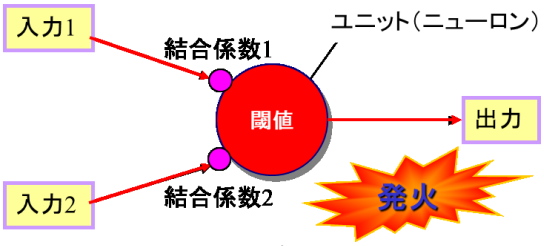
4．本研究で用いたニューラルネットワーク

本研究では、3 層階層型ニューラルネットワークを用いた（図－8）。3 層階層型とは、入力層、中間層、出力層を備えたニューラルネットワークを示しており、データは入力層から出力層へユニットを介して、計算する。このニューラルネットワークが人工知能と言われるのは、図－8 に示した構造が人間の脳を模しているからである。各ユニットは脳細胞の模したニューロン構造を示している（図－9）。左から得



図－8　三層階層型ニューラルネットワーク

【ニューロンモデル】



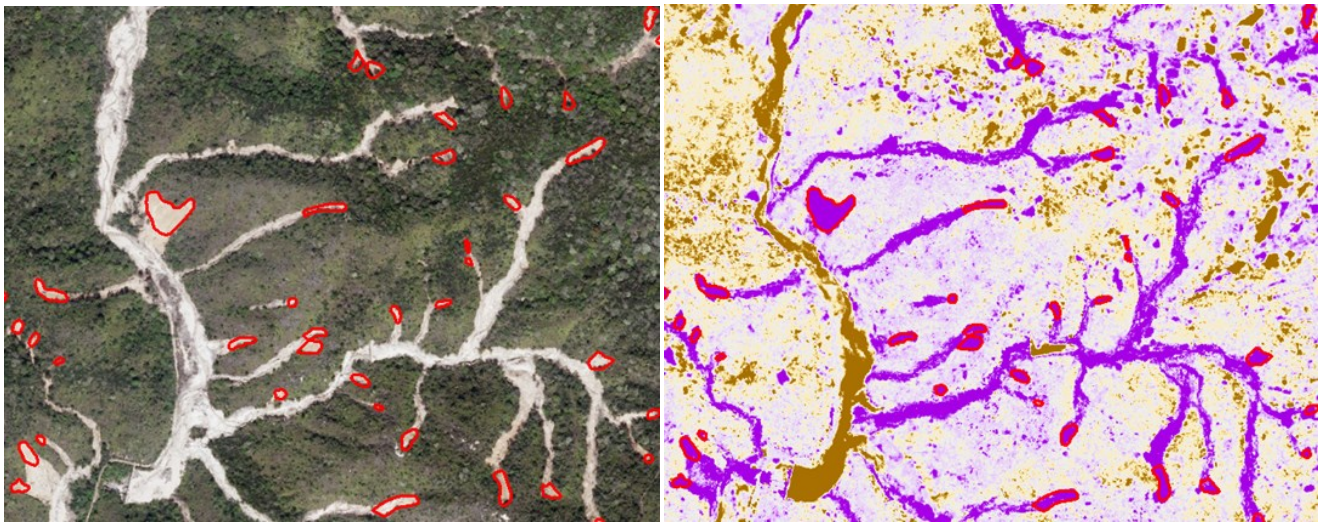
図－9　ニューロンモデル

られた情報は結合係数を経て神経細胞に情報が伝わる。ニューロンに入った情報が閾値を超えると次のニューロンに情報を発することを発火という。人間の脳は、このニューロン構造がネットワーク状（図－8）に配列されたものであり、適切な対応をとることができる。例えば人は目の前に焼き立てのパンが出てきた場合、視覚、聴覚、臭覚、触覚から情報を得た脳は、その時の状況に応じてパンを手に取り食するかどうかを判断するという判断を、図－8 をより複雑化した脳によって決定することと同様である。

本研究では、既往の災害発生箇所を学習することで過去に災害が発生した傾向を地形の視点から特定することを目的としている。前章までに整理した標高、傾斜量、ラプラシアンの数値を用いて入力データを作成し、ニューラルネットワークに学習させ、得られた結果について考察を行う。

5．解析結果

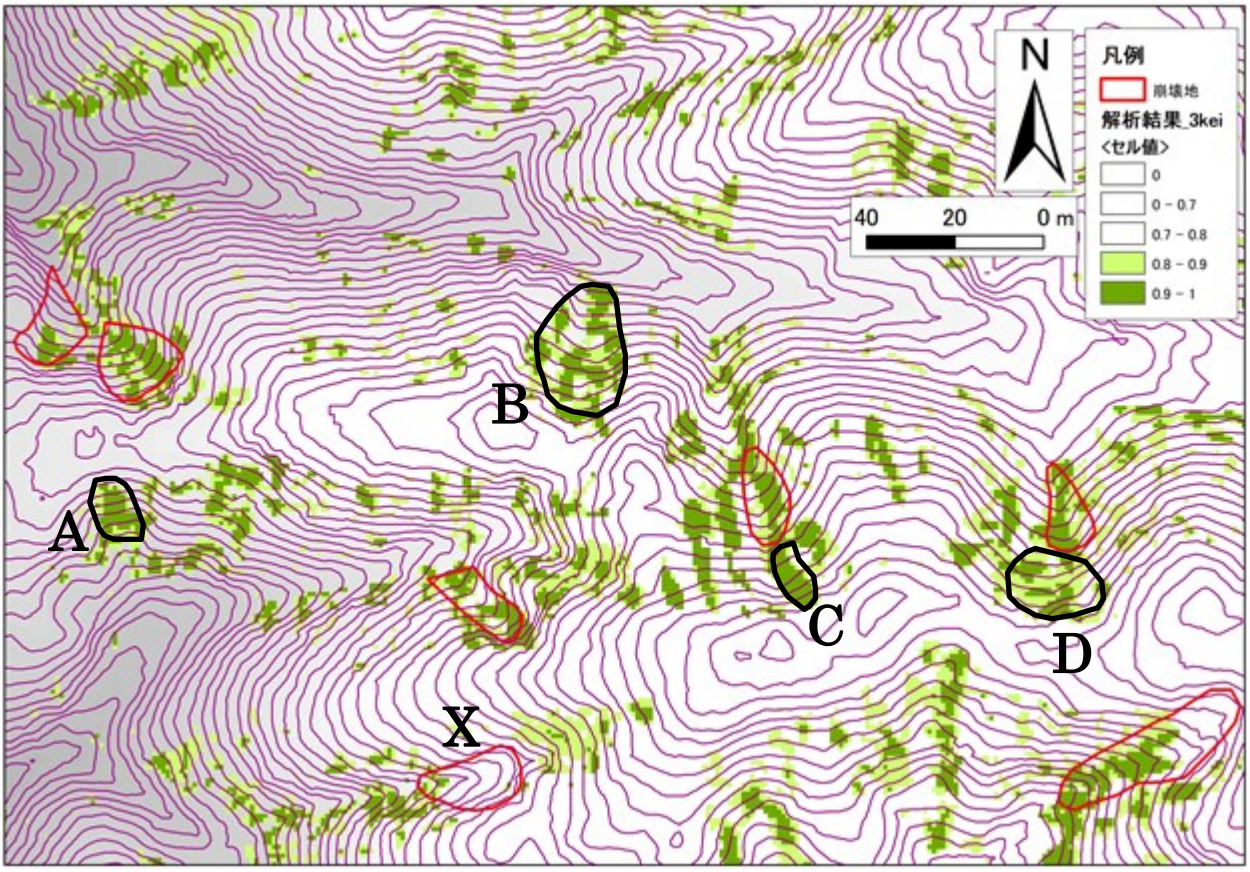
本研究対象地は、平成 21 年で大規模な災害が発生した山口県防府市剣川流域を対象とした（図－10 左）。入力に用いた目的変数の災害発生箇所は、図－10 左を基にして、渓流上部の災害発生箇所をポリゴ



図－10　検討対象箇所の被災状況（左図：航空写真、右図：LP 差分図）

ンデータとして抽出した（赤枠）。また本対象地域では、災害発生前後で、LP データを取っていたことから、その差分を計算した（図－10 右）。図－10 右では、紫色が、災害後標高が低下した箇所を示しており、土石流災害によって、斜面が削り取られた場所、もしくは災害が発生した場所を示している。これに対して、図－10 右中の茶色の場所については災害後に標高が上がった場所を示しており、土砂が堆積した場所を示している。

本研究の解析結果を図－11 に示した。解析結果で閾値を 0.8 に設定し、それ以上の箇所を危険箇所と評価した。図中赤枠の崩壊地と比較すると 7 か所の崩壊地に対して、箇所 X を除いて 0.9 以上のメッシュがあった。箇所 X は、渓床部の再移動型であり冠



図－11　解析結果と崩壊箇所の関係

頭部の崩壊地とは異なる形態であることから地形から箇所Xを的中させることは難しいことは予測される。箇所Cの中腹でも同様の渓床再移動型の土石流が発生しているが、この箇所については、箇所Cの冠頭部から斜面末端までの全体の崩壊を予想している。H21災害時には、冠頭部（箇所C）は持ちこたえたが、斜面中腹の崩壊地から不安定化し下流部が崩壊したと考えられる。箇所Dも同様であり、箇所CとDは、斜面上部に不安定土塊が残存しているといえる。箇所A、箇所BはH21年の災害では、崩壊しなかったが、危険度の高い斜面である。このように着目箇所を図化することは、今後の現地調査や点検斜面の優先度評価に応用可能である。

６．まとめと今後の課題

本研究では、LPデータと既往災害履歴データを用いて、災害発生箇所の地形的特徴をAIに学習させ、近接地域で面的な斜面崩壊危険度の評価を行った。

以下に本研究の成果について記述する。

1)本研究では､H21防府災害地域のLPデータを用い、航空写真と被災前後の差分から崩壊地の詳細な分布範囲を特定することができた。この方法は、LP データがあればどの地域でも実施できる方法である。また、差分の大小によって崩壊深さの分布も定量的に評価することも可能である。

2)崩壊に寄与する地形量として傾斜量とラプラシアンを算定し､LPメッシュと同じ単位で地形量を算出することができた。同じメッシュで標高、傾斜量、ラプラシアンの三種の地形データと崩壊の有無のデータを整理できた。このデータは、本研究以外でも斜面の地形的特徴を分析するうえで基本的なデータとなることから、他目的で応用することも可能である。

3)得られた結果をGISで図示したところ、地質調査技術者が確認して危険と思われる斜面は危険度が高いと評価された。また、H21年災害時の崩壊地と比較してもほぼ同様の結果が得られた。

続いて本研究の課題について、以下に記述する。

1)その一方、図－8で示したネットワークのウエイト（図－9の結合係数）で確認すると、地形的特徴量に明確な差がないことから、地形量ごとの分類が進んでいないと考えられる。このことは、より深く詳細なネットワークを採用することで、より精度の向上することを示唆している。この対応として深層学習（ディープラーニング）が考えられ、今後検討を進めたい。

2)また、今回はH21年度防府災害の発生箇所について、航空写真（図－10）と災害前後の差分量（図－10）を用いて忠実に再現を行った。しかし、その一方で、現地調査時になぜこの斜面が崩壊したのかを明確に説明できない箇所や冠頭部の崩壊と斜面全体の崩壊、渓床移動型の崩壊など崩壊地をすべて同じように抽出を行い、入力データを作成したことも、地形量ごとの分類があいまいになった原因であると考える。

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す。ここに記して感謝申し上げます。

参考文献：

神原規也，佐藤丈晴（2014）：マスムーブメント地形解析にあたってのラプラシアン図表現手法，砂防学会誌，Vol.67，No.1，pp.41-47，2014.5

神原規也、佐藤丈晴、鈴木素之（2017）：細密DEMを用いたマスムーブメント地形解析にあたっての傾斜量表現手法，日本地すべり学会誌，Vol54，No.3，pp.32-39，2017.5

菊地輝行，崎田晃基，秦野輝儀，吉川慶，西山哲，大西有三（2019）：深層学習による崩壊・非崩壊地の自動判読手法の開発，地すべり学会誌，第56巻，第5号，p.255-263

佐藤丈晴、中島翔吾（2015）：大規模崩壊の兆候となる微地形の抽出手法　－天川村における評価事例－，日本地すべり学会誌，Vol52，No.3，pp.29-33，2015.6

血管機能に対する *Streptococcus* 属菌体毒素の影響：高血圧症の新規病態機序解明に向けて

岡山理科大学　獣医学部　獣医薬理学教室

向田昌司

近年、腸内フローラ研究の進展が著しく、社会的にも大きな関心が寄せられている。高血圧症研究の中で、自然発症高血圧ラット SHR において、「善玉菌であるビフィズス菌の減少」や「*Streptococcus* 属の顕著な増加」などの腸内フローラの乱れにより、腸管で免疫応答が起こることで交感神経の活性が上昇し、結果として血圧が上昇するのではないかとの報告がある。一方、SHR では腸管の透過性が亢進することから、悪玉菌由来の細菌毒素が血圧調節に関わる臓器に直接作用し、高血圧を誘導している可能性も考えられるが、*Streptococcus* 属由来の細菌毒素と血圧との関係の詳細は解明されていない。そこで、申請者は「腸管透過性亢進を伴う高血圧症において、*Streptococcus* 属由来の細菌毒素が、血圧調節に関わる血管へ直接作用し、炎症性障害を介して血圧を上昇させているのではないか」との仮説を立てた。本研究は、常在菌である *Streptococcus pyogenes* の細菌毒素ストレプトリジン O の影響について注目し、細菌毒素が血圧調節に関わる血管の機能に直接的に影響を与えるかどうかの検討を行った。

1. 背景と目的

近年、腸内フローラ研究の進展が著しく、社会的にも大きな関心が寄せられている。その要因として、腸内細菌と宿主の免疫応答との関係について、数百種に及ぶといわれる腸内細菌の中から免疫応答に関わる菌種が特定され、さらにメカニズムについて分子レベルで解明されるようになったことなどが挙げられる。そして最近、この免疫応答が中枢神経系の活性に関与し、高血圧症や糖尿病といった生活習慣病から精神病発症や発達障害にまで関与することが報告され、研究領域が飛躍的に拡大している。

最近の循環系研究の中で、腸内細菌と高血圧症との関係に関する研究が注目されている。一例として、自然発症高血圧ラット SHR において、「善玉菌であるビフィズス菌の減少」と「*Streptococcus* 属の顕著な増加」などの腸内フローラの乱れにより、腸管で免疫応答が起こることで交感神経の活性が上昇し、結果として血圧が上昇するのではないかとの報告がある [1, 2]。一方、SHR では腸管の透過性が亢進することから、悪玉菌由来の細菌毒素が血圧調節に関わる臓器に直接作用し、高血圧を誘導している可能性も考えられる。実際、悪玉菌である *Streptococcus* 属の一種（B 群β溶血性レンサ球菌）に感染すると、この細菌毒素が肺に作用し、肺高血圧症の原因になりうる可能性が示唆されている [3]。しかしながら、細菌毒素と血圧との関係の詳細は解明されていない。

以上のような研究背景から、申請者らは「腸管透過性亢進を伴う高血圧症において、*Streptococcus* 属由来の細菌毒素が、血圧調節に関わる血管へ直接作用し、炎症性障害を介して血圧を上昇させているのではないか」との仮説を立てた。本研究では、常在菌である *Streptococcus pyogenes* の細菌毒素ストレプトリジン O の影響について注目し、細菌毒素が血圧調節に関わる血管の機能に直接的に影響を与えるかどうかの検討を行った。

2. 方法と結果

（1）細菌毒素ストレプトリジン O が血管収縮反応に及ぼす影響

上記の仮説を検証するために、ラット大動脈を用いて、細菌毒素ストレプトリジン O が血管収縮性に及ぼす影響を検討した。7-10 週齢ウィスターラットから摘出した大動脈に、ストレプトリジン O 処置（10-1000 ng/ml, 30 分）し、マグヌス法により収縮性張力を測定した。ストレプトリジン O はフェニレフリンによる収縮反応性や最大収縮率に影響を与え

なかった（図 1A, B）。同様に、ストレプトリジン O はアンジオテンシン II 誘導性の収縮反応性や最大収縮率にも影響を与えなかった（図 1C, D）。

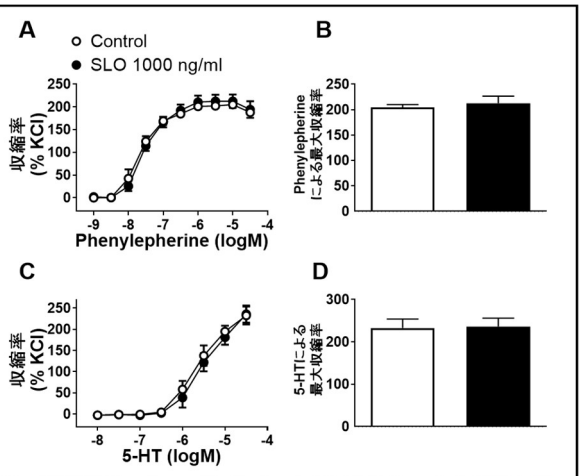


図1　細菌毒素ストレプトリジン O (SLO)がラット大動脈収縮反応性に及ぼす影響
SLO (1000 ng/ml, 30分)処置したラット大動脈における phenylepherineによる濃度反応曲線（A）と最大収縮率（B）。SLO処置したラット大動脈におけるセロトニン（5-HT）による濃度反応曲線（C）と最大収縮率（D）。

（2）細菌毒素ストレプトリジン O が血管弛緩反応に及ぼす影響

次に、細菌毒素ストレプトリジン O が血管弛緩反応に及ぼす影響を検討した。大動脈にストレプトリジン O 処置（10-1000 ng/ml, 30 分）し、マグヌス法により収縮性張力を測定した。ストレプトリジン O はアセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応を有意に低下させた（図 2A, B）。一方、sodium nitroprusside による内皮非依存性弛緩反応に影響を与えなかった（図 2C, D）。以上のことから、本細菌毒素の処置は、血管内皮細胞に作用し、弛緩反応を障害することが示唆された。

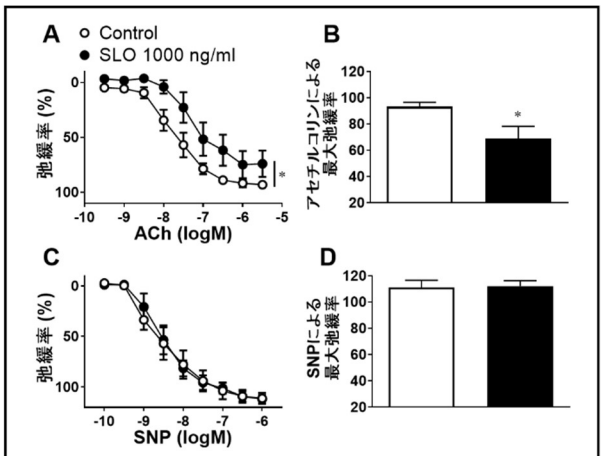


図2　細菌毒素SLOがラット大動脈弛緩反応性に及ぼす影響
SLO (1000 ng/ml, 30分)処置したラット大動脈におけるアセチルコリンによる濃度反応曲線（A）と最大弛緩率（B）。SLO処置した大動脈におけるsodium nitroprusside（SNP）による濃度反応曲線（C）と最大弛緩率（D）。

（3）細菌毒素ストレプトリジン O が内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）の活性および eNOS 阻害薬の影響

細菌毒素が eNOS の活性に及ぼす影響を検討した。ストレプトリジン O の処置により、活性抑制に働く eNOS Thr495 のリン酸を有意に亢進した（図 3A）。一方、細菌毒素処置により、eNOS 発現に影響を与えなかった。また、eNOS 阻害薬 L-NAME の処置により、アセチルコリンによる弛緩反応は完全に阻害された（図 3B）。以上の結果から、ストレプトリジン O は血管内皮細胞の eNOS 活性化を抑制し、結果としてアセチルコリンによる弛緩反応を障害することが示唆された。

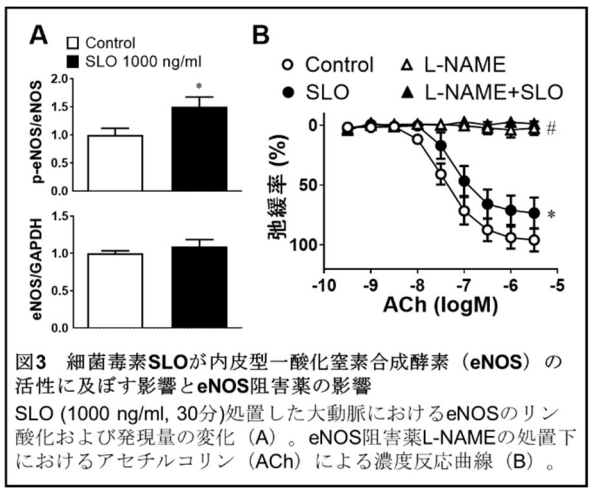


図3　細菌毒素SLOが内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）の活性に及ぼす影響とeNOS阻害薬の影響
SLO (1000 ng/ml, 30分)処置した大動脈におけるeNOSのリン酸化および発現量の変化（A）。eNOS阻害薬L-NAMEの処置下におけるアセチルコリン（ACh）による濃度反応曲線（B）。

（4）細菌毒素ストレプトリジン O が p38 MAPK の活性に及ぼす影響とその阻害薬の影響

これまでに、肥満細胞にてストレプトリジン O は p38 MAPK およびプロテインキナーゼ C（PKC）を活性化することが報告されている [4]。初めに、ストレプトリジン O がラット大動脈において p38 MAPK を活性化するかどうか検討を行った。ストレプトリジン O 処置により、p38 MAPK のリン酸化を有意に亢進した（図 4A）。一方、細菌毒素処置により、p38 MAPK 発現に影響を与えなかった。次に、阻害薬を用いて、p38 MAPK がストレプトリジン O による内皮障害に及ぼす影響について検討した。P38 MAPK 阻害薬 SB203580 処置は、細菌毒素による弛緩障害に影響を与えなかった（図 4B）。以上の結果から、大動脈においてストレプトリジン O は p38 MAPK の活性化を誘導するが、その活性化は内皮障害には関与しないことが示唆された。

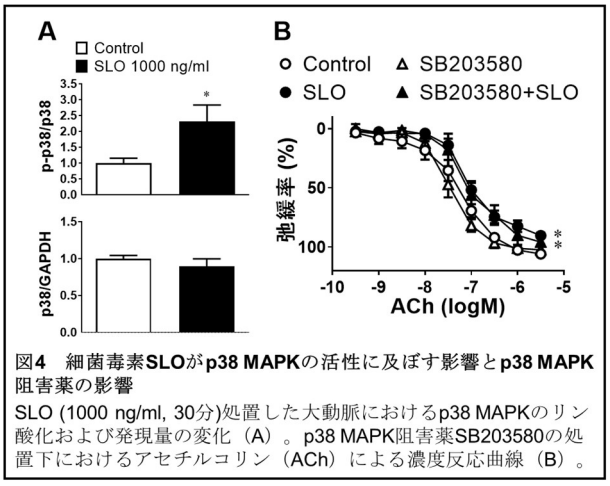


図4　細菌毒素SLOがp38 MAPKの活性に及ぼす影響とp38 MAPK阻害薬の影響

SLO (1000 ng/ml, 30分)処置した大動脈におけるp38 MAPKのリン酸化および発現量の変化（A）。p38 MAPK阻害薬SB203580の処置下におけるアセチルコリン（ACh）による濃度反応曲線（B）。

（5）PKC が細菌毒素ストレプトリジン O 誘導性弛緩障に及ぼす影響

次に、PKC の影響について検討した。PKC 阻害薬 Ro 31-8222 処置は、ストレプトリジン O による弛緩障害を有意に改善した（図 5A）。さらに、PKCβ選択的阻害薬 LY333531 の処置においても同様の改善作用がみられた（図 5B）。以上の結果から、ストレプトリジン O は大動脈内皮細胞の PKC、特に PKCβに作用し、アセチルコリンによる弛緩反応を障害することが示唆された。

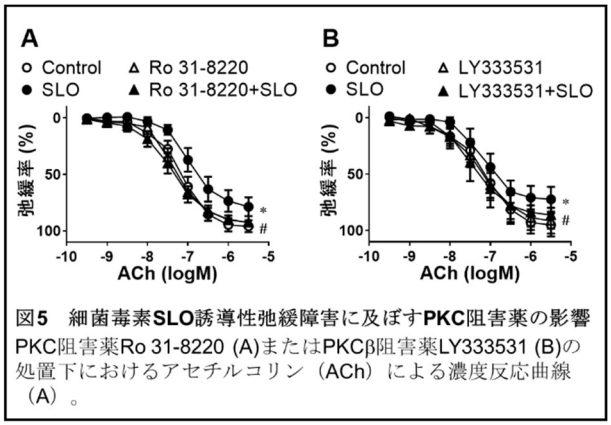


図5　細菌毒素SLO誘導性弛緩障害に及ぼすPKC阻害薬の影響

PKC阻害薬Ro 31-8220 (A)またはPKCβ阻害薬LY333531 (B)の処置下におけるアセチルコリン（ACh）による濃度反応曲線（A）。

3. 考察

自然発症高血圧ラット SHR において、*Streptococcus* 属の顕著な増加 [1] や、炎症を伴う腸管透過性の亢進 [2] が報告されている。申請者は「腸管透過性亢進時に、*Streptococcus* 属の細菌毒素が、血圧調節に関わる血管に障害を引き起こし、それが血圧上昇の要因となるのではないか」との仮説を立てた。本研究において、（1）ラット大動脈においてストレプトリジン O が、内皮依存性弛緩反応の障害を誘導すること、（2）その障害には eNOS のリン酸化（Thr495）による活性抑制が関与すること、（3）また、PKC の活性、特に、PKCβアイソフォームの関与、が示唆された（Mukohda *et al.,* 投稿準備中）。

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厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, Zadeh M, Gong M, Qi Y, Zubcevic J, Sahay B, Pepine CJ, Raizada MK, Mohamadzadeh M. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*. 2015;65:1331-1340
2. Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, Kim S, Yang T, Shenoy V, Cole-Jeffrey CT, Lobaton GO, Stewart DC, Rubiano A, Simmons CS, Garcia-Pereira F, Johnson RD, Pepine CJ,

Raizada MK. Hypertension-linked pathophysiological alterations in the gut. *Circulation research*. 2017;120:312-323

3. Curtis J, Kim G, Wehr NB, Levine RL. Group b streptococcal phospholipid causes pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5087-5090

4. Stassen M, Muller C, Richter C, Neudorfl C, Hultner L, Bhakdi S, Walev I, Schmitt E. The streptococcal exotoxin streptolysin o activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase c-dependent pathways. *Infect Immun*. 2003;71:6171-6177

内内向き整流性 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

うつ病の罹患率は高く、社会的に大きな問題である。既存の抗うつ薬はセロトニン・ノルアドレナリンの伝達を促進するが、患者の 1/3 に無効であり、新規機序の薬の開発が必要である。うつ病発症の機序は脳の特定の神経核の興奮性の異常が原因であると考えられている。ヒトには 76 種の K^+チャネルが存在し、神経細胞の興奮性を制御している。我々は、K^+チャネル活性を修飾し興奮性の異常を補償すれば、新規の抗うつ薬になると考え、うつ病患者脳での 2.5 倍の発現増加が報告されている内向き整流性 K^+チャネル(ROMK)に着目し、同 K^+チャネルの遮断ペプチド tertiapin のうつ様行動への作用をマウス行動実験で検討し、同ペプチドが抗うつ作用と不安誘発作用を持つことを見出した。本研究で我々は、tertiapin が既存薬の作用点であるセロトニン・ノルアドレナリン系の神経核ではなく、外側中隔に作用して抗うつ作用を発揮することを明らかにした。また、マウスの行動実験で不安誘発とまぎらわしい運動失調作用も認められたため、両者を切り離すために、複数の行動実験で tertiapin が抗うつ、不安誘発、運動失調作用をもつことを明らかにした。

「緒言」

うつ病の生涯罹患率は我が国では 8%であるが、欧米では 16%に達し、社会的な損失は計り知れない。現在用いられている主な抗うつ薬はセロトニン・ノルアドレナリンの神経伝達を促進するが、患者の約 1/3 は既存薬が無効な難治性であるため、これ以外の作用機序の抗うつ薬の開発が望まれている。うつ病発症の機序は未解明であるが、脳内のいずれかの神経核の興奮性の異常が原因であると考えられている(Hyman & Cohen, 2012)。事実、電気けいれん療法、脳深部刺激療法、経頭蓋磁気刺激法によって神経細胞を物理的に刺激すると、脳の複数の部位の興奮性が変化し、難治性うつ病にも有効な例があることが報告されており(Nobler et al., 2001)、うつ病患者脳での興奮性の異常を物理的な刺激方法が補償したと考えられる。しかし、これらの刺激方法は容易ではなく、薬理学的に興奮性を補償することが望まれる。ヒトには 76 種の K^+チャネルが存在し、大半は脳に発現して神経細胞の内在性興奮性の制御に関与していると考えられるが、個々の K^+チャネルの脳での具体的な役割は不明である。我々はこれらの点に着目し、K^+チャネルの活性を変化させ、うつ病患者で異常をきたしている神経細胞の興奮性を補償すれば、新規機序の抗うつ薬になると考えた。そして、内向き整流性 K^+チャネル ROMK(renal outer membrane K^+ channel, Kir1.1, kcnj1)の発現がうつ病患者脳で 2.5 倍に増加していること(Smolin et al., 2012)、開放的な性格が ROMK 遺伝子と連鎖していること(Amin et al., 2013)に着目し、同 K^+チャネルを遮断作用があるハチ毒ペプチド tertiapin の脳室内投与のマウスのうつ様行動への作用をマウス行動実験で検討し、同ペプチドが抗うつ作用と不安誘発作用を持つことを見出した。しかし、tertiapin の抗うつ作用機序が既存薬と同じセロトニン・ノルアドレナリンの神経伝達の促進なのか、異なるのかは未解明である。さらに、マウスの行動実験の過程で tertiapin が、不安様行動と重複する表現型を示し区別が難しい運動失調作用をもつことが示唆されたため、両者を区別する必要がある。

本研究では、神経活動のマーカーである c-Fos の免疫染色を用いて tertiapin が作用する神経核を解明することと、不安誘発と運動失調の作用を区別することを試み、tertiapin がセロトニン・ノルアドレナリン系神経核の興奮性に影響を与えずに他の神経核を介して抗うつ作用を示したこと、並びに、同ペプチドが抗うつ作用に加えて、不安誘発と運動失調作用があることを明らかにした。

「結果」

Tertiapin は 21 アミノ酸からなる環状ペプチドであ

る。昨年度の報告に記載した通り、我々は tertiapin の 8 番目の Ile を Arg に変異させたもの(TPN-RQ)が最も強い遮断作用をもつことを明らかにした (図 1A, D)。また、環状構造を取るための Cys 残基が遮断活性には必須であり、3、5 番目の Cys を Ser に変えた変異体 (TPN-C3S, -C5S) はほとんど遮断作用を示さなかった (図 1B, C, D)。そこで、本研究では TPN-RQ と、ネガティブコントロールとして TPN-C3S と TPN-C5S を用いた。

TPN-RQ には 4 つの Cys 残基があり、天然のものは C3 と C14、C5 と C18 がジスルフィド結合を形成することが知られている。本研究で用いた TPN-RQ は化学合成したものであり、天然物と同様に SS 結合が形成されていない可能性がある。この可能性を排除するため、TPN-RQ ペプチドを、SS 結合を適切に再結合することができる protein disulfide isomerase(PDI)で処理し、PDI 未処理のものと ROMK 遮断活性を比較した (図 1E)。その結果、PDI 処理により遮断活性の変化は見られず、化学合成ペプチドも天然物と同様に適切に SS 結合が形成されていることが示唆された。

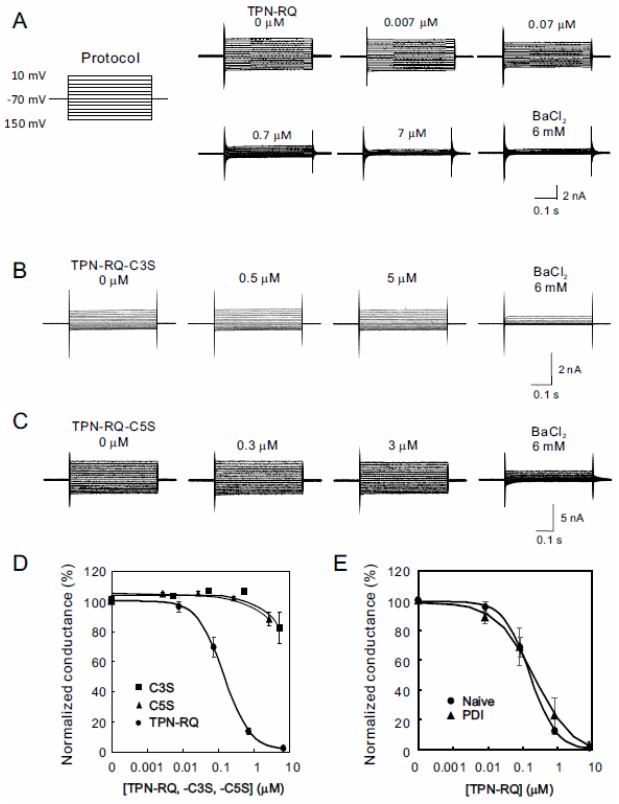


図 1. TPN-RQ の ROMK チャネル遮断作用と C3S、C5S 変異体の遮断活性の喪失。TPN-RQ は濃度依存的に ROMK チャネルを遮断したが(A, D)、TPN-C3S、-C5S 変異体はほとんど遮断活性を示さなかった(B, C, D)。(E)TPN-RQ を PDI で処理しても ROMK 遮断活性に変化が見られなかったことは、分子内の Cys 残基は適切にジスルフィド結合を形成してることを示す。

次に、TPN-RQ が作用している神経核を解明するため、TPN-RQ あるいは対照のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)をマウスに脳室内投与した 30 分後に尾懸垂試験の軽いストレスを負荷し、さらに 30 分後に 4%パラホルムアルデヒド溶液のかん流によって脳を固定し、薄切の後、神経細胞活動のマーカーである c-Fos の免疫染色を行い、TPN-RQ に反応して神経活動が変化した神経核を検討した(図 2, 3)。

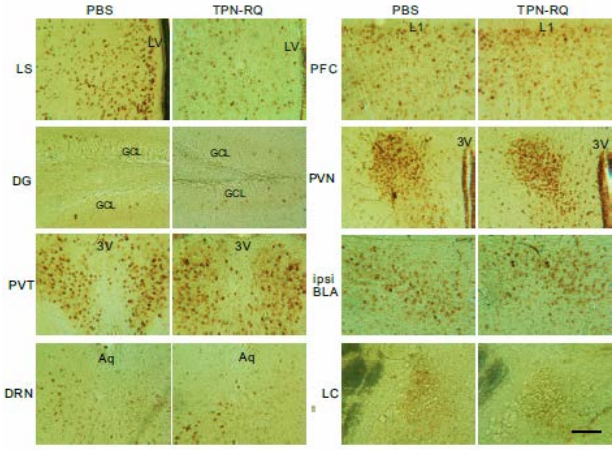


図 2. 抗 c-Fos 免疫染色。PBS 及び TPN-RQ(TPN-RQ)脳室内投与マウスの脳各部位 (LS, 外側中隔、PFC, 前頭前野 (帯状皮質)、DG, 海馬歯状回、PVN, 視床下部室傍核 (CRH)、PVT, 視床室傍核、ipsiBLA (投与側偏桃体基底外側核、DRN, 縫線核、LC, 青斑核) の抗 c-Fos 免疫染色の結果を示す。(Bar100 μm)

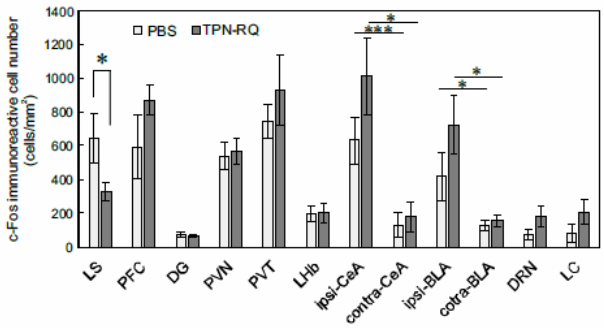


図 3. 核神経核での抗 c-Fos 免疫陽性細胞数。PBS 投与マウスと比較して TPN-RQ 投与マウス脳では、外側中隔(LS)だけで有意な陽性細胞数(per mm^2)の減少が認められ、縫線核(DRN)、青斑核(LC)では有意な変化は認められなかった。偏桃体中心核 (CeA) 基底外側核(BLA)では、薬物投与側(ipsi)と反対側(contra)の間に有意な差が PBS、TPN-RQ の両方で認められた。(*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.005$, Student's t-test, n=6 and 7)

その結果、ストレスや抗うつ作用に関与する様々な神経核でわずかな c-Fos 陽性細胞の増加が認められたが、有意ではなかった。同様にセロトニン神経系の起始核である縫線核や、ノルアドレナリン神経系の起始核である青斑核もわずかな増加が認められただけであった。唯一、顕著な変化が認められたのは外側中隔であり、同神経核では逆に c-Fos 陽性細胞数の減少が認められ、神経活動が抑制されたことが示唆された。本実験では、右側側脳室だけに TPN-RQ を投与したため、偏桃体中心核、偏桃体基底外側核では反対側と比較して投与側で c-Fos 陽性細胞数の増加が認められたが（図 3)、PBS 投与マウスでの同様の増加が見られたので、脳室内投与によるアーチファクトであると考えられる。

次に、TPN-RQ のマウスのうつ様行動への作用を尾懸垂試験で検討したところ(図 4A)、ネガティブコントロールの TPN-C3S 投与マウスでは無動時間のわずかな短縮しか認められなかったが、TPN-RQ 脳室内投与マウスでは有意な短縮が認められた。この抗うつ作用の用量依存性を 3 つの用量で確かめた(図 4B)。TPN-RQ は強制水泳試験でも抗うつ作用を示した(図 4C)。次に、うつ様行動と不安様行動の指標となる新規環境による摂食抑制試験を行うと、摂食開始時間のわずかな延長が認められた。この結果の解釈として、TPN-RQ が抗うつ作用をもつと考えると、摂食開始時間は短縮するはずであるが、TPN-RQ が抗うつ作用だけでなく、不安様行動、あるいは、運動失調をきたしたとすると、両者は摂食開始時間を延長するので、抗うつ作用による短縮を打ち消したと考えられる。我々の観察で TPN-RQ 投与マウスでは動きが遅い印象を受けたので、運動失調の可能性が考えられた。この可能性をバランス beam 試験によって検討した(図 4E)。幅が異なる beam の計 4 回の試験のいずれにおいても通過時間の延長が認められ、TPN-RQ は運動失調をきたすことが示唆された(図 4E)。この運動失調を確かめるため、Activity-Wheel における自発的運動量を検討すると、TPN-RQ 投与マウスで有意な回転数の減少が認められ(図 4F)、運動失調作用が確かめられた。

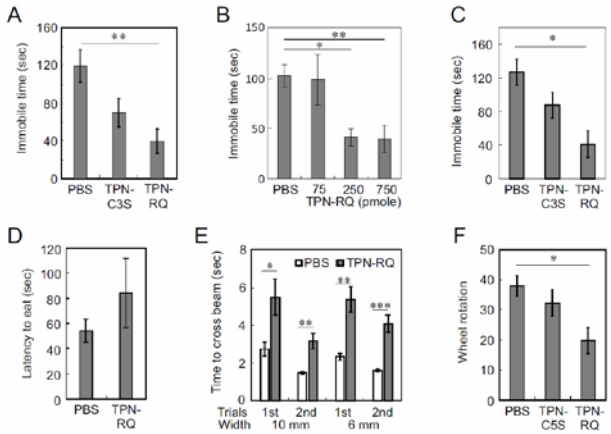


図 4. TN-RQ の抗うつ作用と運動失調誘発作用。(A,B,CTPN-RQ の抗うつ作用。尾懸垂試験における無動時間の短縮(A)。尾懸垂試験における無動時間の短縮用量依存性(B)。強制水泳試験における無動時間の短縮(C)。(D)新規環境による摂食抑制試験における摂食開始時間。(E,F)TPN-RQ の運動失調作用。バランス beam 試験では、幅 10 mm と 6 mm の beam の中央部 60 cm を通過する時間をそれぞれ 2 回連続して測定した(E)。Activity wheel における自発的な運動量を 4 分間測定した(F)。 (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.005, ANOVA followed by Bonferroni test, (E のみ)Student’s t-test)

前年度の報告書に記載の通り、TPN-RQ の脳室内投与は不安誘発作用を示す結果が得られている。しかし、マウスの行動実験のうち、不安様行動については、不安誘発作用と、運動失調の表現型が重複している。そこで、オープンフィールド、高架式十字迷路、明暗箱試験での TPN-RQ の作用を再検討した(図 5A,B,C)。その結果、オープンフィールド試験の total line crossings、高架式十字迷路の entry to open arm 回数、明暗箱の transition 回数の減少は(図 5A,B,C の上段)は運動能力に依存するため運動失調による可能性が否定できないが、中央への進入回数、open arm での滞在時間、明箱での滞在時間の減少は(図 5A,B,C の下段)運動能力への依存性が低いため不安誘発作用と考えられる。したがって、TPN-RQ は抗うつ作用だけでなく、運動失調、不安誘発の作用をもつことが示唆された。

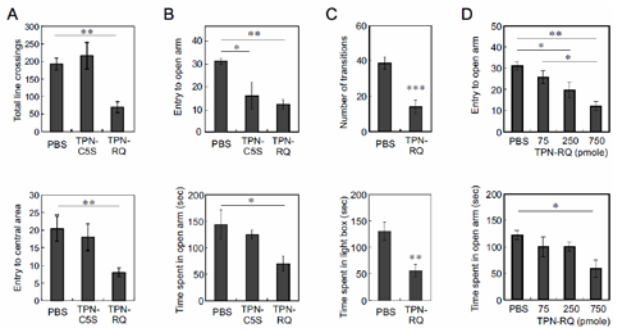


図 5. TPN-RQ の不安誘発作用。TPN-RQ はオープンフィールド試験(A)、高架式十字迷路(B)、明暗箱(C)のいずれの試験でも TPN-RQ は不安誘発作用を示したの対し、ROMK 遮断作用がほとんどない TPN-C3S、-C5S 変異体は有意な作用を示さなかった。(D)高架式十字迷路における不安誘発作用は用量依存的であった。このうち(A,B,C)の上段の表現型は運動を必要とするため運動失調と区別することは難しいが、下段の表現型は運動能力への依存性が低いため運動失調ではなく不安誘発作用によると考えられる。(*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.005$, ANOVA followed by Bonferroni test, (C のみ)Student's t-test)

「考察」

我々はこれまでの研究で、TPN-RQ が抗うつ作用と不安誘発作用を示すことを明らかにしてきた。ROMK 遮断による化合物の抗うつ作用は、我々がすでに報告した 2 ポアドメイン型 K^+チャネル(TREK-1)の活性化薬(ostruthin)を含め世界で 4 例目である。本研究ではその作用点が、外側中隔の神経活動であることを明らかにした。この外側中隔の神経活動の抑制は ostruthin 投与マウスにも認められ、K^+チャネルを介した抗うつ作用に共通のものなのかもしれない。また、既存の抗うつ薬の作用点であるセロトニン・ノルアドレナリン系の起始核である縫線核、青斑核の神経活動に影響を与えなかったことは、TPN-RQ の作用機序がセロトニン・ノルアドレナリン伝達の促進ではなく、新規のものであることを示唆している。

本研究で TPN-RQ は抗うつ作用だけでなく、不安誘発作用と運動失調の抗うつ薬として望ましくない副作用が見られたため、ROMK は抗うつ薬の標的として最適なものではないかもしれない。しかし、TPN-RQ が ostruthin と共に抗うつ作用を示したことは、電気けいれん療法、脳深部刺激療法、経頭蓋磁気刺激法の物理的に刺激と同様に、K^+チャネル修飾薬による神経活動の修飾が難治性のうつ病患者にも有効である可能性の期待を抱かせる。K^+チャネルには 76 種類もあるため、探索のレパートリーを広げていけば最適な新規抗うつ薬の標的が見出せるかもしれない。

「参考文献」

Hyman SE, Cohen JD, 2012, Disorders of Mood and Anxiety, in Principles of Neural Science (5TH edition) Kandel, Schwartz, Jessell, eds., 1402-1424.

Nobler et al., 2001, Decreased regional brain metabolism after ECT, Am J Psychiatry, 158, 305-308.

Smolin B, et al., 2012, Differential expression of genes encoding neuronal ion-channel subunits in major depression, bipolar disorder and schizophrenia: implications for pathophysiology. Int J Neuropsychopharmacol, 15, 869-882.

Amin N, et al., 2013, Refining genome-wide linkage intervals using a meta-analysis of genome-wide association studies identifies loci influencing personality dimensions. Eur J Hum Genet, 21, 876-882.

Joseph A, et al., 2018, Antidepressive and anxiolytic effects of ostruthin, a TREK-1 channel activator. Biagini G, editor. PLoS One, 13, e0201092.

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，対照群と比べ DSS 摂取により引き起こされる大腸上皮細胞およびクリプトの消失や炎症細胞の浸潤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。

現在，我々の研究室では 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ウエスコ学術振興財団の助成を受け検討を行っている。これまでの検討から，DSS 摂取による体重減少，疾患活動指数（Disease Activity Index；DAI）および大腸長短縮が 3 週間のランニングホイールを用いた自発的運動の実施により，抑制される傾向が観察された（平成 30 年度報告書）。一方で，この自発運動による抑制はより短期の運動期間では観察されなかった。一方で，体重減少や DAI の結果は生理学的指標を用いて大腸炎を間接的に評価しているものであることから，より詳細に大腸炎を評価するためには大腸組織自体の組織学的評価が必要である。そこで，本研究ではマウス DSS 誘導性大腸炎に及ぼす運動の影響について，組織学的手法から検討を行った。

［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。

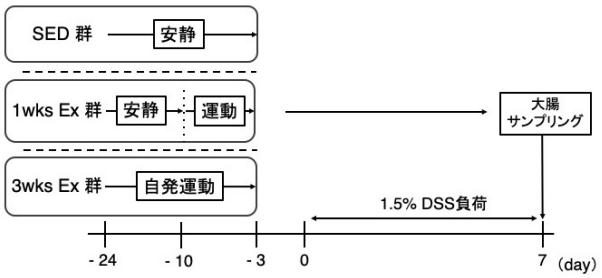


図1 実験プロトコール

DSS 大腸炎の誘導

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。

組織学的評価

DSS 溶液摂取 7 日目にマウスより大腸組織を摘出した。摘出した大腸内腔を PBS で洗浄し，内容物を除去した。その後，大腸を長軸方向に開き，肛門側より swiss-roll を作成した。この大腸組織 swiss-roll を用いてパラフィンブロックおよび切片を作成した。パラフィン切片を HE 染色し，先行研究の評価をもとに，組織学的に評価した。なお組織の評価は，サンプル情報をマスクした染色切片を共同研究者に評価させる方法で実施した。また，一部の切片では AB/PAS および免疫染色を行った。免疫染色は，パラフィン切片を脱パラフィンおよび抗原賦活化処理をした後，上皮細胞マーカーである Keratin-8 および杯細胞マーカーである MUC2 で染色し，上皮組織構造について観察した。

統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。データ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. DSS 誘導性大腸炎マウスにおける大腸組織像の評価（図 2）

HE 染色， AB/PAS 染色および大腸上皮細胞マーカーである Keratin8 染色切片を評価したところ，DSS 摂取マウスの大腸組織は DSS 非摂取マウスの大腸組織に比べ上皮細胞およびクリプトの消失や炎症細胞の浸潤が顕著に観察された（図 2）。また，大腸の粘膜層の形成に大きく寄与する杯細胞を MUC2 をマーカーとして検討したところ，DSS 非摂取マウスでは規則的な分布が観察されたのに対して DSS 摂取マウスでは殆どが脱落していた（図 2）。

2. 自発運動が DSS 摂取時の大腸組織に及ぼす影響（図 3，4）

全ての群において，上皮細胞およびクリプトの消

失や炎症細胞の浸潤が顕著に観察された。自発運動の影響については，SED 群に比べ 3WEX 群においてこ

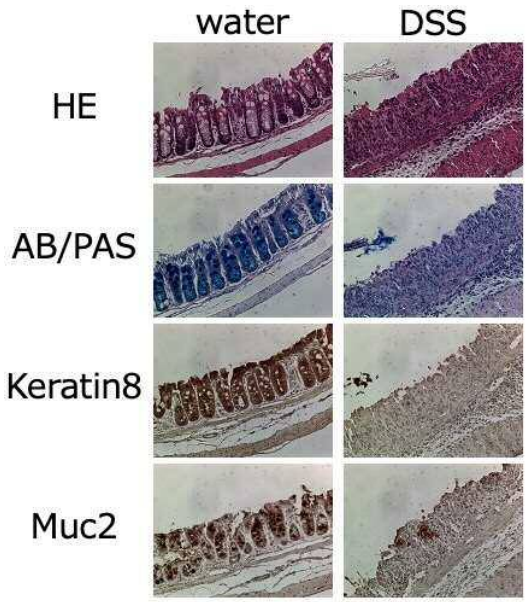


Fig.2 DSS負荷による大腸組織傷害

れらの現象が抑制されている傾向を示したが，1WEX 群においては，抑制傾向は観察されなかった。これらの結果は，昨年度報告した生理的症状と一致するものであった。

［考察］

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 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。

これまでの検討から， DSS 摂取による体重減少や DAI などの生理症状が SED 群に比べ 3WEX 群において有意に抑制されること，その一方で，1WEX 群ではこれらの抑制効果がみられないことを観察された。そこで，これらのマウスの大腸組織像を観察したところ，有意な差では無いではないものの，大腸組織評価でも同様に SED 群および 1WEX 群に比べ 3WEX 群において上皮細胞およびクリプトの消失や炎症細胞の浸潤が抑制されている傾向が観察された。正常な大腸上皮組織は自身の杯細胞が中心となって形成する粘液層で覆われており，腸内に存在する細菌とは接触しない。一方で，何らかの原因によりこの粘液層によるバリアが破綻すると，細菌の大腸組織への接触・侵入を介した炎症応答が惹起され結果的に大腸炎を発症されると考えられる。これまで大腸炎に対

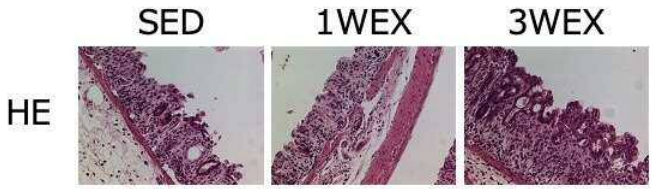


Fig.3 自発運動マウスにおける
DSS負荷による大腸傷害像

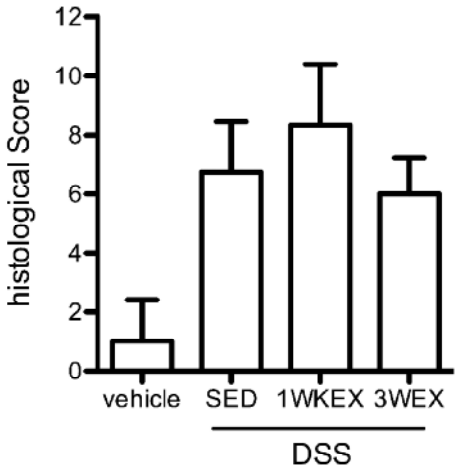


Fig.4 大腸傷害スコア

する運動の影響を検討した研究においては，運動が有する抗炎症作用について着目しているものが盛んに報告された一方で，運動が大腸粘膜層，特に物理的バリアに及ぼす影響を検討した報告は皆無であった。本研究の結果から運動が有する粘膜層バリアに及ぼす影響について言及することは困難であるが，今後そのような検討を行なうことで，運動の大腸炎軽減メカニズムがより詳細に明らかとなる可能性が考えられる。

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，大腸組織に

ついてさらに詳細な検討を行なっている。

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，腸管の物理的バリアを評価項目に加え，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・筋電図を用いたアスリートの筋コンディションの定量評価

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。本研究では陸上競技選手に対して、日々の練習の中で測定できる方法で測定した筋音図・筋電図の測定値と練習量や試合での競技成績との関係を検討することで、筋音図・筋電図を用いて筋コンディションを定量できるかを明らかにすることを目的とした。被験者は陸上競技部に所属する大学生５名（長距離選手１名、短距離選手４名）であった。対象筋は腓腹筋内側頭の近位部（MG）と半腱様筋（HAM）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。最大等尺性収縮中の筋音図・筋電図を週１回、２か月間測定した。その結果、練習量および競技成績と主観的コンディションでは関係がみられなかったが、HAM筋音振れ幅において関係がみられた。このことから、主観的コンディション評価では筋コンディションを捉えられなかったことに対して、HAM 筋音振れ幅は筋コンディションを定量できる可能性が示された。

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、難しいと言われる。筋コンディション定量の可能性として、筋音図と筋電図が挙げられる。筋音図には、変位型、加速度型といった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[1)]。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ている[1)]。一方、加速度型は皮膚表面上で筋線維の横断方向の振動を測定するもので、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[2)]。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[1)]。本研究では、運動中でも測定可能な変位型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。

昨年度の助成研究では、筋コンディションを変化させると考えられるウォーミングアップ後や筋疲労後、筋膜リリースマッサージ後といった状態の筋音図・筋電図変化を明らかにすることを目的とし実験を行った。その研究では仮説として、筋コンディションはウォーミングアップによって高く、筋疲労によって低く、マッサージによって回復するとした。Measee システムを用いて腓腹筋の近位部と遠位部の２か所を対象に、下肢を完全に固定した状態での等尺性最大足底屈時の測定を行った。その結果、筋電図よりも筋音図で筋コンディションを評価ができる可能性が示された。しかしながら、先行研究の結果は一過性の筋コンディションの変化の評価であり、長期に渡り日々練習を行うアスリートに当てはめることは難しい。また、最大努力の底屈測定は等速性筋力測定装置（KINCOM－500H）を使用したため、競技現場などで測定することは困難である。そこで本研究では日常に近い動作で筋音・筋電を測定ができれば、アスリートが現場で定期的に筋コンディションを評価できるのではないかと考え、陸上競技選手に対して、筋電図・筋音図の測定値と練習量や試合での競技成績との関係を検討することで筋コンディションを定量できるかを明らかにすることを目的とした。

Ⅱ．方法

1. 被験者

被験者は大学陸上競技選手５名：長距離選手１名と短距離選手４名（年齢 20.2±1.3 歳、身長 173.2±2.2 ㎝、体重 60±3.7 ㎏）であった。

2. 測定方法

被験者からの聞き取りによってハリ、疲れ、故障が多いと共に、パフォーマンスに強く影響する方の脚を被験肢とした。被験肢の腓腹筋内側頭の筋長1/3 近位部とハムストリングスの最も発達している部位（全被験者ともに半腱様筋筋腹中央）にMeaseeシステムの筋音図・筋電図センサーを専用のバンドで固定した。

腓腹筋（MG）、半腱様筋（HAM）の最大等尺性収縮中の筋音図・筋電図をそれぞれ測定した。MGの測定は壁に手をついた姿勢で立たせ、足関節 90 度位をできるだけ保持した状態で、壁を強く押すようなイメージで最大等尺性収縮を行わせた。弛緩の際は非検査側の脚に完全に体重を乗せるよう指示した。HAMの測定はうつ伏せの状態で膝関節 90 度屈曲位、足関節90度位の状態を保持し、徒手抵抗を加え、膝関節屈曲の最大等尺性収縮を行わせた。1 回の測定につき最大努力の収縮と弛緩を60bpmの電子音に合わせて各 1 秒で繰り返す力発揮を 5〜7 回行わせた。この測定を週に一度、2ヶ月間行った。

測定日のHAMのハリ・疲労感、MGのハリ・疲労感、走りの調子を含めた全体的な調子の3項目について、主観的コンディションを 10 段階で評価させた。さらに、測定期間中（２か月）の練習内容を1日ずつ質的強度、量的強度を10段階で評価させた。質的強度×量的強度を算出し、その値の測定日前一週間の和を算出し、これを練習量として評価した。さらに測定期間中に行われた大会やレースの記録を 10 段階で評価してもらった。

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たし下がり速度を求めた。測定値としては、5〜7回の最大等尺性収縮のうち安定している5回分の力発揮を対象とし、その平均値を用いた。

統計処理は回帰分析を行った。有意水準は 5%とした。

Ⅲ. 結果

被験者は５名だが、そのうち１名が長距離選手であり、また練習内容を記録していたのが３名のみであったため、一人ずつ検討した。記録評価は5名全員を対象とした。

練習量とHAM筋音振れ幅、HAM調子の関係について、長距離選手である被験者Aは練習量が多いとHAM筋音振れ幅が有意に小さくなった。しかし、主観的評価であるHAM調子には相関はみられなかった。短距離選手である被験者B・Cについては、練習量が多いとHAM筋音振れ幅が大きくなった。しかし、HAM調子には相関はみられなかった（図1）。HAM筋音振れ

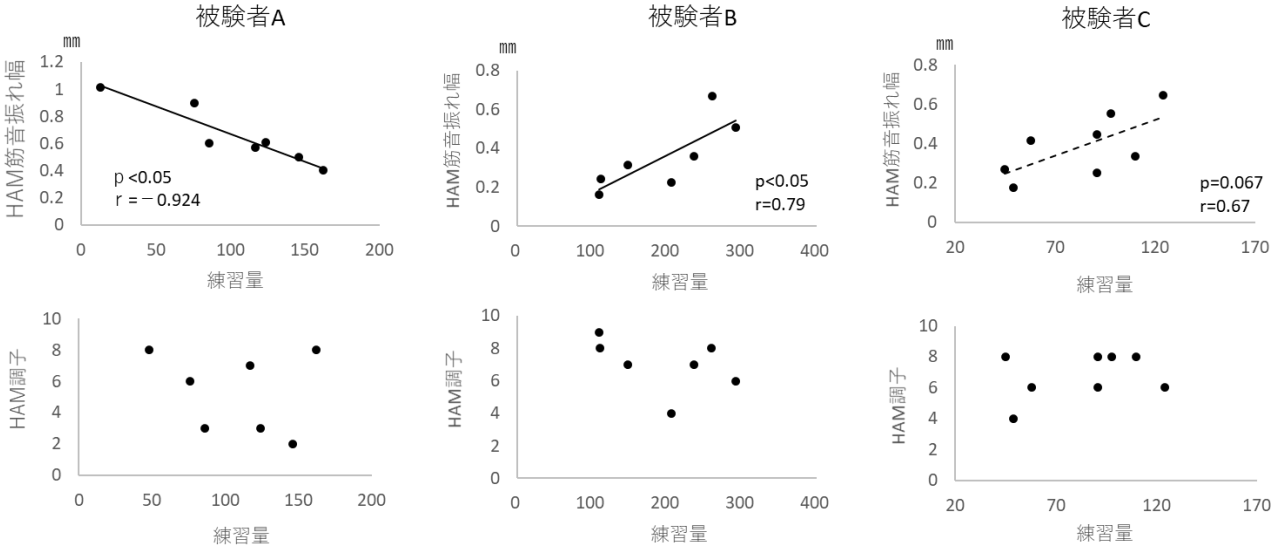


図1　練習量とHAM筋音振れ幅、HAM調子の関係

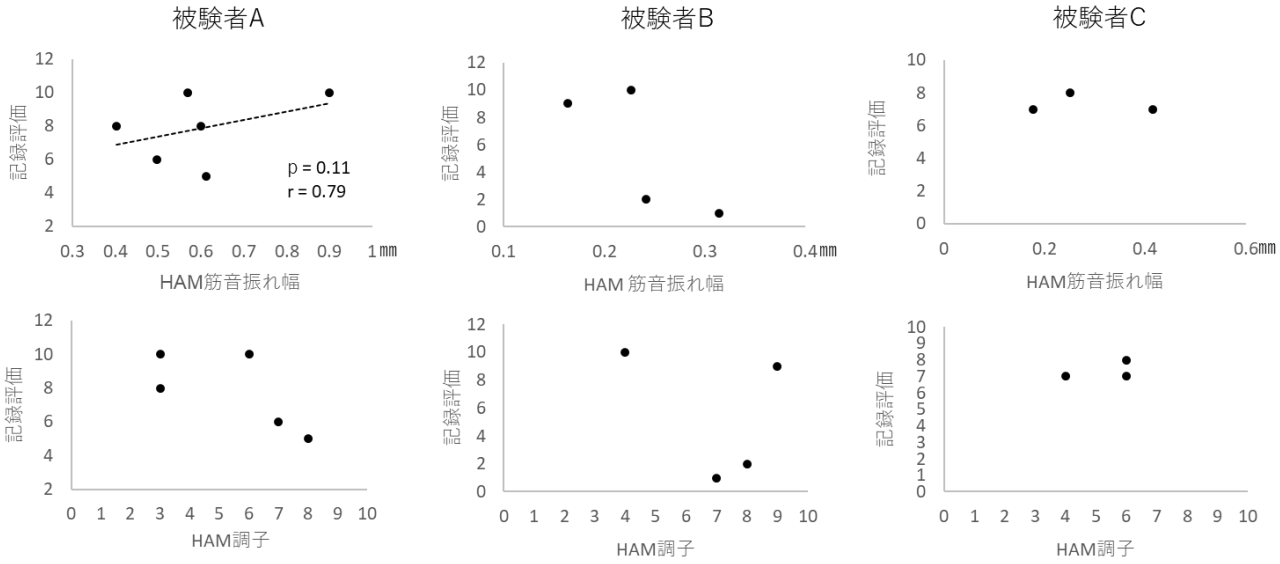


図2　HAM筋音振れ幅、HAM調子と記録評価の関係

幅、HAM 調子と記録評価の関係については、被験者 A は HAM 筋音振れ幅が大きいと競技成績がよくなる傾向であった。HAM 調子には相関はみられなかったが、HAM 調子が良いと競技成績が悪くなる可能性が示唆された。被験者 B については、データ数が少なく統計的には検討できないが HAM 筋音振れ幅が大きいと競技成績が悪くなる可能性が示唆された。HAM 調子と競技成績には関係はみられなかった（図 2）。被験者 D・E についてもデータ数が少なく統計的な検討はできないが HAM 筋音振れ幅が大きいと競技成績が良くなる可能性が示唆された（図 3）。

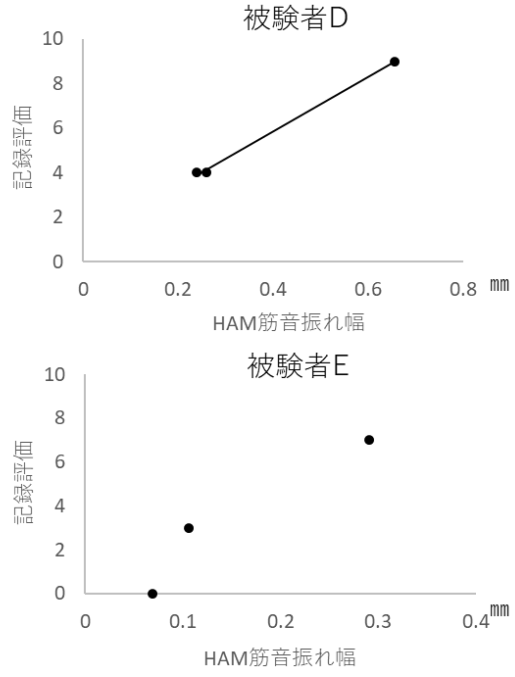


図3　HAM筋音振れ幅、HAM調子と記録評価の関係

Ⅳ. 考察

実験結果より、練習量と HAM 筋音振れ幅において、長距離選手・短距離選手ともに関係がみられた。しかし、練習量と HAM 調子など主観的コンディションでは関係がみられなかった。このことから、主観的なコンディション評価では筋コンディションを捉えられなかったことに対して、HAM 筋音振れ幅は筋コンディションをあらわしていると考えられる。また、HAM 筋音振れ幅と記録評価では被験者 A（長距離選手）において関係性があった。短距離選手 B・C はデータ数が少なかったので統計的な関係はなかったが、その傾向は長距離選手と逆であった。主観的コンディションである HAM 調子と記録評価では被験者 A・B・C ともに統計的な関係はなかったが、主観的に調子が良い時に結果が悪くなるという逆の傾向となっていた。これらのことからも、主観的な評価では筋コンディションを捉えることは難しいが、HAM 筋音振れ幅ではそれを捉えられる可能性があると考えた。

しかしながら練習量と HAM 筋音振れ幅において、長距離選手では練習量が増えると HAM 筋音振れ幅が小さくなったが、短距離選手では練習量が増えると HAM 筋音振れ幅も大きくなる傾向であった。さらに HAM 筋音振れ幅と記録評価においても長距離選手では HAM 筋音振れ幅が大きいと記録評価が高くなるが、

短距離選手はHAM筋音振れ幅が大きいと記録評価が低くなる傾向であった。つまり長距離選手と短距離選手では反対の応答を示した。宮本ら（2019）は、筋のばねとしての働きに着目し、陸上選手の筋の硬さ・軟らかさと競技パフォーマンスとの関係を調査した。超音波剪断波エラストグラフィーを用いて、短距離選手、長距離選手各 22 名の外側広筋におけるスティフネス（剛性）の測定を、パッシブ（安静時）とアクティブ（最大随意収縮の 50%での筋収縮時）条件下で行った。その結果、長距離選手は短距離選手と比較してパッシブ、アクティブ時の剪断波速度が高く、筋が硬かった。これは、一般的に遅筋線維のほうが安静時および収縮時において硬いことが明らかとなっていることと、筋内の結合組織（コラーゲンなど）が強度よりもトレーニング量に依存するため長距離選手のスティフネスが高くなった可能性を報告した。さらにパフォーマンスとスティフネスの関係については、短距離選手ではパッシブな剪断波速度が高い（硬い）ほど 100m のタイムが良く、アクティブな剪断波速度が低い（軟らかい）ほど 100m のタイムが良いこと、長距離選手ではパッシブな剪断波速度が低い（軟らかい）ほど5000mのタイムが良いことを報告した[3]。

この研究を踏まえて本研究の結果を考察すると、HAM筋音振れ幅と記録評価において、被験者A（長距離選手）ではHAM筋音振れ幅が大きいと記録評価が高かった。被験者 A の筋線維組成は ST 線維の割合が高く、筋内の結合組織も多いと考えられ、そのため短距離選手に対してスティフネスが高いと考えられる。宮本らは長距離選手においては短距離選手に対して筋スティフネスが高いにも関わらず、安静時の筋スティフネスが低いと5000m走のパフォーマンスが高いことを報告した。このことは筋収縮におけるスティフネスの変化の幅が大きいことがパフォーマンスを高めることを意味していると考えられる。被験者AにおいてもHAM筋音振れ幅が大きいと記録評価が高かったことは宮本らの報告を支持するものである。被験者 B（短距離選手）ではHAM 筋音振れ幅が大きいと記録評価が低くなる傾向がみられた。短距離選手の筋は FT 線維の割合が多いため、長距離選手と比べると軟らかい筋肉であるが、宮本らは短距離選手の場合、筋スティフネスが安静時で硬く、収縮時で軟らかいと 100m 走のフォーマンスが高いことを報告した。このことは筋収縮におけるスティフネスの変化の幅が小さいことがパフォーマンスを高めることを意味しており、今回の結果においてもHAM 筋音振れ幅が小さいと記録評価が高くなったことは宮本らの報告を支持するものである。しかし、被験者D、E（短距離選手）においては長距離選手と同じ傾向であったので、個人差がある可能性もある。

さらに野中ら（2013）は筋音図に関するレビューの中で、筋の特性が異なる被験者を対象に収縮機能を検討した。成人男子の等尺性脚伸展時の大腿四頭筋の筋電図・筋音図の測定では、最大筋力に対する相対筋力の筋音振れ幅において、60%MVC で筋音図の振れ幅に急激な増加がみられた。これは径が大きく発揮筋力も大きい FT 線維が動員されたことを意味している。また、短距離選手と長距離選手に膝伸展の最大等尺性収縮を困憊まで持続させ、外側広筋から筋音図と筋電図を記録し比較した。その結果、運動開始時の最大筋力は短距離選手の方が大きかったが、逆に困憊までの運動時間は短距離選手が短く、長距離選手の方が長くなった。運動開始時の筋音振れ幅においては短距離選手の方が大きく、その後疲労により急激に小さくなったが、長距離選手の筋音振れ幅は元々が小さいが疲労による変化はほとんどなく一定であった。これらのことから FT 線維が収縮すると ST 線維に比べ筋音図の振れ幅が大きくなると考えられる。FT線維が多い短距離選手は筋音振れ幅が大きいと報告した[4]。

中川ら（1988）はラットを用いて、トレーニングの違いが腱のコラーゲン繊維や筋線維に与える影響を検討した。実験方法は、対照群（C群）、高強度持久性トレーニング群（H群）、中等度持久性トレーニング群（M群）、ジャンプトレーニング群（J群）の4群に分け、それぞれの負荷強度（H群：30m/minで60min/dayトレッドミル、M群:17m/minで75min/dayトレッドミル、J群：4分間にわたり1日50回のジャンプ）で週5回、16週間トレーニングを行った。その結果、コラーゲン繊維の面積と直径において、

腓腹筋腱のコラーゲン繊維1本当りの面積をみると、C群に比べH群、M群は有意な高値を認めた。直径においてもC群に比べ、H群、M群は増大を認めた。J群の面積と直径には有意な変化はなかった。筋線維の平均筋断面積において、ST線維についてはC群と比べH群に有意な増大がみられた。FT線維についてはC群に比べJ群に著しい増大を認めた。これらのことから、持久性トレーニングとジャンプトレーニングはそれぞれの筋線維に特異的な反応を示し、持久性トレーニングによって結合組織は質的量的変化を受け、腱や靭帯などのコラーゲン繊維が肥大するとともに、ST線維の肥大が認められた。ジャンプトレーニングではコラーゲン繊維の肥大はみられないが瞬発的運動に動員される FT 線維に著しい肥大を認めた[5)]。

これらの先行研究より本研究の結果を考察すると、練習量とHAM筋音振れ幅において、長距離選手では練習量が増えるとHAM筋音振れ幅小さくなった。長距離選手の練習は持久的トレーニングが中心であるから、ST線維の肥大や結合組織が肥大したと考えられ、そのためスティフネスが高くなりHAM筋音振れ幅が小さくなったと考えられる。短距離選手では練習量が増えるとHAM筋音振れ幅が大きくなった。短距離選手はハイパワーなトレーニングが多く、FT線維が動員されやすい。野中らは FT 線維が多い短距離選手は筋音振れ幅が大きく、また FT 線維が収縮すると筋音振れ幅が大きくなると報告しており、今回の結果はその報告を支持する結果となった。

今回の結果から種目、人によってHAM筋音振れ幅と練習量、記録評価の関係は異なったが、各個人でHAM 筋音振れ幅のデータを蓄積していけば、筋コンディションを評価できる可能性があると考えられた。

MGの筋電図・筋音図については、全被験者でどの項目においても関係がみられなかった。先行研究では、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にすれば評価できる可能性があるという結果であった。そのため今回、我々はMGの近位部を測定したが、思ったような結果が得られなかった。その原因は測定時の動作であると考える。先行研究では、等速性筋力測定装置を使用して下肢を完全に固定した状態での最大努力の等尺性足底屈の測定を行っていたため、比較的安定した測定値を得られたと思われる。しかし今回は現場でも使えるように、機械を使わない動作で測定した。毎回測定の前には必ず練習を行わせ、足関節をできるだけ固定するよう指示はしたが測定値にばらつきが生じたと考えられる。また測定動作によってセンサーに揺れが生じ、誤差が出てしまった可能性もある。このことについては、今後、動作やセンサーの固定方法を改良する必要がある。

Ⅴ．結論

本研究では、陸上競技選手に対して、筋音図・筋電図の測定値と練習量や試合での競技成績との関係を検討することで筋コンディションを定量できるかを明らかにすることを目的とした。その結果、HAMの等尺性収縮中の筋音振れ幅において、筋コンディションを定量できる可能性が示された。

【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) 岡山大学大学院保健学研究科保健学専攻検査技術科学分野生体情報科学領域：www.okayama-u.ac.jp
2) 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
3) Naokazu Miyamoto, Kosuke Hirata, Kakeru Inoue, Takeshi Hashimoto : Muscle stiffness of the vastus lateralis in sprinters and long-distance runners.Medicine&Science in Sports&Exercise, 2019

4) 野中壽子, 赤滝久美 : 体力科学への筋音図の応用, バイオメカニズム学会誌, Vol. 37, No. 1, 45-51, 2013
5) 中川喜直, 佐藤智明, 福田芳郎, 広田広一 : 有機的, 無機的トレーニングがラット腱のコラーゲン繊維に与える影響, 体力科学, 37, 100-108, 1988

中国電力送電線への地磁気誘導電流の影響評価

吉備国際大学[1]　徳山工業高等専門学校[2]　名古屋大学[3]

橋本久美子[1]　北村健太郎[2]　菊池崇[3]

太陽黒点の爆発現象により地磁気嵐が発生すると、電力送電線に準直流の電流(地磁気誘導電流 GIC)が流れる。カナダなど高緯度地域では停電の原因になることがある。緯度の低い日本でも大規模な地磁気嵐により GIC が流れることが報告されている。私たちは、中国電力株式会社の協力を得て世界で最も低緯度に位置する中国地方でGIC計測をおこなった。東山口変電所(2018年3月-)と新山口変電所(2019年3月-)で計測を実施した結果、①GIC 強度が地磁気東西成分の変動と強く相関した。②新山口 GIC で 5 アンペアに達する電流を記録し、これは東山口 GIC の 4 倍程度の強度であった。③GIC の測定値が地球内部で誘導される電場の計算値と比例した。これらの結果により、①海が良導体であることによる海岸線効果が地磁気東西成分依存性の原因であること、②瀬戸内側と山陰側の送電線が合流する新山口で GIC が強め合うこと、③地磁気変動の予測研究と組み合わせることで GIC の予測が可能であること、を明らかにした。これ等の結果を地球惑星科学連合 2020 で発表予定である。

1.　学術的背景と目的

電力は重要な社会基盤であるが、台風や地震などの自然現象により時として寸断される。また、太陽黒点の爆発現象にともない発生する地磁気嵐が、電力供給に障害を起こすことがある。

地磁気嵐時に数時間から数日にわたって、地球周辺の宇宙空間（電離圏、磁気圏）には強い電流系が発達し、地球の地磁気に大きな擾乱が生じる。この磁気変動は地面に誘導電流を流すため、送電線の途中にある変圧器間に準直流の電流(GIC: Geomagnetically Induced Current)が流れる。GIC は交流波形を歪ませるために、変圧器を加熱し、機器の劣化や送電システムの不安定化を引き起こす恐れがある。これが原因となって、1989 年 3 月にはカナダと北米で 9 時間に及ぶ大規模停電が発生した。日本でも 2003 年 10 月に東京電力管内で 100 A に達する GIC が記録され（Fujita, 2016)、北米の停電時の推定値200～300 Aに比べて無視できない強さであった。

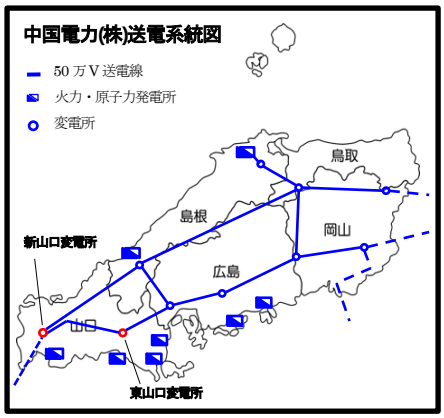


図 1 中国電力の 50 万ボルト送電系統図. 東西に延びる海岸線とこれに平行する送電線が特徴である。

これまで、日本における GIC の詳しい解析は、北海道女満別で計測された GIC によりおこなわれ、GIC に強い地磁気東西成分依存性があること(Watari 他 1997)、東西成分依存性に強い変動周期依存性のあること(Kikuchi 他、投稿中)が示された。現在、名古屋大学と京都大学が東京電力管内で GIC 計測を実施している(Nakamura 他, 2018)が、北海道女満別の GIC の特性と大きく異なる結果が得られている。

この原因として、地下の電気伝導度分布の影響に加えて、送電線と海岸線の相対的位置関係とその方向が重要な要因であることが考えられる。海水は電気伝導度の高い導体の性質を有するために、海に接した地域では電気力線が海岸線に垂直になり、平行成分が減殺されることが予想される。女満別は東西方向の海岸線に近接するため、南北電場を誘導する地磁気東西成分の効果が卓越すると予想される。一方、関東圏は海岸線も、送電網も複雑な構造である。

本研究では、このような海岸線効果を検証するために、海岸線がほぼ磁気緯度線に沿って東西に伸びる中国地方に注目した。しかも、図 1 に示すように、中国電力の電力送電線は比較的単調に東西に延びる送電系統と南北をつなぐ系統で構成されており、構造がシンプルである。そのため、地磁気変動の方向成分と GIC の間の相関関係の要因を切り分けることが可能であると考えられる。さらに、この送電系統では、海岸線効果のほか、山陰側と瀬戸内側の送電系統が合流する新山口で GIC が強められることが期待された。さいわい、中国電力株式会社の協力を得て、2018 年 3 月より東山口変電所で、続いて 2019 年 3 月より新山口変電所で GIC 計測を開始した。この GIC 計測データと気象庁地磁気観測所の磁力計データを用いて、初期解析をおこない、当初期待した以上の成果を得た。

2. 中国電力送電線における GIC の計測

電力送電線を流れる交流の電圧は、途中の変電所において 50 万ボルトに昇圧されて、遠隔地へ送電される。変圧器(写真 1)内では三相交流の中性点が地面に接地される。交流波形が正弦波であれば、接地電流は流れない。しかし、地磁気変動が発生して地面に誘導電流が流れると、数 100 km 離れた地面の 2 点間に電位差が生じる。変圧器の中性点は、接地線を通じて地面と等電位であるために、変圧器の中性点間に電位差が生じ、送電線中に電流が流れる。このとき接地線を流れる電流の周辺に微弱な磁場が発生するため、これをクランプ型電流計(写真 2)を用いて検出する。

データサンプリングは、東山口変電所で 10 Hz、新山口変電所で 20 Hz である。計測データは、FOMA 回線を用いてリアルタイム伝送し、吉備国際大学でデータベース化している。

3. 極域オーロラ現象に伴う GIC

図 2 に新山口変電所(SYG)で取得した GIC データの例を示す。上段は茨城県柿岡地磁気観測所(KAK)で観測されたフラックスゲート磁力計の地磁気データを示す。16-20 時 UT(世界標準時)(日本時間 01-05



写真 1 新山口変電所の 50 万ボルト変圧器.



写真 2 クランプ型電流計と接地線

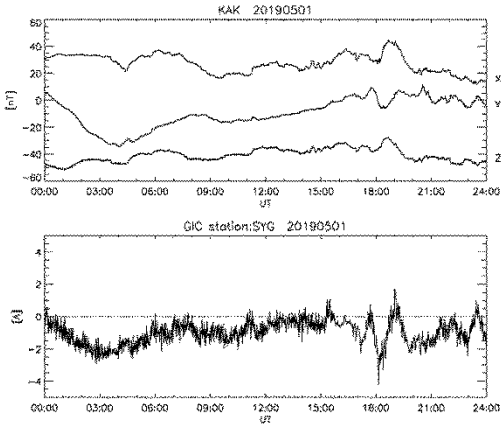


図 2 極域オーロラに伴い柿岡地磁気観測所(上段 KAK)で観測された地磁気変動と新山口変電所(下段 SYG)で計測された GIC (16-20 UT).

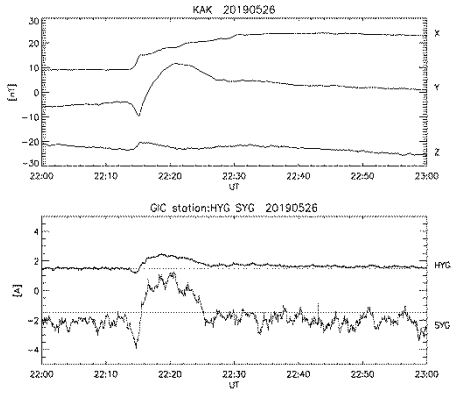


図 3 磁気急始事象時に観測された GIC の事例.
柿岡地磁気観測所で観測された地磁気 3 成分 (上段)、東山口変電所(HYG)と新山口変電所(SYG)の GIC(下段).

時)に極域オーロラ現象に伴う地磁気変動が観測された。これに対応して、新山口変電所で計測したGICが最大振幅5アンペアの強度で変動した。この現象は、宇宙空間から極域電離層にオーロラ電子とともに電流が流れ、電流が極域だけでなく、中低緯度でも地磁気変動を発生させる。この地磁気変動は柿岡でも観測され、新山口変電所でGICを発生させた。GICは誘導電流であるために、磁場の時間変化が急であると強い電流が流れる。

図3に、太陽爆発による太陽コロナ放出現象(CME)が原因となる磁気急始(SC)の例を示す。柿岡の地磁気がインパルス状に変動し、これと同時に東山口と新山口のGICが急激に変動した。この例では、地磁気南北(X)成分が階段状に増加したとき、東西(Y)成分が減少している。GICはこの磁場の減少に対応した変化を示しており、GICが地磁気東西成分によって誘導されたことを示している。また、新山口のGICの強度は、東山口のGICの4倍程度である。東山口変電所が瀬戸内側の送電系統の途中に位置するのに対して、新山口変電所では、瀬戸内側と山陰側の送電線が合流するために、GICが強められたと考えられる。

4. モデル計算によるGICの再現

地磁気嵐は、人工衛星などに障害を与える高エネルギー放射線の発生を伴うために、宇宙の安全利用のための宇宙天気予報が世界規模で実施されている。宇宙天気予報のための地磁気嵐発生の予測研究がスーパーコンピュータを用いて進められている。これをGICの予測に生かすためには、地磁気変動からGICを再現するモデルの開発が必要となる。この目的のために、磁気急始(図 3)が地球内部で誘導する電場を計算し、新山口で計測したGIC と比較した。図4上段左は柿岡の地磁気変化を示し、下段左にGICを実線で示す。また、電気伝導度を 1 層(one-layer)と仮定した時の誘導電場(IEF)と2層(two-layer)と仮定した時の誘導電場をそれぞれ図4上段右と下段右に示す。GIC は両モデルの計算値と高い相関関係にあることがわかる(相関係数＝0. 93 と 0. 95)。この結果は、比較的簡単なモデルを用いて地磁気変動から新山口GICを再現できることを示しており、将来のGIC予測を可能とする結果である。

5. まとめ

①東山口変電所と新山口変電所で計測したGICは地磁気東西成分による誘導電流であることが明らかになった。良導体である海に接する海岸線の方向が東西成分依存性の原因と思われる。②新山口GICが東山口GICの4倍程度の強度を示したことは、瀬戸内側と山陰側の送電線が合流する新山口でGICが強め合うことを示している。③GICは柿岡地磁気観測所で記録された地磁気変動が地球内部で誘導する電場により再現されることが示された。地磁気変動の予測研究と組み合わせることでGICの予測が可能であることを示した。

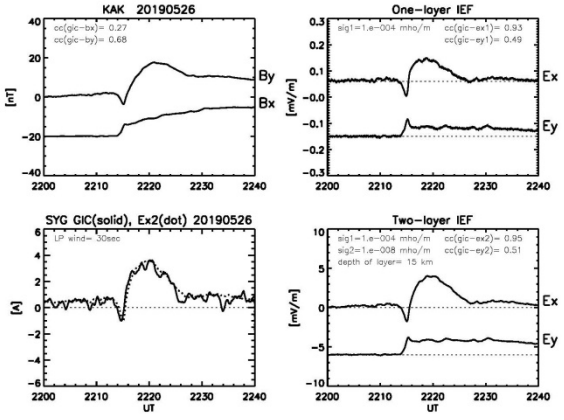


図 4 柿岡地磁気観測所(KAK)で観測された磁気急始事象時に新山口変電所(SYG)で観測された GIC(下段左)と地球の電気伝導度を一層としたモデル(One-layer, 上段右)と二層としたモデル(Two-layer, 下段右)で計算した誘導電場. 両モデルとも、GIC との相関が高い(相関係数=0.93, 0.95).

【謝辞】

本研究は、ウエスコ学術振興財団・学術研究費助成事業の助成を受け実施しました。深謝いたします。本研究のGIC計測は、中国電力株式会社周南電力所および、山口電力所の多大なるご協力の下、継続的に実施しています。また、東山口変電所におけるGIC計測機器設置において、新学術領域P-STEPプロジェクトの支援を受けました。関係者の方々に深く感謝申しあげます。

参考文献

Fujita, S. R. Kataoka, I. Fujii, A. Pulkkinen and S. Watari, Extremely severe space weather and geomagnetically induced currents in regions with locally heterogeneous ground resistivity, Earth, Planets and Space (2016) 68:51, DOI 10.1186/s40623-016-0428-y.

Kikuchi, T. Y. Ebihara, K. K. Hashimoto, and S. Watari, Reproducibility of the geomagnetically induced currents in Hokkaido with a two-layer conductivity model, Space Weather under review.

Nakamura, S., Y. Ebihara, S. Fujita, T. Goto, N. Yamada, S. Watari, Y. Omura, (2018), Time domain simulation of geomagnetically induced current (GIC) flowing in 500-kV power grid in Japan including a three-dimensional ground inhomogeneity. Space Weather, 16, 1946–1959.https://doi.org/10.1029/2018SW002004.

Watari, S., M. Kunitake, K. Kitamura, T. Hori, T. Kikuchi, K. Shiokawa, N. Nishitani, R. Kataoka, Y. Kamide, T. Aso, Y. Watanabe, and Y. Tsuneta (2009), Measurements of geomagnetically induced current in a power grid in Hokkaido, Japan, *Space Weather*,*7*, S03002, doi:10.1029/2008SW000417.

微細な水中漂流ごみを巻き込むように回収するクラゲ型ロボットの試作研究

津山工業高等専門学校　細谷 和範
大阪工業大学　谷口 浩成

親水の場である湖沼や沿岸におけるゴミ問題は国内だけでなく海外でも問題になっており，水質の悪化を招く懸濁ごみや生物による摂取の影響が心配される微細なプラスチック片の回収が注目されているが，漂流物は気象条件や利水状況によって一か所に留まらないことが多い．本研究は水の濁りの原因となり，網では回収が難しい懸濁態の漂流ごみや小プラスチック片を長期間にわたって回収するクラゲ型ロボットを開発する．本研究では，クラゲ型ロボットの傘の開閉に伴う負圧場と噴流のメカニズムを水理実験により明らかにし，ロボット設計のための基礎データを得た．本稿でははじめに DC サーボモータにより駆動するクラゲ型ロボットの流れの可視化実験結果と口腕を参考に設置したゴミ捕集器の捕集特性について述べる．続いてこれらの特性をもとに試作した SMA ソフトアクチュエータ駆動のクラゲ型ロボットについて述べる．

1.　はじめに

親水の場でもある湖沼や沿岸において長期間にわたって浮遊し続ける廃プラスチック片等の漂流ごみの回収は難しく，湖沼，沿岸等において水面付近を広範囲にわたって表層付近を漂う懸濁態のごみは地域によって組成が異なり[1]，微細なプラスチック片は気象条件や水の流れによって移動し，紫外線や風雨によってより細かいごみへと変化する．近年問題視されている直径 5 mm 以下のマイクロプラスチックはそれ自体の毒性は低いとされているが，残留性有機汚染物質（POPs: Persistent Organic Pollutants）の吸着が指摘されており，生物濃縮が心配される [1-3]．水中を漂う微小なごみの回収は非常に難しく，陸域からの新たなごみが海域に流入しないよう河口付近でのごみ回収の必要性が指摘されている[1]が，現実的には非常に難しい．護岸や防波堤に囲まれた港湾内に限定してみても，微細な浮遊ごみの少ない状態を維持するためには水域内を移動しながら長期間にわたり回収し続ける必要がある．漂流する微細なごみは吸着材やフィルターである程度の量を回収することができるが，長期間回収装置を水没させていると，海水による強い腐食や，海藻やフジツボなどの海生生物が付着し，ポンプの故障やフィルターの目詰まりを起こすことが容易に想像できる．

本研究は長期運用が可能で，かつ巻き込み等による故障の心配が少ない漂流ごみの捕集システムとして，Fig. 1 に示すネクチクラゲの口腕による採餌方法を参考にした浮遊ごみ捕集装置を考えた．Fig. 2 に示すようにクラゲ型ロボットが作り出す流れは傘の開運動に伴って周囲から傘内部への流れを誘起し，閉動作によって噴流状の下向きの流れを発生させる[4]．この傘の開閉に伴う水の流れは一種のバルブレスポンプとみなすことができ，傘下部にクラゲの口腕を模した捕集装置を設置することで水中に浮遊する微細なプラスチック片や懸濁物を遊泳しながら回

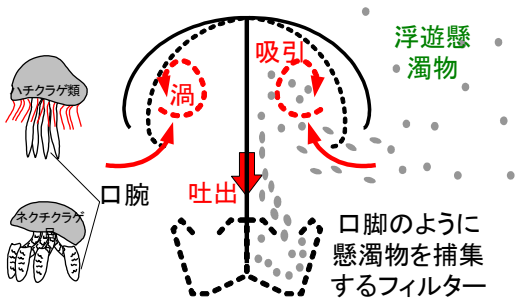


Fig. 1 クラゲ型ロボットによるごみ回収システム

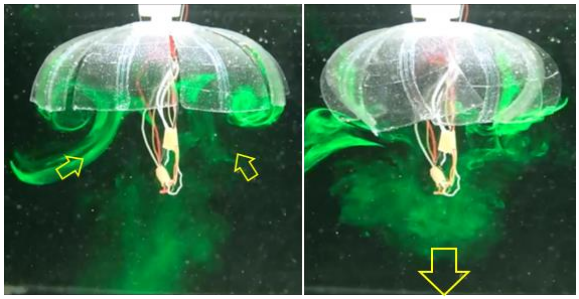


Fig. 2 クラゲ型ロボットの傘の開閉動作に伴う流れ[4]

収できるロバスト性のある浮遊ごみ捕集システムになると考えた．しかしながらクラゲ型ロボットがごみ捕集に十分な流れを発生できるのかやフィルターを有する Fig. 1 のごみ捕集装置に適した流れパターンについては十分に把握されていない．本稿でははじめにクラゲ型ロボットの傘動作に伴う流れについて染料による可視化と二次元の PIV（粒子画像流速測定法）により調べた結果について述べ，続いて応用展開として，ソーラーセルにより給電されるゴミ捕集システムならびに SMA ソフトアクチュエータにより駆動されるクラゲ型ロボットについて述べる．

2. 実験装置と実験方法

2.1 試作した実験装置

クラゲ型ロボットや遊泳メカニズムに関する研究はこれまでに多くなされている[4-6]．クラゲには大きく有櫛門と刺胞動物門があり，傘の動きが異なる．本研究ではネクチクラゲをモデルにロボットを設計する．このタイプのクラゲは傘の内側に取り込んだ水を吐出した際の反作用で推力を得る．これまでに開発されたクラゲ型ロボットはいずれも傘の開閉に伴う推進に注目しているのに対し，本研究では傘の開閉に伴って周囲から水を吸い込み，下方へ噴出するポンプとしての役割に注目しているのが特徴である．ごみ捕集の参考とした Fig. 1 のネクチクラゲの採餌方法は傘部の先端あるいは口腕を使ってプランクトンを捕食する．そこでロボットには口腕に似せた形状のフィルターを取り付け，噴流を与えることでごみを捕集する．傘の開閉動作による流れの模式図を Fig. 3 に示す．定常流動系で考えると噴流がフィルターに与える力は吐出水塊の質量流量 $Q = Av$（傘断面積 A と噴流速度 v）より $F = \rho Qv$ と記述される．傘の開閉により流量は周期的に変化することを考慮すると発生力は単位時間当たりの水塊の質量変化 W と断面積の変化に伴って変化する流速 $v(t)$により $F(t) = Wv(t)$と表現できる．実際には傘の開閉に伴う水の流れは傘端部より発する強制渦や乱れの影響を大きく受ける．本研究では傘の周囲にある水塊をより多く吸引してフィルターに水塊を送り出すための傘のサイズや駆動条件を実験的に調べることができるよう，小型の DC サーボモータで駆動されるロボットを試作した．試作ロボットの外観と仕様を Fig. 4 及び Table 1 に示す．ロボットの傘部はステンレス製の蒸し器を流用し，傘部先端とサーボモータはナイロンテグスでつながれる．傘の開動作はサーボモータの駆動によって行われ，試行錯誤により決定した Table 2 の条件が与えられる．閉動作は傘部に取り付けたゴムの弾性によって行われる．予想される推力と流量はクラゲロボットの傘の閉じる間に押し出される水塊量から，推力は $F = 0.7$ N，流量は $Q = 0.7$ kg/s と見積もられ，押し出される水塊の速度はおよそ 3 cm/s である．

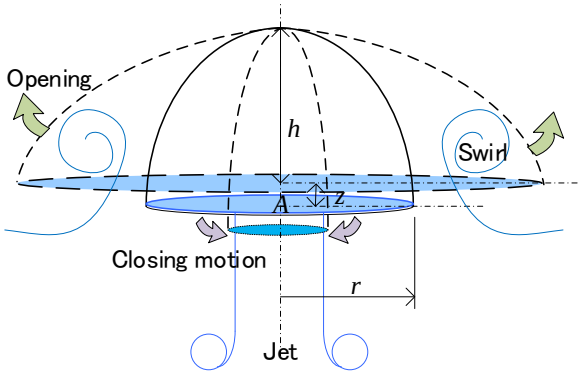


Fig. 3　傘の開閉動作による流れ

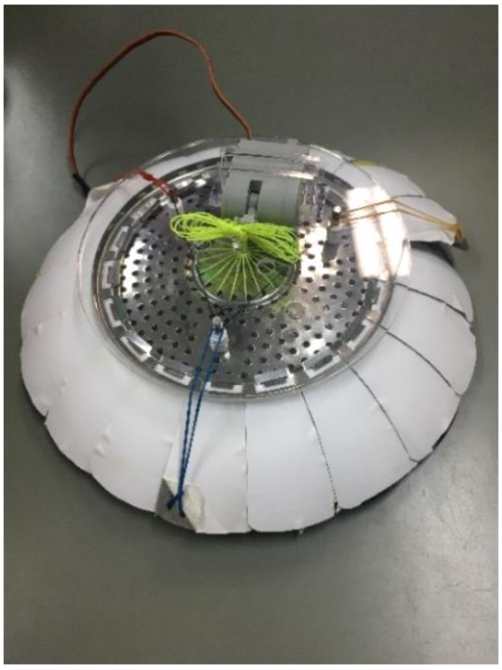


Fig. 4　DC サーボモータ駆動のロボット

Table 1 ロボットの仕様

傘直径	φ175mm(閉)～240mm(開)
DCサーボモータ	VIGOR VS-1, トルク:3.6kgf・cm, 3.6W
傘材質	ステンレス
制御方法	マイコンによる時間シーケンス制御
傘の復元	ゴムによる駆動（バネ定数: およそ0.018N/m）

ごみ捕集フィルターについて，ネクチクラゲは 8 本の口腕に餌となるプランクトン等を付着させて採餌する．この捕食方法を参考に Fig. 5 及び Table 3 に示す捕集フィルターを試作した．装置は市販の熱帯魚飼育水槽用のポリエステル製不織フィルターを用い，10 ㎝程度の大きさのフィルターを放射状に 5 個配置した．

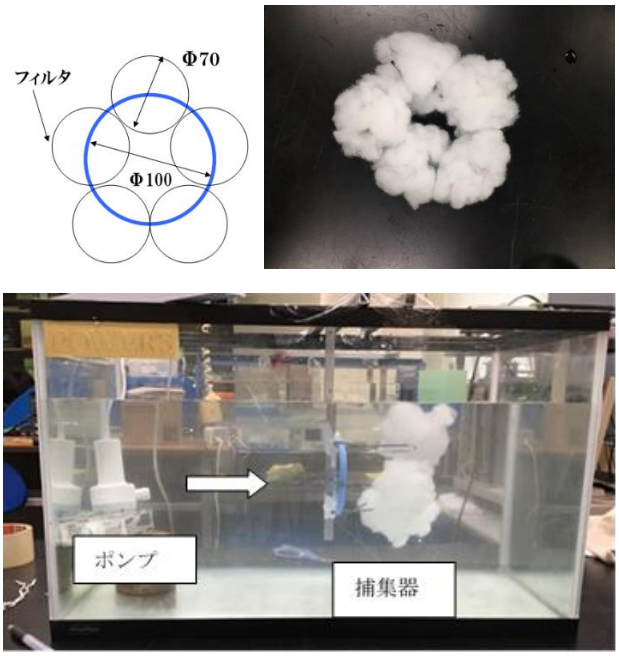


Fig. 5 ゴミ捕集フィルター

Table 2 駆動条件

サーボモータ振り角	90°
閉傘速度	0.45 sec/90°
開傘速度	0.9 sec/90°
待機時間（閉動作後）	2.5 sec
待機時間（開動作後）	1.0 sec
開閉周期	4.58 sec

Table 3 捕集フィルター

フィルター材質	ポリエステル
寸法（1個あたり）	φ70 mm×100 mm
質量 （1個あたり）	1g × 5
フィルター空隙率	17.6 %

2.2 運動量（推力）測定試験

試作したロボットはポンプとしての機能を狙ったものであるが，傘の開閉に伴う水塊の運動量により推力も発生する．そこで推力の程度を把握するために推力測定を行った．クラゲ型ロボットを 3 分力計(共和電業製)に取り付け，Table 2 の駆動条件で動作させた際の上下方向の力を 1/100 秒毎に測定した．

2.3 粒子捕集試験

ネクチクラゲの口腕に似せて製作した捕集フィルターの捕集性能を把握するためにセルロースパウダー(φ0.1mm)が 2 g 投入された水槽（400 L）にフィルターを設置し，水中ポンプを用いて流速が 2.6 m/s と 1.5 m/s の噴流を与えて粒子回収実験を行った．実験では一定時間経過後のフィルターを乾燥させ，実験前後の重量の差からパウダーの回収量を求めた．

2.4 PIV 計測とフィルター周りの流れの可視化

傘の開閉に伴う水塊移動とごみ捕集器へ送られる流動パターンを把握するため，はじめにごみ捕集器を装着しないクラゲ型ロボットの流れ場を 2 次元の PIV 計測により調べ，続いてごみ捕集器を装着したクラゲ型ロボットを用いて染料による流れの可視化実験を行った．各実験の条件を Table 4 に示す．PIV 計測では直径が約 0.1 mm のセルロースパウダーをトレーサ粒子とし，傘中央部の鉛直二次元断面をレーザーライトシートで照射し，トレーサの動きを 300fps のカメラで撮影した．PIV には市販の濃度相関法によるソフトウェア(カトウ光研製)を用いた．染料を用いた流れの可視化はフルオレセイン溶液を傘内部にシリンジポンプを用いて注入し，傘の開閉に伴う着色水塊の移動の様子を撮影し，フィルター部を通過する水の流れを観察した．

Table 4 可視化と PIV 計測条件

染料	フルオレセイン($C_{20}H_{12}O_5$)
トレーサ	セルロースパウダー(φ 0.1mm)
光源	グリーンレーザーライトシート(50mW, 532nm)
測定画像の画素数	1920pix ×1080pix
時間間隔	300fps
画像数	1029枚
測定範囲	傘後流の19.3cm×10.9cm
基準格子の大きさ	48pix
追跡範囲	48pix
水槽の寸法	300cm×300cm×620cm

3. 結果と考察

3.1 推力実験結果

クラゲ型ロボットの傘を 7 回開閉させ，閉動作に伴う各サイクルの最大推力の平均値を求めたところ，1.07 N であった．また傘の開動作による逆向きの力は 0.3 N であった．この推力は水中を遊泳することができることを示唆しているが，本研究ではロボットをポンプとして利用するため，噴流による水塊の運動量はフィルターに与えられる．なお，推算される噴流の流速はおよそ 5 cm/s である．

3.2 粒子捕集実験結果

Fig. 5 のフィルターを噴流中に置き，10 分毎の粒子回収量を調べた．Fig. 6 に噴流速度 2.6 m/s を与えたケースの粒子の付着状況を，Table 5 に 10 分毎の付着粒子の重量を示す．いずれの流速ともフィルター表面にパウダーが付着していることがわかる．付着量は噴流速度が大きくなり，噴流速度が 2.6 m/s のケースにおいて，パウダーの捕集量は時間とともに増加し，20 分経過後には投入された 2g のパウダーのうち，1.4g を捕集した．しかしながらこれ以降の捕集量は増加せず，30 分経過後の捕集量は 20 分経過後と同程度であった．



(a) Flow rate: 2.6 m/s　　(b) Flow rate: 1.5 m/s

Fig. 6 セルロースパウダーの捕集状況

Table 5 セルロースパウダー捕集量 (v = 2.6 m/s)

経過時間	10 min.	20 min.	30 min.
1回目	0.3	1.5	1.3
2回目	0.8	1.4	1.3

3.3 PIV による傘周囲の流れ

傘開閉時の流れを PIV 計測した結果について，Fig. 7 に閉動作中の流れ場（流線）を示す．傘の閉動作中の流線(Fig. 7a)を見ると，傘先端から発生した強制渦を伴う下向きの流れが確認できる．噴流の中心（コア領域）の流速はおよそ 0.1 m/s であり，流線は下方に向かって拡大している（流線は左右に偏りがあるが，これは傘の動きに偏りが生じたためである）．次にロボットの傘部の動きが傘の開動作(Fig. 7b)を見ると，下部に向かう流れと傘の左右から傘内部に向かう流れが発生していることかがわかる．傘内部の様子は可視化できないため，PIV 計測が行えなかったが，傘下部には既往研究[4]の遊泳ロボット(Fig. 2)と同様に循環構造が発生しているものと推測される．

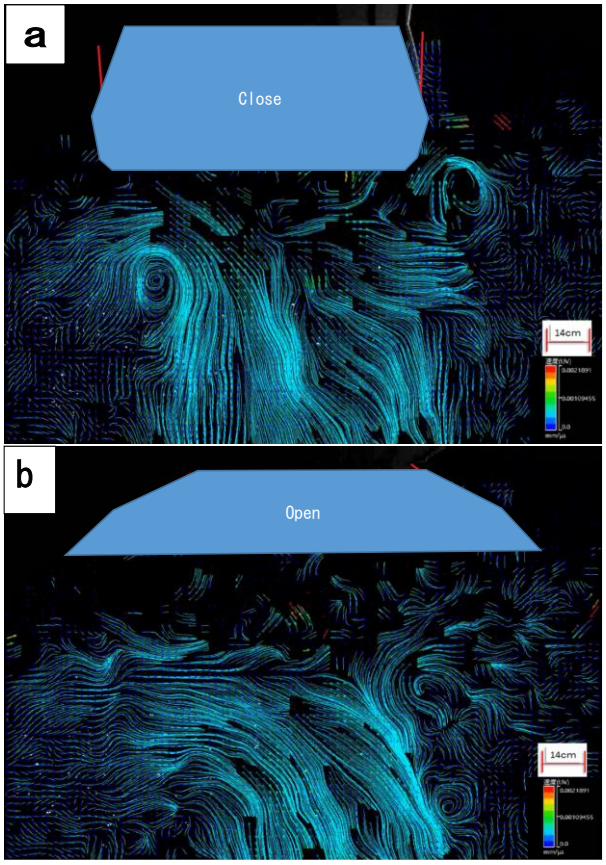


Fig. 7　PIV により得られた流線（a: 閉動作, b: 開動作 ）

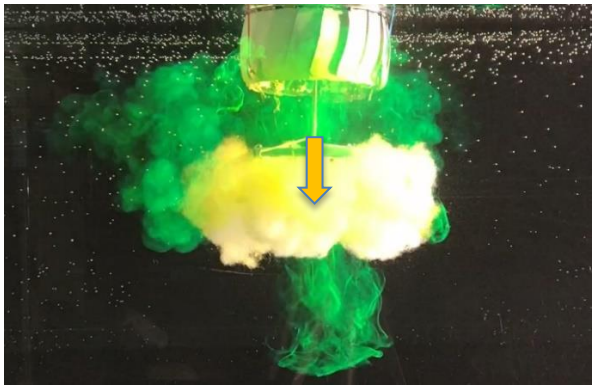
3.4 染料によるごみ捕集器を過ぎる流れの可視化

傘の閉動作によって発生する渦を伴う下向きの流れによって傘内部にため込んだ水塊がどのようにごみ捕集器を通過するか調べるために，染料によって着色した水塊の流れを観察した．フルオレセイン溶液を用いて可視化された傘の閉動作時の流れの様子を Fig. 8 に示す．染色された水塊は開動作により傘内部に向けて水塊が吸引され，閉動作によりフィルター間を抜けて下方へ進んでいる様子がわかる．この流れパターンは開閉動作のタイミングによって異

なり，開動作後及び閉動作後の待機時間を調整して噴流状の流れが十分に発達してから開動作を開始するよう調整した（Table 2 の駆動条件）．染料がフィルターを通過する流れ場は 3.2 節で述べた噴流ポンプを用いた捕集実験と同様に噴流によって移流される水塊はフィルター間の隙間を貫通しながらフィルター面に接触する流れパターンとなっている．このことからクラゲ型ロボットに取り付けられた環状のフィルターは微細粒子の捕集が可能と思われたが，水槽内にセルロースパウダーを投入して捕集実験を行ったところ，パウダーをほとんど捕集しなかった（0.1 g 未満）．これは傘が作り出す流速が小さく，粒子をフィルターに押し込むに十分な運動量を与えることができなかったためと推測される．また染料の分布を見ると，フィルター上部に滞留する水塊が存在するほか，フィルター外縁部には着色水塊が殆ど接触していないなどの課題を有する．



a)　opening motion



b)　closing motion

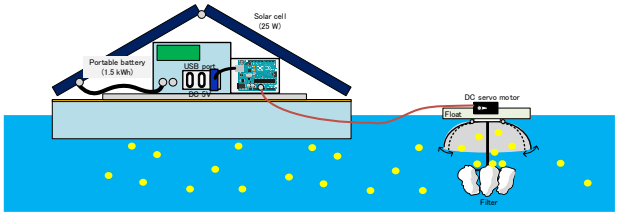
Fig. 8　フルオレセイン溶液による流れの可視化

4.　フィールド試験と SMA 駆動ロボットへの展開

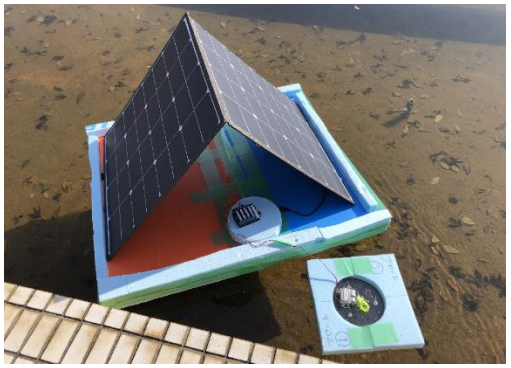
本章ではクラゲ型ごみ捕集ロボットを静穏な港湾や湖沼で長期間運用するためのシステムとして試作したソーラーセルにより発電した電力を利用するシステムと，ソフトアクチュエータにより駆動されるクラゲ型ごみ捕集ロボットについて述べる．

4.1 ソーラーセル給電のゴミ回収システム

Fig. 9 にフィールド試験用ごみ捕集システムのシステム構成と試作した装置の試験風景を示す．システムは電源部とクラゲ型ロボットとで構成され，電源部には 25 W の発電能力を有するソーラーセルと 1.5 kWh の容量を持つポータブルバッテリー，ロボットを制御する Arduino マイコンが搭載される．クラゲ型ロボットは DC サーボモータにより駆動されるロボットや形状記憶合金（SMA）で駆動されるロボット等が接続される．Arduino マイコンはシングルボードコンピュータに比べて消費電力が小さく，タイマーまたは光センサによりロボットの稼働を抑え長期間の活動を可能にする．実験は筆者が所属する高専内の池で行った．晴天下ではバッテリーなしにロボットを駆動することができた．しかしながら，システムの推進制御を行うことができず，回収すべきごみのあるなしに関わらず装置は流れにまかせて移動する．今後は何らかのセンシングとクラゲロボットの推力制御によりごみに向かって装置が移動するシステムを構築する必要がある．



a) system configuration



b) snapshot of experimental scene

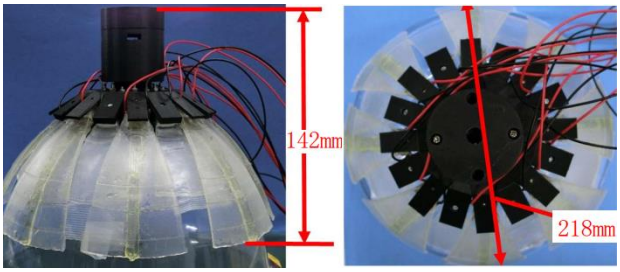
Fig. 9　ソーラーセルにより給電されるクラゲ型ロボット

4.2 ソフトアクチュエータ駆動型ロボット

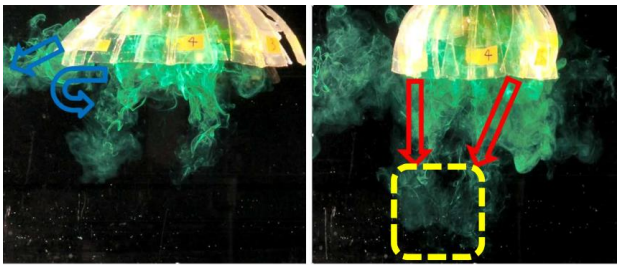
通電による加熱を利用した形状記憶合金（SMA）をアクチュエータとするシリコン樹脂製のクラゲ型ロボットを試作した. SMA は歯車等の駆動部品を持たず，水域での長期運用に適している．Fig. 10 に試作したロボットを示す．このクラゲロボットはポンプ利用を考慮し，傘部の駆動力を強化し，また噴流を作り出すための水圧に耐えるよう，傘部を厚く設計した．ロボットの傘直径は 30 cm であり，二液性のシリコンゴムを三次元加工機で作った型枠に流し込んで製作した． SMA は傘部内側に張り，有線による給電により駆動する．傘部はユニット化された傘が 5 葉組み合わされた構造となっており，ユニットの交換は容易に行うことができる．試作ロボットは前章までの DC サーボモータにより駆動されるロボットと同様の推力計測と可視化実験を行った．水槽内で試作したロボットを駆動させ，染料とセルロースパウダーを投入し，流れと粒子の動きを観察したところ，噴流の発生は確認できたものの，セルロースパウダーが傘部の隙間から流出する様子が見られた．また SMA の駆動に必要な電力が数十 W と大きく，Fig. 9 のフィールド用システムに接続するためには工夫が必要であることがわかった.

5. おわりに

本研究では，沿岸水域を漂流する微細なごみの回収を目的に，長期駆動が可能なクラゲ型ごみ捕集ロボットを試作した．流れの可視化実験により，傘の開閉に伴う循環流と噴流の発生を確認した．またクラゲの採餌を参考としたごみ捕集フィルターはロボットが作る噴流状の流れを阻害することなく接触することが確認された．しかしながら，セルロースパウダーの捕集が十分にできなかったことから，今後大幅な改良が求められる．ごみ捕集を目的に設計した SMA ソフトアクチュエータにより駆動するクラゲ型ロボットは DC サーボモータにより駆動されるクラゲ型ロボットと同様の流れを発生することを確認した．今後は傘部の隙間からの粒子の流出等の課題を改善し，実海域での実証試験を行いたい.



a)　SMA 駆動クラゲ型ロボット



b)　実験風景

Fig. 10　ごみ捕集を目的としたソフトロボット

謝　辞

本研究の実施にあたっては公益財団法人ウエスコ学術振興財団の支援を受けて実施した．ここに謝意を記す.

文　献

[1] 平成28年度化学物質安全対策（マイクロプラスチック国内排出実態調査）報告書，2016.
[2] 府川伊三郎, 海洋プラスチックごみと マイクロプラスチック（上）, ARCリポート (RS-1019), 55pp, 2017.
[3] 府川伊三郎, 海洋プラスチックごみと マイクロプラスチック（下）, ARCリポート (RS-1019), 45pp, 2017.
[4] 常安岳，ミズクラゲを模倣したアニマルセラピーロボットの検討，津山高専専攻科特別研究報告書, 2016.
[5] Frame, J., Lopez, N., Curet, O. and Engeberg, E., Thrust force characterization of free-swimming soft robotic jellyfish, Bioinspiration & Biomimetics. 13. 064001. 10. 1088/ 1748 - 3190/ aadcb3, 2018.
[6] Herschlag, G. and Miller, L., Reynolds number limits for jet propulsion: A numerical study of simplified jellyfish, Journal of Theoretical Biology, 285, 84-95, 2011.

生体深部の非侵襲・三次元・動的イメージングを実現する新規蛍光プローブの開発

津山工業高等専門学校　総合理工学科 先進科学系

守友　博紀（講師）　Mail; moritomo@tsuyama-ct.ac.jp

（概要）

多光子励起蛍光顕微鏡は, 生体組織の三次元的な観察に有効なツールである. この多光子蛍光顕微鏡の光源として, 温度や湿度といった外部環境の変化に対して安定して発振するフェムト秒ファイバーレーザーが注目されている. しかし, フェムト秒ファイバーレーザーの発振波長である 1030 nm で二光子励起が可能な蛍光プローブの種類は限られている. そこで本研究では, 1030 nm において高効率に多光子励起が可能なプローブの選択肢を増やし, 多光子励起励起蛍光顕微鏡を「どこでも・誰でも」使える技術へと高度化・汎用化することを目指している. 2019 年度は, 1030 nm で効率よく多光子励起が可能な化合物の設計指針を得るべく, 蛍光プローブとして 6 種の縮合多環炭化水素化合物を設計・合成し, それらの分光学的性質の調査およびファイバーレーザーを用いた細胞のイメージングを実証した.

Introduction

多光子励起過程における光吸収レートは, 入射光強度の累乗に比例する. したがって, 励起光を適切な条件の下にレンズでしぼって入射すると, 光強度の高い焦点付近でのみ多光子吸収が生じ, 光励起に空間選択性を付与することができる. この空間選択性により, 多光子励起顕微鏡を用いれば, 原理的には組織や臓器の深部の営みを三次元的に観察することが可能である [1].

多光子励起顕微鏡の励起光源として, Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーが注目を集めている. このレーザーは, 現在の多光子励起顕微鏡に搭載されている Ti; sapphire レーザーと比べると, i) 湿度や温度といった周辺環境変化に対して安定である, ii) サイズがコンパクトである, iii) スイッチ一つで動作し, メンテナンスフリーといった利点がある [2]. したがって, このファイバーレーザーを多光子励起蛍光顕微鏡の励起光源に用いることができれば, “どんな場所でも・誰にでも”使える三次元生体イメージングが実現する.

Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを用いて多光子イメージングを行う場合は, このレーザーの発振波長である 1030 nm と 1050 nm において効率よく多光子励起蛍光を示す蛍光色素を観察に用いる必要がある. 波長 1030 nm においてで蛍光色素を二光子励起する場合, 蛍光色素の一光子吸収帯は 1030 nm の半分である 550 nm 付近に吸収極大があるものを選ぶことが定石とされてきた. しかしながら, その波長に吸収を示し, かつ生体内で蛍光を発することが知られているプローブは未だ数が少ない. 本研究は, このプローブの選択肢を増やし, 夢のファイバーレーザー励起イメージングを普及させることを目指している. 2019 年度は, 励起過程として二光子吸収ではなく, 三光子吸収の利用に着目した.

三光子吸収を励起過程に用いれば, Yb-dopefs fiber laser を励起光源とした多光子イメージングに用いることができる色素の選択の幅は広がると考えられる. 三光子吸収は, 3 つの光子を同時に吸収し励起状態へと遷移する現象である. したがって, 化合物を三光子励起するためには, 励起光波長の 1/3 である 350 nm 付近に吸収極大波長をもつものを選べばよいと想定され, そのようなプローブは 550 nm に吸収があり, かつ生体内で蛍光を示すものと比べると多く知られている. しかし, 純粋な二光子, 三光子励起を用いる限りにおいては, 蛍光色素は吸収極大波長が 515 nm, 350 nm にあるもののどちらかを選ばざるを得ず, Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを光源としたイメージングを行うための色素選択の幅にはまだ制限がある. また, 350 nm に吸収極大波長がある化合物は一般に遷移双極子モーメントが小さ

いため, 多光子励起効率が低く, 観察の際には大出力なレーザー光が励起光源として必要となる.

近年, 二光子と三光子吸収を競争的に生じさせることにより, 化合物を純粋な三光子吸収過程と比べ効率よく多光子励起できることがCohanoschiらにより指摘されている[3]. この現象を利用すれば, 吸収極大波長が必ずしも 550 nm あるいは 350 nm に位置していない蛍光プローブであっても, 1030 nm の光源により多光子励起が可能となり, 色素の選択の幅が大幅に広がると考えられる. Cohanoschi らの結果に基づけば, 1030 nm の光源により二光子吸収と三光子吸収の競争を生じさせるためには, i) 1030 nm の 1/3 である 350 nm 付近に吸収帯が少なからず存在する, ii) 一光子吸収帯の cut-off 波長のエネルギーが, 1030 nm の光子 2 つの和に相当する準位のエネルギーと近い, という条件が必要である. そのような色素を選べば, たとえ 1030 nm で二光子吸収は起きなくとも, 二光子吸収と三光子吸収の競争の利用により, 純粋な二光子励起イメージングほどではないが三光子励起イメージングよりも効率よく像を得ることができると考えた.

そこで, そこで本研究では, fig. 1 に構造を示す, これまで当研究室がデザインしてきた [4-6], あるいは今回新規に設計・合成した cut-off 波長が 412 – 488 nm に存在し, かつ生体中のミトコンドリアに局在する水溶性の色素をモデルとし, Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを光源とした多光子励起挙動の調査と HEK293 cell を用いたミトコンドリアの多光子励起蛍光イメージングを行なった. その結果, いずれの色素を用いた場合でも, 生きた細胞中のミトコンドリアの多光子励起イメージングを行うことでき, cut-off 波長が 515 nm に近いものをプローブに用いた場合ほど, 二光子吸収の寄与が大きくなるために明るい画像を取得できた.

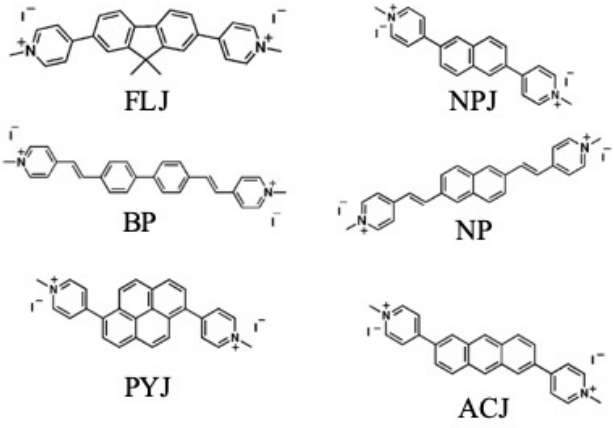


Fig. 1 Chemical structure of model compounds treated in this study.

Results and Discussion

本研究で用いたモデル化合物の水溶液の紫外可視吸収スペクトルを fig. 2 に実線で示す. ACJ, PYJ, NP,

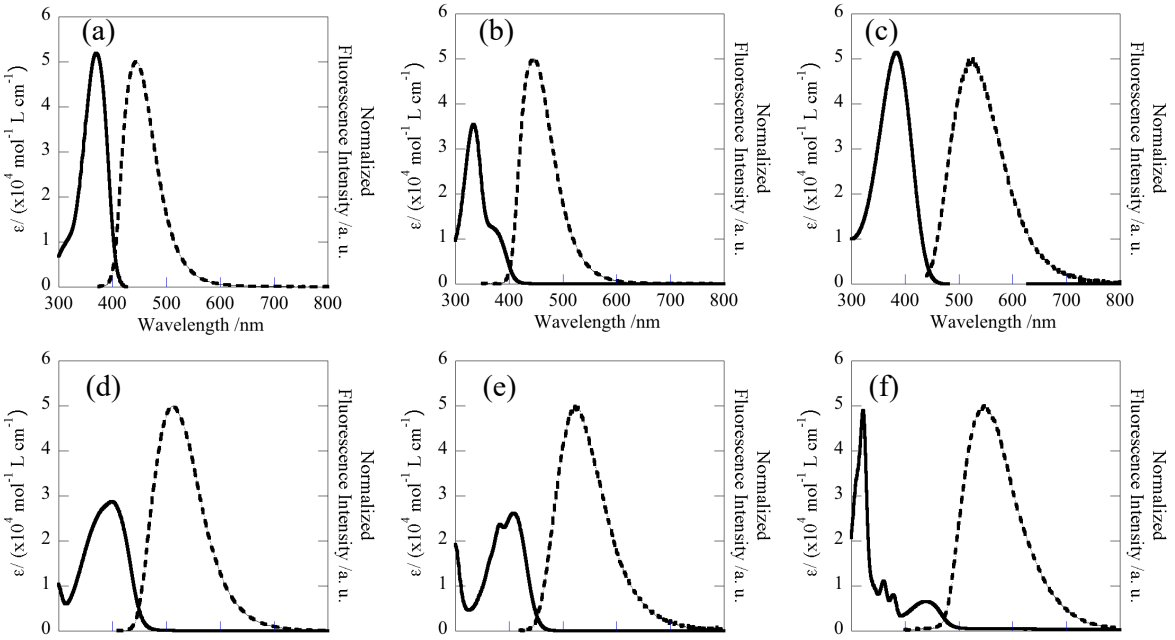


Fig. 2 Absorption (solid line, left axis) and fluorescence (dotted line, right axis) spectra of model compounds in water. (a) FLJ, (b) NPJ, (c) BP, (d) NP, (e) PYJ and (f) ACJ.

BP の吸収極大波長はそれぞれ 436, 409, 401 ,383 nm で, cut-off 波長は 488, 451, 455, 436 nm であった. 一般に, カットオフ波長が 450 nm 付近にある化合物は, 波長 1030 nm において二光子吸収と三光子吸収過程の競合により光励起されるとされている [3]. したがって, これらの化合物も 1030 nm において二光子吸収と三光子吸収過程の競合を示すと考えられる.

モデル化合物群の水溶液の蛍光スペクトルを fig. 2 に破線で示す. FLJ, NPJ, BP, NP, PYJ, ACJ の蛍光極大波長は 443, 445, 526, 511, 548 nm であり, 蛍光量子収率は 0.98, 0.87, 0.33, 0.43, 0.53 であった. 全ての化合物は蛍光イメージングに用いるには十分な蛍光量子収率を示していた.

波長 1030 nm における各化合物の励起過程を調査するために, 蛍光強度の励起光強度依存性を調査した. 各化合物からの蛍光強度の対数を, 励起光強度の対数に対してプロットしたものを fig. 3 に示す. 一

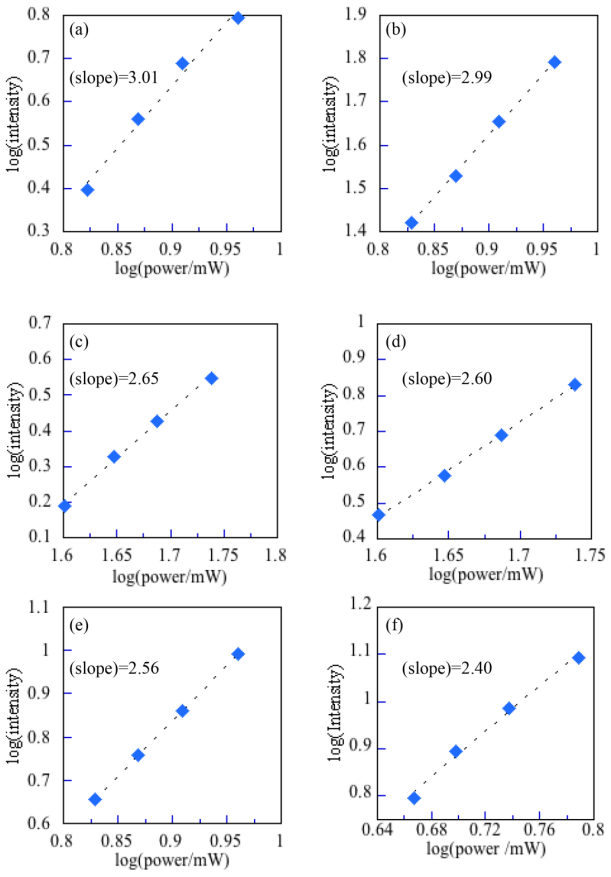


Fig. 3 Incident laser power dependences of multi-photon excited fluorescence intensities of model compounds at 1030 nm. a) FLJ, b) NPJ, c) BP, d) NP, e) PYJ and f) ACJ.

般に, n 光励起発光強度は励起光強度の n 乗に比例するため, このプロットの傾きは光吸収過程の次数（光吸収次数）を表すこととなる [7]. したがって, この値が 2 に近ければ, 二光子吸収の寄与が大きいことを示し, 一方 3 に近づけ三光子吸収の寄与が大きくなることを意味する. モデル化合物の分光学的性質と, 光吸収過程の次数を表 1 にまとめた. BP, NP, PYJ, ACJ の光吸収次数は 2.65, 2.60, 2.56, 2.40 であった. これらの値は 2 と 3 の中間の値であり, このことはこれらの化合物が 1030 nm において二光子吸収と三光子吸収の競合過程によって光励起されることを示唆していた. この光吸収次数はカットオフ波長が 515 nm に近いほど小さくなっており, このことから 1030 nm における光吸収過程は, カットオフ波長が 515 nm に近い化合物ほど二光子吸収が優位になることが明らかになった. これらの化合物とは対照的に, NPJ と FLJ の光吸収次数は 2.9 であった. NPJ と FLJ は 1030 nm において三光子吸収を示すことが明らかになった. 二光子吸収の効率は, 三光子吸収の効率と比べると極めて大きいことが知られている. したがって, 光吸収次数が 2 に近い化合物を用いるほど, 1030 nm において効率よく光励起が可能であると考えられる.

光吸収次数と多光子励起発光強度を定量的に調査するために, 同一強度の 1030 nm のレーザー光をモデル化合物に照射した際に発生する多光子励起発光強度を比較した. 多光子励起発光強度は次式で表される.

$$I \propto \sigma \phi c$$

ここで I, σ, ϕと c はそれぞれ発光強度, 1030 nm における多光子吸収効率, 蛍光量子収率, 試料濃度である. したがって, 発光強度を蛍光量子収率と試料濃度で除すことにより多光子吸収効率を見積もることができる. 得られた多光子吸収効率の対数を光吸収次数に対してプロットしたものを fig. 4 に示す. 光吸収次数が小さいほど, 多光子吸収効率が大きくなっていた. この傾向は, 多光子励起イメージングにおいて, 二光子吸収と三光子吸収の競合過程を用いれば, 純粋な三光子吸収を用いたときと比べて明るい画像を得られることを示唆していた.

Table 1 Spectroscopic properties of model compounds and orders of photon absorption

Compound	Absorption maximum /nm	Cut-off wavelength / nm	Fluorescence maximum /nm	Fluorescence quantum yield	Order of photon absorption at 1030 nm
FLJ	377	412	443	0.98	3.01
NPJ	340	415	445	0.87	2.99
BP	383	436	526	0.33	2.65
NP	401	455	511	0.35	2.60
PYJ	409	451	525	0.43	2.56
ACJ	436	488	548	0.58	2.40

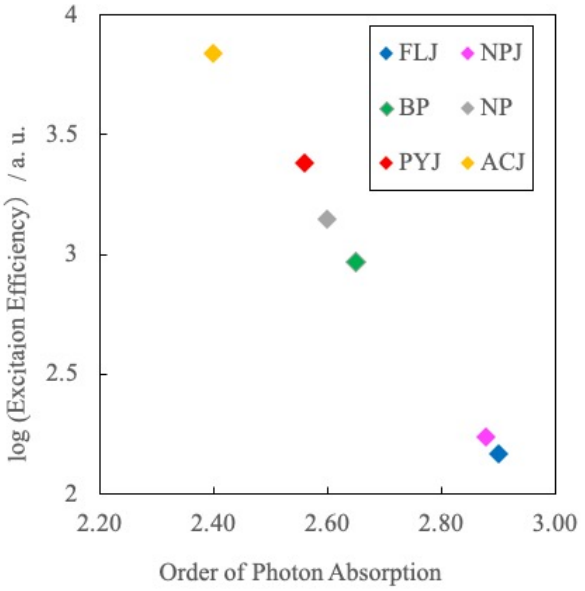


Fig. 4 Relationship between order of photon absorption and excitation efficiency.

モデル化合物により染色された HEK 293 細胞の Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを光源にもちいて得られた多光子励起蛍光イメージを fig. 5 に示す. いずれの化合物を用いても, 細胞中のミトコンドリアを明瞭に観察することができた. このときの励起光強度は対物レンズを抜けた後で 10 mW であった. 波長 1030 nm において, 二光子吸収の寄与が最も大きい ACJ をプローブに用いたときに, 最も明るい画像が得られた. 二光子吸収と三光子吸収の競合過程, そして三光子吸収過程さえも, Yb-dope フェムト秒レーザー励起多光子イメージングに十分用いることができると明らかになった.

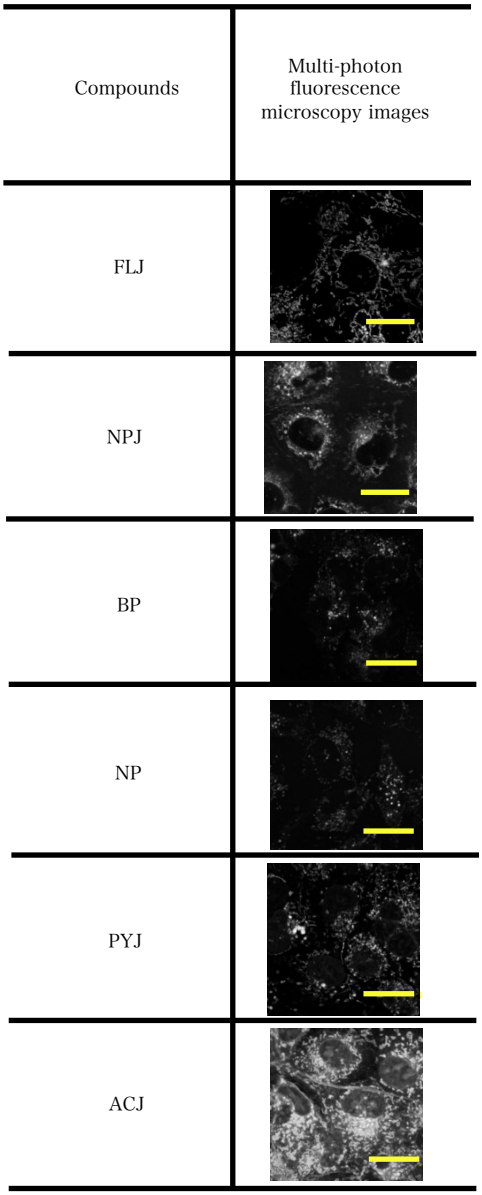


Fig. 5 Multi-photon excitation fluorescence microscopy images of HEK293 cells stained with model compounds.

Conclusion

本研究では, Yb-dope フェムト秒レーザーを励起光源とした多光子イメージングを実証した. 二光子吸収と三光子吸収の競合過程を用いることにより, 明瞭な多光子励起イメージを得られた. それだけでなく, 純粋な三光子吸収過程を用いてさえも, 同様に多光子イメージを取得することができた. したがって, 二光子吸収過程のみならず二光子吸収と三光子吸収の競合過程, そして三光子吸収過程が Yb-dope フェムト秒レーザーを励起光源とした多光子イメージングに有用であることが明らかになった. ファイバーレーザー励起のイメージングに用いることのできるプローブには限りがあると考えられていたが, 本研究によりいかなるプローブも 1030 nm において励起可能であることが明らかになった. 以上, この結果は山口大学との共同研究として現在学術論文として発表する予定である(*AIP Advances, in preparation)*。

Reference

1. W. Denk, *et al*., *Science*, 248, 7, 1990.
2. M. E. Fermann, *et al*., *Nature photonics*, 7, 868, 2013.
3. I. Cohanoschi, *et al*., *Chemical Physics Letters*, 406, 462, 2005.
4. H. Moritomo, *et al*., *Cell Structure and Function*, 39, 125, 2014.
5. M. Tominaga, *et al*., *Chemistry Letters*, 43, 1490 2014.
6. S. Onishi, *et al*., Mitochondrial Membrane Potential Sensitive Red-Green-Blue Fluorescent Probes for Multi-Photon Microscope, presented at the 2018 MRS SPRING MEETING EXHIBIT. RP03.01.04, 3 Aip. 2018
7. M. A. Albota, *et al*., *Applied Optics*, 37, 7352, 1998.

双方向可変剛性機構によるロボット義足に関する研究

津山工業高等専門学校　総合理工学科　機械システム系

野中　摂護

近年，下肢切断者の活動支援のため，義足の研究や技術向上が行われている．しかし，従来義足は単一方向にしか剛性を設計できないことや装具装着後に剛性を変化させることができないといった問題点が挙げられる．そこで本研究では，圧縮ばねと引張ばねを二重構造に組み合わせた機構を構築することで解決を試みている．この機構を用いて，人の歩行時における身体運動と，これに対する足部と脚部の動きに着目した脚部の反力剛性の制御を目指している．提案する可変剛性機構について制御や義足として構築しやすい新たな可変剛性機構を搭載したロボット義足の開発と制御に関する検討を行っている．本申請期間内においては，これら義足としての構築と歩行時のデータ検証，また制御構築により実際の剛性変化を実現させることを目標とした．本活動の中で義足機構の構築を行ったが，いくつかの課題が明らかになり改善することとなった．当初の予定通り試作機を完成させ提案機構と比較用の義足による歩行時の身体動作データを解析した．またこれにより，装置の可変剛性を確認し機構の妥当性を考察した．

1.　はじめに

近年，下肢切断者の活動支援のため，義足の研究や技術向上が行われている[1]．これらの従来義足は，単一方向にしか剛性を設計できないことや装具装着後に剛性を変化させることができないといった問題点が挙げられる．そこで状況や使用者の変化によって，装着後に剛性の変化が可能な可変剛性機構を導入することで上記の問題の解決を試みる研究が行われている[2]．ただし，この機構は足首のねじれ方向の検討をしているもので伸縮方向には変化しない．

そこで本研究では，圧縮ばねと引張ばねを二重構造に組み合わせた機構を構築することで足首の伸縮方向における可変剛性を試みた．提案する機構は，2つのコイルばねを二重構造に配置することで直動的な剛性とトルクを得ることができ，これらの剛性は双方向にそれぞれ変化させることが可能である．本稿では，これら双方向可変剛性機構を用いた義足の製作を行う．また，その義足とシンプルな義足装具での歩行実験を行い，画像による運動解析を用いて歩きやすさの評価を検討した．また義足の剛性を可変する機構が正常に機能するか構築した試作機を用いて確認を行った．

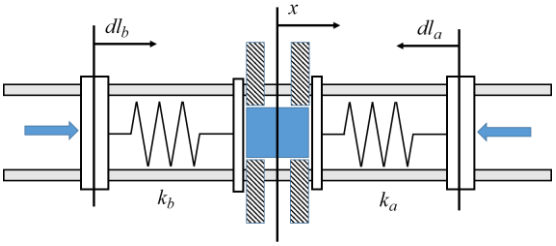


図 1　力学モデル

2.　可変剛性機構

これまでに申請者は，図 1 のような二重ばね構造による双方向可変剛性機構を提案した[3]．本機構の運動方程式は

$$\frac{d^2x}{dt^2} = -\frac{k_a}{m}(x + dl_a) \quad (x > 0)$$

$$\frac{d^2x}{dt^2} = -\frac{k_b}{m}(x - dl_b) \quad (x > 0)$$

のようになる．ただしmは質量，k_a，k_b，dl_a，dl_bはそれぞれ正負方向のばね定数および，ばねのたわみ量とする．これは，各ばねの剛性による働きが切り替わるため非線形なシステムとなる．また本機構の特徴として，初期たわみ量を与えた場合，通常のばね系と比較して反力の応答性が高くなるといった独自の応答パターンが得られるといった点が挙げられる．

表 1　各ばねの仕様

	圧縮ばね	引張ばね
自由長 [mm]	$l_1 = 61.58$	$l_2 = 105.98$
ばね定数 [N/mm]	$k_1 = 26.5$	$k_2 = 66$
最大たわみ・伸び [mm]	$\delta_{max} = 30.4$	$\lambda_{max} = 15$

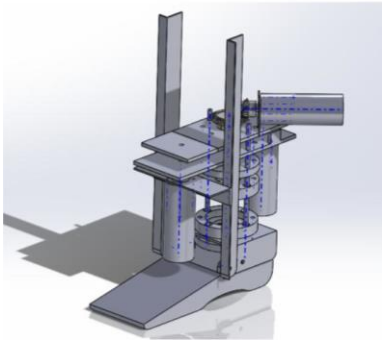


図 2　義足機構の 3D モデル

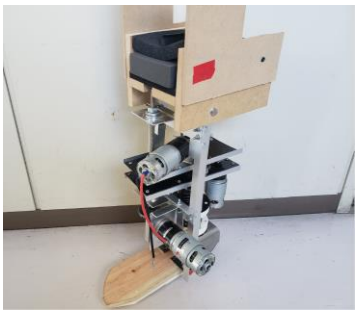


図 3　試作した義足機構



図 4　比較義足

3.　義足機構の設計・試作

双方向可変剛性機構を用いた義足機構の試作として，設計と製作を行った．設計のため想定される負荷として，成人男性の平均体重である 66［kg］を対象とする．決定した各ばねの特性を表 1 に示す．次に，3DCAD ソフトを使用し図 2 に示すモデルを設計した．大きな荷重が働く部品にはステンレスやアルミニウムを使用し，市販されていない部品や大きな荷重の働かない部品などは軽量かつ造形の自由度の高さから 3D プリンタで製作する．これらの金属パーツや出力パーツを組み合わせることで装置の試作を行った．

製作の過程で装置には主に 3 つの問題が生じたためこれら改善を施した．1 つ目の問題は「構造的問題による足首関節への動力不伝達領域」が生じたため，対策としてばね座金の回転固定を行った．

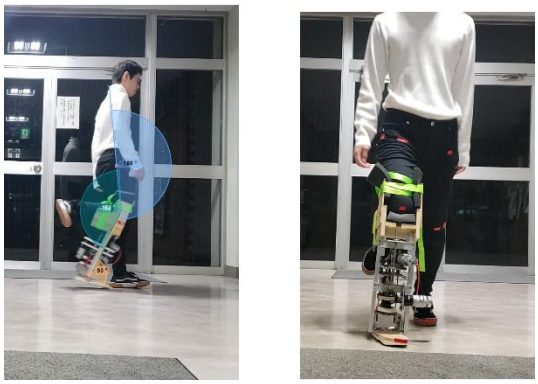


図 5　側面・正面からの解析



図 6　解析の様子

2 つ目の問題は「モータ固定部の剛性不足」が生じたため，サポート部材を追加することで対策した．3 つ目の問題は「足首角変化機構の剛性不足」が生じたため，機構部を上下共に支柱によってフレームに固定することで対策した．製作した提案義足を図 3 に示す．

4.　歩行実験と研究成果

4.1 実験方法

今回，比較義足として足首の回転機構などをもたない最も単純な装具を図 4 のように製作した．その後，歩行実験によって提案義足と比較義足の比較を行った．今回の実験では，健常者が膝を曲げたままそれぞれの装具を装着した．装着者は体重 52［kg］，身長 162［cm］であり，どちらの装具も右足に装着する．検証は，側面と正面の定点からの撮影と解析を図 5 ，図 6 のように行った．

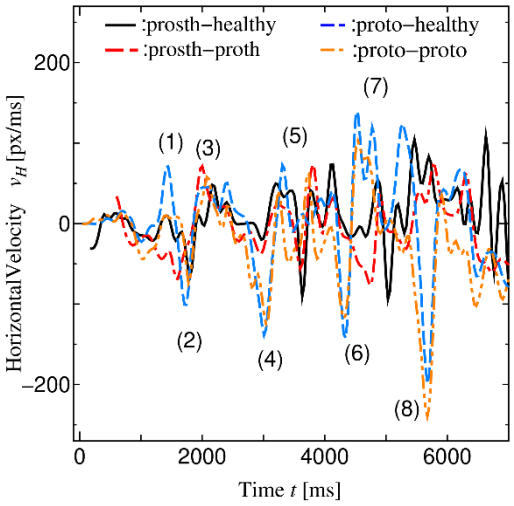


図 7　股関節の速度の水平方向成分の時間変化

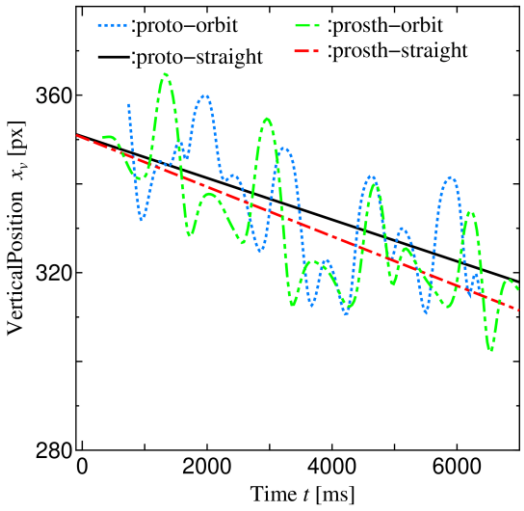


図 8　頭部の垂直方向変位の時間変化

4.2 実験結果と成果考察

正面からみた股関節の水平方向の速度成分を解析したものを図 7 に示す．ただし対象がカメラに近づく程に値は大きくなる傾向にある．ここで，比較義足を proto，提案義足を prosth としている．また，解析から得られた左右の股関節の速度比を表 2 にまとめた．図中の(1)～(8) は歩数を表す．図 7 の proto の速度に着目すると左右の水平速度において負のとき同期傾向にあることがわかる．これらの傾向は表 2 の比からもみてとれる．また，側面からみた頭部の垂直方向変位の時間変化と近似直線を図 8 に示す．ただしカメラの設置角により右に進む程値が低くなる傾向にある．図 8 より，比較義足の方が提案義足と比較して頭部の位置が高くなっている

表 2　各歩数における速度の水平方向成分速度比

	速度比	
歩数	比較義足	提案義足
1	7. 75	0. 96
2	1. 37	0. 67
3	0. 87	1. 61
4	1. 11	1. 00
5	1. 17	1. 24
6	1. 21	1. 44
7	1. 35	1. 61
8	0. 83	1. 73

表 3　各歩容数における左右脚の位相比

	位相比	
歩数	proto	prosth
1	0. 57	0. 31
2	0. 49	0. 37
3	0. 48	0. 41

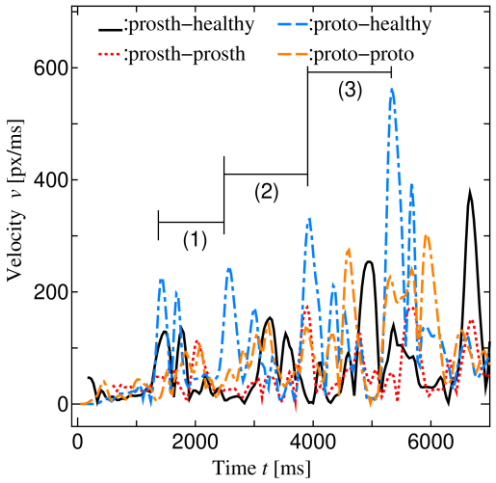


図 9　股関節の速度の時間変化

ことがわかる．これらより，比較義足による歩行時に身体が義足側に乗り上げるような動作をしており，提案義足の方が乗り上げる動作量が小さい．そのため提案義足の方が健常脚での着地時にかかる衝撃が小さなものであると推察される．

さらに，歩行を正面から見た時の股関節の水平方向速度と垂直方向速度の絶対量から計算された速度成分の時間変化を図 9 に示す．また，この成分より

得られた左脚の位相に対する右脚の位相の割合を表3 にまとめて示す．通常の歩行では交互に左右の脚が動作するためその比は 0.5 となるが，比較義足では平均比 0.513，提案義足では平均比 0.363 となった．そのため，歩行位相としては比較義足の方が健常脚に近い動きと推察される．

これらの成果より，試作した義足により，歩行時に異なる特性が得られることがわかった．これは，歩行者にとって負担軽減につながるものかは今後検討する必要があるが，スムーズさを感じる指標に影響するものと考えられる．

5. 今後の課題

本装置は試作において，強度の不足などが多数，明らかになった．また実験後，数回の歩行により破損した．そのため今後の課題として，装置の軽量化や小型化，各部の強度の向上，装着部の改善といった課題が挙げられる．装置のモータを駆動させ，双方向の剛性や足首関節の可動ができるか確認をしたが，設計通りの動きは可能であった．しかし構造上の問題があり，フレームの歪みが生じるなど改善の余地はまだ多くある．

また今後，装置のモデル化を行い，適応する制御手法の選定の後，歩行状況に応じた制御の導入などを検討していく必要がある．これについては今回検証したデータや今後さらなる評価を行い，有効なパラメータや制御方針を考えていく必要がある．このため，まずは装置の改善を行った上でさらなる運動解析を重ねていくことで，これらの方針を明らかにしていくことが重要だと考える．

6. おわりに

本研究では，義足機構の試作機について設計・製作を行い，歩行実験による評価を検討した．製作した機構は，構造上の問題に伴う強度や可変剛性機構部の可動効率の低下などいくつかの課題が明らかになった．また解析によって左右脚の位相の割合と左右支持中の身体の動きなどが明らかになった．これらの指標により，歩行時の特性変化を確認でき，開発した提案義足の評価が可能であることがわかった．また構造上のみでなく，回路や制御構築に関する今後の課題を明らかにした．

7. 謝辞

今回本研究の遂行にあたり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，心より感謝申し上げます．

参考文献

[1] Sanghamitra Debta, Kaushik Kumar, Biomedical Design of Powered Ankle-Foot Prosthesis - A Review, ICMPC, March17-19, 2017.

[2] Corey Pew, Glenn K. Klute, Second generation prototype of a variable stiffness transverse plane adapter for a lower limb prosthesis, Medical Engineering and Physics Vol. 49, pp. 22-27, 2017.

[3] 野中摂護，井上勝登，二重ばね構造を用いた義足における剛性制御機構の開発，日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会講演概要集，2P1-C16(2019)，pp. 1-2.

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）筆者はこれまでの 2 年間において、食感を改善することに役立つ放線菌由来酵素トランスグルタミナーゼ（TGase）の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（CM）を作成し、親酵素・キメラ酵素との性状比較を行った。その結果、C 末端部分にアシルドナーを認識する部位が含まれることを明らかにしている。また、アシルドナーとして、β-カゼイン由来のペプチド 2 種（VLPVPQK および AVPYPQR）を同定した。本報告では、よりきめ細かなキメラ酵素を作成し、VLPVPQK および AVPYPQR に対する反応性を比較することで、放線菌由来 TGase におけるアシルドナーの認識部位を同定した。

1．はじめに

筆者は、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。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 [1]。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。

昨年度の検討で、カゼインのトリプシン消化物に含まれるβ-カゼイン由来のペプチド 2 種（VLPVPQK および AVPYPQR）が、放線菌由来 TGase のアシルドナーであることを見出した（図 1）。

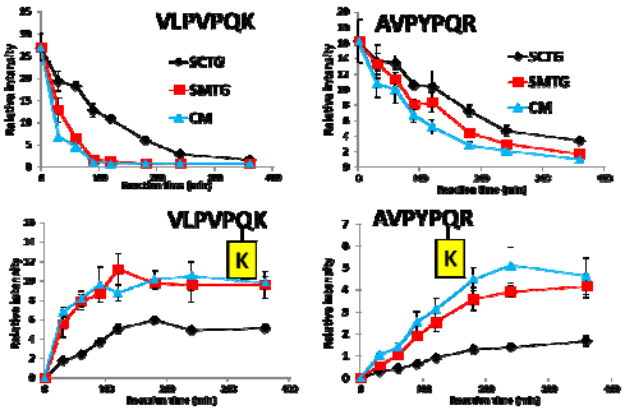


図 1　カゼインペプチドを基質とした反応経時変化
上段：基質の消長、下段：生成物の生成

また、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、作成したキメラ酵素（CM＝N 端 SCTG/C 末端 SMTG）を作成し、SMTG、SCTG、CM の 3 者を比較することにより、CM に含まれる C 末端側に、アシルドナー認識部位が含まれることを明らかにし、論文発表した[2]。

今年度は、SMTG と SCTG との間で、サンドイッチ型キメラ酵素 2 種を作成し、VLPVPQK および AVPYPQR に対する反応性を比較することで、アシルドナー認識を担う部位を同定した結果について記載する。

２．実験方法

（１）SMTG と SCTG の C 末端側の 1 次配列を比較することにより、図２に青と緑で示す大きく異なる部位２ヵ所を抽出した。

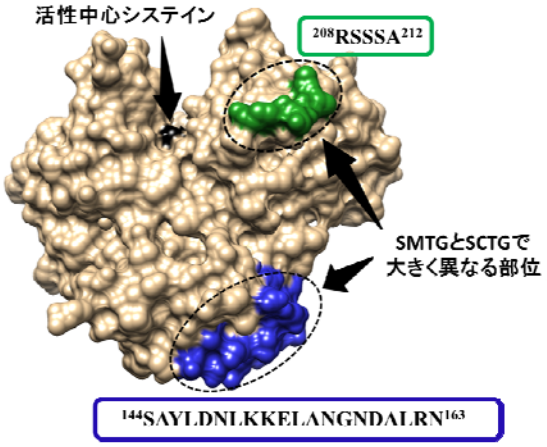


図２　SMTG の立体構造上に示す
SCTG と大きく異なる部位

次に、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、図２の部分のみ SCTG 配列を含む制限酵素 *Cpo*I 以降の配列をもつ遺伝子を合成し、SCTG 遺伝子とのサンドイッチ型キメラ酵素 2 種（SCTG の 1 次配列に、SMTG 部分構造を入れ替えた酵素 CMC-1 および CMC-2）を作成した（図３）。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 [3]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%$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，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。

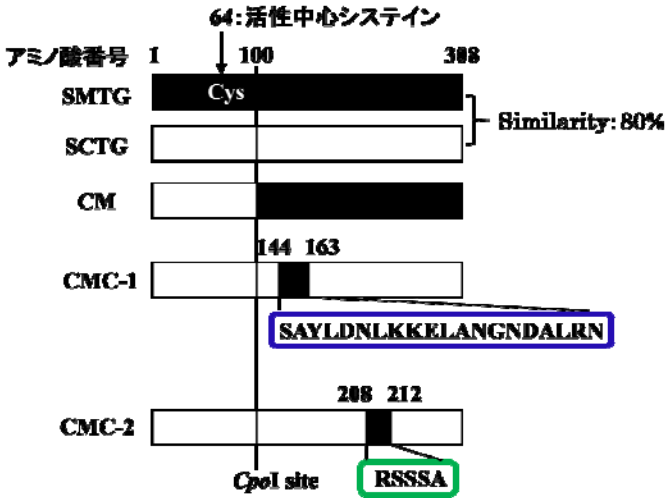


図３　サンドイッチ型キメラの
1 次構造模式図

（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）カゼイントリプシン消化物をアシルドナーとした酵素反応

より実際に近い条件で、酵素の性能比較を行う目的で、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、SMTG、CMC-1、CMC-2 の 3 種の 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、VLPVPQK（2 価イオン、*m/z*：390.7）およびそのリジン付加物（2 価イオンとして分子質量が 65 増加するピーク、*m/z*：455.3）を質量数で抽出し、これらの経時変化を追った（図４（A））。また、AVPYPQR（2 価イオン、*m/z*：415.7）およびそのリジン付加物（2 価イオンとして分子

質量が 65 増加するピーク、*m/z* : 480.2）についても同様に経時変化を追った（図４（B））。LC-MS 測定時には、検出強度を標準化するために、内部標準として、0.02 mM 4-methoxybenzamide を加えた。

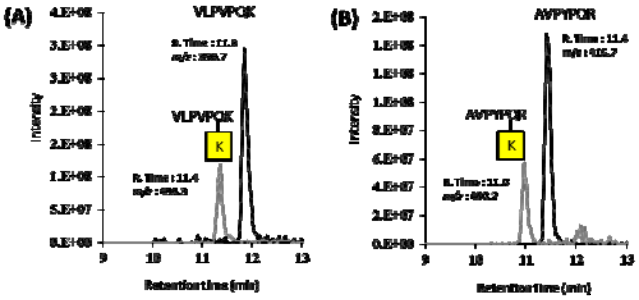


図４　VLPVPQK およびそのリジン付加物（A）
AVPYPQR およびそのリジン付加物（B）
の LC-MS による検出

（４）内部配列情報の取得

NBRC から市販されている *S. cinnamoneus* 由来 TGase の配列情報を得るため、遺伝子の保存されている配列をプライマーとし、PCR により、TGase 内部配列約 1kbp を増幅し、シーケンスした。得られた配列と、公表されているものも含めた配列情報を比較した。

３．結果と考察

（１）カゼインペプチドを基質とした反応

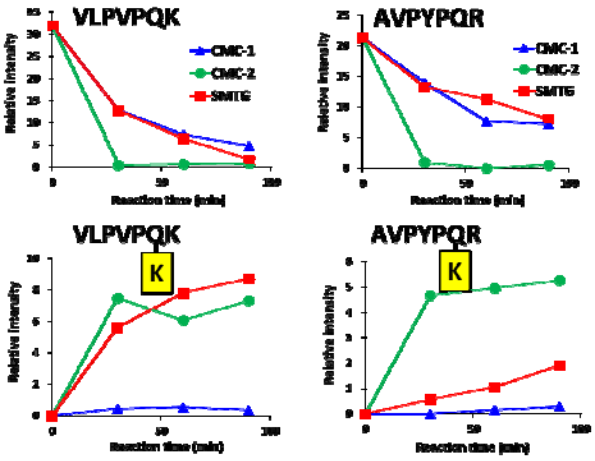


図５　SMTG およびサンドイッチ型キメラ酵素のカゼインペプチドを基質とした反応経時変化
上段：基質の消長、下段：生成物の生成

３種の酵素について、VLPVPQK および AVPYPQR を基質とした反応の経時変化を追った（図５）。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、サンドイッチ型キメラ酵素 CMC-2 は、SMTG の同等以上に優れた反応性を示した（図５）。

（２）内部配列の比較

サンドイッチ型キメラ酵素 CMC-2 は、SMTG のわずか５アミノ酸残基（^{208}RSSSA^{212}）が SCTG と入れ替わっただけの酵素である。そこで、NBRC によって市販されている *S.cinnamoneus* ８株をすべて入手し、PCR により、７株から内部配列情報を得た（表１）。

表１　アシルドナー認識部位の比較



既報の配列も、合わせると、計 11 種の内部配列情報を比較したが、表１に示すように、SCTG のもつ配列は、最も多い７種であった。しかしながら、SMTG タイプのものは、他には存在しなかった。SMTG の 208-212 アミノ酸残基部分（RSSSA）は、活性中心のシステインからは、離れた位置に存在するが、フレキシブル・ループであり（図２）、このループ構造がアシルドナーペプチドを認識する際に重要な役割を担うものと推測している。

４．まとめ

SMTG と SCTG 間で、サンドイッチ型キメラ酵素を作成し、より実際に近い条件で、酵素の性能比較を行う目的で、カゼインのトリプシン消化物に含まれる VLPVPQK および AVPYPQR に対する反応性を比較した。その結果、SMTG のフレキシブル・ループである 208-212 アミノ酸残基部分（RSSSA）が、アシルドナー認識に重要な部位であることを明らか

にした。今後、この部分で、SMTG、SCTG 以外の配列をもつ TGase 全長遺伝子配列を得て、その性能比較を行うことを計画している。

５．参考文献

1) 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*

2) Tokai S. *et al*., Molecular insights into the mechanism of substrate recognition of *Streptomyces* transglutaminases. *Biosci. Biotech. Biochem.* 84(3) : 575-582 (2020)

3) Hopwood DA. *et al*., Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. Norwitch: The John Innes Foundation, (1985)

６．３年間の本研究助成による研究成果に関する学会発表

1) S. Tokai, M. Uraji, T. Hatanaka
Comparison of *Streptomyces* transglutaminases on substrate specificities toward casein peptides
Bioactive Okayama 2018, Okayama, Oct 16 2018

2) 東海彰太、裏地美杉、畑中唯史
Streptomyces cinnamoneus ゲノム情報を利用した有用酵素の探索
日本農芸化学会中四国支部第 53 回講演会
２０１９年１月２６日

3) 東海彰太、裏地美杉、畑中唯史
放線菌トランスグルタミナーゼの基質認識部位の探索
日本農芸化学会２０１９年度大会（２０１９年３月２４日－３月２７日）

4) T. Hatanaka, S. Tokai, M. Uraji
Molecular insights into the mechanism of substrate recognition of *Streptomyces* transglutaminase
Asian Congress on Biotechnology (ACB-2019), Taipei, July 1-4, 2019

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。

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（外的要因）および植物ホルモン、栄養状態、成長度合いなどの生理的要因（内的要因）が刺激となって、花芽を発生させる(このことを花成と呼ぶが、詳細には茎頂から発生する器官が葉から花に成長相が転換する現象である)。日長は季節に伴い正確に変化するので、植物は日長の変化に鋭敏に反応し、花成が誘導される(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、日長応答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、茎頂に届き花成を誘導するホルモン様の物質として 1930 年代に定義された。近年、モデル植物のシロイヌナズナを用いた研究から、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。また、*FT* のホモログ遺伝子は殆どの被子植物に保存されており、調べられた植物では花成に関与していることが明らかになったことから、FT ホモログタンパク質がフロリゲンの分子実体であることが広く認められるようになった。

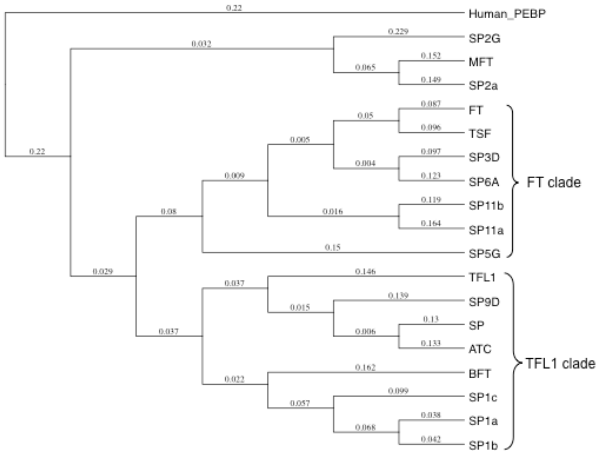
トマトは日長によらず花成が起きる典型的な中性直物とされているが、トマトの近縁野生種の多くが短日植物であることから、人類が栽培化の過程で中性化した変異体を品種として固定した可能性が高い。本研究では、トマトが栽培化の過程で失った日長応答的花成の鍵となる遺伝子の特定を目指している。また、農作物の中性植物化は、季節に非依存的に花成が期待できる（四季咲き性）ことから、有用な農業形質として栽培化や品種改良の過程において積極的に取り入れられてきた形質である。しかしながら近年の地球環境変動に伴い、農作物の花成時期の制御を従来の栽培技術のみで行うことが困難になりつつあり、またコストも高く着くようになって来ている。日長応答性を利用すれば、非常に鋭敏な花成誘導が可能になり、かつ季節性の利用などで低コストで花成誘導することができる。本研究により日長応答的花成の鍵となる遺伝子を特定することができれば、中性化した現在の栽培トマト品種にその遺伝子機能を復活させ、日長応答的花成を示す品種を開発することで、人為的花成制御が容易になったトマトを育種することが可能となる。

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た。その後、18 世紀に一般的な食用作物となるまで約 200 年に渡る品種改良が主に南ヨーロッパで行われたとされている。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。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多数知られている。

植物の日長応答的花成に関する研究は、国内外で 100 年以上の歴史がある。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が明らかにされ、長年その分子実体が不明であった花成ホルモン(フロリゲン)は、FT というタンパク質であるということが解明された。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ホルモン様の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



【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 *FT* ホモログ遺伝子で、MFT、FT、TSF、BFT、ATC と TFL1 はシロイヌナズナの *FT* パラログ遺伝子である。Human_PEBP は root を計算するためのヒトのもつ *FT* ホモログ遺伝子。

日長応答的花成を示さない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、温度ならびに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、ある植物の花成制御機構を解明するためには、まずその植物が持つ *FT* ホモログ遺伝子の機能と発現とを解析することが第一歩となると考えられる。

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 RNA を抽出し cDNA を合成した。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 法による目的遺伝子の増幅を行った。

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、発現していないか、遺伝子アノテーションに誤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、全長の塩基配列を決定し、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)。図に示す FT clade とは、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 clade とは、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つことから[2]、フロリゲンとは逆の機能を持つアンチフロリゲンとよばれる TFL1 に近いアミノ酸配列を持つタンパク質群である。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、日長感受性を示さない中性植物であるとされている。実際に日本で栽培されている品種およびヨーロッパ系と呼ばれる品種について、十数種類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。

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。

特に注目すべき知見として、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

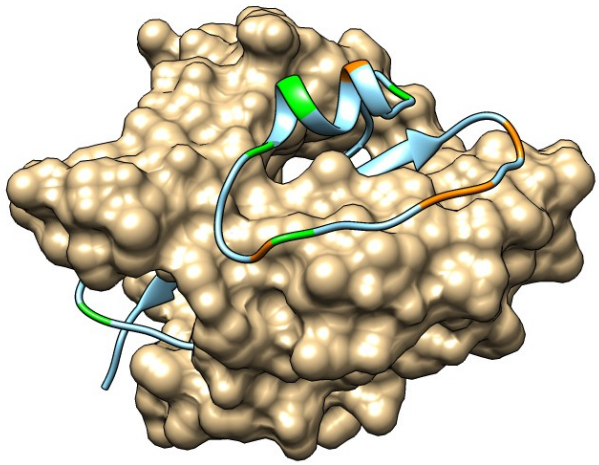
S. galapagense	短日性
S. pennellii	短日性
S. pimpinellifolium	中性
S. cheesmaniae	短日性
S. lycopersicum var. cerasiforme	短日性
S. peruvianum	中性
S. corneliomulleri	中性
S. neorickii	短日性
S. chilense	中性
S. huaylasense	短日性
S. arcanum	中性
S. chmielewskii	中性
S. chilense	中性
S. chmielewskii	短日性
S. habrochaites	短日性

【表 1】トマト近縁野生種の日長応答性
短日性は、長日条件下に比べて短日条件下で花成が促進されたもの。長日性は、逆に長日条件下の方が花成が促進されたもの。中性は、長日条件かと短日条件下とで花成に差がみられなかったもの。

が見つかった。一方、対応する近縁野生種の遺伝子では完全長のタンパク質をコードしていた。これらについて予想される立体構造を比較すると、栽培品種のタンパク質では、分子表面に位置する機能的にも重要な領域が突然変異により欠損していることがわかった（図 2)。このことは、野生種で機能していたタンパク質が、栽培品種では機能が失われている可能性を示唆するものと考えられる。

2-4. トマト *FT* ホモログ遺伝子の組織特異的発現の解析

トマト *FT* ホモログ遺伝子の機能解析を進めるにあたって、遺伝子を絞り込む必要がある。トマトには、FT clade と TFL1 clade の両方の遺伝子群が存在しているが、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

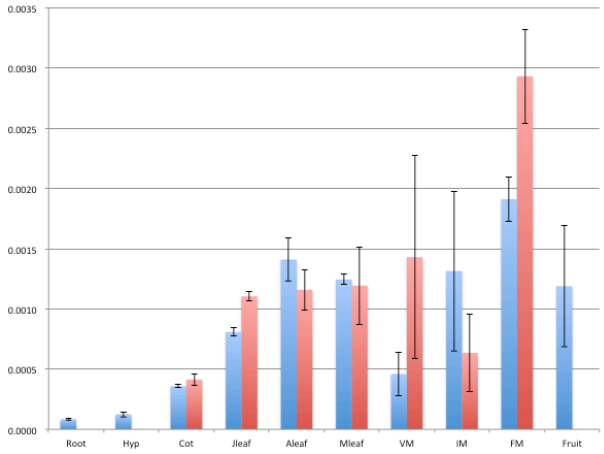


【図 2】トマト SP タンパク質の立体分子構造比較。SP タンパク質の内、栽培トマトにおいて変異があるタンパク質（変異型、茶色のサーフェスモデル）と近縁野生種のタンパク質（野生型、カラーのリボンモデル）の予想立体構造を重ね合わせた。変異型では、分子表面に位置する領域が欠損していることがわかる。

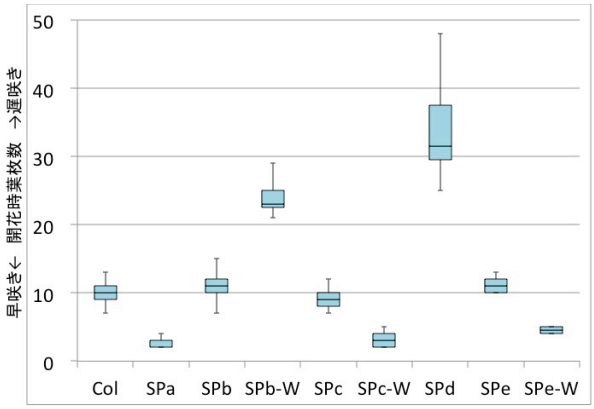
することが知られている。これまでに調べられたトマトの TFL1 ホモログは、直接花成に影響を与えていない。

そこで、葉で特異的に発現する遺伝子について機能解析を進めるため、栽培トマトにおける *FT* ホモログ遺伝子の組織特異的発現を調べた(図 3)。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（図 4)。

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 3 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



【図3】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。



【図 4】遺伝子導入シロイヌナズナを用いたトマト *FT* ホモログ遺伝子の機能解析。
Col は遺伝子導入していない対照植物。SPa、SPb、SPc、SPd、SPe は、栽培トマト由来の遺伝子を、SPb-W、SPc-W、SPe-W は、近縁野生種由来の遺伝子を持つ遺伝子導入植物を示す。

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。

2-5. シロイヌナズナを用いたトマト *FT* ホモログ遺伝子の組織特異的発現

組織特異的遺伝子発現解析の結果、FT clade の遺伝子の殆どが葉特異的な発現を示し、TFL1 clade の遺伝子の多くが茎頂特異的な発現パターンを示した。

そこで、FT clade の遺伝子について、シロイヌナズナを用いた機能解析を行った。35S プロモーターを用いて、各々の遺伝子を構成的に発現させたシロイヌナズナの花成の表現型を調べた（図 4）。

SPc と *SPe* 遺伝子は花成に関する表現型を示さず、遺伝子構造から予想されたように、変異遺伝子であることが示された。そこで、これらの遺伝子の野生型遺伝子と考えられる近縁野生種由来の遺伝子 *SPc-W*、*SPe-W* を導入したところ、早咲き表現型がみられ、フロリゲンとして働き得ることが示された。

この実験で得られた非常に興味深い事実は、次の 2 点である。まず、*SPd* 遺伝子は FT clade の遺伝子であるにもかかわらず、遅咲きの表現型を示したことである。さらに、SPb は、構造上では栽培種由来のタンパク質と近縁野生種由来のタンパク質とで、2 個のアミノ酸置換が起きているだけであるが、栽培種由来のタンパク質は機能を持たないことが示された。

他の植物種由来の遺伝子機能をモデル系であるシロイヌナズナで評価する手法は、これまでの研究から十分に妥当性のあることだと認められている。特に花成に関する表現型は、十分に信頼できるものである。本研究で明らかになった事実は、これまでの FT ホモログ遺伝子に関する既成概念を覆すような重要なものであると考えられる。今後、これらトマト FT ホモログ遺伝子の機能解析をトマトにおいて行い、本結果を確認する必要がある。

3. まとめと展望

本研究では、トマトの持つ *FT* ホモログ遺伝子を全てクローニングし、その遺伝子構造を明らかにした。

FT clade に属する２遺伝子について、トマト近縁野生種由来の遺伝子と比べて、トマト栽培種の遺伝子には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。また、シロイヌナズナを用いた遺伝子機能解析の結果、確かに栽培種由来の遺伝子機能が失われていることが確認できた。

遺伝子機能解析により、フロリゲンとして機能することが期待されるFT cladeに属する遺伝子であっても、花成を抑制するアンチフロリゲン様の機能を持っていることが明らかとなった。また、遺伝子構造解析からだけでは予想し得なかった機能変異が起きている遺伝子も見つかった。

以上の結果に基づき、今後の研究においては、ゲノム編集技術を積極的に用いることにより、トマトにおいてFT cladeに属する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鍵となる遺伝子を明らかにし、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た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).

ヒトシトクロム P450 の遺伝子多型が薬物相互作用に及ぼす影響の予測

就実大学　薬学部

丹羽 俊朗

各種ヒト薬物代謝型シトクロム P450 (CYP) サブファミリー間及び遺伝子多型による触媒機能及び薬物相互作用の相違の原因を解明することを目的とし、初年度である今年度は、新たな酵素活性測定方法を確立し、ステロイドホルモンなどの内在性物質の代謝反応に対する各種化合物の効果に対する CYP3A サブファミリー及び CYP2D6 遺伝子多型の影響を検討した。CYP3A サブファミリーである CYP3A4 及び CYP3A5 を用いた時、プロゲステロンは CYP3A4 によるテストステロン及びコルチゾール 6β 水酸化活性並びに CYP3A5 によるテストステロン 6β 水酸化活性を阻害し、テストステロンは CYP3A5 の活性を増加させた。また、CYP2D6.1 及び遺伝子多型である CYP2D6.2 (R396C/S486T) 並びに CYP2D6.10 (P34S/S486T) による *p*-チラミンからドパミン生成活性に対するヒト CYP2D6 の阻害薬であるキニジン及びラット CYP2D サブファミリーを強く阻害するキニーネによる阻害強度は、CYP2D6.1≧CYP2D6.2＞CYP2D6.10 であり、変異体により阻害強度は異なっていた。以上より、CYP3A サブファミリー及び CYP2D6 変異体間で薬物相互作用が異なることが示された。

１．はじめに

ヒトに投与された薬物を含む異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 [1.2]。また、異物のみでなく、ステロイドホルモンを含む内在性の化合物も肝臓、副腎などの各種代謝酵素によって代謝されて生成する [1, 2]。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、その一次構造の相同性からさまざまな分子種に分類されており、一般的に基質特異性が低い [1-3]。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り、多くの CYP で遺伝子多型があることが知られている [1-4]。例えば、CYP3A4 は肝臓の総 CYP 含量の約 30%を占め、医薬品代謝の約 50%に関与しているが、CYP3A4 に加え 遺伝的な CYP3A5 の発現の有無により CYP3A で代謝されるタクロリムスなどの薬物の体内動態に影響を及ぼす [4,5]。CYP3A5 は、CYP3A4 と 83%のアミノ酸相同性を示し、CYP3A4 と同様の基質特異性を示すと考えられてきたが、近年、CYP3A4 と CYP3A5 の間には若干の基質特異性の相違があることが明らかにされてきた [4]。一方、CYP2D6 などでは、多くの遺伝子多型が報告され、薬物動態に影響を及ぼす [6]。CYP2D6 では、現在までに 100 種以上の遺伝子多型が報告され、*CYP2D6*2* アレルは白人の約 30%に、*CYP2D6*10* アレルはアジア人の 30-50%に発現しており、それぞれ CYP2D6.2 (R396C/S486T) 及び CYP2D6.10 (P34S/S486T) を産生する [6]。 しかし、このようなサブファミリー内及び遺伝子多型における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。

ステロイドホルモンは副腎などに存在するステロイド代謝型 CYP のみでなく、肝臓などの各種代謝酵素によって代謝される [2,7]。糖質コルチコイドであるコルチゾールは身体的・精神的ストレスにより分泌が増加するが [8]、CYP3A4 により 6β 位が水酸化され、尿中 6β 位水酸化体／コルチゾール濃度比は *in vivo* における CYP3A 活性の指標となることが報告されている [9]。また、黄体ホルモンであるプロゲステロンは、CYP3A4 により 6β 位が水酸化されるのみでなく、脳内で CYP2D6 により 21 位が水酸化され、脳神経ステロイドとして機能する [7,9]。そこで、CYP のサブファミリー内及び遺伝子多型における基質特異性の相違の原因究明の一環として、まず今年度は、代表的なステロイドの代謝反応の新規測定方法の確立を検討し、各種ステロイドを含む内在性物質に対する酵素活性に基づいた酵素学的特性

を比較した。

２．方法

1. 材料

大腸菌に発現した CYP2D6.1、CYP2D6.2 (R396C/S486T)、CYP2D6.10 (P34S/S486T)、CYP3A4 及び CYP3A5 (Bactosomes®、EasyCYP) は、Cypex 社 (Dundee、英国)より購入した。各種基質、阻害剤及び測定用試薬は市販品を購入して使用した。

2. 薬物代謝酵素活性及び阻害活性の測定

プロゲステロン水酸化活性は既報[10]の方法において、移動相などの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 条件を若干変更することにより、6β 位の水酸化体と 21 位の水酸化体を同時に測定できるように改良した。テストステロン及びコルチゾール 6β 水酸化活性は既報 [11]の HPLC 法を改良した方法で測定し、*p*-チラミンからドパミンの生成活性は HPLC-蛍光法[12]で測定した。各種化合物の影響を検討する際には、基質となるステロイドホルモン及び *p*-チラミンの反応混合液中の濃度は各酵素反応における Michaelis 定数 (K_m) 以下とした。

３．結果

プロゲステロン代謝物の同時定量法では、HPLC の移動相のメタノール含量を若干変更することにより、主に CYP3A サブファミリーにより生成する 6β 水酸化体と CYP3A サブファミリー、CYP2D6 などにより生成する 21 水酸化体を同時に、既報[10]の方法と同じ感度で測定できるように改良した。コルチゾール 6β 位の水酸化体は既報[11]を参考にして、カラム、移動相などを変更して、最適な測定方法を開発した。また、酵素活性測定は、予備的な実験で得られた酵素濃度及び反応時間が反応生成物濃度と比例性を示す最適条件で実施した。

CYP3A4 及び CYP3A5 によるテストステロン、プロゲステロン及びコルチゾールの 6β 水酸化活性に対するこれら 3 種ステロイドホルモンの影響を検討したところ (表 1)、コルチゾールはテストステロン及びプロゲステロン 6β 水酸化活性に影響しなかったが、プロゲステロンは CYP3A4 及び CYP3A5 によるテストステロン 6β 位水酸化反応並びに CYP3A4 によるコルチゾール水酸化反応を阻害した。一方、テストステロンは、CYP3A4 及び CYP3A5 によるコルチゾール水酸化活性並びに CYP3A4 によるプロゲステロン水酸化活性には影響しなかったが、CYP3A5 によるプロゲステロン水酸化活性を増加させた。尚、CYP3A4、CYP3A5 共に、プロゲステロンの 6β 位の水酸化反応は検出されたが、21 位水酸化反応は認められなかった。

表 1. CYP3A4 及び CYP3A5 によるステロイドホルモン 6β 水酸化活性に対する各種ステロイドホルモンの影響

基質	阻害剤	CYP [1)]	影響 [1)]
ﾃｽﾄｽﾃﾛﾝ	ﾌﾟﾛｹﾞｽﾃﾛﾝ	CYP3A4	阻害
		CYP3A5	阻害
	ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	CYP3A4	影響無
		CYP3A5	影響無
ﾌﾟﾛｹﾞｽﾃﾛﾝ	ﾃｽﾄｽﾃﾛﾝ	CYP3A4	影響無
		CYP3A5	2.1 倍に活性増加
	ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	CYP3A4	影響無
		CYP3A5	影響無
ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	ﾃｽﾄｽﾃﾛﾝ	CYP3A4	影響無
		CYP3A5	影響無
	ﾌﾟﾛｹﾞｽﾃﾛﾝ	CYP3A4	阻害
		CYP3A5	効果無

阻害剤 (ステロイド) 濃度：1-100 μM.

キニジンはヒトの CYP2D6 を、キニーネはラットの CYP2D サブファミリー(CYP2D1、CYP2D2 及び CYP2D4) を強く阻害する典型的な阻害剤であることが報告されている [13]。そこで、CYP2D6.1、CYP2D6.2 及び CYP2D6.10 による *p*-チラミンからドパミンの生成活性に対する各種ステロイドホルモン及びこれらの CYP2D サブファミリーの阻害剤の影響を検討したところ (表 2)、コルチゾール及びコルチコステロンはいずれの CYP2D6 変異体に対しても阻害しなかったが、プロゲステロンはいずれの変異体も同程度に阻害した。また、キニジン及びキニーネによる阻害強

度は、CYP2D6.1≧CYP2D6.2＞CYP2D6.10 であり、いずれもキニジンによる阻害の方がキニーネの阻害より強かった。

表 2. CYP2D6.1、CYP2D6.2 及び CYP2D6.10 によるドパミン生成活性に対する各種ステロイドホルモン及び CYP2D 阻害剤の影響

阻害剤	CYP [1)]	影響 [1)]
プロゲステロン	CYP2D6.1	10 μM で 25%阻害
	CYP2D6.2	10 μM で 25%阻害
	CYP2D6.10	10 μM で 30%阻害
コルチゾール	CYP2D6.1	影響無
	CYP2D6.2	影響無
	CYP2D6.10	影響無
コルチコステロン	CYP2D6.1	影響無
	CYP2D6.2	影響無
	CYP2D6.10	影響無
キニジン	CYP2D6.1	0.1 μM で 86%阻害
	CYP2D6.2	0.1 μM で 95%以上阻害
	CYP2D6.10	1 μM で 60%阻害
キニーネ	CYP2D6.1	1 μM で 57%阻害
	CYP2D6.2	10 μM で 59%阻害
	CYP2D6.10	100 μM で 40%阻害

阻害剤濃度：0.001-100 μM.

4．考察

初年度は、新たな各種酵素活性測定方法を確立し、ステロイドホルモン及びドパミンという内在性物質の代謝反応に対する各種化合物の効果に対する CYP3A サブファミリー及び CYP2D6 遺伝子多型の影響を検討した。

まず、CYP3A4 及び CYP3A5 の 3 種のステロイドホルモンによる影響を検討したところ、プロゲステロンは CYP3A4 によるテストステロン及びコルチゾール水酸化活性並びに CYP3A5 によるテストステロン水酸化活性を阻害し、テストステロンが CYP3A5 の活性を増加させた以外は影響が無かった。特に、テストステロンによる CYP3A5 のみの活性増加は、CYP3A サブファミリー間での薬物相互作用の相違を示唆した。

CYP2D6.1、CYP2D6.2 及び CYP2D6.10 によるドパミン生成活性に対して、コルチゾール、コルチコステロンはいずれの CYP2D6 変異体に対しても阻害しなかったが、プロゲステロンはいずれの変異体も同程度に阻害した。また、ヒト CYP2D6 の阻害薬であるキニジン及びラット CYP2D サブファミリーを強く阻害するキニーネ [13]による阻害強度は、CYP2D6.1≧CYP2D6.2＞CYP2D6.10 であり、変異体により阻害強度は異なっていた。

一般には。同一の薬物代謝酵素で代謝される 2 種類の化合物を同時に添加して酵素反応を実施した場合、競合阻害（阻害剤によっては非競合阻害）を起こし、薬物代謝酵素活性は低下する。しかし、テストステロンは CYP3A5 によるプロゲステロン 6β 水酸化反応の活性を増加させ、活性化反応(activation、heterotropic cooperativity）が認められた。この活性化反応は、最初 CYP3A4 による酵素反応で報告されたが、その後、CYP1A2、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A7 などの種々の CYP による代謝反応でも報告された[14-17]。しかし、これらの活性化反応が起こる原因は、詳細には解明されていない。今回、テストステロンによる活性化反応は、CYP3A4 では認められず、CYP3A5 にのみ観察された。すなわち、活性化反応の有無が、CYP3A サブファミリー間で異なることが示され、特に、種々の化合物の代謝反応で報告されている CYP3A4 では活性化反応は認められず、CYP3A5 のみで観察されるという、非常に興味深い貴重な知見を得た。今後、この活性化反応が起こる酵素学的なメカニズムを、各種 CYP サブファミリー及び遺伝子多型により産生する変異体などの各種代謝酵素、種々の基質及び化合物（effector）などを用いて、さらに詳細に追究する必要がある。

以上、CYP3A サブファミリー及び CYP2D6 変異体間で酵素活性が異なることは多くの基質で報告されているが [4, 6]、2 種の化合物を共存させることにより観察される薬物相互作用も異なることが示された。今後、種々の CYP サブファミリー及び CYP の遺伝子多型並びにステロイドホルモンなどの内在性物質を含む多くの化合物を用いて、さらに詳細に検討する予定である。

５．謝辞

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

６．参考文献

[1] Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. Drug Metab Rev. 29:413-580 (1997).

[2] Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. Drug Metab Rev, 34: 83-448 (2002).

[3] Niwa T, Yamazaki H. Comparison of cytochrome P450 2C subfamily members in terms of drug oxidation rates and substrate inhibition. Curr Drug Metab, 13: 1145-1159 (2012).

[4] Niwa T, 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, Current Drug Metab, 9: 20-33 (2008).

[5] 丹羽俊朗, 白神歳文, 大村　稔, 近藤利彦, 黒田昌利, 高木　明, 免疫抑制薬タクロリムスの薬物動態に及ぼす薬物代謝酵素およびトランスポータの遺伝子多型の影響, 日本薬理学雑誌, 128: 395-404 (2006).

[6] Niwa T, Murayama N, Yamazaki H. Comparison of cytochrome P450 2D6 and variants in terms of drug oxidation rates and substrate inhibition. Curr Drug Metab, 12: 412-435 (2011).

[7] Niwa T, Murayama N, Imagawa Y, Yamazaki H, Regioselective hydroxylation of steroid hormones by human cytochromes P450, Drug Metab Rev. 47: 89-110 (2015).

[8] Galteau MM, Shamsa F. Urinary 6β-hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals. Eur. J. Clin. Pharmacol. 59: 713-733 (2003).

[9] Peng CC, Templeton I, Thummel KE, Davis C, Kunze KL, Isoherranen N. Evaluation of 6β-hydroxycortisol, 6β-hydroxycortisone, and a combination of the two as endogenous probes for inhibition of CYP3A4 in vivo. Clin. Pharmacol. Ther. 89 (2011) 888-895. doi: 10.1038/clpt.2011.53.

[10] Hiroi T, Kishimoto W, Chow T, Imaoka S, Igarashi T, Funae Y. Progesterone oxidation by cytochrome P450 2D isoforms in the brain. Endocrinology. 142: 3901-3908 (2001).

[11] 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).

[12] Hiroi T, Imaoka S, Funae Y. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. Biochem Biophys Res Commun. 249: 838-843 (1998).

[13] Venhorst J, ter Laak AM, Commandeur JN, Funae Y, Hiroi T, Vermeulen NP. Homology modeling of rat and human cytochrome P450 2D (CYP2D) isoforms and computational rationalization of experimental ligand-binding specificities. J Med Chem. 46: 74-86 (2003).

[14] Niwa T, Murayama N, Yamazaki H. Heterotropic cooperativity in oxidation mediated by cytochrome P450, Curr Drug Metab. 9: 453-462 (2008).

[15] Niwa T, Shiraga T, Yamasaki S, Ishibashi K, Ohno Y, Kagayama A. *In vitro* activation of 7-benzyloxyresorufin *O*-debenzylation

and nifedipine oxidation in human liver microsomes. Xenobiotica. 33: 717-729 (2003).

[16] Niwa T, Okada K, Hiroi T, Imaoka S, Narimatsu S, Funae Y. Effect of psychotropic drugs on the 21-hydroxylation of neurosteroids, progesterone and allopregnanolone, catalyzed by rat CYP2D4 and human CYP2D6 in the brain. Biol Pharm Bull. 31: 348-51 (2008).

[17] Nakamura H, Torimoto N, Ishii I, Ariyoshi N, Nakasa H, Ohmori S, Kitada M. CYP3A4 and CYP3A7-mediated carbamazepine 10,11-epoxidation are activated by differential endogenous steroids. Drug Metab Dispos. 31: 432-438 (2003).

AGEs と相互作用する新規内在性起炎分子の同定と慢性炎症病態への寄与の解明

就実大学 薬学部

渡邊 政博，豊村 隆男，森 秀治

過去に我々は，生体内において生成・蓄積する終末糖化産物（Advanced glycation end products, AGEs）が，特定の生体分子と複合体を形成し，その結果として生体分子の作用が変化することを見出した．さらに，AGEs と複合体を形成することが示唆された別種の生体分子（AGEs-BP）の作用について検討を進めたところ，AGEs-BP は新規のダメージ関連分子パターン（Damage-associated molecular patterns, DAMPs）である可能性が見出された. そこで本研究では, AGEs-BP が新規 DAMPs であることを検証することを目的とした解析を行った．その結果，AGEs-BP は代表的な DAMPs である High mobility group box-1 と同様に，単独では炎症誘導活性を示さず，Lipopolysaccharide の共存下において活性を示すことが明らかになった．この結果は，AGEs-BP が新規 DAMPs である可能性を強く示唆している．

1. 背景と目的

これまでに我々は，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 end products, AGEs）の作用メカニズムの解明を目指した解析を進めてきた[1, 2]．AGEs は糖類とアミノ基を有する分子が非酵素的に結合することによって生じ，古くから食品の褐変現象の要因として認識されてきた．一方で近年，AGEs が生体内において生成していることが明らかになった．一例として，糖尿病の診療に用いられるヘモグロビン A1c が挙げられる．さらに，AGEs の内在性受容体としてマルチリガンド受容体である Receptor for AGEs（RAGE）が同定されている．AGEs は，この受容体を介して炎症反応を活性化することが示唆されている．このことから, 加齢や高血糖に伴い生体内に蓄積した AGEs が，持続的に AGEs-RAGE 系を活性化することにより，非感染性の炎症の慢性化（慢性炎症）が生じる可能性が考えられる[3]．慢性炎症は，メタボリックシンドロームをはじめとする成因が未知の疾患の要因として注目されている病態である．この病態の成立に AGEs が寄与しているとすれば，AGEs の生成・作用・代謝などを標的とすることで，疾患の新規治療法を開発することが可能となると考えられる．

これまでの研究では, AGEs の作用に AGEs-RAGE 系が大きく寄与していると考えられてきた. 一方で，この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．そこで我々は，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することに成功した. これらの分子のうち 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[4-6]．この検討により見出した，AGEs が他の生体分子との相互作用を介して生理機能に干渉する現象は，これまでほとんど報告されていない．さらにこの知見は，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と考えられた．

続いて我々は，AGEs と複合体を形成する可能性をもつ別の候補分子（AGEs-BP（仮称））に着目した解析を試みた．AGEs-BP は，細胞内において作用する分子として知られており，TWEAK のようなサイトカイン様の機能をもつことは示唆されていない．したがって，この分子を細胞に与えた場合，無影響であることが想定された．このことを確認するために予備的な検討を行った．大腸菌発現系を用いて作製した AGEs-BP を用いた解析を行ったところ，この分子は単独で免疫担当細胞を活性化し，炎症反応を誘起する可能性が示唆された．この結果は，AGEs-BP が，通常細胞内に存在し，細胞の損傷に伴い細胞外に放出され，炎症反応を引き起こすダメー

ジ関連分子パターン（Damage-associated molecular patterns, DAMPs）と総称される内在性起炎分子群に属する分子である可能性を強く示唆している．従って，AGEs-BP は新規 DAMPs であり，TWEAK と同様に AGEs との結合によって作用が変化する分子である可能性が考えられた．そこで本研究では，新規 DAMPs としての AGEs-BP の作用を検討することを目的として以下の解析を行った．

2. 方法

リコンビナント分子の調製

AGEs-BP および High mobility group box-1（HMGB1）は，昆虫細胞発現系により調製した．系としては Thermo Scientific 社の Bac-to-Bac 法を用いた．まず，N 末端側に His タグを付加した目的分子のコード領域を転移ベクターにサブクローニングした．このベクターを Bacmid 調製用大腸菌（DH10Bac）に導入し, Bacmid を調製した. 続いて，Bacmid を昆虫細胞（Sf9）に導入し，培地に放出された目的分子発現用のバキュロウイルスを調製した．さらに，得られたバキュロウイルスを Sf9 に感染させることにより，細胞内において目的分子の発現を誘導した．バキュロウイルスの力価は，フローサイトメーター（NovoCyte Flow Cytometer（ACEA Biosciences））を用いて Sf9 細胞表面における gp64 の発現を検出することにより決定した．

目的分子を発現させた Sf9 を回収し，破砕した上で，目的分子を TALON レジン（タカラバイオ）により精製した．精製した目的分子のエンドトキシン含量は，ToxinSensor Single Test Kit（GenScript）により評価し，0.01 EU/μg 未満であることを確認した．

目的分子の細胞への作用の評価

リコンビナント AGEs-BP，HMGB1，および Lipopolysaccharide（LPS）（Invivogen）を培地（10%FBS（Gibco）を添加した DMEM（Sigma））に混合し，野生型 RAW264.7 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 ; Tumor necrosis factor-α（TNFα），MA154015-F および-R）．

統計解析

統計解析は R（version 3.6.3，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 単独の作用の検討

本研究に先だって実施した予備検討では，AGEs-BP が免疫担当細胞モデルとして用いられる RAW264.7 細胞を刺激し，炎症性サイトカインである TNF-αの発現を促進することが示された．この結果は，AGEs-BP が DAMPs である可能性を示唆していると考え，本研究において詳細を検討することとした．

これまでに, DAMPs に分類される分子について，単独で作用するとする報告と，他の炎症関連分子と複合体として作用するとする報告が混在している．後者の報告の多くは，リコンビナント分子の発現系として汎用されている大腸菌発現系から混入する LPS が，DAMPs による炎症の誘導に寄与することを指摘している．我々の行った予備検討で用いた AGEs-BP のリコンビナント分子もまた，大腸菌発現系を用いて調製していた．したがって，AGEs-BP についても，既に DAMPs であると考えられている分子と同様に，発現系から混入した LPS による影響の有無を検討する必要があると考えられた．大腸菌発現系を用いて調製したリコンビナント分子から，LPS を除去する方法として LPS 吸着樹脂などを用いた手法が存在する．しかしながら別の検討により我々は，現在利用可能な手法を用いて大腸菌発現系

由来のリコンビナント分子に含まれるLPSを低減することは可能であるものの，RAW264.7 細胞に対して無影響のレベルまでLPS含量を低下させることは困難であることを見出した．実際に，大腸菌発現系により調製した AGEs-BP リコンビナント分子についても，必要十分なレベルまで LPS 含量を低下させることは不可能であった.

そこで本研究では，LPS を生成しない昆虫細胞を用いた発現系において AGEs-BP リコンビナント分子を調製することを試みた．Bac-to-Bac 法により N 末端にHisタグを付加したAGEs-BP発現を誘導するバキュロウイルスを調製し，このウイルスを用いて昆虫細胞における当該リコンビナント分子の発現を誘導した. ウイルス添加の 72 時間後に細胞を回収し，N 末端に付加したタグを用いて当該分子の精製を行った．その結果，SDS-PAGE による分離後の CBB 染色において単独のバンドのみが検出されるサンプルが得られた．このサンプルについて LPS 含量の確認を行った結果，0.01 EU/μg 未満であることが示された．以上より，LPS 含量が低レベルの AGEs-BP リコンビナント分子が得られたと判断した.

続いて，AGEs-BP リコンビナント分子を RAW264.7 細胞に与え，TNF-αの発現に与える影響を検討したところ，予備検討の結果とは異なり，無影響であることが示された（図 1A）．この結果は，予備検討において用いたリコンビナント分子に残存していたLPSがTNF-αの発現に影響していた可能性を示唆している．先に述べたように DAMPs の作用にはLPSの共存が影響している可能性が示唆されていることから，この AGEs-BP のみの結果から，この分子が DAMPs であるのか否かを判断することはできないと考えられた.

そこで，代表的な DAMPs である HMGB1 について AGEs-BP と同様の方法により，リコンビナント分子を調製し，RAW264.7 細胞への作用を検討した. その結果，この分子もまた TNF-αの発現に影響しないことが示された（図 1B）．この結果は，LPS が DAMPs による炎症の誘導に寄与するとする報告と一致している[7, 8].

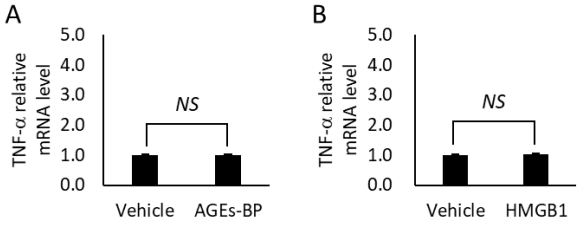


図 1. AGEs-BP 単独の作用　RAW264.7 細胞に，（A）1 μg/mL の AGEs-BP もしくは（B）1 μg/mL の HMGB1 を与え，1 時間培養後に total RNA を精製し，real time RT-PCR により TNF-αの mRNA レベルを相対定量した．*NS* : Student の t 検定により統計学的な有意差なし.

LPS 共存下における AGEs-BP の作用の検討

ここまでの検討により，代表的な DAMPs である HMGB1 と同様に AGEs-BP は単独で RAW264.7 細胞における TNF-αの発現に影響しないことが示唆された．HMGB1 が単独で作用しない可能性は過去に報告されており，それらの報告では HMGB1 は LPS との共存により，従来認識されてきた DAMPs の作用を発現することが指摘されている[7, 8].

そこで，この現象が我々の調製した HMGB1 リコンビナント分子においても生じるか否かについて検討した．その結果，図 1 で検討に用いた 1/10 量である 100 ng/mL の HMGB1 と，200 pg/mL の LPS を共存させた場合，RAW264.7 細胞において TNF-αの発現を強く促進することが示された（図 2）．また，この LPS と HMGB1 の共存による作用は，LPS 単独の作用よりも有意に増強されることが示された（図 2）. この結果は，他の研究グループによる報告と一致している[7, 8]．以上より，我々の系においても，HMGB1 は単独では作用せず，LPS と共存することにより炎症促進作用を発揮するという可能性が強く示唆された.

続いて，AGEs-BP について HMGB1 と同様の検討を行った. その結果, AGEs-BP はHMGB1 と同様に，LPS と共存することにより TNF-αの発現を強く促進することが示された（図 2）．この結果は，AGEs-BP が DAMPs である可能性を示唆していると考えられた.

以上の検討により，DAMPs は LPS と共存した場合に炎症を強く促進する分子である可能性が強く示唆され，AGEs-BP は HMGB1 と同等にこの DAMPs の特性を保持する分子であることが示された.

引き続き，AGEs-BP の作用について検討を進めることで，当該分子が新規 DAMPs である可能性を明確にしていきたいと考えている．また，AGEs-BP には複数のファミリー分子が存在することが知られており，これらの分子についても検討を進めていく予定である．さらに，AGEs-BP の生体内における挙動を検討する必要があると考えており，解析手法について検討を進めている.

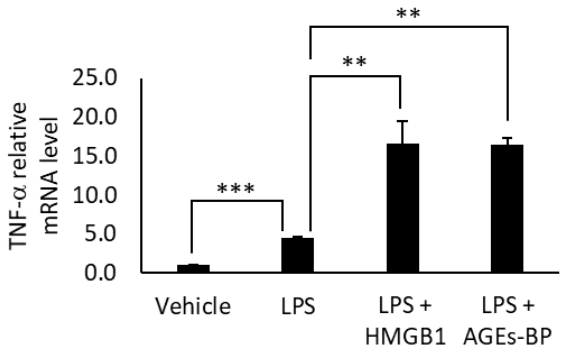


図 2. LPS 共存下における AGEs-BP の作用
RAW264.7 細胞に，200 pg/mL の LPS，LPS と 100 ng/mL の HMGB1，および LPS と 100 ng/mL の AGEs-BP を与え，1 時間培養後に total RNA を精製し，real time RT-PCR により TNF-αの mRNA レベルを相対定量した．***：$P < 0.001$，Student の t 検定（Vehicle *vs* LPS），**：$P < 0.01$，Dunnett の検定（LPS *vs* LPS+HMGB1 or LPS+AGEs-BP）.

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.

[6] Watanabe M., Toyomura T., Wake H., Liu K., Teshigawara K., Takahashi H., Nishibori M., Mori S., 2020. Differential contribution of possible pattern-recognition receptors to advanced glycation end product-induced cellular responses in macrophage-like RAW264.7 cells. Biotechnol Appl Biochem, *in press*

[7] Hreggvidsdottir H.S., Ostberg T., Wähämaa H., Schierbeck H., Aveberger A.C., Klevenvall L., Palmblad K., Ottosson L., Andersson U., Harris H.E., 2009. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. J Leukoc Biol. 86, 655–662.

[8] Hreggvidsdóttir H.S., Lundberg A.M., Aveberger A.C., Klevenvall L., Andersson U., Harris H.E., 2012. High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor. Mol Med. 18, 224–230.

胎児期葉酸欠乏マウスにおける高次脳機能低下の発現メカニズムに関する研究

就実大学　薬学部

吉川　弥里

（概要）葉酸は胎児の正常な成長に重要な栄養成分である．妊娠時や妊娠前の葉酸不足が児の神経管閉鎖障害のリスクを高めることは知られているが，発達障害，特に記憶・学習障害や情動行動に及ぼす影響については十分に分かっていない．本研究では，妊娠中に葉酸削減餌を摂取させた母マウスから産まれた胎児期葉酸欠乏マウスモデルを作製し，その仔マウスの記憶・学習能力および情動行動に及ぼす影響について行動解析を用いて評価した．その結果，胎児期葉酸欠乏マウスの物体認識記憶および空間記憶学習能力の低下，不安様行動の減少が観察された．また，発達障害の小児ではてんかん併存率が高いことから，けいれん誘発剤によるけいれん閾値を測定したところ，胎児期葉酸欠乏マウスにけいれん閾値の低下が認められた．記憶学習およびけいれん誘発に関連する脳部位である海馬における抑制性シナプス関連タンパク質の発現量を測定したところ，γ―アミノ酪酸（GABA）合成酵素（GAD）のタンパク発現量が低下していた．これより，胎児期葉酸欠乏マウスの行動異常やけいれん閾値の低下にGABA関連タンパク質の発現量低下が関与していることが示唆された．

1. 背景

発達障害は高次脳機能不全であり，①社会性の障害，②こだわり行動（固執性），③言語機能の発達障害（知的障害），④注意欠陥／多動性障害などを基本的特徴とする．発達障害の発症要因には，遺伝的および環境的要因があり，多様な因子が関与していると考えられている．わが国では，妊娠可能な若年女性のやせ（BMI＜18.5）が20歳代で19.8%であり（平成30年「国民健康・栄養調査」），若年女性のやせは低出生体重児（出生体重が2,500g未満児）出産のリスクと関連しており，妊娠中の低栄養状態が推察される．

とりわけ，葉酸について，厚生労働省は妊娠時の葉酸不足により二分脊椎症や無脳症などの神経管閉鎖障害発症のリスクが高まるとして，1日0.4 mg/dayの葉酸を摂取するように勧告している．葉酸は、核酸やタンパク質の生合成を促進し，細胞分裂や成熟に関わるため，特に胎児に重要な栄養成分である．しかし，葉酸の積極的な摂取について十分に周知されていないのが現状である．

これまでの葉酸の臨床研究において，妊娠中や妊娠前の葉酸摂取によって言語発達の遅延や自閉症のリスクが軽減される等の効果を示す報告がなされている（1-3）．また，妊娠期に葉酸などのメチル基供与体が欠乏することによって，ヒトにおける情緒行動のリスク増加（4）や仔マウスにおいても不安行動の増加（5,6）が報告されている．しかし，妊娠時や妊娠前の葉酸不足が次世代の子の記憶・学習や情動行動に及ぼす影響について十分検討されていない．

また，発達障害の小児でのてんかん併存率は，自閉症スペクトラム障害（ASD）で5-38%，注意欠陥・多動性障害（ADHD）で 12-17%と高いことが報告されている．発達障害モデルマウスとして広く用いられている，胎児期に抗けいれん薬であるバルプロ酸を曝露されたマウスでも，けいれん閾値の低下が報告されている（7）．これらの報告から，妊娠時や妊娠前の葉酸不足が次世代の子に発達障害を引き起こした場合，けいれん閾値が低下する可能性は高い．

本研究では，胎児期葉酸削減マウスの記憶・学習機能および情動行動，けいれん閾値を測定し，高次脳機能低下の発現メカニズムを検討した．

2. 方法

・実験動物

動物は，ICR雌性マウス（日本エスエルシー株式会社）を用いた．妊娠マウスに葉酸削減餌（オリエ

ンタル酵母 AIN-93G，葉酸 0.3 mg/kg 飼料）を妊娠１日目から出産まで給餌した．対照群（control）には通常餌（オリエンタル酵母 AIN-93G，葉酸 2 mg/kg 飼料）を給餌した．実験には，各群のマウスから出生した 6〜12 週齢の雄性の仔マウスを用いた．飼育は，室温 23±2℃の動物飼育室内にて，紙製床敷を敷いた通常のプラスチックケージ内に，4〜6 匹ずつ飼育した．餌および水は自由に摂取させた．

なお，本実験は，就実大学薬学部動物実験委員会の審査を受けて実施した．

・行動実験

① 高架式十字迷路試験

実験には高架式十字迷路装置を用いた．この装置は，壁のない走行路（open arm）と壁のある走行路（enclosed arm）を十字に交差させ，床から約 70 cm の位置に設置した．マウスの行動を 8 分間記録し，open arm および enclosed arm の侵入回数および滞在時間を測定し，不安様行動を評価した．

② 物体認識試験

実験には 3 等分した区画からなる 3-chamber 装置を用いた．初めに，片端の区画に物体 A（pyramid）を，もう一方の区画に物体 B（cone）を置き，マウスの行動を 8 分間記録し，3 区画における滞在時間と侵入回数を測定した．その 24 時間後に，物体 A はそのままで，物体 B を物体 C（cylinder）に置き換え，3 区画における滞在時間と侵入回数を 8 分間測定した．

③ Morris 水迷路試験

Morris 水迷路試験により，空間記憶の獲得過程と保持・想起（probe 試験）を評価した．プール（直径 120 cm）の水面下に逃避台を設置し，上限時間を 60 秒とし，逃避台に到達するまでの時間を計測した．この試行を 1 日 3 回 4 日間継続して行い，逃避台への到達時間を経示的に計測することで，空間記憶の獲得過程を測定した．5 日目に実施した probe 試験では，逃避台を撤去したプールにマウスを放ち，水泳行動を 60 秒間観察した．プールを 4 分割し，マウスの水泳時間のうち逃避台を設置していた区画（TQ：Target Quadrant）の滞在時間の割合（%）を算出することで，記憶の保持・想起を評価した．

・けいれん閾値測定

けいれん誘発剤として，GABAa 受容体遮断薬のペンチレンテトラゾール（PTZ）を用いた．流速 0.5 mL/min で尾静脈内投与し，頸頭部のけいれん又は間代性けいれんが最初に現れたときを指標として，けいれんの閾値を算出した．

・脳内タンパク質発現量解析

頸椎脱臼後，海馬を摘出しホモジナイズした後，核を除去し，粗シナプトソーム分画をサンプルとして用いた．GABA の合成に関与するグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）の発現は Western blot 法を用いて測定した．

・統計解析

測定値は，いずれも平均値±標準誤差で示した．有意水準（*P* 値）は，$P < 0.05$ とした．

3. 結果および考察

高架式十字迷路試験において，胎児期葉酸欠乏マウス（folic acid deficiency）では，open arm への進入回数と滞在時間が有意に増加した（図１，$P<0.01$）．したがって，胎児期の葉酸不足が不安閾値を上昇させることが示唆された．これまでに報告された葉酸欠乏マウスでは不安行動が増加することが観察されているが，本研究では反対の結果を示した．これは，葉酸削減餌の摂取時期や餌の葉酸濃度が関与する可能性が考えられる．本研究では，妊娠 1 日目から葉酸削減餌を摂取させている．しかし，報告された葉酸欠乏マウスは，交配前から葉酸削減餌を摂取しており，母親マウスの葉酸欠乏による影響だけでなく，父親マウス（精子異常など）の影響も受けていると考えられる．

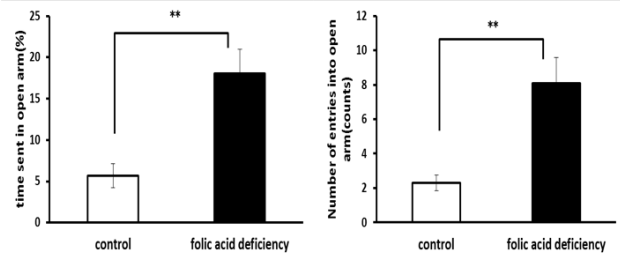
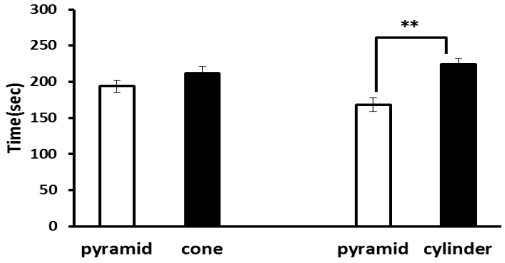


図１　高架式十字迷路試験

mean ± SEM，Student's t-test （**$P<0.01$），control n=10，folic acid deficiency　n=10

物体認識試験では，control マウスは新規物体に興味を示すため，既知物体 B を置いた chamber と比較し，新規物体 C を置いた chamber での滞在時間が有意に延長した（図 2A， P<0.01）．しかし，胎児期葉酸欠乏マウスでは滞在時間に有意な差は見られず，物体認識機能に障害があることが認められた（図 2B）．

A ＜control＞



B ＜folic acid deficiency＞

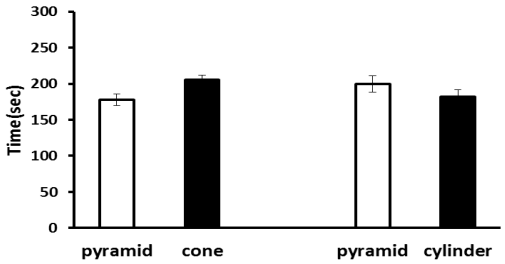
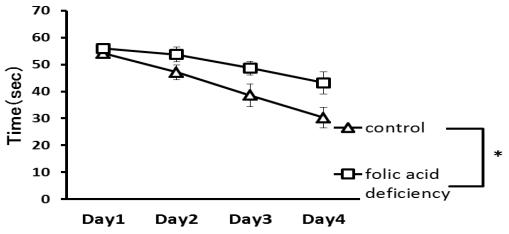


図 2　物体認識試験

mean ± SEM, Student's t-test （**P<0.01）, control　n=16, folic acid deficiency　n=20

Morris 水迷路試験において，control マウスでは Day1～Day4 の記憶獲得の試行により，逃避台への到達時間が短縮した．この空間記憶の獲得過程は，胎児期葉酸欠乏マウスで障害された（図 3A, P<0.05, two-way ANOVA）．Day5 の probe 試験において，逃避台のあった区画（TQ）の滞在時間を測定した結果，胎児期葉酸削減マウスでは TQ（%）が有意に低下し（P<0.01），記憶の保持・想起が有意に障害されていた．

A ＜記憶獲得の過程＞



B ＜probe 試験＞

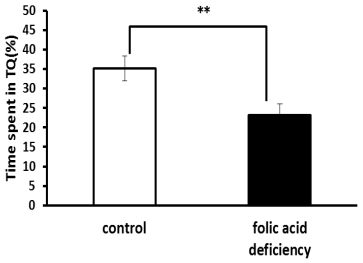


図 3　Morris 水迷路試験

mean ± SEM，two-way ANOVA（*P<0.05）　または Student's t-test（** P <0.01），control　n=16，folic acid deficiency　n=20

発達障害とけいれんとの関連性が高いことから，GABAa 受容体遮断薬の PTZ によるけいれん閾値の検討を行った．その結果，胎生期葉酸欠乏マウスは control マウスと比較し，PTZ によって誘発されるけいれん閾値に有意な低下（図 4，P＜0.05）が認められた．

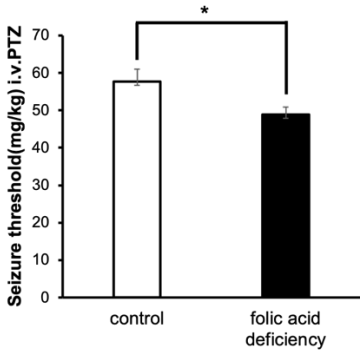


図 4　PTZ によるけいれん閾値

mean ± SEM，Student's t-test (* P <0.05), control　n=9, folic acid deficiency　n=10

次に，記憶学習およびけいれん誘発等に関与する海馬における GABA 合成酵素（GAD）のタンパク質発現量を測定したところ，control マウスと比較して，胎児期葉酸欠乏マウスで有意な GAD タンパク質の発現量の低下が認められた（図 5，P＜0.05）．葉酸は正常な胎児の形成に必要なビタミンであり，メチル基供与体としてエピジェネティックな変化にも関与している．GABA の抑制性神経経路は，早期胎児期発達に重要な役割を担っている．胎児期の葉酸欠乏が GABA 合成酵素の発現を低下させ，抑制性

神経活動が低下することで興奮性神経と抑制性神経のバランスが崩れ，不安様行動の増加，物体および空間認識記憶の低下，けいれん閾値の低下が誘発された可能性が示唆された．今後は，不安に関与する前頭前野での変化，他のシナプス関連タンパク質の発現量の変化について検討し，胎児期の葉酸欠乏による高次脳機能変化の原因メカニズムを解明していく計画である．

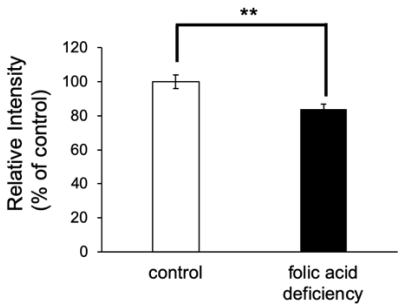


図 5　海馬における GAD タンパク質発現量
mean ± SEM，Student's t-test（**P<0.01），control　n=7，folic acid deficiency　n=7

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）Levine SZ, Kodesh A, Viktorin A, Smith L, Uher R, Reichenberg A, Sandin S. Association of maternal use of folic acid and multivitamin supplements in the periods before and during pregnancy with the risk of autism spectrum disorder in offspring. JAMA Psychiatry. 2018;75: 176-184.

2) Bjørk M, Riedel B, Spigset O, Veiby G, Kolstad E, Daltveit AK, Gilhus NE. Association of folic acid supplementation during pregnancy with the risk of autistic traits in children exposed to antiepileptic drugs in utero. JAMA Neurol. 2018;75: 160-168.

3）Husebye ESN, Gilhus NE, Riedel B, Spigset O, Daltveit AK, Bjørk MH. Verbal abilities in children of mothers with epilepsy: association to maternal folate status.　Neurology. 2018;91: e811-e821

4）Steenweg-de GJ, Roza SJ, Steegers EA, Hofman A, Verhulst FC, Jaddoe VW, Tiemeier H. Maternal folate status in early pregnancy and child emotional and behavioral problems: the Genaration R study. Am J Clin Nutr, 2012;95:1413-1421.

5)　Ferguson SA, Berry KJ, Hansen DK, Wall KS, White G, Antony AC. Behavioral effects of prenatal folate deficiency in mice. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2005;73: 249-252.

6）Barua S, Chadman KK, Kuizon S, Buenaventura D, Stapley NW, Ruocco F, Begum U, Guariglia SR, Brown WT, Junaid MA. Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. PLoS ONE. 2014;9: e101617.

岡山県産黄ニラの抗酸化作用機序の解明

就実大学　薬学部

川上　賀代子

グルタチオンは生体内で産生される抗酸化物質であり、酸化ストレスに対する防御をはじめ、毒物や薬物の解毒など様々な生理作用を有している。よって、グルタチオンの細胞内濃度を上昇させることにより、酸化ストレスを軽減し、さまざまな疾病の予防することができると考えられる。本研究では、細胞内グルタチオン量の上昇活性を指標に、肝障害抑制作用をもつ機能性食品素材の開発を目的として研究を行った。ヒト肝ガン由来 HepG2 細胞において、黄ニラ抽出物を添加することにより濃度依存的な上昇がみられた。細胞内グルタチオン量の上昇メカニズムの検討を行った結果、黄ニラ抽出物添加により、グルタチオンの構成アミノ酸であるシステインの取り込みに関与する cystine/glutamate transporter（xCT）のタンパク質発現が誘導されることを明らかにした。また、xCT と同様に転写因子である Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)の制御下にある抗酸化酵素 hemeoxygenase-1（HO-1）のタンパク質発現の誘導や、Nrf2 の核移行がみられた。さらに、あらかじめ黄ニラ抽出物を処理することで、過酸化水素による細胞傷害が抑制された。以上の結果より、黄ニラは細胞内グルタチオン量を上昇させるだけでなく、Nrf2 を活性化することにより抗酸化系を誘導することで、酸化ストレスによる細胞傷害を抑制していることが示唆された。

1. はじめに

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドであり、生体が有する主要な抗酸化物質である(*1*)。その細胞内濃度は比較的高く維持されており、抗酸化作用だけで無く、薬物などの解毒にも大きく関わっている。細胞内のグルタチオンの恒常性が変化することにより酸化ストレスを誘引し、様々な疾病につながることが報告されている(*2*)。よって、細胞内グルタチオンを制御することにより様々な疾病の予防に有効であると考えられる。

グルタチオンの構成アミノ酸のひとつであるシステインは、酸化されて 2 分子がジスルフィド結合したシスチンとして細胞外に存在しており、cystine/glutamate transporter（xCT）は、細胞外のシスチンを取り込む際、細胞内のグルタミン酸を 1：1 の割合で放出する交換輸送系である。xCT により細胞内に取り込まれたシスチンは、速やかに還元されてシステインになり、xCT が活性化することにより細胞内グルタチオン量が上昇することが分かっている。また、xCT の発現調節は転写因子 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)によって制御されていることが報告されている(*3*)。細胞が活性酸素などのストレスに晒されると Nrf2 は細胞質から核内へ移行し、xCT をはじめ、ヘムを分解して強い抗酸化作用を持つビリベルジンを産生する酵素である hemeoxygenase-1 (HO-1)などの抗酸化系を誘導する。

我々はこれまでに、細胞内グルタチオン量を上昇させる食品成分の探索を行い、黄ニラが細胞内グルタチオン量を上昇させることを明らかにした(*4*)。黄ニラは岡山県が生産量第 1 位であり、全国生産量の約 7 割を占めている岡山県の特産品のひとつである(*5*)。黄ニラは青ニラと同じニラの品種であるが栽培方法が異なる。黄ニラは青ニラの地上部を刈り取り、被覆資材で太陽光を遮断する軟化栽培による周年出荷の野菜であり、先端と下端を切断して出荷される（図 1）。そこで本研究では、黄ニラの部位別の細胞内グルタチオン上昇作用のの解析を行った。また、xCT や HO-1 のタンパク質発現への影響や Nrf2 の関与についても調べた。



図１　黄ニラの栽培風景と可食部・廃棄部

2. 実験方法

黄ニラ抽出物の調製

黄ニラは岡山県農林水産総合センター農業研究所から供与いただき、可食部（中間部）と廃棄部（出荷時に切断される先端および下端）に分けた。黄ニラは通常､太陽光を遮断して栽培し､収穫されるが、栽培期間の途中で 1～3 時間程度､太陽光に暴露（露光）することで葉の黄色が濃くなる(*6*)。そこで、露光ありと露光なしの黄ニラを試験試料とした。黄ニラをフードプロセッサーで破砕した後､100 g あたりに 100 mL の 50%エタノールを加え、スターラーで撹拌しながら 1 時間抽出した。得られた抽出液を吸引ろ過し、ろ液を凍結乾燥した。比較対象として同じ品種を露地栽培した青ニラも同様に 50%エタノールで抽出し、試料とした。

細胞内グルタチオン量の測定

ヒト肝がん細胞 HepG2 を 6 穴プレートに 1.5×10^5 cell/ 2 mL で播種し、48 時間培養した。その後、黄ニラ抽出物を添加し 1、3、8、24 時間後に細胞を回収した。細胞をホモジナイズし、上清を過塩素酸で除タンパクした後、DTNB 法を用いてグルタチオン量を測定した。

xCT、HO-1 および Nrf2 タンパク発現量の測定

回収した細胞に RIPA buffer を添加してタンパク質抽出液を調製した。抽出したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後､PVDF 膜に転写した。Nrf2 の核移行を調べるため、核抽出液は Ramyaa らの方法を用いて調製した(*7*)。一次抗体は anti-xCT、anti-HO-1、anti-Nrf2、anti-β-actin、anti-lamin B を用いた。二次抗体は anti-rabbit 又は anti-mouse IgG HRP conjugated antibody を用いた。ECL Prime Western Blotting Detection を用いて目的タンパク質を検出した。各バンドは画像解析ソフト Image-J により定量化し、β-actin または lamin B で補正した。

細胞傷害の測定

HepG2 細胞を 96 穴プレートに 1.5×10^4 cell/ 100 μL で播種し、24 時間培養した。黄ニラを添加した培地で細胞を 24 時間培養後、過酸化水素で 24 時間処理し、MTT 法により細胞の生存率を算出した。

3. 結果と考察

黄ニラの廃棄部と可食部の細胞内グルタチオン量に対する影響を調べた結果、廃棄部および可食部ともに細胞内グルタチオン上昇作用があることが分かった（図２）。また、露光処理の有無で比較すると、露光処理によりグルタチオン上昇作用がみられなくなり、青ニラつまり太陽光に当てて栽培したニラでは無処理のコントロール細胞と比べて有意差はなかった。以上の結果から、露光太陽光に暴露することにより、細胞内グルタチオン上昇活性成分が減少することが示唆された。

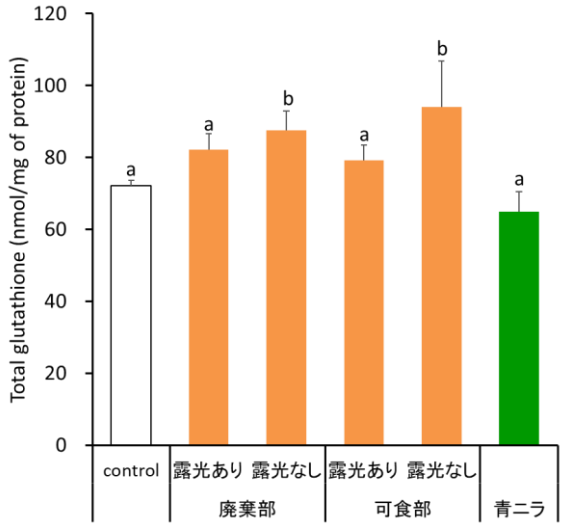


図２　黄ニラ部位別の細胞内グルタチオン量への影響
（平均値±標準偏差、n = 3、$^{a,b}p < 0.05$）

黄ニラ抽出物を HepG2 細胞に添加することにより濃度依存的に細胞内グルタチオン量が上昇した（図３A）。また、細胞内グルタチオン量の経時変化を調べた結果、1、3 時間後では減少が見られたが、24 時間後で上昇することが分かった（図３B）。

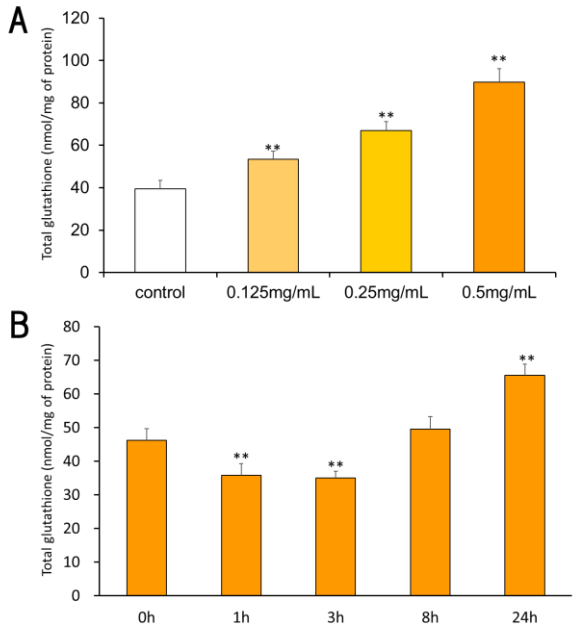


図３　黄ニラ抽出物による細胞内グルタチオン量への影響（平均値±標準偏差、n = 3、$p < 0.01$ vs. control または 0h）**

A：濃度による影響、B：時間による影響

黄ニラ抽出物の添加による HepG2 細胞内グルタチオン上昇メカニズムを調べるために、xCT のタンパク質発現量を調べた。その結果、黄ニラ抽出物を添加することにより 8、24 時間後に 0 時間に比べて xCT の発現上昇がみられた。（図 4）。一方、HO-1 は 8 時間後から有意に上昇し、24 時間後では 0 時間と比較して 2 倍に上昇した。さらに、xCT や HO-1 の発現を制御している Nrf2 のタンパク質発現を調べた結果、核内の Nrf2 は 1 時間後から上昇がみられ、8、24 時間後に有意に上昇していることが明らかとなった（図５）。以上の結果から、黄ニラ抽出物は Nrf2 の核移行を誘導し、下流の xCT や HO-1 の発現を誘導していることが示唆された。

Nrf2 は通常 Keap1 と結合してユビキチン-プロテアソーム系で分解されるが、Keap1 と解離すると安定化し、核へ移行して抗酸化酵素群を誘導することが分かっている(*8*)。また、含硫化合物である Dinallyl trisulfide は Keap1 と結合して Nrf2 を活性化し、HO-1 の発現を誘導するという報告がある(*9*)。黄ニラと同じ種で栽培方法が異なる青ニラにも含硫化合物が含まれている(*10*)。しかし、黄ニラの

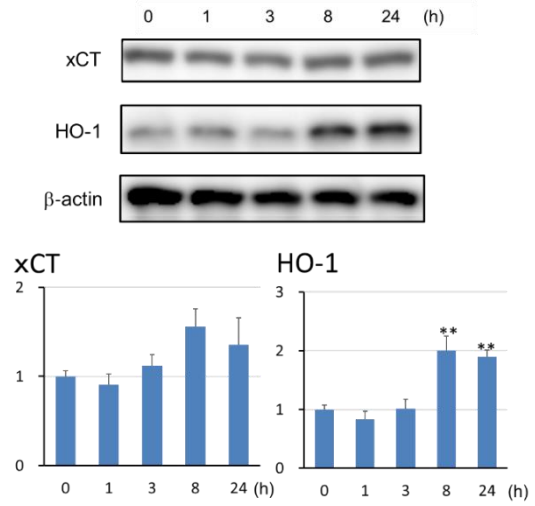


図４　黄ニラ抽出物によるタンパク質発現への影響（平均値±標準誤差、n = 3、$p < 0.01$ vs. 0 h）**

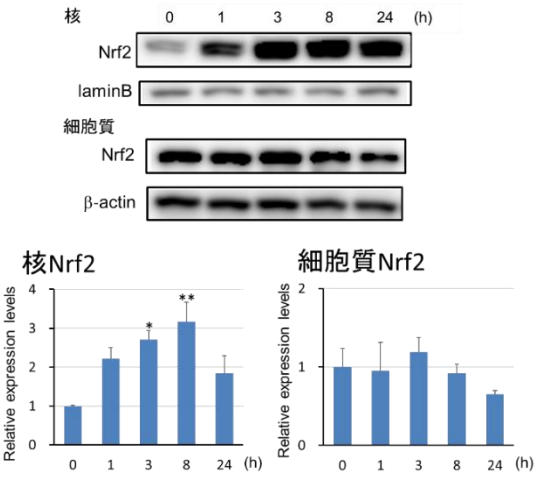


図５　黄ニラ抽出物による Nrf2 の核移行への影響（平均値±標準誤差、n = 3、*$p < 0.05$、$p < 0.01$ vs. 0 h）**

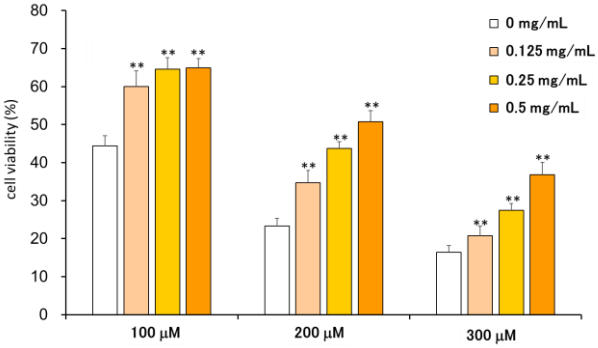


図６　黄ニラ抽出物の細胞傷害に対する影響（平均値±標準偏差、n = 8、$p < 0.01$ vs. 0 mg/mL）**

成分に関する報告はほとんどなく、青ニラとは栽培方法が異なるため、含硫化合物の含有量や成分が異なることが予想される。現在、黄ニラの活性成分の同定を進めているところである。

細胞内グルタチオン上昇作用および抗酸化酵素の発現誘導作用が明らかとなったので、過酸化水素による酸化ストレスによる細胞傷害抑制効果について検討を行った。過酸化水素を添加することにより濃度依存的に生存率が低下した（図６）。一方、黄ニラをあらかじめ細胞に添加することで、濃度依存的に生存率の低下が抑制された。

以上の結果から、黄ニラの可食部と廃棄部ともに細胞内グルタチオン上昇作用があること、黄ニラ抽出物は細胞内グルタチオンを上昇させるだけでなく、抗酸化系を誘導することにより、酸化ストレスによる細胞傷害の抑制効果があることが示唆された。酸化ストレスは糖尿病、高血圧、がんなど多くの病気の発症や進展に関与していることが明らかとなっている。例えば、アセトアミノフェンは解熱鎮痛剤として市販薬にも含まれている成分であるが、過剰に摂取すると肝臓中のグルタチオンが枯渇し、急性肝障害を引き起こすことが分かっている。今後は黄ニラ抽出物中の細胞内グルタチオン上昇活性をもつ成分の同定とアセトアミノフェン誘導肝障害モデルマウスを用いて黄ニラ抽出物の肝障害抑制作用を評価する予定である。

4. 謝辞

本研究は公益財団法人ウエスコ学術振興財団学術助成事業の助成を受けて実施しました。心より感謝申し上げます。黄ニラを提供していただいた岡山県農林水産総合センター農業研究所に感謝申し上げます。

5. 参考文献

1) Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* **52**: 711-760.

2) Reid M, Jahoor F. 2001. Glutathione in disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **4**: 65-71.

3) Ye P, Mimura J, Okada T, Sato H, Liu T, Maruyama A, Ohyama C, Itoh K. 2014. Nrf2- and ATF4-dependent upregulation of xCT modulates the sensitivity of T24 bladder carcinoma cells to proteasome inhibition. *Molecular and Cellular Biology* **34**: 3421-3434.

4) Kawakami K, Matsuo S, Moritani C, Hatanaka T, Tsuboi S. 2017. Antioxidant activity of agricultural products in Okayama Prefecture. *The Shujitsu University Journal of Pharmaceutical Sciences* **4**: 32-36.

5) 岡山県農林水産部農政企画課ホームページ. *http://wwwprefokayamajp/page/detail-26757html*.

6) 平成 25 年度試験研究主要成果. 2014. 黄ニラ軟化処理途中の日入れ処理による黄色発色向上技術. *岡山県農林水産総合センター農業研究所*: 57-58.

7) Ramyaa P, krishnaswamy R, Padma VV. 2014. Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells — up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF-κB and COX-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1840**: 681-692.

8) Kobayashi M, Yamamoto M. 2005. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* **7**: 385-394.

9) Kim S, Lee HG, Park SA, Kundu JK, Keum YS, Cha YN, Na HK, Surh YJ. 2014. Keap1 cysteine 288 as a potential target for diallyl trisulfide-induced Nrf2 activation. *PLoS One* **9**: e85984.

10) Yabuki Y, Mukaida Y, Saito Y, Oshima K, Takahashi T, Muroi E, Hashimoto K, Uda Y. 2010. Characterisation of volatile sulphur-containing compounds generated in crushed leaves of Chinese chive (*Allium tuberosum Rottler*). *Food Chemistry* **120**: 343-348.

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

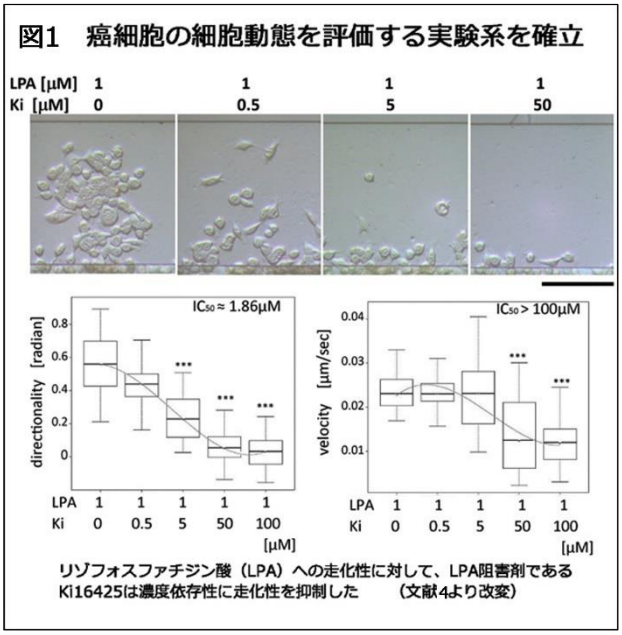
山内 明

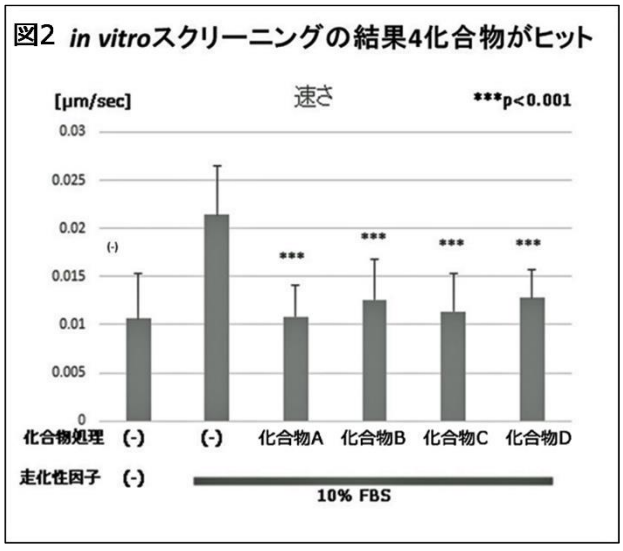
（概要）悪性新生物（癌）には転移・浸潤する性質があり、転移を抑えることができれば生存率を劇的に改善することが出来る。我々は転移・浸潤を制御することで治療を行うことを模索してきた。その試みの一つとして、我々はこれまで癌細胞の細胞動態を評価する実験系を確立し、この評価系を用いて化合物をスクリーニングし、癌転移を抑制する新規化合物を見出した。本研究では、この化合物の抗腫瘍効果の分子機序を明らかにするために、この化合物に結合する細胞内タンパク質を探索し、複数の結合タンパク質を見出した。本ヒット化合物は癌転移抑制という新しい機序に基づいた癌治療薬となりうると考えられる。今後、新薬として開発を進めるために、動物実験にて薬効、毒性、代謝などの評価を進めて行きたい。

【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罹患率が上昇し生涯のうち2人に一人は悪性腫瘍にかかるとされている（文献1)。癌細胞には“増殖”と“転移・浸潤”の2つの面があり、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る。つまり、転移・浸潤を抑えることができれば、手術療法のみで治癒を目指すことができると考えられる。これまでの抗癌剤は主に増殖を抑えることを目的としていたため、強い副作用を伴うことが多かった。もう一つの特徴である転移・浸潤を標的にした治療薬は知られていない。このような理由から、我々は悪性腫瘍の動きを直接抑制し、転移を制御することに着眼し、本研究を進めている。

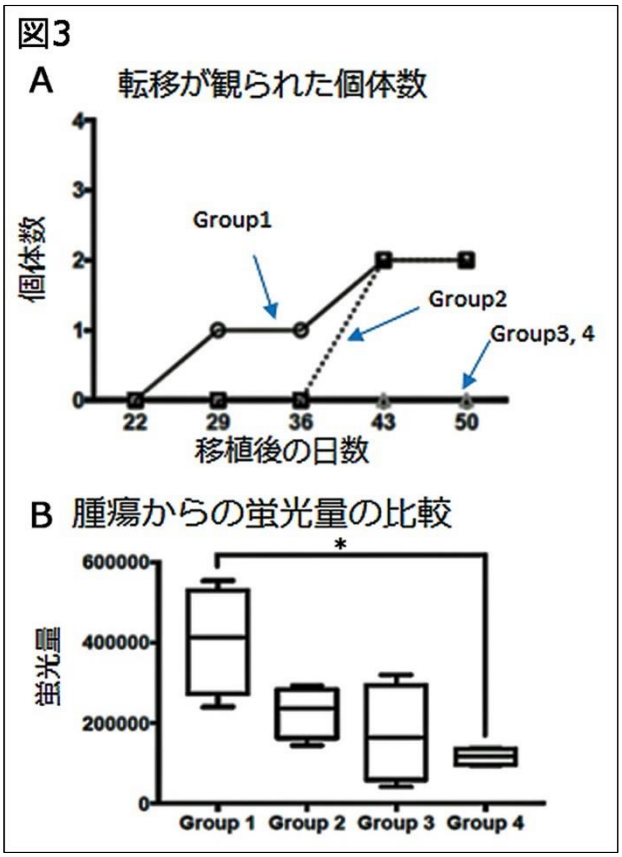
これまで我々は、細胞の動きをリアルタイムに観察し、画像解析により定量化する画期的な技術TAXIScan法（文献2, 3）を応用し、癌細胞の動態を評価する方法を確立した（図1、文献4)。この評価方法を用いて、市販およびアカデミア保有の化合物ライブラリーの中から、ヒト膵癌細胞BxPC-3の走化性を抑制する化合物Dを見出した（図2、文献5)。





即ち、*in vitro* にて膵癌細胞 BxPC-3 の走化性を抑制し、動物実験（*in vivo*）にてこの膵癌細胞をヌードマウスに移植した際の転移・浸潤および増殖をどちらも抑制する化合物を見出した（図 3、特許出願済）。しかもこの化合物の細胞毒性は、既存の抗癌剤よりも低いことが分かった。

本研究では、この化合物 D がどのように細胞に働いているかを明らかにすることを目的に、化合物 D に結合する分子を探索した。



【材料と方法】

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、実験日に培養皿から剥離して用いた。

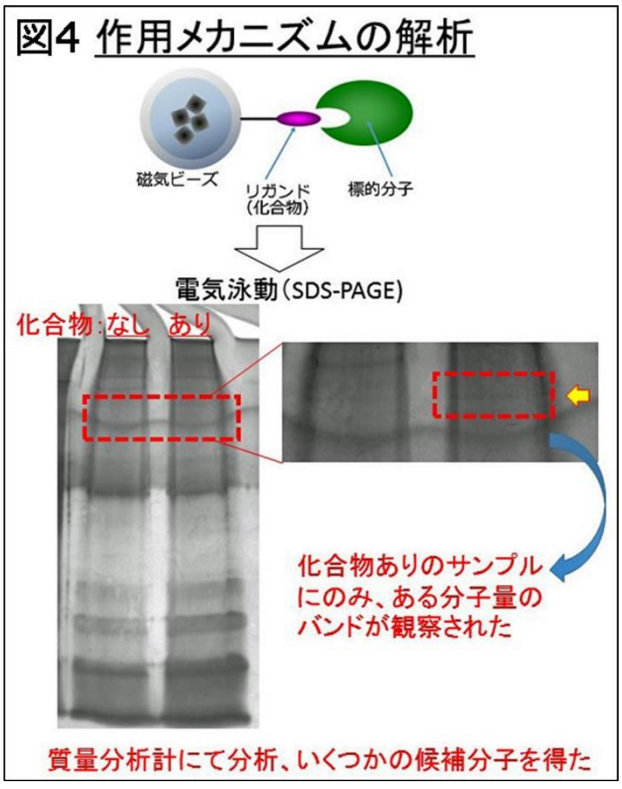
動物実験（異種異所移植実験）； ヒト化合物による癌転移抑制効果を評価するために、ヌードマウス（BALB/c-Ajcl-nu-/nu, 6 週齢、雄）BxPC-3 細胞を 1 匹あたり $1x10^6$ 個、背部に接種した。5 週間後にマウス由来細胞を採取した。

リガンド・フィッシング法; 化合物 D に結合するマウス細胞由来の分子を探索するために、磁気ビーズ（機能性ナノ磁性微粒子 FG Beads, 多摩川精機社製）に化合物 D 誘導体を結合させ、上記担癌マウス由来細胞の抽出物（ライセート）を混和し、化合物 D 誘導体に結合する分子群を釣り上げた。（図 4）

質量分析; 上記磁気ビーズ-化合物 D 誘導体に結合した分子群を電気泳動（SDS-PAGE）し、銀染色を行った後、タンパク質が検出された部分を切り出し、タンパク質を抽出後、液体クロマトグラフィー質量分析装置（LC-MS）にて質量分析を行い、タンパク質を同定した。

【結果と考察】

リガンド・フィッシング法および質量分析により、約 100 種類のタンパク質を検出した。このうち、細胞の生命活動に必須の分子群（ハウスキーピング分子）を除いた 59 分子を化合物 D の作用候補分子とした。候補分子は、質量分析による同定の際のスコアに従い、化合物 D が作用する分子として最も可能性の高い分子としてランク付けした。スコアの高い上位 10 分子に絞り解析を継続した。（表 1）現在、これらの分子について、マウス細胞中の分子の遺伝子発現抑制、および遺伝子過剰発現の細胞を作成して詳細な機能を解析中である。



今後は、本化合物を新薬として開発するために、前臨床試験および臨床試験へと進めることを目指している。そのためには詳細な、薬効（化合物Dをマウスに投与したときの癌細胞の遺伝子発現レベル・タンパク質レベルの変化、宿主のマウス免疫細胞への影響の評価など)、毒性（マウスおよびその他の動物に投与したときの臓器の変化や毒性の評価など)、代謝（動物に投与後の代謝産物や排泄の経路など）の評価を行うことが必要とされる。

表1　結合候補分子10傑

順位	分子名	分子量	スコア
1	a	82kD	675
2	b	69kD	443
3	c	69kD	441
4	d	49kD	355
5	e	40D	303
6	f	59kD	267
7	g	50kD	224
8	h	85kD	200
9	i	23kD	186
10	j	30kD	177

（分子名は非公表とさせていただきます）

【まとめ】

今回､我々が見出した癌転移抑制物質化合物Dとその誘導体について、この化合物が働く機序を明らかにすることを目的に、マウス細胞中にある化合物 Dの作用分子の探索を行った。化合物D誘導体に結合する分子の候補として59分子を同定した。現在、この結合分子の作用機序を解析中である。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。今後、新薬として開発を進めるために、動物実験にて薬効、毒性、代謝などの評価を進めて行きたい。

【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. Kanegasaki K, et al. J Immunol Methods. 282:1-11, 2003
3. Yamauchi A, et al. J Immunol Methods. 404:59-70, 2014
4. Yamauchi A, et al. BMC Cancer. 17:234, 2017
5. 山内明. 平成30年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団事業報告書研究成果報告書. 139, 2019

小胞体ストレス応答転写因子の機能不全による糖尿病発症機序の解明

川崎医科大学　薬理学教室

北風 圭介

小胞体に折り畳み不全タンパク質が蓄積すると、小胞体ストレスとなり、細胞は恒常性を保つために小胞体ストレス応答 (UPR)を活性化させる。UPR の一つである PERK-eIF2α-ATF4 経路と糖尿病発症の関連性が指摘されているが、膵β細胞における ATF4 の役割には不明であった。そこで本研究では、糖尿病発症における膵β細胞と ATF4 機能との関連を解析した。まず、膵β細胞特異的 *Atf4*KO マウス (β*Atf4*KO)と小胞体ストレス誘導性の糖尿病モデルマウス(Akita マウス)を交配した (Akita/ β*Atf4*KO)。 Akita/β*Atf4*KO マウスは、早期から血糖コントロールが悪化し、寿命が短かった。また、β細胞の減少に加え、α細胞やδ細胞が著しく増加していた。さらに、*Atf4* KO 膵β細胞株では、未分化マーカーの発現が亢進しており、これらの因子を抑制する転写因子の発現が顕著に減少していた。近年、膵β細胞は強い代謝ストレスに曝されると、脱分化およびα細胞等への再分化を起こし、糖尿病を発症することが報告されている。本研究結果より、膵β細胞の ATF4 は小胞体ストレスの緩和や脱分化の抑制に必須であり、糖尿病発症を抑制していることが示唆される。

【背景・目的】

小胞体はタンパク質の合成やカルシウム貯蔵等の機能を担う細胞内小器官であるが、さまざまな要因で小胞体に折り畳み不全タンパク質が蓄積すると小胞体ストレスが惹起される。細胞は恒常性維持のために、小胞体ストレス応答 (unfolded protein response; UPR)という一連の適応機構を活性化させて小胞体ストレスを解消するが、UPR の破綻や異常活性化は糖尿病、慢性炎症、がん等の様々な疾患の発症に寄与することが報告されている (参考文献 1)。UPR の一つである PERK-eIF2α 経路は、下流の転写因子である Activating transcription factor 4 (ATF4)の発現を誘導して、アミノ酸代謝の促進や活性酸素の軽減等に関わる遺伝子の転写を亢進させる (参考文献 2)。

これまでに、*Perk* ノックアウト (KO)マウスや eIF2α のリン酸化部位変異体マウスは膵β細胞不全により重度の糖尿病を発症することが報告されており、PERK 経路と糖尿病発症の関連性が指摘されている (参考文献 3, 4)。一方で、*Atf4* KO マウスは、通常の飼育条件では糖代謝異常を認めず、高脂肪食負荷では肥満抵抗性を示すことが報告されており、肝臓や視床下部特異的*Atf4* ノックアウトマウスの解析では ATF4 の下流因子である TRB3 や ATG5 の発現調節を介して脂肪酸合成あるいはオートファジーを亢進し、脂質代謝や糖代謝が改善することも報告されている (参考文献 5, 6, 7)。近年、糖尿病分野では GLP-1 受容体作動薬が注目されているが、2005 年から米国で臨床使用されている Exendin-4 (Exenatide)は ATF4 を活性化するとの報告もあり (参考文献 8)、ATF4 は糖尿病の治療標的としての可能性も考えられる。しかしながら、膵β細胞における ATF4 の役割には不明な点が多く残っている (図 1)。

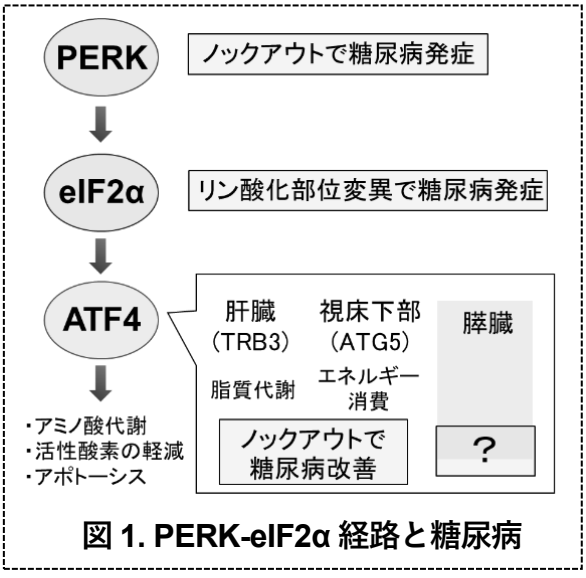


図 1. PERK-eIF2α 経路と糖尿病

そこで本研究では、糖尿病発症における膵β細胞と ATF4 機能との関連を明らかにするために、膵 β 細胞特異的 *Atf4*KO マウスおよび培養膵 β 細胞株を用いて ATF4 および下流因子の機能を解析した。

【方法】

膵 β 細胞特異的 *Atf4*KO マウス (β*Atf4*KO)は Rat insulin promoter (RIP)-Cre マウスと *Atf4* ^{flox} マウスを交配することで作製した。また、Akita マウス (*Ins2*^{C96Y}) と β*Atf4*KO を交配することで、Akita/β*Atf4*KO を作製した。血糖コントロールの解析は HbA1c およびグリコアルブミンを定量した。免疫組織化学は各マウス膵臓のパラフィン切片を作製し、インスリン (β 細胞)、グルカゴン (α 細胞)、ソマトスタチン (δ 細胞)、膵ポリペプチド (PP 細胞)陽性細胞を定量した。また、膵β細胞の生存に必須の転写因子である Pdx1 および Nkx6.1 についても定量した。

マウス膵β細胞株を用いた実験では、組み換えレンチウイルスベクターを用いた CRISPR-Cas9 系を用いて *Atf4* を KO し、ウエスタンブロットによるタンパク質発現解析ならびに定量的 PCR による mRNA 発現解析を行った。また、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを各細胞株に添加し、細胞生存率を定量することで小胞体ストレス感受性を評価した。

【結果】

まず、β*Atf4*KO マウスを解析したが、通常の飼育条件では野生型マウスと同程度の体重や血糖値であり、目立った表現型を示さなかった。そこで *Ins2* の変異が原因で強い小胞体ストレスを引き起こし、糖尿病を発症する Akita マウスと β*Atf4*KO マウスを交配した (Akita/ β*Atf4*KO マウス)。 Akita/β*Atf4*KO マウスは Akita マウスに比べ、HbA1c およびグリコアルブミンが上昇しており、血糖コントロールが悪化していることが示された。また、Akita/β*Atf4*KO マウスの寿命は顕著に短く、血中の 3-ヒドロキシ酪酸濃度が上昇していたことから、糖尿病性ケトアシドーシスを発症していることが示唆された。さらに、Akita/β*Atf4*KO マウスの膵島を免疫組織化学で解析すると、インスリン、Pdx1 あるいは Nkx6.1 陽性細胞 (β 細胞)が著しく減少していた。加えて、グルカゴン (α 細胞)、ソマトスタチン (δ 細胞)および膵ポリペプチド陽性細胞 (PP 細胞)が著しく増加することが明らかとなった。

次に、CRISPR-Cas9 系で樹立した *Atf4* KO 膵β細胞株は野生型に比べ、小胞体ストレス誘導剤を添加時の生存率が低かった。また、*Atf4* KO 膵 β 細胞株では未分化マーカーである *Oct3/4* や *Nanog* の mRNA 発現が亢進しており、KO 株にヒト *ATF4* 遺伝子を再導入することで、この発現増加はキャンセルされた (図 2)。さらに、これらの未分化マーカーの発現を抑制する転写因子の mRNA 発現が顕著に減少していることを見出した。

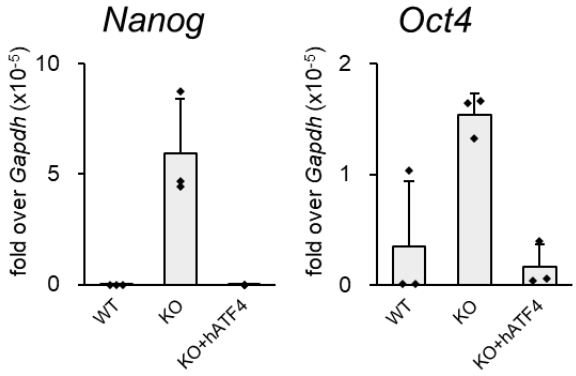


図 2. Atf4 KO β 細胞株では未分化細胞マーカーの発現が上昇していた

【考察】

これまでに *Atf4* KO マウスの糖代謝は改善することが報告されているが、今回の解析では β*Atf4*KO マウスの糖代謝が逆に悪化することを見出した。近年、膵β細胞は強い代謝ストレスに曝されると、脱分化およびα細胞等への再分化を起こし、糖尿病を発症することが報告されている (参考文献 9)。本研究結果より、膵β細胞の ATF4 は小胞体ストレスの緩和や脱分化の抑制に必須の転写因子であり、糖尿病発症を抑制していることが示唆される (図 3)。

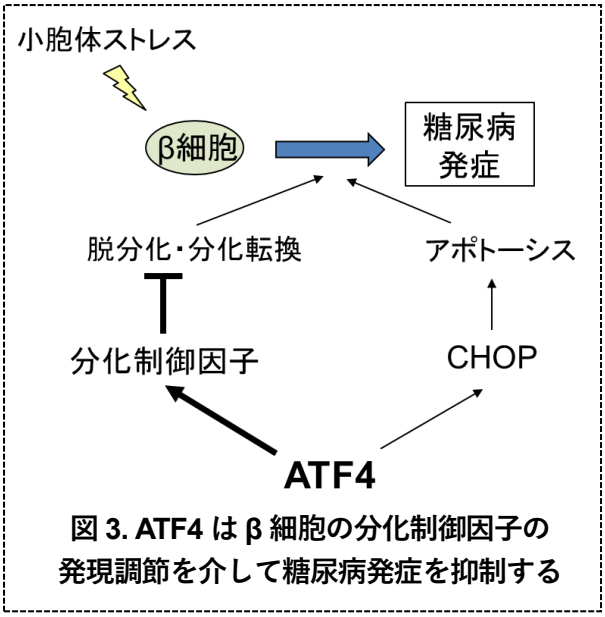


図 3. ATF4 はβ細胞の分化制御因子の発現調節を介して糖尿病発症を抑制する

【謝辞】

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

【参考文献】

(1) Hotamisligil, G. S. (2010). "Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease." Cell 140(6): 900-917.

(2) Jackson, R. J., et al. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." Nature reviews Molecular cell biology 11(2): 113-127.

(3) Harding, H. P., et al. (2001). "Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in Perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival." Molecular Cell 7(6): 1153-1163.

(4) Back, S. H., et al. (2009). "Translation attenuation through eIF2α phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in β cells." Cell metabolism 10(1): 13-26.

(5) Seo, J., et al. (2009). "Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure." Diabetes 58(11): 2565-2573.

(6) Li, K., et al. (2016). "Liver-specific Gene Inactivation of the Transcription Factor ATF4 Alleviates Alcoholic Liver Steatosis in Mice." J Biol Chem 291(35): 18536-18546.

(7) Xiao, Y., et al. (2017). "ATF4/ATG5 Signaling in Hypothalamic Proopiomelanocortin Neurons Regulates Fat Mass via Affecting Energy Expenditure." Diabetes 66(5): 1146-1158.

(8) Yusta, B., et al. (2006). "GLP-1 Receptor Activation Improves Beta Cell Function and Survival Following Induction of Endoplasmic Reticulum Stress." Cell Metab, 4 (5): 391-406.

(9) Talchai, C., et al. (2012). "Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure." Cell 150(6): 1223-1234.

脾臓の形成過程における核内受容体 NR5A1 の機能解明

川崎医科大学　解剖学教室

嶋　雄一

脾臓は、免疫系の細胞が集合した白脾髄と赤血球の処理に関与する赤碑髄で構成され、このうち赤脾髄には特殊な毛細血管である脾洞が存在する。脾洞の壁を構成する内皮細胞は杆状細胞（紡錘状内皮細胞、rod cell）と呼ばれ、隣接する杆状細胞の間には赤血球が通り抜けられるほどの隙間があるが、古くなって柔軟性を欠く赤血球や異常な赤血球は通り抜けることができず、マクロファージにより貪食される。

NR5A1 は核内受容体型の転写因子であり、副腎や生殖腺に加えて [1]、非ステロイド産生組織である脾洞の杆状細胞にも発現している。ゲノム編集により *Nr5a1* 遺伝子第 4 イントロンの小領域を欠失するマウスを作出したところ、このマウスでは脾臓が矮小化し、脾洞の発達が障害されていたことから、この領域が *Nr5a1* 遺伝子の脾臓特異的なエンハンサーであると考えられた。脾臓特異的エンハンサー欠失マウスでは、脾洞杆状内皮細胞における NR5A1 の発現が完全に消失し、杆状内皮細胞の形態に異常が生じていた。今後、杆状内皮細胞の機能異常が脾臓全体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにする必要がある。

【材料と方法】

1.　実験動物（マウス）

ゲノム編集によって作出した *Nr5a1* 遺伝子の脾臓エンハンサー欠失マウスを用いた。このマウスは *Nr5a1* 遺伝子の第 4 イントロンに存在するエンハンサー領域の上流・下流に設計したガイド RNA と Cas9 タンパクを、エレクトロポレーションによって C57BL/6 系統の受精卵に導入することにより作出された。エンハンサーヘテロ欠失マウスを対照群（コントロール）とし、エンハンサーホモ欠失マウスを解析に用いた。生後 10 週齢のオス個体を用い、1 群あたり 3 匹以上のマウスを解析した。

2.　赤血球の形態解析

心室穿刺により採取した血液を用いて塗抹標本を作成し、Giemsa 染色を行い Howell-Jolly 小体を持つ赤血球をカウントした。

3.　H&E 染色

0.1 M リン酸緩衝液（含 4%パラホルムアルデヒド）を用いて灌流固定を行い、脾臓を摘出し常法に従いパラフィンに包埋した。ミクロトームにより 5 μm の薄切標本を作成し H&E 染色を行った。

4.　蛍光免疫染色

0.1 M リン酸緩衝液（含 4%パラホルムアルデヒド）を用いて灌流固定および摘出した脾臓の浸漬固定を行い、ビブラトーム（VT1200S, Leica）で 50 μm にスライスした標本を用いて浮遊法による免疫染色を行なった。一次抗体としてラット NR5A1 抗体 [3]、ウサギラミニン抗体（Sigma-Aldrich, L9393）、二次抗体として Alexa Fluor 555 抗ラット IgG 抗体と Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG 抗体（Thermo Fisher scientific）を用い、 DAPI （4’,6-diamidino-2-phenylindole ）(Sigma-Aldrich）による核染色を行なった。染色した標本はスライドガラス上に VECTASHIELD（Vector Laboratories, Inc.）を用いて封入し、共焦点顕微鏡（Zeiss LSM700）により撮影した。また、連続撮影画像を用いて Imaris（Zeiss）による三次元再構築を行なった。

5.　走査型電子顕微鏡解析

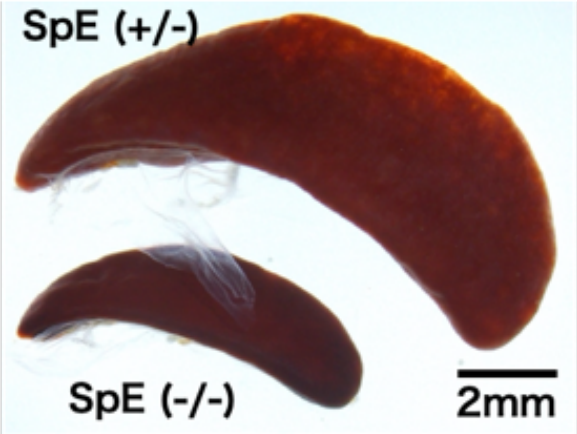
0.1 M リン酸緩衝液（含 4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド）を用いて灌流固定および摘出した脾臓の浸漬固定を行い、組織を 4 x 4 x 2 mm にトリミングした。1%四酸化オスミウムによる後固

定の後、バッファーを 50%DMSO に置換し液体窒素により凍結した。物理的な破砕後に再度固定を行い、「modified tannin-osmium method」[4]により試料を作成し、走査型電子顕微鏡（S-3400N SEM, Hitachi）により観察した。

【結果】

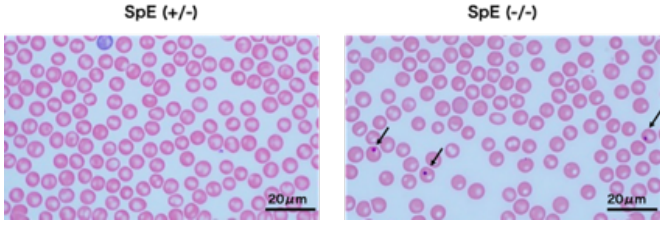
1. 脾臓の矮小化

エンハンサー欠失マウスとコントロールマウスを比較した結果、肉眼的に明らかな脾臓の矮小化が認められた（下図）。



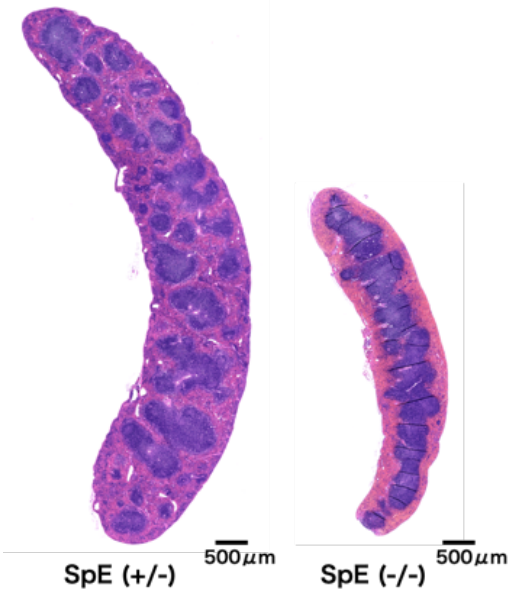
2. 異常な赤血球の増加

エンハンサー欠失マウスの血中には、Howell-Jolly 小体を持つ赤血球が増加していた（下図、矢印）。赤血球 1000 個あたりの Howell-Jolly 小体を持つ赤血球の数をカウントした結果、コントロールマウスでは 0.73±0.74（中央値 ± 標準偏差）であったのに対して、エンハンサー欠失マウスでは 5.46±0.72 と有意に数が多かった（$p = 0.0027$）。



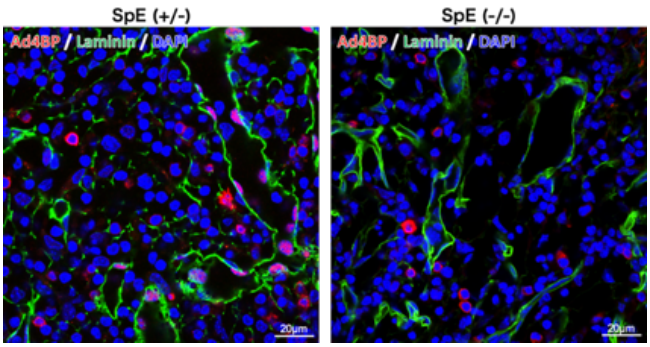
3. 白脾髄の融合

H&E 染色の結果、コントロールマウスでは脾臓全体に白脾髄が島状に点在していたが、エンハンサー欠失マウスでは白脾髄が融合して脾臓の中心に存在していた（下図）。

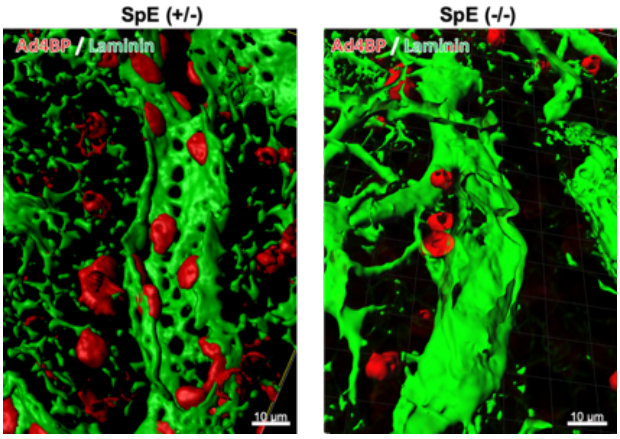


4. NR5A1 の発現消失と脾洞の低形成

ラット抗 NR5A1 抗体、ウサギ抗ラミニン抗体、および DAPI を用いた免疫染色の結果、コントロールマウスでは脾洞杆状内皮細胞の核に NR5A1 の発現が認められたが、エンハンサー欠失マウスの脾臓では NR5A1 の発現が完全に消失していた（下図）。

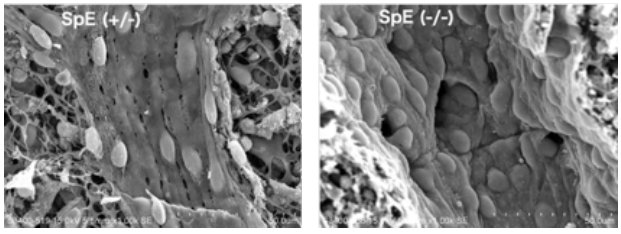


一方、抗ラミニン抗体で染色された基底膜の構造から、エンハンサー欠失マウスで脾洞の形成が不完全であることが示唆された。Z 軸方向に連続撮影した画像を用いて三次元再構築を行った結果、コントロールマウスでは基底膜に間隙が認められたのに対して、エンハンサー欠失マウスでは基底膜は連続しており間隙は全く認められなかった（下図）。



5. 杆状内皮細胞の形態異常

走査型電子顕微鏡解析の結果、コントロールマウスでは脾洞の杆状内皮細胞が規則正しく配列し、細胞間に間隙が認められたのに対して、エンハンサー欠失マウスでは杆状内皮細胞の配列の規則性が失われており、また細胞間の間隙も認められなかった（下図）。



【考察】

NR5A1 は核内受容体型の転写因子であり、副腎や生殖腺の発生に必須であることが知られている [1]。一方、本因子は脾臓の特殊な毛細血管である脾洞の杆状内皮細胞にも発現しており、*Nr5a1* 遺伝子ノックアウトマウスの解析から、杆状内皮細胞の分化に必須の因子であることが示唆されている [2]。しかしながら、*Nr5a1* 遺伝子ノックアウトマウスは副腎不全のために出生後すぐに死亡するため、成獣における NR5A1 の機能解析は不可能であった。我々は *Nr5a1* 遺伝子の組織特異的エンハンサーの探索を行い、これまでに胎仔副腎 [5]、視床下部腹内側核 [6]、下垂体ゴナドトロピン産生細胞 [3]、胎仔ライディッヒ細胞 [7]のエンハンサーをそれぞれ同定してきた。今回、*Nr5a1* 遺伝子の第 4 イントロンに脾臓特異的エンハンサーを同定し、脾臓エンハンサー欠失マウスを作出した。このマウスでは脾臓における NR5A1 の発現が完全に消失していたことから、成獣における NR5A1 の機能解析に理想的なモデルマウスであると考えられた。

エンハンサー欠失マウスでは、杆状内皮細胞の形態に異常が生じていた。杆状内皮細胞の特殊な形態維持のためには、ストレスファイバーが重要であることが報告されている [8]。したがって、NR5A1 がストレスファイバー関連因子の発現を制御している可能性が考えられ、今後の解析が必要である。一方、杆状内皮細胞の異常によって、なぜ脾臓全体が矮小化するのかは不明である。今後、杆状内皮細胞の未知の機能を明らかにすることで、この疑問に対する解答が得られるかもしれない。

【文献】

1. Luo X, Ikeda Y, Parker KL: ***Cell*** 77:481-90 (1994)
2. Morohashi K, Tsuboi-Asai H, Matsushima S, Suda M, Nakashima M, Sasano H, Hataba Y, Li CL, Fukata J, Irie J, Watanabe T, Nagura H, Li E: ***Blood*** 93:1586-94 (1999)
3. Shima Y, Zubair M, Komatsu T, Oka S, Yokoyama C, Tachibana T, Hjalt TA, Drouin J, Morohashi K: ***Mol Endocrinol*** 22:1633-46 (2008)
4. Murakami T: ***Arch Histol Jpn*** 36:189-93 (1974)
5. Zubari M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K: ***Mol Cell Biol*** 26:4111-21 (2006)
6. Shima Y, Zubair M, Ishihara S, Shinohara Y, Oka S, Kimura S, Okamoto S, Minokoshi Y, Suita S, Morohashi K: ***Mol Endocrinol*** 19:2812-23 (2005)
7. Shima Y, Miyabayashi K, Baba T, Otake H, Oka S, Zubair M, Morohashi K: ***Endocrinology*** 153:417-25 (2012)
8. Uehara K, Miyoshi M: ***Anat Rec*** 254:22-7 (1999)

活性酸素生成酵素 Nox の制御機構の破綻メカニズムの解明

川崎医科大学 生化学

宮野 佳

NADPH オキシダーゼ（NADPH oxidase）は、活性酸素の一種であるスーパーオキシド（O_2^-）や過酸化水素（H_2O_2）を生成する一群の酵素系である。Nox ファミリーの中でも、Nox1 は大腸上皮細胞に豊富に発現し、局所における感染制御に関わっている。また、粘膜損傷の修復における重要な過程である上皮細胞の遊走と Nox1 の関連が指摘されている。本研究では、(1) フリーラジカルスカベンジャーedaravone が Nox1 由来の活性酸素を効率良く消去すること、そしてこの化合物を用いて (2) Nox1 の酵素活性が自身の生成物により正のフィードバック調節を受け増強されること、(3) Nox1 活性の低下が、上皮細胞の遊走能を増加させることを見出した。これらの結果は、Nox1 活性の制御機構の維持が、消化管の局所における殺菌のみならず粘膜損傷の修復に関わる細胞の遊走に重要な役割を果たしていることを示す。

[背景]

1. Nox ファミリー

NADPH オキシダーゼ（NADPH oxidase; Nox）ファミリーは、生体防御や甲状腺ホルモンの合成、さらには細胞内シグナル伝達分子として利用される活性酸素を積極的に生成する一群の酵素系である。Nox は、ヒトでは Nox1～Nox5、Duox1 と Duox2 の 7 種類が知られている（図 1）。活性酸素の過剰な生成は、生体に害を及ぼすため、Nox の酵素活性は厳密に制御されている。この制御システムの破綻は、活性酸素の無秩序な生成を引き起こし、様々な疾患の発症に繋がる。例えば、がん化した細胞においては、Nox ファミリーが過剰に活性化されていることが知られている。

2. Nox1 の制御機構と生理的な役割の解明

Nox1 は、活性酸素の一種であるスーパーオキシド（O_2^-）を生成する酵素で、大腸上皮細胞に豊富に発現し、局所における感染制御に関わっている。また、粘膜損傷の修復における重要な過程である上皮細胞の遊走と Nox1 の関連が指摘されている。今回私は、Nox1 を発現する大腸上皮細胞株（ヒト結腸腺癌; HCT-116 細胞）における遊走能に対する活性酸素スカベンジャーの前処理の効果を検討した。実験に使用したフリーラジカルスカベンジャーedaravone は、HeLa 細胞に外来性に発現させた Nox1 由来の O_2^-や不均化されて生じる H_2O_2 を効率良く消去した。興味深いことに、Nox1 を発現する HeLa 細胞の edaravone

Noxファミリー	遺伝子座	アミノ酸数	発現の多い組織・細胞	機能の一例
Nox1	Xq22	564	大腸、血管平滑筋細胞	生体防御
Nox2	Xp21.1	570	食細胞（好中球など）	生体防御
Nox3	6q25.1–26	568	内耳、胎児腎臓	耳石形成
Nox4	11q14.2–21	578	腎臓、血管内皮細胞	シグナル伝達
Nox5	15q22.31	737	脾臓、精子、血管平滑筋	シグナル伝達
Duox1	15q21	1551	甲状腺、唾液腺、肺	生体防御
Duox2	15q21	1548	甲状腺、大腸	甲状腺ホルモン合成

図1 Noxファミリー

による前処理は、化合物の洗い出し後に生成される O_2^-量を減少させた。これは、Nox1 が生成する O_2^-が自身の酵素活性を促進していること示す。次に、edaravone で前処理した HCT-116 細胞は、未処理の細胞に比べて、リガンドの濃度勾配に従い、遊走速度が上昇することを明らかにした。以上の結果より、Nox1 活性は、自身の生成物により正のフィードバック調節を受け、増強された Nox1 由来の O_2^-は、細胞の遊走能の抑制に寄与することを示唆する。

[結果と考察]

1. Nox1 由来の活性酸素の除去

Nox1 は、特異的な細胞質タンパク質因子 Noxa1 と Noxo1 の存在下で、細胞刺激非依存性に細胞外に恒常的に O_2^-を生成する酵素である（図 2)。生成された活性酸素は、消化管の局所における殺菌において重要な役割を果たしている。一方、活性酸素は基本的に生体にとって有害である。私は、Nox1 由来の O_2^-が、Nox1 を発現している細胞自身を障害して、Nox1 活性を低下させる（フィードバック阻害）のではないかと考えた。そこで、Nox1 を発現する細胞を活性酸素スカベンジャーで前処理し、Nox1 活性に与える影響を検討した。

O_2^-は、速やかに不均化され H_2O_2 に変換される。O_2^-は、極性を持つため細胞膜を横切ることはできないが、H_2O_2 は比較的自由に細胞内へと拡散する。従って、Nox1 由来の O_2^-の細胞への影響を調べるためには、活性酸素の両者を効率良く消去できるスカベンジャーを選択する必要がある。私は、HeLa 細胞に外来性に Nox1-Noxo1-Noxa1 を発現させ、Nox1 の O_2^-生成活性を再構成した。生成される O_2^-は、化学発光法で測定した。Nox1 由来の O_2^-は、H_2O_2 消去酵素の catalase では消去できず、O_2^-の消去酵素である SOD（superoxide dismutase）で完全に消去できた。フリーラジカルスカベンジャーで、酵素系ではなく化合物である edaravone は、Nox1 由来の O_2^-を SOD と同様に消去できた（図 3 と 4)。次に、標準 H_2O_2 を消去できるかどうかを検討した。スカベンジャーの能力は、残存 H_2O_2 依存性に強まるホモバニリン酸の蛍光強度により見積もった。edaravone は、catalase と同様に H_2O_2 を完全に消去することができた。以上の結果より、edaravone は、Nox1 由来の O_2^-に対する効率的なスカベンジャーであることが分かった。

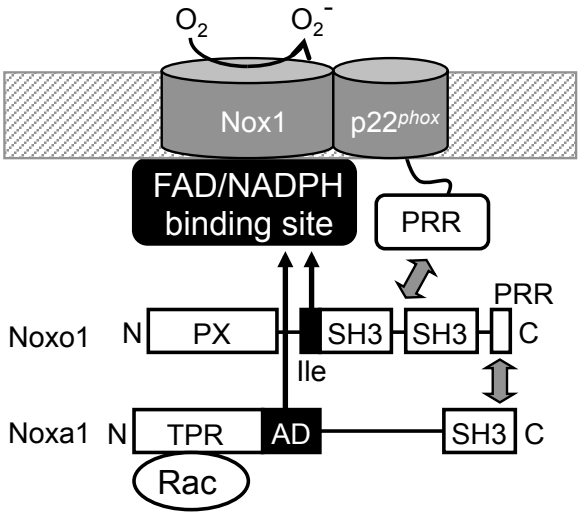


図2 Nox1の活性化

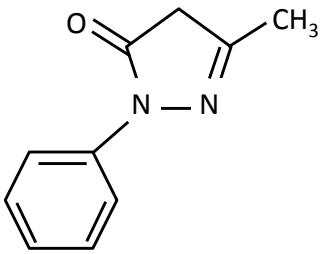


図3 edaravone

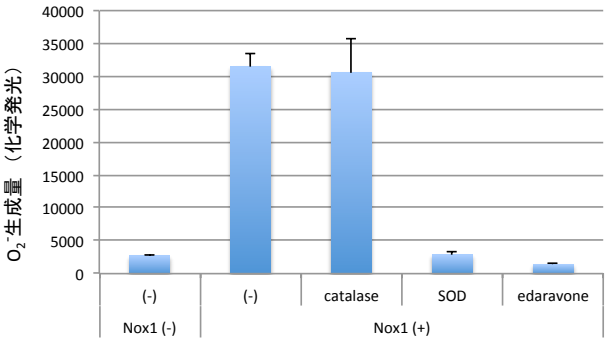


図4 スカベンジャーの評価

2. Nox1 活性の正のフィードバック調整

続いて、Nox1 を発現させた HeLa 細胞を edaravone で前処理した。Nox1-Noxa1-Noxo1 の cDNA を含むプラスミドを遺伝子導入し、24 時間後に様々な濃度の edaravone を培養液に加えた。edaravone 存在下でさらに 24 時間培養し、edaravone の洗い出しを行い、生成される O_2^-を測定した。興味深いことに、edaravone で前処理した細胞は、O_2^-の生成量が減少した。これは、Nox1 活性が、フィードバック阻害ではなく、自身の生成物により正のフィードバック調

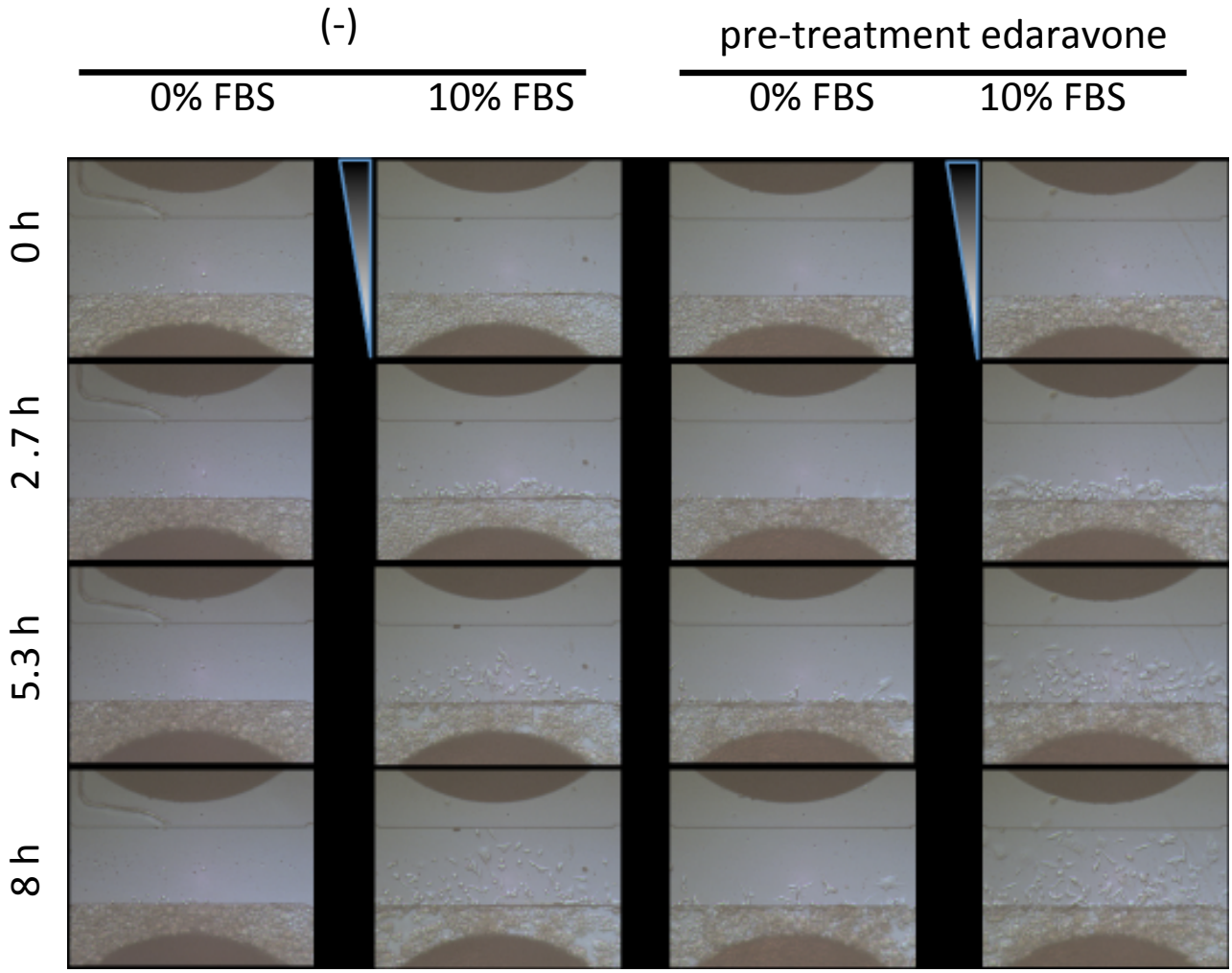
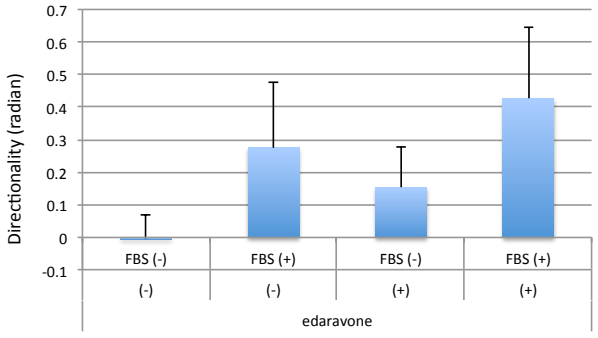


図5 TAXIScanの結果

節を受けていることを示唆する。

3. Nox1 活性と上皮細胞の遊走

edaravone の前処理により、Nox1 活性が低下したことが、上皮細胞の遊走にどのような影響を与えるかを検討した。大腸上皮細胞株として Nox1 を発現しているとこが知られるヒト結腸腺癌細胞（HCT-116 細胞）を遊走測定の実験に用いた。細胞の遊走能は、走化性因子に向かって水平方向に移動する細胞をリアルタイムで観察できる細胞動態測定装置（TAXIScan）を用いて測定した（図 5）。遊走能は、走化性因子に対する細胞遊走の“方向性”と“速度”で定義した。また、走化性因子は、10% ウシ胎児血清を用いた。edaravone 未処理の HCT-116 細胞は、



6 遊走の方向性

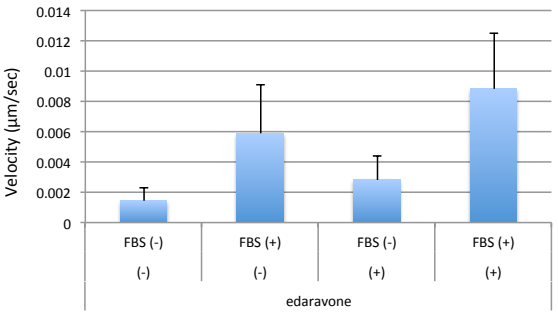


図7 遊走の速度

走化性因子の非存在下ではほとんど遊走能を示さない。一方、走化性因子が存在すると、濃度勾配に従って、遊走の方向性と速度が上昇する。興味深いことに、edaravone で前処理した細胞は、未処理の細胞に比べて、方向性と速度が共に上昇していた（図6 と 7)。この結果は、Nox1 由来の 0_2^-が、上皮細胞の遊走を抑制していることを示す。

[まとめ]

今回の研究で、(1) Nox1 活性が自身の生成物である 0_2^-により正のフィードバック調節を受けていること、(2) 正のフィードバックにより促進された Nox1 活性が上皮細胞の遊走を抑制していることが分かった (図 8)。これらの結果は、Nox1 活性のオン・オフにより粘膜損傷の修復における重要な過程である上皮細胞の遊走能を制御していることを示唆する。一方、活性酸素は基本的に生体に有害であるため、Nox1 の制御機構の破綻は、消化管上皮の疾患を引き起こす可能性がある。実際に、大腸がんの増悪と Nox1 の過剰な活性化の関連が指摘されている。今後、どのようなメカニズムで Nox1 活性が正のフィードバック調節を受けるのか、また、0_2^-がどのような分子メカニズムで遊走を制御しているかを明らかにしたい。

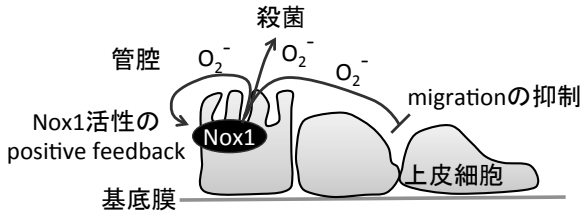


図8 Nox1の役割

[謝辞]

本研究をご支援して頂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。

ATP/P2 受容体経路による糖尿病性腎臓病の新規進展機序の解明と治療法の開発

川崎医科大学　腎臓・高血圧内科学
城所　研吾

(概要)
糸球体上皮細胞内への過剰な Ca^{2+}流入は細胞骨格の remodeling を誘導し、結果アルブミン尿が出現する。近年 Transient Receptor Potential Cation hannel(TRPC)6 や TRPC5、また ATP 感受性イオンチャネル型受容体も Podocyte の Ca^{2+}流入に重要な経路であることが報告されている。高血糖による障害血管内皮由来 ATP が Podocyte ATP 感受性イオンチャネル型受容体を介して、Podocyte 内への Ca^{2+}流入増大により Podocyte 障害を促進するとの仮説を立てこれを検証した。ヒト糸球体内皮細胞では、高血糖や NO 経路の阻害剤に上清中の ATP レベルが上昇した。この上昇は ATP 放出に関与する Pannexin1 の阻害作用を持つ Probenecid の添加により抑制された。内皮障害糖尿病モデルマウスでは有意な血漿 ATP レベルの上昇、尿中アルブミン排泄量の増加を認め、糸球体上皮細胞内の Ca^{2+}レベルの上昇も確認された。Probenecid 投与はこれらを抑制した。糖尿病性腎臓病におけるアルブミン尿の出現、糸球体上皮細胞障害進展には細胞内 Ca^{2+}濃度の増大が関与しており、内皮障害により増強されることが示唆された。

背景・目的
糖尿病は腎障害のみならず心血管病のリスクとなり、これら血管障害の基盤には血管内皮障害が存在している。我々はこの内皮機能障害に着目し、内皮細胞の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS)-一酸化窒素(Nitrogen oxide: NO)の不均衡が、早期糖尿病性腎症進展における主な要因であることを見出し、不均衡是正により腎障害進展抑制、アルブミン尿減少効果を報告している。一方で、内皮酸化ストレスの亢進が糸球体上皮細胞障害をより早期に惹起することも報告している。これらの研究結果では血管内皮障害が糸球体病変の初期病巣と強く関連することが明らかとなってきたが、実際の細胞間連関の分子メカニズムに関しては依然不明である。

糸球体上皮細胞内 Ca^{2+}濃度は、収縮、骨格維持、顆粒分泌、遺伝子翻訳やアポトーシスと深く関係する。糸球体上皮細胞内への過剰な Ca^{2+}流入は細胞骨格の remodeling を誘導し、結果アルブミン尿が出現する。近年 TRPC6 や TRPC5 などが糸球体上皮細胞内への重要な Ca^{2+}流入経路として報告されており、また ATP 感受性イオンチャネル型受容体(Purinergic receptor)である P2 受容体も、糸球体上皮細胞間の傷害伝播(Ca^{2+}伝播)に重要な役割を果たしていることが報告されている。障害内皮細胞から放出される ATP は糸球体上皮細胞上の P2 受容体を刺激し、過剰な Ca^{2+}流入を惹起することが想定される。しかし糖尿病における in vivo での糸球体上皮細胞 Ca^{2+}濃度変化と上皮障害における病因的関与や ATP/P2 受容体の病態進展における寄与についての検討はされていない。

慢性腎臓病(CKD)における糸球体障害進展過程での糸球体内皮-上皮連関の分子機序を解明し、新規治療法構築に資することを目的とする。障害内皮からの ATP 放出あるいは糸球体上皮 ATP 感受性イオンチャネル型受容体(Purinergic receptor) P2 受容体に着目し、糖尿病細小血管障害の最早期病変である血管内皮機能障害と糸球体上皮細胞障害の連関機序を解明する。具体的には、①高血糖状態下における内皮障害と細胞外 ATP 放出変化について検討する。②内皮細胞から放出される ATP により、糸球体上皮細胞内 Ca^{2+}流入増大が、上皮細胞障害、糸球体透過性制御に及ぼす影響及びその分子機序について検討する。③糸球体上皮細胞の P2 受容体阻害ないし ATP 放出制御による糖尿病性腎症進展抑制の可能性を検討する。

方法
1) 高血糖下における障害内皮細胞からの ATP 放出・産生変化と分子機序の検討
ヒト糸球体内皮細胞(hGEC)を用いて高血糖刺激(normal glucose(NG); 5mM, high glucose(HG); 30mM)による ATP 産生能・放出の変化とその機序を解析する。内皮機能障害を想定し NOS(NO 合成酵素)阻害薬 (L-NAME;500μM)、PKG 阻害薬(KT 5823; 500nM)添加群、及び ATP 放出に関与する Pannexin1 の阻害作用を持つ Probenecid(Probe.)添加群も作成する。24 時間刺激後、上清中の ATP 濃度測定を行う。

2) 糖尿病モデル動物における血漿中 ATP 濃度と糸球体細胞アポトーシス及びアルブミン尿の解析
内皮機能障害モデルとして eNOS 欠損マウス

(eNOSKO)を用い、高血糖下での糸球体障害への影響を検討する。糖尿病モデル作成にはStreptozotosin(STZ)の腹腔内投与を行い、STZ、STZ/eNOS-KO マウスを作成する。血糖上昇後 3-4 週間で血漿中 ATP 濃度、尿中アルブミン排泄を測定、TUNEL 染色により糸球体細細胞アポトーシスの評価を行う。Probenecid 投与による効果の検討も行う。

3) 内皮障害糖尿病モデルにおける生体内糸球体上皮細胞 Ca^{2+}動態の in vivo imaging による解析

Podocine-Cre マウスと、Ca^{2+}感受性蛍光タンパクである GCaMP の flox マウス(GCaMP3)を交配させ、Pod-GCaMP5 マウスを作成する。これらのマウスを内皮障害モデルマウス(eNOS-KO)と交配させることにより、eNOS-KO/Pod-GCaMP3 マウスを作成し、STZ 糖尿病モデルを作成し検討を行う。in vivo serial imaging により上皮細胞 Ca^{2+}濃度の変化を評価する。

結果

HG 群での hGEC 培養上清中における ATP の濃度は、NG 群と比較して有意に高値であった。Probenecid は HG 群の上清中 ATP レベルを有意に低下させた(表1)。L-NAME、PKG 阻害薬では高血糖状態でなくとも上清中 ATP レベルは有意に上昇していた。Probenecid 添加群では、上清中の ATP レベル上昇は PKG 阻害薬群で有意に抑制されていた (表 2)。高血糖刺激、あるいは内皮機能障害を有する糸球体内皮細胞では、ATP 放出が亢進していた。

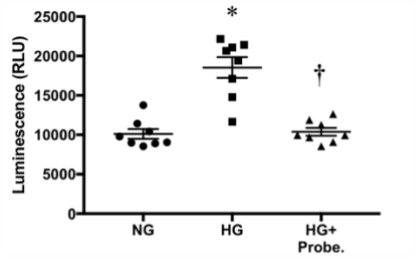


表 1 ：上清中ATPレベル
NG; normal glucose: 5mM, HG; high glicose: 30mM
Probe.; probenecid: 200μM.
＊p<0.05 vs NG, †p<0.05 vs HG

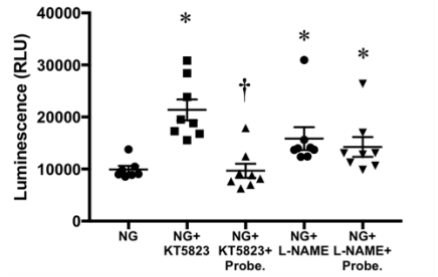


表2：上清中ATPレベル
NG; normal glucose: 5mM,
KT5823; PKG阻害薬: 500nM, L-NAME: 500μ,
Probe.; probenecid: 200μM.
＊p<0.05 vs NG, †p<0.05 vs NG+KT5823

内皮障害糖尿病(eNOS-KO/STZ)マウスでは、STZ マウスで尿中アルブミン排泄の有意な上昇を認めない時点で既に有意なアルブミン排泄の増加を認めていた（表３）。血漿中 ATP レベルも同様に他群と比較し有意な上昇を認めた（表 3）。Probenecid の投薬(100mg/kg/day)により、血漿中 ATP 濃度、尿中アルブミン排泄量は共に低下していた(表 3,4)。

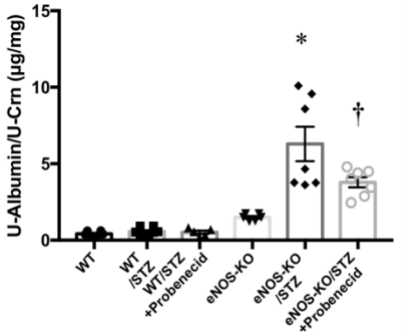


表3：尿中アルブミン排泄量
＊p<0.05 vs WT/STZ, †p<0.05 vs eNOS-KO/STZ

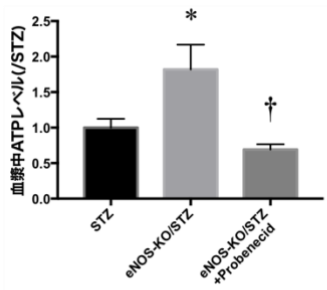
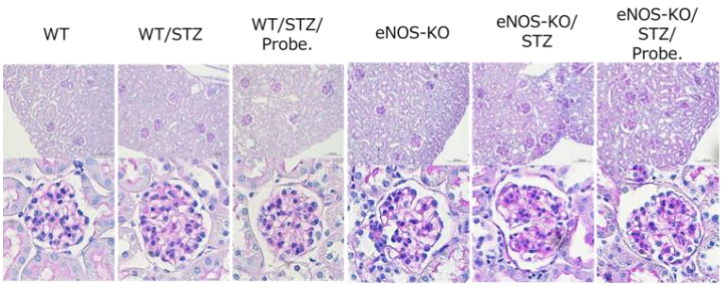


表4：血漿中ATPレベル
＊p<0.05 vs STZ, †p<0.05 vs eNOS-KO/STZ

PAS 染色による組織評価では、eNOS-KO/STZ 群において有意に glomerulosclerosis score が高かった。Probenecid 投与により改善傾向を認めた (表 5)。また TUNEL 陽性糸球体細胞数は eNOS-KO/STZ マウスにて多く観察されたが、細胞種までの同定には至らなかった (表 6)。NO bioavailability が低下した状態では血漿中 ATP レベルは高値となり、Pannexin1 阻害による ATP レベル低下とともにアルブミン尿が抑制されたことから、この両者には関連があることが強く示唆された。

糸球体上皮細胞内の Ca^{2+}濃度評価を Ca^{2+}感受性蛍光蛋白質(GCaMP5)発現マウスを用いて行なった。内皮障害糖尿病(eNOS-KO/STZ)マウスでは、control や STZ と比較して、GCaMP 蛍光強度増大が確認され、細胞内 Ca_2 濃度が上昇していることが示唆された。Probenecid 投与により、この GCaMP intensity の増強は抑制された (表 7)。上皮細胞 Ca^{2+}濃度の増大は細胞骨格のリモデリングによる foot process の精緻構造消失を惹起する。このことが大量アルブミン尿出現に関与していると考えられた。この現象は内皮障害により増強されることが示唆された。



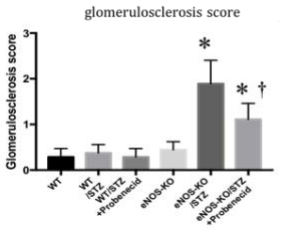


表5：PAS染色によるglomerulosclerosis score
*p<0.05 vs WT, WT/STZ, WT/STZ+Probe., eNO-KO,
†p<0.05 vs eNOS-KO/STZ

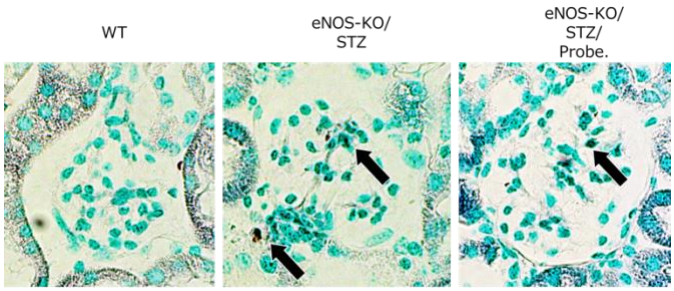


表6：TUNEL染色

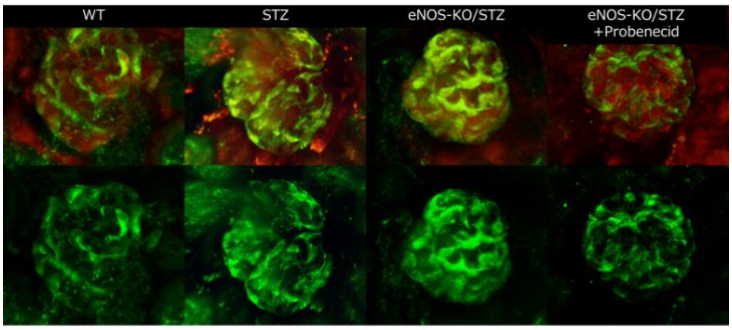


表7：GCaMP5 intensityによる糸球体上皮細胞内カルシウム濃度の比較
緑：GCaMP5, 赤：BSA-Alexa594

結論

DKD におけるアルブミン尿の出現、上皮細胞障害進展には細胞内 Ca^{2+}濃度の増大が関与しており、内皮障害により増強されることが示唆された。今後電子顕微鏡による詳細な形態学的変化の観察、macromolecule の糸球体透過性変化の評価、また遺伝学的手法による内皮 ATP 放出制御と合わせ、病態進展機序における上皮-内皮連関の因果関係をより深く検討していく必要がある。

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

（概要）
本研究は、外環境・季節変化と腸内細菌叢の変化を明らかにするため、春から夏への暑熱に対する順化時期と秋から冬の寒い時期に移行する体外環境の変化が、運動実施時における身体適応と腸内細菌変化の関連を調べ、暑熱・寒冷等のコンディショニングに関わる一資料を作成することが目的である。
一般成人男性を対象に、春から夏（5-7 月上旬）と秋から冬（10-12 月上旬）の外環境が変化する時期において、50%HRmax 強度の自転車運動を 30 分間実施し、体外環境の変化における深部体温（直腸温）の上昇度合いを調べた。安静時の心拍数と直腸温は、10-12 月上旬と比べ 5-7 月上旬において高値を示した。最終年度では一過性運動における直腸温の上昇変化に関わる腸内細菌の詳細解析を加え、体外環境変化に関連する生理学的変化と腸内細菌を調べる予定である。将来的には、アスリートのトレーニング現場における腸内環境悪化予防の対策、夏季の運動実施時の効率の良い水分摂取方法の確立など、運動時のコンディショニング対策に役立つ基礎資料として活用することを目標としている。

（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）。

また、運動処方を目的とした実践的研究において、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（河村、松生 2018）。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、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。

一方、エリートマラソン選手を対象とした腸内細菌叢の分析では、肥満者が多く保有している腸内細菌である *Firmicutes* が多く、*Bacteroidetes* が少ない傾向が示された（松生ら 2019）。マラソン選手は身体に貯蔵されたエネルギーを効率よく消費して走るために有効な腸内環境を保持しておく必要があるため、トレーニングの適応であることが示されている。体外環境やトレーニングにおける身体適応に対して腸内環境も適応する可能性が考えられる。

また、アスリートを対象としたケーススタディにおいて、高所トレーニング前後を含めた合計 4 回の腸内細菌叢を調べたところ、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が明らかになった（松生ら 2015）。さらに、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示された。これらの現場的・実践的研究の結果から、体外環境の変化と運動中の深部体温（直腸温）の上昇変化と腸内細菌との関連性を調べることにより、身体の適応状態に関連する腸内細菌を調べることで、コンディショニングに貢献できる可能性があると考えられる。

（目的）

本研究は春から夏（5 月～7 月上旬）と秋から冬（10月～12月上旬）への体外環境の変化に対する、運動実施時の深部体温の上昇変化と腸内環境（腸内細菌叢）との関連を調べ、運動処方現場やスポーツ選手のコンディショニングに活用できる資料を作成

することを目的とした。

（方法）

本研究は、初年度に川崎医療福祉大学倫理委員会の承認後（18-087）、研究に参加希望の被験者募り、実施した。被験者は、一般健康成人男性 9 名とした（年齢：23.4±3.0 歳、身長：172.0±6.5 歳、体重：73.6±12.2kg、最大酸素摂取量：41.7±5.9ml/kg/min）。

運動の種類は、自転車エルゴメータを用いたペダリング運動とし、50%HRmax 強度で 30 分間実施した。運動強度の設定は、実施前に自転車エルゴメータを用い、多段階漸増負荷法にて最大酸素摂取量を測定し、50%HRmax 強度を算出した。一過性のペダリング運動は 5-7 月上旬と 10-12 月上旬の間に各 1 回ずつ実施した。両運動とも測定実施時の室温は 20-25℃に設定し、5 分間の安静、30 分間の運動、5 分間の安静における深部体温の上昇変化を季節ごとに調べた。

測定項目は、安静時・運動中・運動後の心拍数、直腸温とした。腸内細菌の測定は、検便のキットを用いて各被験者に運動実施後に採便を依頼した。被験者から回収した便検体は、株式会社テクノスルガ・ラボに腸内細菌の分類解析を委託した。

（結果）

一過性の運動実施時の心拍数変化の平均値を図 1 に示した。心拍数は、5-7 月上旬より 10-12 月上旬の方が、安静時および運動実施時において、有意差はみられなかったが、やや高値を示した。5-7 月上旬の運動開始 5 分の心拍数の平均値は、128 拍/分、終了時には 147 拍/分であった。また 10-12 月上旬の運動開始 5 分の心拍数の平均値は、122 拍/分、終了時には 138 拍/分であった。

また、同様に一過性の運動実施時の直腸温変化を図 2 に示した。心拍数と同様に 5-7 月上旬より 10-12 月上旬の方が、安静時および運動実施時において、有意差は認められないものの、やや高値を示した。5-7 月上旬の運動開始 5 分の直腸温の平均値は、37.4℃、終了時には 37.8℃であった。また 10-12 月上旬の運動開始 5 分の直腸温の平均値は、37.1℃、終了時には 37.6℃であった。

次に、体外環境の違いが、直腸温の上昇変化に関連があるかどうかを調べるため、安静時の直腸温を 0 とした時、運動実施時にどの程度、深部体温が増加していくか、増加量Δ値として図 3 に示した。運動実施における直腸温の変化は、5-7 月上旬より 10-12 月上旬の方が、増加度合いが高くなる傾向を示し、運動開始 15 分からは有意差が認められた（$p<0.05$）。

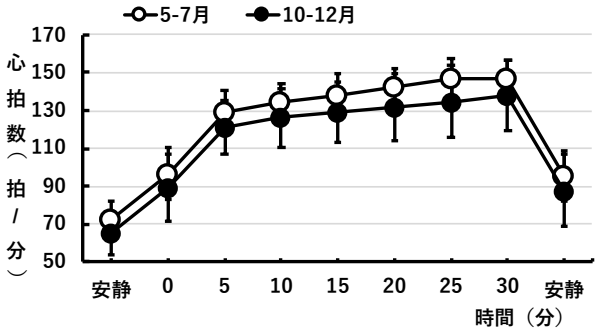


図 1．運動実施時における心拍数変化

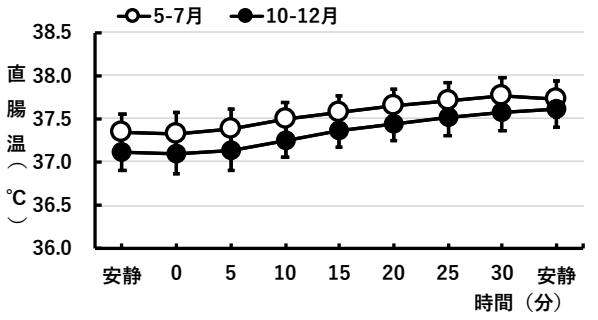


図 2．運動実施時における直腸温変化

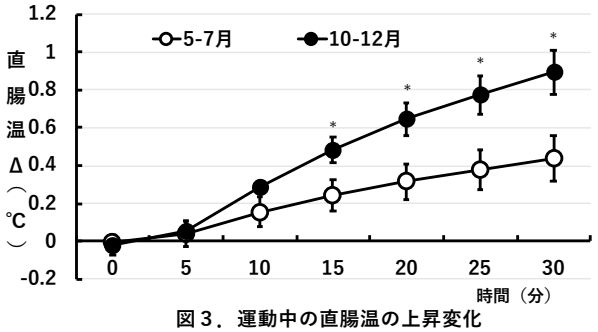


図 3．運動中の直腸温の上昇変化

（安静時の体温を0とした場合の増加を示す. *p < 0.05）

（考察）

本研究は、春から夏への暑熱への順化および、秋から冬の寒冷に移行する時期の運動実施時の身体適応と腸内環境（腸内細菌叢）の変化を調べ、運動処方現場やスポーツ選手のコンディショニングに活用できる資料を作成することを目的としている。

一過性運動時における心拍数と直腸温の変化は、有意差はないものの、5-7 月上旬の方が 10-12 月上旬よりもやや高値を示した（図１、図２）。運動は体温（直腸温）を上昇させるが、この上昇変化は温熱や寒冷環境で影響されず、運動強度に従って上昇することが古くからの研究で知られている（Nielsen et.al 1956）。本研究の一過性運動実施時における身体の適応も同様であった。安静時、運動時ともに心拍数と直腸温やや高値を示したことは、体温はおよそ 36.0-37.0℃程度に保たれているが､そのわずかな範囲内における体外環境に対する適応状態である可能性が考えられる。したがって、有意差は認められないものの、5-7 月上旬の方が 10-12 月上旬よりも若干の心拍数、直腸温がやや高い傾向として確認できた可能性が示唆される。

さらに、運動実施時における直腸温の上昇変化を確認するためΔ値で表したところ、運動開始 15 分以降において､5-7 月上旬より 10-12 月上旬の方が、増加度合いが高くなる傾向を示した（図３）。

体外環境が暑熱や寒冷に暴露された場合でも、自律神経系の機能によって体内環境の恒常性が維持されるため､体温は一定に保たれるのが一般的である。本実験の一過性運動時の測定は、室温 20-25℃と同一に設定していたものの、体外環境への順化・適応の影響によって 10-12 月上旬の直腸温の上昇度合いが高くなった。このことは、寒冷暴露にともない体温を素早く上昇しなければならないという身体の反応と同様に考えられる。したがって、同一強度の運動における深部体温の上昇変化は、心拍数と連動して自律神経系による体内の調節機構に影響されていると考えられる。

最終年度は、春から夏への暑熱環境、秋から冬への寒冷順化を鍵とし、一過性の運動実施に伴う直腸温の上昇変化と生理学的指標と併わせて、腸内細菌変化の関連を調べていく予定である。

将来的には、アスリートのトレーニング現場における腸内環境悪化予防の対策、夏季の運動実施時の効率の良い水分摂取方法の確立など、運動時のコンディショニング対策に役立つ基礎資料として活用することを目標としている。

（進捗状況）

本研究課題は３年間の継続課題で進めており、２年目の実験は滞りなく遂行できた。最終年度では、腸内細菌叢の分析結果に詳細解析を追加し、運動実施時の直腸温の上昇変化と、深部体温の上昇に関連する腸内細菌の種類を調べ、体外環境変化との関係を明確にする。

（引用文献）

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.
4. **松生香里**, 吉田升, 玉里祐太郎, 濱田大幹, 上野浩司, 小柳えり, 矢野博己, 小野寺昇. マラソン選手における腸内細菌叢の特徴とBMI の関連. 川崎医療福祉学会誌. 29(1):99-105. 2019.
5. Nielsen B, Nielsen M. Body temperature during work at different environmental **temperature**s. Acta. Physiol. Scand. 56. 120-129.1962

（謝辞）

本研究課題の実験実施にあたり、平成 31・令和元年度、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。

ロイシン代謝産物 HMB の抗炎症作用はがん細胞誘発性の炎症反応を抑制しうるか

川崎医療福祉大学　医療技術学部　臨床栄養学科

三宅　沙知

（概要）

【背景】がん患者は、過度な手術侵襲や術後合併症、化学放射線治療などにより急性的な炎症に侵される。これらが引き金となり、がん細胞そのものによる炎症反応が誘発され、全身の慢性炎症状態や悪液質に至る速度に拍車をかける。本研究では、抗炎症作用を持つとして知られるロイシン代謝産物である HMB(β-Hydroxy-β-methylbutyrate)が、がん細胞に対しても炎症反応抑制効果を発揮するか否かについて検討することを目的とした。【方法】TNFα を投与したヒト食道扁平上皮がん細胞株 TE-1 を炎症モデルとして用い、HMB を用いた場合の細胞増殖能、炎症反応、アポトーシス誘導の解析を行った。【結果】HMB による、TE-1 細胞への明らかな細胞増殖抑制効果および、アポトーシス細胞割合への影響は認められなかった。しかし、TNFα 刺激により活性化した NF-κB を制御し、IL-6 産生量を濃度依存的に減少させた。【結語】本研究は、HMB の TE-1 細胞に対する TNFα 誘発性炎症反応抑制効果を明らかにする中で、HMB は活性化した NF-κB の核内移行抑制を介して、炎症反応を抑える可能性を見出した。しかし、がん細胞への炎症反応抑制効果とアポトーシス誘導との明らかな関連性を示す結果は得られなかった。

【背景】がんの治療は著しく進歩し、がん患者の生存率向上に寄与している。しかしながら、進行がんの治療成績は、満足いくものとは言い難い。なかでも、食道がんに対する開胸開腹手術のような、侵襲度の高い手術や術後合併症により惹起されたサイトカインストームは、患者をしばしば低栄養状態に陥らせる。実際に、30～80%のがん患者において体重減少が認められ、治療開始時にはすでに栄養状態不良であることも多い（文献 1)。がん細胞によって分泌される炎症性サイトカインの関与が、治療や食事摂取不足に関係なく患者の体重を減少させることは良く知られている（文献 2)。この体重減少は、一般的に行われている栄養管理では改善が期待できない。したがって、がん患者は常に、悪液質をはじめとした栄養障害の危機にさらされているといえる。この体重減少を食い止めて、体重増加を促進する栄養成分としてエイコサペンタエン酸（EPA）が注目され、申請者らは、がん細胞を用いて EPA の細胞増殖抑制効果だけでなく、抗がん剤併用による副作用改善の可能性を明らかにしてきた（文献 3, 4)。この結果から、がん患者に対する栄養面からのアプローチは効果が期待できると思われた。加えて、体重減少に伴う骨格筋減少を食い止めることができれば、患者の QOL 向上に貢献すると考え、EPA と同様の抗炎症作用と、除脂肪量の維持効果をもつことが報告されている HMB に着目した（図 1、文献 5, 6, 7)。HMB が、がん細胞のユビキチン-プロテアソーム経路の重要な活性化因子である NF-κB を下方制御できれば、がん患者の治療への貢献が期待できると推測された。そこで本研究では、HMB が、がん細胞の炎症性サイトカイン活性化の抑制を介し、抗腫瘍効果を発揮するか否かを検証することとした。（図 2)。

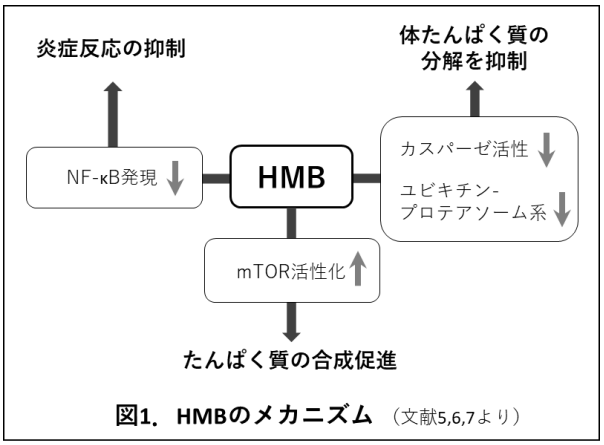


図1．HMBのメカニズム（文献5,6,7より）

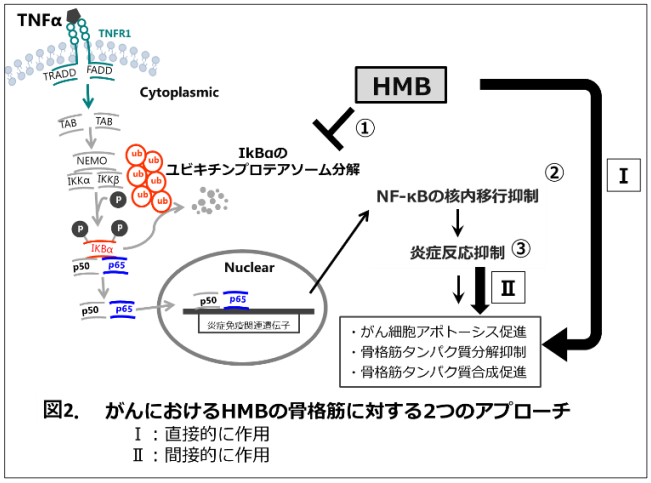


図2.　がんにおけるHMBの骨格筋に対する2つのアプローチ
Ⅰ：直接的に作用
Ⅱ：間接的に作用

【方法】

1. 材料および細胞培養

細胞は、ヒト食道上皮がん細胞株 TE-1（RIKEN BRC, Tsukuba, Ibaragi, Japan）を用いた。RPMI-1640 培地（Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA）に 10％FBS（Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan）を添加したものを通常培地とし、37℃、5%CO_2 の加湿インキュベーターで培養した。HMB（Alfa Aesar, Lancs, UK）は蒸留水に溶解後、滅菌ろ過したものを、TNFα（CST, MA, USA）は 50 ng/ml に希釈したものを用いた。

2. 細胞増殖能測定

TE-1 細胞を 96well culture plate（IWAKI, Chiba, Japan）に 2×10^4 cell/ml になるように 100 µl 播種し、24 時間培養した。翌日、0.001～1 mM になるように希釈した HMB を加え、さらに 24 時間、48 時間、72 時間培養した。WST-1（Takara, Tokyo, Japan）10 µl を各ウェルに添加し、細胞を 4 時間インキュベート後、自動マイクロプレートリーダー（Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan）により 450 と 690 nm のフィルターを用いて測定した。細胞増殖率は、HMB 0 mM を基準にして算出した。

3. NF-κB 核内移行観察

24well culture plate に φ13mm カルチャーカバーグラス（Matsunami Glass, Osaka, Japan）を敷き、TE-1 細胞を 2×10^4cell/ml になるように播種した。24 時間インキュベート後、新しい培地と TNFα または HMB（0.3、0.5 mM）を含む培地で 6 時間処理した。各細胞の固定処理を行い、試料を作成した後、免疫染色操作を行った。一次抗体には p65（D14E12, CST）、蛍光標識二次抗体には Alexa Fluor®488（CST）を用いた。核は DAPI（CST）を用いて対比染色した。Confocal Laser Scan Microscope 700（CLSM; Carl Zeiss Microscopy, Tokyo, Japan）にて観察し、画像を取得した。染色された p65 を核に持つ細胞を NF-κB 活性化を有する細胞としてカウントし、総数 500 個に対する割合を算出した。

4. サイトカイン産生量測定

TE-1 細胞を 24well culture plate に 1 ml（1×10^5 cell/ml）播種し、24 時間インキュベートしたのち、新しい培地および TNFα と 0.03～1 mM の HMB を含む培地と交換した。これを 0 時間とし、1 時間、3 時間、6 時間培養後に上清を採取し、Human IL-6 ELISA Kit（Thermo Fisher Scientific）を用い、自動マイクロプレートリーダーにより、450 nm と 570 nm のフィルターを用いて測定した。

5. アポトーシス解析

TE-1 細胞（0.3×10^6 cell/well）を 6well culture plate に播種し、24 時間インキュベート後、新しい培地および TNFα および HMB（0.3, 0.5, 1 mM）を含む培地で 24 時間処理した。細胞を回収後、Annexin-V-Alexa Fluor®647（Thermo Fisher Scientific）および 7-AAD（IMMUNOSTEP, Salamanca, Spain）で染色し、BD FACSAria™Ⅲ（Japan BD Biosciences, Tokyo, Japan）を用いて測定後、FlowJo® software Ver7.6（BD Biosciences）を用いて解析を行った。

6. 細胞形態観察

TE-1 細胞（1×10^5cell/well）を 24well culture plate に播種し、24 時間インキュベート後、新しい培地および TNFα と HMB（0.3, 0.5, 1 mM）を含む培地と交換した。さらに 24 時間培養し、倒立型電動リサーチ顕微鏡 IX83（OLIMPUS, Tokyo, Japan）を用いて位相差観察を行った。

【結果】

1. 細胞増殖能に及ぼす影響

HMB は 24 時間培養では TE-1 細胞の増殖能に影響を及ぼさなかった。しかし、48 時間培養および 72 時間培養では、HMB 濃度が 0.4 mM 以上から細胞増殖能の有意な減少を認めた（$p<0.05$, 図 3）。

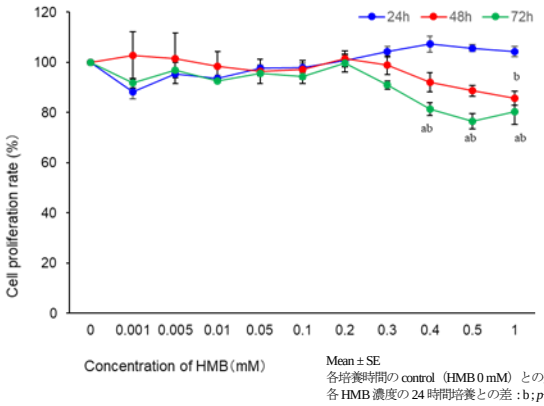
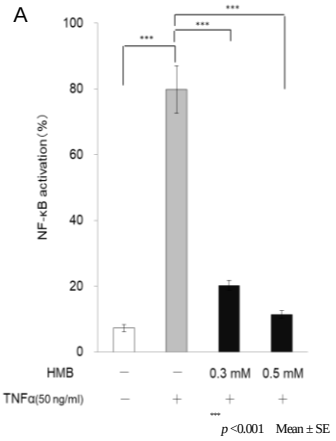


図 3. 細胞増殖能の変化

2. 炎症反応に及ぼす影響

NF-κB 活性化の割合は、control の 7.3%に比べ、TNFα 刺激を行うことで 79.8 %へと有意に増加した（p<0.001,）。さらに HMB 0.5 mM を同時添加することで、11.3%（p<0.001）へと減少していた（図 4. A, B）。さらに、HMB は、TNFα 刺激後 3、6 時間後に有意に増加した IL-6 産生を濃度依存的に抑制した（図 4. C）。



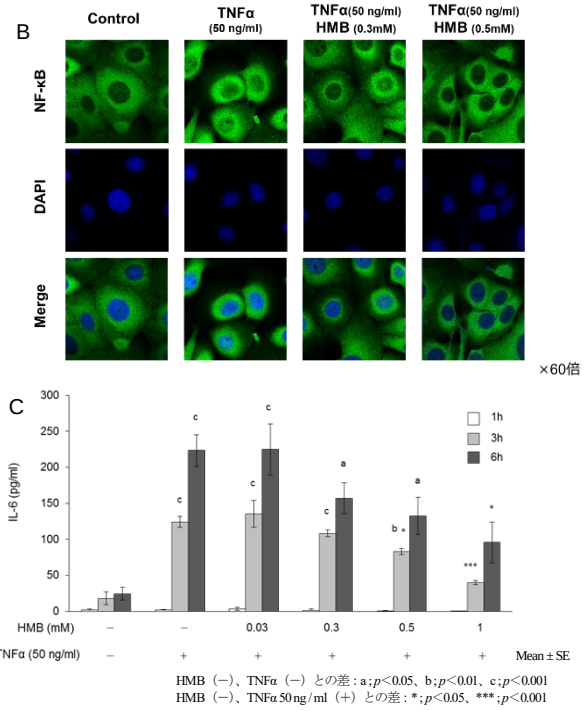


図 4. NF-κB 活性化細胞割合(A), NF-κB 核内移行蛍光観察(B), IL-6 産生量(C)

3. アポトーシス誘導および細胞形態に及ぼす影響

アポトーシス細胞の割合は control と比較し、TNFα および HMB 0.3 mM 同時添加において増加傾向がみられたが、HMB 0.5、1 mM では control と同様まで減少した（図 5. A）。また、位相差観察による細胞形態では、control、TNFα 単独刺激、TNFα と HMB（0.3、0.5、1 mM）同時添加のいずれにおいても、細胞形態への影響は観察されなかった（図 5. B）。

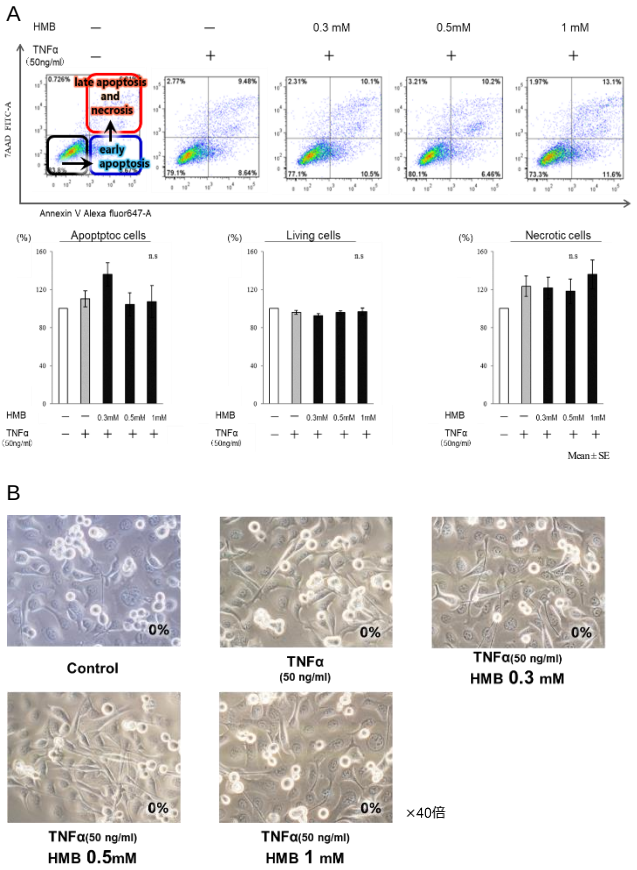


図 5. アポトーシス細胞割合の変化(A)，細胞観察による形態変化割合(B)

【考察】

本研究では、HMB ががん細胞の炎症性サイトカイン活性化の抑制を介し、抗腫瘍効果を発揮すると仮説し、検証を行った。ヒト血漿濃度に近い HMB 濃度（0.001～1 mM）による、明らかな細胞増殖抑制は認められなかったが、培養時間が 48 時間、72 時間と長くなるにつれて増殖を抑制する結果が得られた。健常者に 1 g の CaHMB を摂取させた研究では、血漿 HMB 濃度は最大で 259±24 μmol/l（約 0.3 mM）まで上昇することが報告されているが（文献 8）、HMB の効果を発揮する至適濃度は未だ明らかではない。また HMB の半減期は 2～3 時間と短く、24 時間後には摂取前と同等まで

戻るとされている。すなわち、HMB 0.3mM 前後の比較的低濃度においても、血漿濃度を長時間維持することができれば、がん細胞への増殖能抑制効果をもたらす可能性が示唆された。

さらに、細胞死シグナルを回避するために重要なタンパク質合成に関与している転写因子 NF-κB は、細胞の生存・維持に必須とされている。がん細胞の中には正常細胞と比較し、NF-κB の転写活性が異常に高いものがあり、この転写因子を標的にして阻害することでアポトーシスを誘導させる可能性があるとして、がん治療薬の開発に希望がもたれている。本結果では、TNFα を用いて NF-κB を活性させることで、ダイマーの 1 つである p65 緑色蛍光シグナルが核青色蛍光シグナルと重複して示され、NF-κB の核内移行率が増大したことを確認したが、HMB はそれを顕著に阻害した。炎症性サイトカイン産生量を検証した結果においても、同様の傾向がみられ、HMB は TNFα 刺激により惹起された IL-6 産生量を抑制した。この結果より、HMB は、細胞増殖および転移形成に関与するとされる代表的なサイトカインである IL-6 産生の抑制を介し、がん細胞増殖抑制作用をもつことが推測された。したがって、HMB は NF-κB 活性を抑制することで、炎症性サイトカインの過剰産生を制御し、アポトーシス誘導をもたらす可能性があるという仮説の検証を実施することで、がん細胞死の作用機構を明らかに出来ると考えた。

しかしながら、本結果では、細胞増殖能に明らかな影響は見受けられず、HMB 0.3 mM ではアポトーシス誘導に傾いたものの、NF-κB 活性抑制効果を最も発揮する HMB 0.5 mM ではアポトーシス抑制に向かう傾向にあり、明確な効果は観察されなかった。これまで知られている HMB の抗炎症反応については、検証濃度、細胞の種類、暴露時間に関係なく一致した見解が得られている。細胞死に対する作用に関しては、骨格筋細胞に対してのみではあるが、抗アポトーシス効果をもつと報告されている（文献9）。以上のことから、HMB は、がん細胞である TE-1 細胞において、IL-6 産生に関与する経路と細胞増殖に関与する経路に対し、それぞれ異なる経路から作用することが推察された。このように、細胞死においては、がん細胞である TE-1 細胞では HMB 独自の経路の関与が示唆されたことから、アポトーシス関連タンパク質の発現についてさらに詳細に検証を行う必要がある。しかしながら、HMB が NF-κB 活性を阻害するという点においては、がん細胞の化学放射線療法耐性および、がん患者の体内で惹起している慢性炎症を抑える可能性があり、悪液質管理に有用な一助となり得ることが示唆された。

【まとめ】

以上の結果から、HMB はがん細胞において NF-κB の核内移行抑制を介した炎症反応抑制に一定の効果を示したものの、がん細胞増殖能およびアポトーシス誘導への明らかな関連は解明できなかった。今後は、HMB の慢性炎症抑制と同時に骨格筋量を維持するといった、悪液質治療における栄養療法確立に向けた基礎的なデータを集積し、エビデンスを構築することで、臨床応用への発展に努めたい。

【謝辞】

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

【利益相反開示】

本研究に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業等はありません。

【参考文献】

1. Persson C, et al. *Clin Nutr*. 18; 71-77, 1999
2. George J, et al. *Head Neck*. 29(5); 497-507, 2007
3. H Kubota, et al. *Anticancer Res*. 33(10); 4319-4324, 2013
4. Ogo A, et al. *Ann Nutr Metab*. 71(3-4); 247-252, 2017
5. Eley HL et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293; E923-E931, 2007
6. Smith HJ, et al. *Cancer Res*. 65; 277-283, 2005
7. Nunes EA, et al. *Nutr Res*. 28; 487-493, 2008
8. Fuller JCJr, et al. *Br J Nutr*. 105(3); 367-372, 2011
9. Kornasio R, et al. *Biochim Biophys Acta*. 1793(5); 755-763, 2009.

高脂肪食性 dysbiosis に及ぼすグアーガム部分分解物摂取と運動の相補作用効果

川崎医療福祉大学　臨床栄養学科

青木　孝文

【目的】高脂肪食餌誘導性肥満モデルマウスの腸内細菌叢の悪化（dysbiosis）に対するグアーガム部分分解物（Partially Hydrolyzed Guar Gum: PHGG）摂取と運動の相補作用効果について検討した。【方法】4 週齢の C57BL/6J 雄マウス（n=48）を用い、通常食餌安静（CDC）群、高脂肪食餌安静（HFDC）群を設け、さらに HFD 条件には自発運動（HFDW）群、PHGG 摂取（GHFDC）群、自発運動と PHGG 摂取の併用（GHFDW）群を設け、計 5 群とし飼育を行った。飼育期間は 10 週間とし、食餌摂取量、体重、新鮮便 pH、最大酸素摂取量の測定、耐糖能試験および腸内細菌叢の解析を実施した。【結果および考察】10 週間の HFD 摂取に伴い、肥満が誘導され、糖代謝能の悪化、腸内環境の悪化が観察され、併用群においてその変化が軽減された。さらに、腸内細菌叢の結果において、併用群での劇的な構成変化、すなわち抗肥満に働く腸内細菌叢への変化が観察された。【結論】高脂肪食餌性誘導性肥満モデルマウスの腸内環境悪化を PHGG 摂取と運動は相補的に改善し、肥満の抑制に関与する可能性が示唆された。

【背景】

近年、高脂肪食摂取などの食習慣や不活動を含めた生活習慣の変化が腸内細菌叢の変化をもたらし、肥満や糖尿病、がんなどの生活習慣病の発症、そして重症化が誘導されると報告されている[1)]。この変化は、主にdysbiosisと呼ばれる腸内細菌叢の悪化（多様性の減少や有害菌の増加）によるとされている[2)]。メカニズムに関しては不明な点も多いが、dysbiosis状態の改善は、生活習慣病の治療や予防に寄与することが期待されている[3)]。このdysbiosisの改善策として食物繊維摂取と運動がある。食物繊維には、体重の増加抑制、大腸がんの発生抑制など健康に有益な生理作用をもつことが多くの研究から明らかとなった[4)]。すなわち、食物繊維が腸内細菌により発酵を受け産生される短鎖脂肪酸（Short chain fatty acids; SCFAs）が関与している[5)]。食物繊維の中でも近年注目されているのがグアーガムを酵素により低分子化した水溶性食物繊維であるPHGGである。特徴として、ほとんどが腸管内で発酵される高発酵性であり、他の食物繊維と比較しSCFAs産生量が多いため[6, 7)]、消化管および腸内細菌叢を介した多くの効果が期待される。一方、運動に関しては腸内細菌叢を変化させる可能性が報告されているものの、一致した腸内細菌叢の変化は見られていない[8)]。近年、Scheimanら[9)]は、乳酸をSCFAsの1つであるプロピオン酸に代謝する*Veillonella*を運動前にマウスへ投与すると、運動中に発生した乳酸を腸管においてプロピオン酸に代謝し、そのプロピオン酸を再利用することで、運動継続時間の延長が観察されたと報告した。すなわち、運動による生体内の代謝変化が腸内細菌叢に影響し、SCFAs産生を変化させる可能性があるということである。以上のように、食物繊維摂取あるいは運動単独による腸内細菌叢、さらにはSCFAs産生変化を介した報告はあるものの、食物繊維摂取による腸内細菌叢の変化が運動習慣によって促進されるのかについては明らかとなってはいない。そこで本研究では、食餌誘導性肥満モデルマウスのdysbiosisに対するPHGG摂取と運動の相補作用効果について検討することを目的とした。

【方法】

実験動物

4週齢のC57BL/6J雄マウス（n=48）を用い、まず通常食（CD）と高脂肪食（HFD）の2条件に分けた。両食餌条件共に、安静状態とするCD＋安静群（CDC）群（n=8）、HFD＋安静（HFDC）群（n=8）を設け、HFD条件にはさらに、自発運動を負荷するHFDW群（n=8）、PHGGを摂取させるGHFDC群（n=12）、自発運動とPHGG摂取を組み合わせるGHFDW群（n=12）

の合計5群とし飼育を行った。飼育期間は10週間とし、食餌および水は自由摂取とした。なお、本研究は川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：18-010）。

食餌

CDにはエネルギー比10%の脂肪食（D12450Jpx1, Research Diets, New Brunswick, NJ）を、HFDにはエネルギー比60%の脂肪食（D12492Gpx10, Research Diets, New Brunswick, NJ）をそれぞれ用いた。PHGG摂取群には、HFDに5%重量のPHGG（Sunfiber®, Taiyo Kagaku Co., Ltd, Yokkaichi, Japan）を添加したGHFD食を供した。

自発運動

自発運動群は、24時間アクセス可能な回転輪付き飼育ケージ（Natsume Seisakusho, Co., Ltd, Tokyo, Japan)にて、自発運動を行わせた。

耐糖能試験（Glucose tolerance test: GTT）

GTT は、飼育 10 週目に、$\dot{V}O_2max$ の測定から 2 日以上空けて行った。血糖値の測定は、尾静脈を剃刀でカットし得られた血液を採取し、血糖測定器（ACCU-CHEK®, Roche, Basel, Schweiz）にて行った。測定間隔は、グルコース投与前、投与後 15 分、30 分、60 分、120 分とした。グルコースの投与は、2g/kg 体重の量を 5 時間以上絶食させた状態のマウスに、イソフルラン麻酔下で腹腔より行った。得られた血糖値より、血糖曲線下面積（blood glucose area under the curves; BGAUC）を算出し検討を行った。

最大酸素摂取量（$\dot{V}O_2max$）

$\dot{V}O_2max$ は、飼育 10 週目にマウス用のトレッドミルチャンバーを質量分析器装置（ARCO-2000, ARCO SYSTEM, Inc., Chiba, Japan）に接続し、ブレス・バイ・ブレス法にて測定した。全てのマウスは、トレッドミルでの走行に慣れさせるために、測定 5～7 日前に 15～20m/min で走行練習を行った。測定は、傾斜角度を 20 度とし、5m/min で 5 分間、10m/min で 5 分間の計 10 分間のウォーミングアップの後、30 秒ごとに 1m/min ずつ速度を上げて行った。測定終了は、5 秒間以上電気ショックを受けても走れない、あるいは $\dot{V}O_2$ のレベリングオフが観察された時点とした[10]。

新鮮便pH

腸内環境の指標として、飼育6週目に新鮮便のpH測定を行った。新鮮便は、マウスの腹部あるいは臀部を優しくなで、排便を促し、1.5mlのサンプリングチューブへ直接回収した。得られた便は、2～3倍重量の超純水で希釈し、ペッセルを用い破砕した。希釈液のpHを、キャリブレーションを行ったpHメーター（twin pH B-212, HORIBA, Ltd, Kyoto, Japan）にて測定した[11]。

腸内細菌叢解析

飼育 10 週目に糞便の回収を行い、得られた糞便にて、次世代シーケンサーを用いて、16S-rRNA メタゲノミクス解析を行った。糞便から得られた 16S-rRNA の配列は、Ribosomal Database Project（RDP Release 11 Update 4 May 26, 2015）[12]にて、97%の相同性で OTUs （operational taxonomic units）に分類し、解析を行った。

試料採取

飼育終了後、イソフルラン麻酔下で、眼科静脈叢より採血を行った後、組織の採取を実施した。

統計解析

統計解析は、SPSS Statistics 23.0（IBM, Armonk, NY） を用いて行った。まず、HFD の影響を検討するために CDC と HFDC に対して Student の t 検定を行った。次に、HFD 群に対し、2 元配置分散分析を、post-hoc 解析に Bonferroni 法を用いて行った。腸内細菌叢のデータに関しては、CDC と HFDC に対して、Mann-Whitney の U 検定、HFD 群に対しては、Kruskal-Wallis 検定を行い、post-hoc 解析に Mann-Whitney の U 検定を用いた。全ての値は、平均±標準誤差で示し、統計学的有意水準は 5%未満とした。

【結果】

1. 肥満への影響

10 週間の HFD 摂取により、体重と脂肪蓄積の増加、自発運動および PHGG 摂取により、脂肪蓄積の抑制、さらに併用群では、最も抑制効果がみられ、各因子の肥満に対する影響が確認された（Fig. 1a, b）。

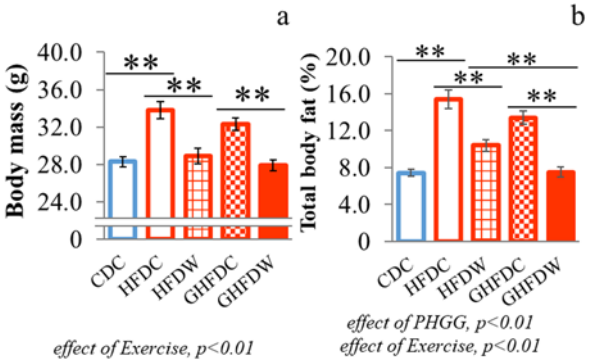


Fig. 1 The effect of PHGG and wheel running activity on body mass and total body fat in both CD and HFD mice.

Body mass (a) after 10 weeks. Total body fat (b) showed as percentage of body mass after 10 weeks. *p<0.05, **p<0.01

2. 糖代謝能への影響

一方、GTT の結果では、PHGG の効果は限定的であり、BGAUC は運動の効果のみ観察され（*effect of Exercise*, p<0.01, Fig. 2 b）、PHGG 摂取による糖代謝能の改善はみられなかった。

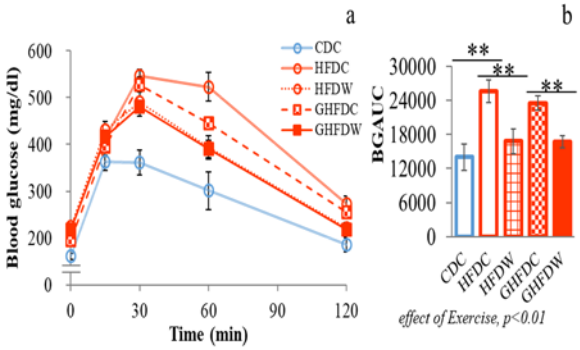


Fig. 2 The effect of PHGG and wheel running activity on blood glucose concentration and the corresponding incremental blood glucose area under the curves (BGAUC) during the GTT in both CD and HFD mice.

Time dependent blood glucose level (a) after glucose load (2mg/g body mass) into the abdominal cavity and BGAUC (b) during GTT. *p<0.05, **p<0.01

3. 筋重量および $\dot{V}O_2max$ への影響

PHGG の効果は、腓腹筋、ヒラメ筋および心臓重量において観察されず、自発運動負荷に伴う各臓器へのトレーニング効果のみが観察された（*effect of exercise*, p<0.05）。$\dot{V}O_2max$ では、併用群が最も高値であり、運動の効果だけでなく、交互作用を持つ傾向が観察された（*effect of Exercise and Interaction*, p<0.01 and p=0.060）。

4. 腸内環境への影響

腸内環境への影響では、飼育 6 週目の新鮮便 pH において、HFD 性の増加が観察された（CDC vs. HFDC, p<0.05, Fig. 3a）。この変化は自発運動および PHGG 摂取によりそれぞれ改善し、併用群で最も低値を示した（Fig. 3a）。また、盲腸重量においても、HFD 性の減少が観察された（CDC vs. HFDC, p<0.05, Fig. 3b）。この変化は、PHGG 摂取により打ち消され、運動の効果はみられなかったものの、併用群では最も高値を示した（Fig. 3b）。

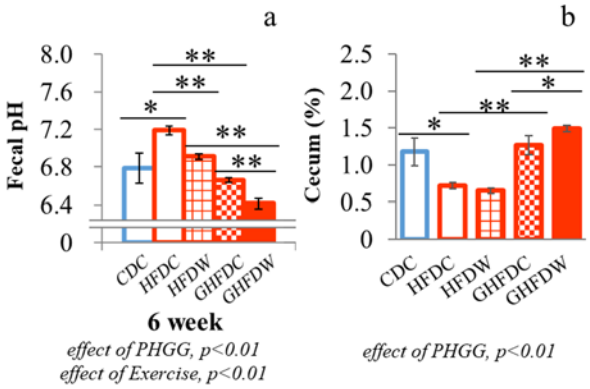


Fig. 3 The effect of PHGG and wheel running activity on fecal pH and cecum mass in both CD and HFD mice.

Fecal pH (a) at 6 weeks, and cecum mass (b) showed as percentage of body mass after 10 weeks. *p<0.05, **p<0.01

5. 腸内細菌叢への影響

現在までで解析できている腸内細菌叢の結果は、n 数は限られているものの、phylum のレベルにおいて劇的な構成変化が観察された（Fig. 4a）。菌の分類群でみると、PHGG 摂取と運動の併用群では、肥満と正の相関のある *Firmicutes* の減少、負の相関のある *Bacteroidetes* の増加、およびその比である F/B 比の減少が観察された（Fig. 4b-d）。

【考察】

本研究は、10 週間の HFD 摂取による腸内細菌叢の悪化、すなわち dysbiosys 状態が、PHGG 摂取および自発運動により改善され、肥満を抑制するという仮説を立て実施した。

10 週間の HFD 摂取により、CDC 群と比較し HFDC 群において過剰な体重増加と体脂肪の蓄積が観察され、肥満の誘導が確認できた。併せて糖代謝能の悪化、腸内環境の変化も観察された。この肥満は、PHGG 摂取および運動のいずれの刺激によっても改

善されたが、特に運動による改善が顕著であった。さらに併用を行うことで体脂肪の蓄積がより改善された。しかしながら、糖代謝能への PHGG 摂取の効果は限定的であり、自発運動においてのみ、顕著な改善効果が観察された。食物繊維が糖代謝能に影響を及ぼす因子に粘性がある [13]。粘性の高い食物繊維は、小腸における糖類の吸収を抑制し、急激な血糖上昇を抑制することで効果が発揮される。PHGG は、粘性のあるグアーガムを酵素により、低分子化、低粘度化し、発酵性が高められている。そのため、高脂肪食餌性の糖代謝の悪化を改善するまでには至らなかったと考えられる。したがって、高脂肪食餌性の肥満および糖代謝能の悪化を改善するためには、PHGG 摂取のみでは効果が乏しく、運動を組み合わせる必要がある事が示唆された。

一方、新鮮便 pH の上昇と盲腸重量の減少がみられた、腸内環境の HFD 性変化は、特に PHGG 摂取により打ち消され、運動との併用群において最も顕著な効果が観察された。腸内 pH は、腸内細菌による難消化性物質の発酵とそれに伴う SCFAs 産生の影響を受けると考えられる。pH の低下は、有害菌の増殖抑制、ペプチド分解の抑制に伴う有害物質の産生抑制、有用菌の増殖促進を引き起こし、宿主に対し多くの有益な効果をもたらすと考えられている [4,5]。PHGG 摂取群における pH の減少は、PHGG の発酵に伴い、有機酸産生が増加していることを示唆する結果である。さらに、盲腸重量の増加も、内容物の発酵が促進していることを示唆するものと考えられ、有機酸が増加した可能性を支持するものといえる。さらに併用群は、これらの変化が促進されている。少なくとも PHGG 摂取と運動を行う事で、相加的に腸内細菌叢および代謝産物に大きな影響を与えていることが推察される。実際に、現在までに解析が終了している腸内細菌叢の結果では、併用群において、劇的な構成変化が観察された。この変化は、肥満との関連が報告されている腸内細菌叢 [14] とは逆の、すなわち抗肥満様の変化であった。したがって、腸内細菌叢に及ぼす PHGG 摂取と運動の相補作用効果の可能性が示唆された。さらに、PHGG が腸内細菌に資化されることによる直接的な影響と、宿主の反応を介して腸内細菌に作用する運動の間接的な影響の組み合わせが、劇的な影響をもたらす新たな発見の可能性を示唆するものと考えられた。今後は、HFD 性の dysbiosis、および有機酸の変化に対する PHGG と運動の影響について解析を行う予定である。

10 週間の運動トレーニングの効果は、筋重量および $\dot{V}O_2max$ の増加において確認された。PHGG 摂取の影響は、安静群でみられなかったものの、$\dot{V}O_2max$ において、運動との併用群で最も高い値を示していた。SCFAs が及ぼす運動能力への影響では、腸内細菌叢由来の酢酸、あるいは運動前のプロピオン酸産生菌の摂取による運動継続時間の増加が報告されている [9, 15]。これは、酢酸やプロピオン酸が運動中のエネルギーの基質になること、あるいはプロピオン酸が刺激となり心拍数と酸素消費を増加させることが関係すると示唆されている。以上の様に、SCFAs

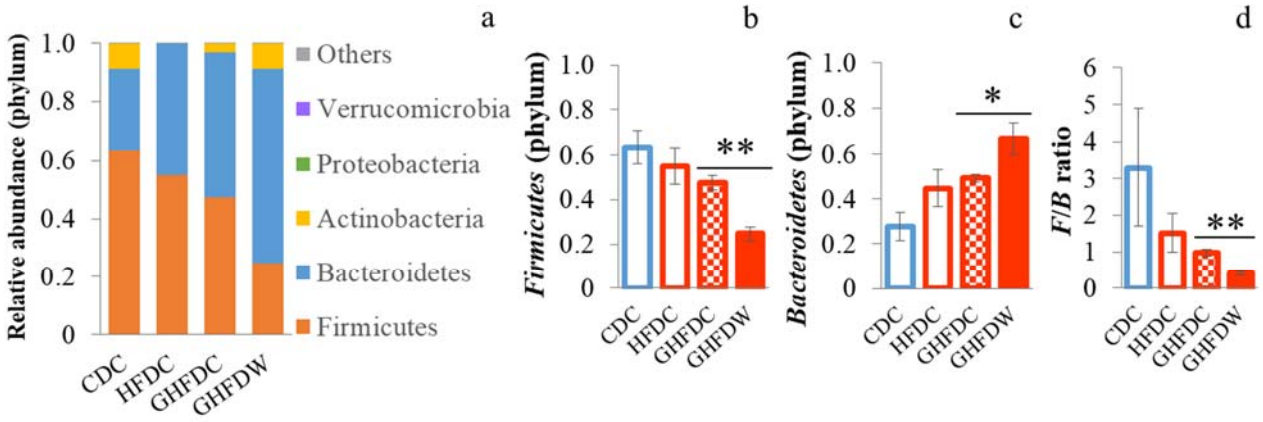


Fig. 4 The effect of PHGG and wheel running activity on gut microbiota at phylum and genus level in both CD and HFD-fed mice.

Relative abundance at phylum level (a), *Firmicutes* (b), *Bacteroidetes* (c) and *F*/*B* ratio (*Firmicutes* and *Bacteroidetes* ratio) (d) after 10 weeks. The number of samples in each group was CDC=4, HFDC=4, GHFDC=8 and GHFDW=7, respectively. *p<0.05, **p<0.01

の運動能力に対する好影響が報告されているものの、本研究においてみられた $\dot{V}O_2max$ の増加に対し、因果関係を示すデータは現在のところ得られていない。少なくとも、併用を行う事で筋重量には変化が観られず、筋機能にのみ一部好影響をもたらす可能性が推察される。今後さらなる検討が必要である。

【結論】

以上より、高脂肪食餌誘導性肥満モデルマウスの腸内環境悪化を PHGG 摂取と運動は相補的に改善し、肥満を抑制する可能性が示唆された。

【謝辞】

本研究にご協力いただいた、川崎医療福祉大学矢野博已教授、小柳えり講師、小引菜々子研究生、川崎医療福祉大学大学院　渡邉知央氏、三浦鈴夏氏、横川由佳氏に深謝する。

本研究は、令和元年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団、ならびに平成 30 年度川崎医療福祉大学医療福祉研究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) Cerda B, Perez M, et al., Gut microbiota modification: another piece in the puzzle of the benefits of physical exercise in health? *Front Physiol*. 2016, 7: 51.
2) Weiss GA & Hennet T, Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci*. 2017, 74: 2959-2977.
3) Rinninella E, Raoul P, et al., What is the healthy gut microbiota composition? a changing Ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019, 7: E14.
4) Slavin J, Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 2013, 5:1417-1435.
5) Markowiak P & Slizewska K, Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017, 9: E1021.
6) Velazquez M, Davies C, et al., Effect of oligosaccharides and fiber substitutes on short-chain fatty acid production by human faecal Microflora. *Anaerobe*. 2000, 6: 87-92.
7) Pylkas AM, Juneja LR, et al., Comparison of different fibers for in vitro production of short chain fatty acids by intestinal microflora. *J Med Food*. 2005, 8: 113-116.
8) Karl JP, Hatch AM, et al., Effects of psychological, environmental and physical stressors on the gut microbiota. *Front Microbiol*. 2018, 9: 2013.
9) Scheiman J, Luber JM, et al., Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat Med*. 2019, 25: 1104-1109.
10) Ishihara K & Taniguchi H, Fat max as an index of aerobic exercise performance in mice during uphill running. *PLoS One*. 2018, 13: e0193470.
11) Ji-Lin D, Ying-ying Z, et al., Effect of oat soluble and insoluble β-glucan on lipid metabolism and intestinal *Lactobacillus* in high-fat diet-induced obese mice. *J Food Nutr Res*. 2014, 2: 510-516.
12) Cole JR, Wang Q, et al., Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014, 42: D633-D642.
13) McRorie J W & McKeown NM, Understanding the physics of functional fibers in the gastrointestinal tract: an evidence-based approach to resolving enduring misconceptions about insoluble and soluble fiber. *J Acad Nutr Diet*. 2017, 117: 251-264.
14) Cornejo-Pareja I, Muñoz-Garach A, et al., Importance of gut microbiota in obesity. *Eur J Clin Nutr*. 2019, 72: 26-37.
15) Okamoto T, Morino K, Microbiome potentiates endurance exercise through intestinal acetate production. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019, 316: E956–E966.

老化による筋力低下に対するステロイド類の影響の行動学的解析

川崎医療短期大学　医療介護福祉科

平口　鉄太郎

近年，アンチエイジングなどの名目でステロイドを含むサプリメントが一般的にみられるようになった．代謝向上させる 7-oxoprasteron も含めその効果や副作用は不明な点も多い．成長後の老化現象は，ヒトだけではなく昆虫においても筋組織の白色化や，威嚇や逃避といった行動の発現頻度が低下する形で観察される．しかし，本研究の実験からコオロギでは，7-oxoprasteron の経口投与により僅かに増加する傾向がみられた．さらに，生存期間は延長した。このことは，昆虫においてもステロイドが老化個体の代謝の活性化に役立つことを示唆する。

１．緒言

高齢化が急速に進行する我が国において老化と健康寿命に関する問題は，医療・福祉の分野において喫緊の課題である．このようなことから近年，虚弱の状態（フレイル）の予防が提唱されている。高齢者であっても，筋力が維持されている場合，活動性は維持され生活の質の向上が期待できる。しかし，筋力の衰えなどの基礎的研究はいまだ数少ないのが現状である．

虚弱状態になる理由に一つにメタボリックシンドロームが挙げられている。加齢による代謝の低下と体重の増加による運動能力の低下が虚弱を引き起こす一因と考えられている。虚弱の手前の前虚弱（プレフレイル）の段階においてこれを阻止することが可能になれば，自立した生活を維持できる。自立した生活に必要なのは高齢になったのちの筋力の維持であり、運動であると考えられている。

近年，運動力の維持と向上が名目の様々な栄養補助食品が出てきている。その多くにはアミノ酸が主体となり，若齢者の筋力維持を目的としている。一方肪燃焼と代謝向上を促進する成分の一つとしてステロイドの一種である 7-oxoprasteron(以後 7-keto)を含有するものがある。これは，プレホルモンの一種である Dehydroepiandrosterone の代謝産物である．性ホルモンに変化しないため、代謝促進の目的で栄養補助食品の成分の一つとして活用されている。

昆虫の成長段階でも、ホルモンが作用し体の成長や脱皮や蛹化が起こることが分かっている。そのうち脱皮を促進するエクダイソン(Ecdysone)は、ステロイドホルモンである。

フタホシコオロギを含むコオロギ類はエコロケーションの研究に多用されている生物であり，振動感覚器の研究は以前より多数存在する（Cricket Behavior and Neurobiology, Huber *et . al* , Cornell Univ.Press,1989）．コオロギは、約８週間で成長したのち成虫脱皮後，約３週間で身体の機能が低下する。この過程でヒトと同様に次第に筋力は低下し、跳躍の頻度は減少する。また，雄の雌に対する求愛は減少する。

しかし近年，直翅目昆虫でエクジソン等のステロイドホルモンとの関連性を問うた論文はほとんどない．

研究代表者は，これまで成熟個体における行動解発の要因を追及してきた．この追求の過程で，加齢などの時間的要因が深く関与している行動の存在することを観察してきた．その上で，これまで得られた知見をもとに老化過程における体の変化を行動学的手段によって解析できるものと考えた．

２．材料と方法

実験動物には，フタホシコオロギ（*Gryllus bimaculatus*）を用いた．飼育には人工飼料と水を与え，環境の明暗サイクルは，L：D＝12:12 とした．8 週間の飼育後，成虫化後の個体を収集し集団飼育を行った．成虫化後 21 日経た個体に 7-keto acetate を米粉に混入したものを人工飼料に加え，経口投与した．

7-keto acetate 投与個体を用いて，機械刺激に対する逃避行動をデジタルカメラ（OLYMPUS　TG4）により高速撮影記録し歩容解析した．　7-keto acetate 投与個体群と対照群を継続飼育し、経口投与後 2 日目からの生存率を調査した。筋力は，前肢の脚力を電子天秤で計測して算出した．

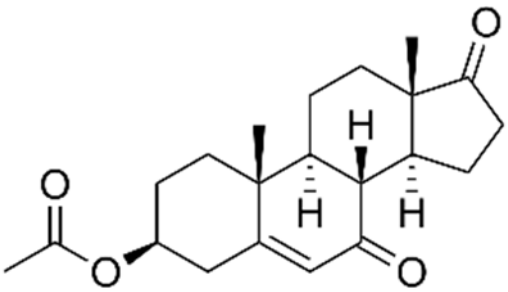


図１：7-keto acetate

３．結果

成虫化直後の個体と 21 日経過後の個体では胸部の筋肉で顕著な差異がみられた（図２）。成虫化直後では，筋は太く収縮力は強かったが，21 日後には筋は細くなり白色化していた。この状態になると，胸部の筋肉も強縮させられないので，雄は前翅を強くこすり合わせることができず，雌に対して求愛行動ができなくなる．



図２：左）若齢成虫，右）老齢成虫の胸部筋肉　加齢に伴い筋が細くなり，白化している．

また，生存率を調べると，7-keto を経口投与した個体群（N=20）では 28 日経過時点で 33.3%の個体が生存したが

対照群では，0%であった（図 3）．雄では求愛行動が観察され，雌では産卵行動が維持されていた．産卵された卵は 7 日後に孵化した．

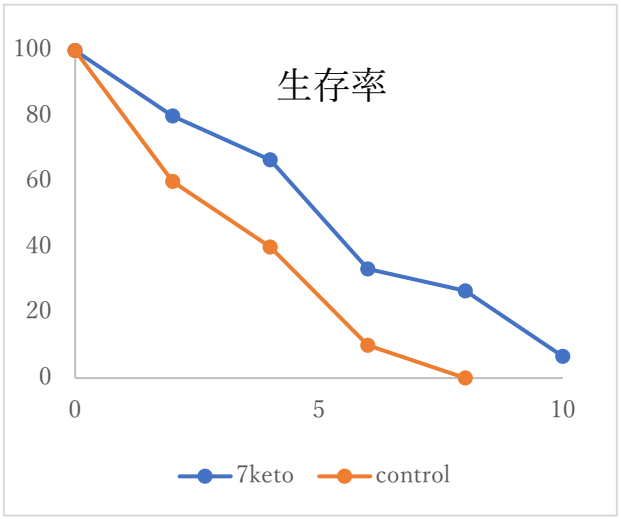


図３：7-keto 投与群と米粉投与（対照）群の生存率

図４に 21 日令個体の歩容の一例を示す．機械刺激に対する逃避，または回避行動では，肢が動きにくく若齢個体のような対側の前・中・後肢が同期運動するトライポッド歩行パターンが明瞭に観察されなかった．つまり，左右の肢のタイミン 0.2－0.3 秒と短く，接地時間が伸びている．

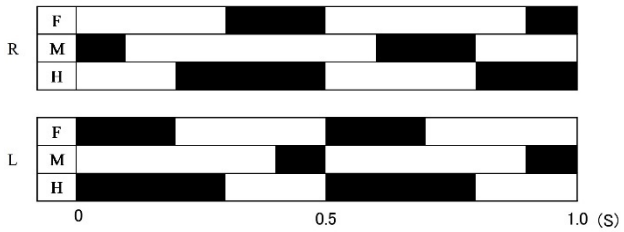


図４：21 日令の歩容　R:右　L：左　F：前肢　M:中肢　H:後肢　黒：接地時間を示す．

運動力の基本となる脚力と体重の値を表 1 に示す．成虫化後 21 日経過した時点で体重には顕著な差異はない．しかし脚力では，成虫化直後で 0.0015 N，21 日後には 0.00058 N と約 2.7 倍の差が現れた．

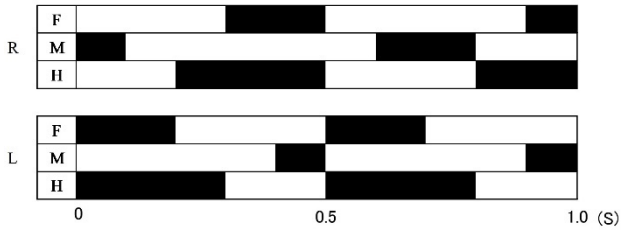


表１：成虫化後の日齢と体重，前肢の脚力を示す

４．考察

生物の寿命には長短がある．寿命が 180 日ほどのコオロギと約 100 年生存可能なヒトを端的に比較することは困難である．今回の研究では老化は，ヒトだけではなく寿命の短いコオロギでも起こりうることを調べてきた．

歩行や飛翔といったコオロギ特有の運動パターンを惹起するに不可欠な胸部の筋は，21 日間で顕著に衰退していることが解剖の結果から明らかである．このことは，表１に示した体重の数値と矛盾するように見えるが，コオロギの体内では成虫化後に日齢とともに精巣，卵巣が発達し，代わりに筋肉は収縮していくため全体重への影響は比較的小さいと考えられる．以前に著者は若齢成虫で逃避行動について解析しているが，刺激直後に反応が現れ跳躍によって逃避した[(1)]．しかし，本研究で用いた成虫化後 21 日の個体では筋肉は衰退しているため前肢の脚力は著しく低下しており，これが歩行の際に体を持ち上げたり，体を前方に移動させる推進力の低下を引き起こすと考えられる．また，後肢の脚力は歩容から読み取れるが接地時間が長いことから推進力としては大きな役割は果たしていない．このような個体にヒトでは代謝活性を高めるとされる 7-oxoprasterone を経口投与すると活発に活動し，オスはメスに求愛し雌は孵化可能な卵を産み続ける（data not shown）ことから身体機能の劣化を妨げていると考えられた．このことは，図３に示した 7-keto 投与群と対照群の生存率からも明らかである．本来，全個体が死滅している成虫化後 28 日目の時点で 1/4 の個体が生存していたことは，7-keto がコオロギのような短命な生物に対する効果を示すものである．

今後，7-keto の運動量に対する影響を調査する必要がある．

参考文献

1. Hiraguchi T, Yamaguchi T and Takahata M: Mechanoreceptors involved in the hindwing-evoked escape behaviour in cricket, *Gryllus bimaculatus*. Journal of Experimental Biology 206: pp523-534 (2003)
2. Hiraguchi T and Yamagauchi T: Escape behavior in response to mechanical stimulation of hindwing in cricket, *Gryllus bimaculatus*, Journal of Insect Physiology 46: pp1331-1340 (2000)

謝辞

本研究を遂行するにあたり助成を賜りましたウエスコ学術振興財団に深くお礼申し上げます．

気候変動と土砂災害対策法制の課題～広島地域を事例として

山陽学園大学地域マネジメント学部

准教授　澤俊晴

（概要）地球温暖化による降雨の極端化等により、土砂災害の発生増加が政府のドクトリンでは懸念されている。その内容の適否はともかく、行政学の知見によれば、ドクトリンの内容が法制度に転化すると想定されている。そのため、本稿では、まず、地球温暖化と土砂災害対策に係るドクトリンを整理する。その上で、現行の土砂災害対策法制、とりわけ最も歴史の古い砂防法に着目して、その機能を分析し、暴露度の低減などに失敗している可能性があることを明らかにする準備作業を行う。

1　はじめに

1973 年、日本気象協会が発行する雑誌「気象」に、気象庁の「近年の世界の天候について」という小論が載った。そこでは、「1940 年代ごろからは顕著な寒冷化の傾向が現われている。この寒冷化の傾向は、平均的にみると、現在もつづいており、その傾向がとどまったことを示す資料は、いまのところ得られていない」と述べていた。1970 年代には、温暖な時期は 1940 年代に終わり、現在は間氷期の半ばを過ぎたところで、これから氷期に向かう、つまり、寒冷化が進行するとの考えが強かった。ところがそれから 50 年近くが経過した現代では、寒冷化ではなく温暖化が問題視されている。温暖化か寒冷化かについて判断する能力を筆者は有しないが、現時点では、温暖化派が大勢を占めているようである。

本研究は、地球温暖化そのものを検討するものではなく、地球温暖化に対応した土砂災害対策に係るドクトリン（政策原則）の内容とそれが政策（法制度）にどのように転化されるのかという点に着目し、議論をしていくための事前準備を行うものである。

なお、ここでいうドクトリン（政策原則）とは、「「政策」の背後にある、いわばもっともらしい「理論」」のことであり（牧原出『行政改革と調整のシステム』東京大学出版会 2009 年 19 頁・20 頁）、学術論文に代表される「理論」とは似て非なるものである。

学術論文などで科学的知見や公共的課題が明らかにされると、それが直ちに政策つまり法制度に転化されると考えるのではなく、政府の審議会などによる答申や報告書、つまりドクトリン（政策原則）を介して（変換あるいは翻訳されて）、政策（法制度）が立案されると想定する。

土砂災害対策に話を戻すと、土砂の移動現象や土砂災害の発生原因、降雨との関係、土砂災害の発生と気候的要因、土壌的要因、地形的要因、人為的要因との関係や、土砂災害の発生予測といった土木工学などでの研究が、そのまま政策に採用されるのではない。それらの研究を基にしつつ、政府に設置された御用学者などで構成される審議会が、外部（政治家や省庁）からの影響を受けつつ作成する答申や報告書が、法制度の設計に反映されると考える。そのため、土砂災害対策法制を研究するに当たっては、審議会などの答申や報告書を広くサーベイする必要がある。最初に地球温暖化対策に係るドクトリン（政策原則）を確認する。

2　地球温暖化対策ドクトリン

地球温暖化と近い言葉に気候変動がある。地球温暖化対策の推進に関する法律（平成 10 年法律第 117 号。以下「温暖化対策法」という。）では「人の活動に伴って発生する温室効果ガスが大気中の温室効果ガスの濃度を増加させることにより、地球全体として、地表、大気及び海水の温度が追加的に上昇する現象」（2 条 1 項）が「地球温暖化」とされ、気候変動適応法（平成 30 年法律第 50 号）1 条は、地球温暖化を含む気候の変動を「気候変動」と定義付けており、法律上、地球温暖化は気候変動に包含されている。

地球温暖化は、経済活動、生態系、自然災害、水

資源、健康、国民生活など様々な分野に影響を及ぼすことが予想されているが、以下では、自然災害のうち土砂災害、更にその中でも、降雨によるものに限定して検討していく。

なお、ドクトリン（政策原則）として政府が公表する報告書等には様々なものがあるが、本報告では、紙幅の関係から主に直近のものを取り上げる。

まず、地球温暖化に関するドクトリン(政策原則)として、現在最も影響力があるのはIPCC（気候変動に関する政府間パネル）の報告書である。IPCC の2014 年の第 5 次評価報告書では、「気候システムの温暖化には疑う余地がなく、また1950 年代以降、観測された変化の多くは数十年から数千年間にわたり前例のないものである。大気と海洋は温暖化し、雪氷の量は減少し、海面水位は上昇している」とされ、複数の将来予測のうち、2100 年における温室効果ガス排出量の最大排出量に相当するシナリオであるRCP8.5 シナリオ(1986～2005 年に比べて平均 3.7 度の気温上昇) によれば、「多くの中緯度の湿潤地域では年平均降水量が増加する可能性が高」く、「中緯度の陸域の大部分と湿潤な熱帯域において、極端な降水がより強く、より頻繁となる可能性が非常に高い」とされている（『気候変動 2014 統合報告書政策決定者向け要約』翻訳文部科学省・経済産業省・気象庁・環境省)。

また、2019 年の特別報告書では、「沿岸域のコミュニティは、熱帯低気圧、極端な海面水位の上昇及び洪水、海洋熱波、海氷の消失及び永久凍土の融解を含む、複数の気候に関連するハザードに曝露されている（確信度が高い)。」とされている（「変化する気候下での海洋・雪氷圏に関する IPCC 特別報告書政策決定者向け要約の概要」環境省仮訳(速報版))。

このように、IPCC によれば、地球温暖化は疑いなく速度を上げて進行しており、それにより中緯度の湿潤地域（日本の大部分がこの地域に含まれる。）では、年平均降水量が増大し、かつ、極端化すると考えられている。つまり、これまで経験したことのないような集中豪雨などの異常気象が増大し、そのことが、今後、土砂災害の主な「誘因」である「降雨」に大きな変化を生じさせることを意味している。

次に、環境省・文部科学省・農林水産省・気象庁が共同で 2018 年 2 月に公表した『気候変動の観測・予測及び影響評価統合レポート 2018～日本の気候変動とその影響～』(以下「統合レポート」という。)を取り上げる。この統合レポートが、現時点での日本政府のドクトリンを集大成したものと言ってよい。

統合レポートによれば、「日本の年平均気温も世界の年平均気温と同様、変動を繰り返しながら上昇しており、長期的には 100 年あたり 1.19° C の割合で上昇している（信頼度水準 99%で統計的に有意)」、「1980 年代後半から急速に気温が上昇した。顕著な高温を記録した年は、概ね 1990 年代以降に集中している。これは世界の平均気温と同様に、温室効果ガスの増加に伴う地球温暖化の影響に、数年～数十年程度で繰り返される自然変動が重なって現れているためと考えられる」とされている。また、IPCC の「RCP8.5 シナリオを用いた予測では、日本の 21 世紀末における 1 時間降水量 30㎜ 以上の短時間強雨（バケツをひっくり返したように降る雨）及び 1 時間降水量 50㎜ 以上の短時間強雨（滝のように降る雨）の発生回数は、全ての地域及び季節で有意に増加すると予測されている」とし、大雨については、「4 つの RCP シナリオを用いた予測では、日本の 21 世紀末における大雨による降水量は全国的に増加し、RCP2.6 シナリオで約 10%、RCP8.5 シナリオでは約 25%増加する可能性があると予測されている」としている。土砂災害については、「総降雨量の大きい豪雨や数時間続く高降雨強度の豪雨の発生頻度に増加傾向が見られ、このような豪雨による土砂災害の激甚化が予想され」、「今後、総降雨量の大きな降雨頻度の増大により深層崩壊が増える」、「広範囲に同時多発する表層崩壊・土石流の発生頻度の増加も予想される」とされている。

つまり、豪雨の発生頻度の増加により、表層崩壊や土石流の発生が増加するとともに、深層崩壊が増加すると予想されている。

以上のことから、現在の政府ドクトリンは、地球温暖化が進むことを認めた上で、土砂災害の主な「誘因」となる降雨について、今後も気温上昇が続くことにより、豪雨の頻発化・激甚化が進むと想定して

いることになる。

３　地球温暖化対策の法制度

現在、地球温暖化に対する主な法制度は二つある。一つは緩和策を中心とした温暖化対策法であり、もう一つは適応策を謳う気候変動適応法である。

温暖化対策法の目的は、温室効果ガスの排出抑制にある。具体的には、国が定める地球温暖化対策計画と、それに即した地方公共団体実行計画の策定、更に一定事項について事業者に報告義務を課し、それを公開することで、温室効果ガスを相当程度多く排出する特定排出者に対する排出抑制へのインセンティブ効果を狙っている。なお、報告義務違反に対しては、罰則も設けられている。

温暖化対策法は、平成 10 年の制定以来、何度か改正が行われている。もともとは平成 4 年にリオ・デ・ジャネイロで開催された地球サミットで採択された気候変動に関する国際連合枠組条約を受けて制定されたものであるが、平成 9 年に採択され平成 17 年に発効した京都議定書の国内担保法として位置付けるための改正が行われ、更に平成 28 年に発効したパリ協定に対応した改正も行われている。

次に、気候変動適応法は、気候変動の影響による被害を防止・軽減する適応策を法的に位置付けるものとして定められており、実際、この法律の意義はそれに尽きる。具体的な内容は、これまで閣議決定で定められていた気候変動適応に関する計画の法定化と、気候変動影響や気候変動適応に関する情報の提供などであり、規制的な規定はなく、強制力もない理念的な法律に過ぎない。さらに、気候変動適応法は、温暖化対策法と異なり、パリ協定の国内担保法とも位置付けられていない。

温暖化対策法も気候変動適応法も、基本となる枠組みは政府及び地方公共団体による計画策定と各種施策の推進であるが、温暖化対策法ではその実効性確保が図られているが、気候変動適応法にはそれがない。

しかし、土砂災害との関係では、適応策を規定している気候変動適応法が重要となる。具体的には、同法に基づいて策定された政府の気候変動適応計画が、土砂災害に対する適応策として何を取り上げているのかということである。

気候変動適応計画（平成 30 年 11 月 27 日閣議決定）では、「土砂災害に関する適応の基本的な施策」として３頁にわたって記述されているが、分量的には他の分野に比べて手薄である。しかも、その内容は、基本的にこれまでの取組の延長線上であり、さほど見るべきものはない。

次に、気候変動適応法では地方公共団体に対しても地域気候変動適応計画の策定を求めているが、努力義務とされていることから、中国地方では、広島市と下関市の策定にとどまっている（2019 年末時点）。このうち、広島市の計画は、既存の温暖化対策法に基づく計画を気候変動適応法に基づく計画として位置付け直したものとなっており、計画名称も「広島市地球温暖化対策実行計画」とされている。その中で、土砂災害に対する適応策ついては、「本市では、都市化や高度経済成長による急激な人口増加と宅地需要の高まりに伴って、デルタ部郊外の丘陵部を中心に、かつて山林等であった場所に戸建て住宅が立ち並ぶ住宅団地が数多く開発されてきました。短時間強雨の増加によって、こうした住宅団地における、土砂災害による被害のリスクが高まっています」との認識が示されている。

しかし、具体的な対策は、従来の「急傾斜地崩壊防止対策」、「土砂災害防止対策」という言葉を掲げるにとどまっている。

４　広島県の土砂災害

広島県では、平成 30 年 7 月豪雨により県内で土石流・崖崩れが 1,242 箇所発生し、犠牲者 126 名、行方不明者 5 名、負傷者 146 名の甚大な人的被害を出した。その４年前の平成 26 年 8 月豪雨でも、広島市内の各所で土石流・崖崩れが発生し、犠牲者 77 名、負傷者 68 名の人的被害を出している。さらに、平成 11 年 6 月豪雨では、土石流等災害が 139 箇所、崖崩れ災害が 186 箇所発生し、死者 31 名、行方不明者 1 名の人的被害が出ている（広島県ホームページ「土砂災害ポータルひろしま・過去の主な土砂災害」令和元年 11 月 15 日閲覧）。

また、これらの豪雨による被災地は、かなり近接している。例えば、平成 26 年 8 月豪雨で土石流や崖

崩れが発生した広島市安佐北区可部東と広島市安佐南区八木とは、直線距離で５㎞程度しか離れていない。しかし、斜面の向きは安佐北区可部東が北西であるのに対し、安佐南区八木は南東となっている。



平成 26 年 8 月豪雨被災地（広島市安佐北区可部東二丁目）2019 年 10 月 4 日撮影



平成 26 年 8 月豪雨被災地（広島市安佐南区八木三丁目）2019 年 10 月 13 日撮影

５　土砂災害対策

土砂災害を考えるに当たっては、素因・誘因・ハザード・脆弱性・暴露度に整理することが有用である。素因とは、その場所が有している潜在的な土石流や崖崩れの発生のしやすさであり、誘因とは、外力として素因に働き、土石流や崖崩れを発生させる力（降雨など）である。ハザードとは、物理現象としての土石流や崖崩れの発生そのものであり、脆弱性とは、ハザードに対する社会の抵抗力で、例えば砂防ダムや流路工が整備されていれば脆弱性が低く、そうでなければ脆弱性が高いということになる。

そして、土石流や崖崩れといったハザードの発生と、それに対する抵抗力の低さ（脆弱性の高さ）によって生じるのが、生命、身体又は財産の侵害、建築物の損壊、経済活動の中断などの経済的損失の発生＝「災害」ということになる。つまり、土石流が山奥の誰もいないところで発生しても「災害」にはならないが、都市近郊などで発生して人命や建築物などに被害が生じた場合は「災害」となる。防災対策としては、「ハザード」と「脆弱性」のいずれの対策を優先するのか、それぞれの対策にどのようなものがあり、その費用対効果はどうか、といったことを検討していく必要がある。

最後に重要なのが、「暴露度」である。「暴露」とは、土石流や崖崩れによって被害を受ける可能性のある場所に、人が住み公共施設などが存在しているということであり、大まかにいえば、人口密集地は暴露度が大で、過疎地は小となる。そのため、被災の可能性がある土地での暴露度をいかに小さくするかが今後問われる政策課題となる。

６　土砂災害対策ドクトリン

土砂災害対策に関連したドクトリン（政策原則）についても、紙幅の関係から主に近年のものを取り上げる。『日本における気候変動による影響に関する評価報告書』（平成 27 年 3 月中央環境審議会・気候変動影響評価等小委員会）によれば、「土砂災害の増加については概ね一致した見解が示されている」とした上で、次のような「変化が予測される」としている。

①観測史上最大となるような極めて激しい強度の降雨が増えることで、集中的な崩壊、崖崩れ、土石流等が頻発し、山地や斜面周辺地域の社会生活に与える影響が増大する、②同時多発の土石流等が発生することなどで、土砂移動現象の規模が計画を上回り、砂防施設等のハード対策の効果が相対的に低下し、被害範囲が拡大する、③強雨の降り始めから短時間で災害が発生することで、警戒避難のためのリードタイムが十分確保できず、ソフト対策の効果が相対的に低下し、人的被害が増大する、④累積雨量の大きな降雨が増えることで、深層崩壊等の大規模現象が増加し、直接的及び間接的（天然ダムの形成などによる）影響が長期化する、⑤現象が大規模化することなどで、これまで把握されている土砂災害危険箇所等以外での発生も含め、被害が拡大する、などである。

つまり、素因に変化はないが、誘因が大きく変化（豪雨や猛烈な台風の増加）することで、ハザードが増大（頻発・大規模化・深層崩壊の増加）し、それにもかかわらず、脆弱性も暴露度も現状のままであれば、被害が大きくなると予想されている。

また、大規模広域豪雨を踏まえた水災害対策のあり方について、平成30年8月30日付けで国土交通省が社会資本整備審議会長に諮問しているが、その答申では、「気候変動等による豪雨の増加傾向は顕在化しており、平成30年7月豪雨においても「地球温暖化に伴う水蒸気量の増加」が寄与したとされている。今後、ますます影響が増大することが予測されており、豪雨の頻発化・激甚化が懸念される」との認識の下、緊急的に実施すべき対策として、「土砂災害警戒区域の早期指定」、「減災のためのハード対策の実施」といった取組が掲げられている。また、そのほかに「気候変動等による豪雨の増加や広域災害に対応する取組」の一環として、「災害リスクの現地表示」や「災害リスクへの配慮の推進」として、土砂災害リスク情報を現地に表示する取組や、防災部局と都市部局の連携強化、住宅等を購入・改築する際の土地の災害リスクの把握や、災害リスクを軽減・回避する努力を促すための不動産関連業界や保険業界等との連携強化が掲げられている。

このように、政府のドクトリンでは、気候変動等による豪雨の頻発化・激甚化を前提として、従来のソフト対策・ハード対策のほかに、そもそも危険な土地に住まない、住ませない方向への取組の頭出しがなされている。ただし、その頭出しは、「連携強化」という表現に示されているように、かなり抑制的である。

7　土砂災害対策の法制度

土砂災害対策を目的とした法律には、主なものとして、砂防法（明治30年法律第29号）、地すべり等防止法（昭和33年法律第30号。以下「地すべり法」という。）、「急傾斜地の崩壊による災害の防止に関する法律（昭和44年法律第57号。以下「急傾斜地法」という。）、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（平成12年法律第57号。以下「土砂災害防止法」という。）がある。このうち、砂防法、地すべり法、急傾斜地法が「素因」（災害発生の原因となる土地）に着目して、防災工事や指定した区域での行為規制を行うことにより「ハザード」の発生を防ぐとともに「脆弱性」をカバーする対策（例えば、砂防ダムによる「ハザード」の抑制と流路工による「脆弱性」の低減）に主眼を置いているのに対して、土砂災害防止法は、被害が発生する地域に対する警戒避難体制の構築や建築物の構造規制、開発行為の規制、住家の移転など「脆弱性」だけでなく「暴露度」にも着目した対策を講じるものとなっている。

つまり、土砂災害防止法の制定までは、砂防ダムなどによる「ハザード」を抑制する対策と、流路工などによる「脆弱性」をカバーする対策が採用されてきたのに対し、土砂災害防止法では、被害が発生する地域に対する警戒避難体制の構築や建築物の構造規制、開発行為の規制など「脆弱性」に対する対策が強化されている。

なお、これらの法制度では、一定の土地を指定し、その指定地内での有害行為を規制するといった仕組みが取られているが、それらの権限者を整理すると次のようになっており、この権限者の不統一の及ぼす影響については、今後検討を進めていく。

	指定		管理（許可等）	
	大臣	知事	大臣	知事
砂防法	○			○
地すべり法	○			○
急傾斜地法		○		○
土砂災害防止法		○		○

8　広島・岡山地域の人口移動

広島県及び岡山県では、高度成長期に急激に中山間地から沿岸部へ人口が移動している。中山間地と沿岸部の面積比は、前者が56.2%（面積8758.70㎢）、後者が43.8%（6828.22㎢）である。国勢調査人口の推移を示すと、次のようになる。

	S35	S50	H2	H17	H27
中山間地	870,105	675,431	646,325	580,807	515,201
	22.6%	15.1%	13.5%	12.0%	10.8%
沿岸部	2,982,752	3,785,198	4,129,399	4,253,099	4,250,314
	77.4%	84.9%	86.5%	88.0%	89.2%

沿岸部人口は、高度経済成長期の昭和35年から平成27年にかけて、約298万人から約425万人へと120万人以上増加し、その人口増加圧力により、宅地開発等が進んでいる。

9　砂防指定地の指定

土砂災害対策に係る法律のうち、ここでは紙幅の関係から砂防法を取り上げる。高度成長期以降、広島県・岡山県では中山間地から沿岸部への大規模な

人口移動と人口増加が生じ、それにより沿岸部では宅地開発が促進された。例えば、広島市には、平成25年3月31日時点で開発が完了している住宅団地が169団地あり、そのうち124団地（73.4%）は昭和59年以前に開発されている（広島市住宅団地活性化研究会第1回研究会平成25年5月29日資料）。

広島市の最北にある安佐北区可部地域は、もともと安佐郡可部町であり、平成47年に広島市に編入合併された地域である。太田川とその支流の根谷川が合流し、国道54号線（かつての可部街道）と国道191号線が分岐し、JR可部線という都市近郊路線もあり、更に広島市西区の横川と可部との間では日本で初めて国産乗合バスが運行されるなど交通の要衝であり、広島市北部の中心地である。

地形的には、島根県や広島県北部の中山間地から高低差が約80mある上根峠を下ってすぐが可部地域となる。このため、高度成長期には、島根県や広島県北部からの人口移動の受け皿、あるいは広島市中心部のベッドタウンとして多数の住宅団地が造成された。平成26年8月豪雨災害では、その中の一つである新建団地で死者3名を含む被害を出している。ここでは、その新建団地から真南に1km弱離れている可部東亜ハイツ団地を取り上げる。昭和41年の航空写真では、開発前のこの地区は山林と田畑が広がり、若干の家屋が点在する標高50mから100mにかけての緩い傾斜地となっており、その傾斜地を過ぎると等高線が狭まり、地区の中心にある渓流の上原川を遡ること1.8kmで標高が700mを超える。そのような地区で、開発面積14.6haの住宅団地が造成され、昭和52年に完成し、平成24年9月時点で1,388人が住んでいる。

この上原川は、昭和35年4月13日、建設省告示第876号により砂防指定地に指定されている。砂防指定地の指定は、「治水上砂防」のために行われる。この「治水上砂防」の意味については、「具体的に何を意味するかを明確にした法制定当時における資料の存在は確認されない」（栗島明康「砂防法制定の経緯及び意義について」砂防学会誌66巻5号2014年85頁）が、ひとまず砂防指定地を「土砂等の生産、流送若しくは堆積により、渓流、河川若しくはその流域（以下「渓流等」という。）にいちじるしい被害を及ぼす区域」（国土交通省「砂防指定地指定要綱」第2）と解するならば、砂防指定地における住宅団地開発は、よほどの安全が確保されない限り、認められないと考えられる。

ところが、この地区では、住宅団地開発が終わって7年を経過した昭和59年3月30日になって、建設省告示第797号により、住宅団地造成地の上流域で砂防指定地の追加指定が行われている。前述した砂防指定地の指定の意図を踏まえると、この追加指定の意味するところについても検討する必要がある。実際、近年、減災まちづくりなどの取組では、こういった指定地が重要な意味を持っている。



砂防指定地内河川上原川

10　おわりに代えて

可部東亜ハイツ団地の65歳以上人口率（高齢化率）は33.5%であり、しかも、平成14年と平成24年を比較すると、この10年間で居住者が1割以上減少している。つまり、この団地では、団地開発時の若い夫婦と子どもという年齢構成が時代とともに高齢化し、さらに急激な人口減少が始まっている。

こういった地域に対する適応策として何が考えられるであろうか。その検討に当たっては、地球温暖化に対する適応策という狭い目的から土砂災害対策を取り上げるだけでなく、広く、土地の有効活用、住民の福祉の向上という観点からも検討を行っていく必要があると考えられる。

なぜなら、この問題は、砂防指定地などの区域「指定」の問題、住宅政策の問題、都市計画の問題など様々な問題と関連しているからである。今後は、更に深掘りしつつ、これらの点についても研究を進めていきたい。　**（以上）**

ダウン症児における発話技法および言語理解促進に関する研究

山陽学園大学

上地玲子

障がい児においては，口腔機能低下と様々な発達の遅れが指摘され，知的障がい児は，その口腔筋力の低下から，知的能能力やコミュニケーション能力がさらに低下することが危惧されている。音韻的な情報の保持については問題を有し，視覚機能に問題を抱えているケースも多く，文字を獲得することや文字を読んで発話を獲得することにも大きな困難を抱えていると考えられる。

そこで，本研究では，視覚における困難さを改善する取り組みとして実績のあるビジョントレーニングによる眼球運動をすることにより，図形，文字言語が正確に模写することができるようになるかを課題とし，模写もしくは形を正確に読み取ることは文字の内容，意味を理解する力へとつながっていくのかどうか検証した。

その結果，目と手の協応運動においては向上していることが見受けられたが，実施回数等の問題もあり大きな変化を得ることはできなかった。今後は，保護者による子どもの指導力を向上させ，持続することが必要であると考えられる。

はじめに

障がい児においては，口腔機能低下と様々な発達の遅れが指摘され，知的障がい児は，その口腔筋力の低下から，知的能力の低下やコミュニケーション能力のさらなる低下を来たす悪循環を呈する(Figure1)。

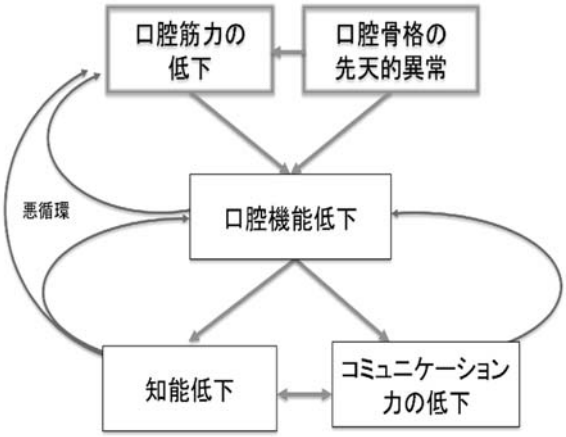


Figure1. 障がい児における口腔機能低下が及ぼす悪循環

中でも，ダウン症児は日常的に口腔開口状態なっており，そのほとんどに発語や構音障がい等々，さまざまな問題を抱えているケースが多い(水上ら,2015)。そのため発語が不明瞭となりコミュニケーション力の低下要因となっている。コミュニケーションを獲得するためには，正しい発音，発語を獲得することが必要であり，適切な音節，単語，発音を理解することは発語のために重要な要素である。

上地ら(2018)は，ダウン症児を対象に口唇閉鎖力を高めるために口輪筋をトレーニングする器具を用いて指導した結果,1 日 3 回以上実施した児は,QOL 向上が期待できることを見出した。しかし，発音の明瞭さを向上させる要因については，詳細を調べていない。

石田(1999)は，知的発達や言語発達について，発話明瞭度が特に落ちているダウン症児の指導で，単音節の構音を獲得させてから単語に移行させる指導では効果が上がらなかったが，構音練習の際に，文字や記号を同時に提示し，単語を構成している音節数や個々の音節へ注目させるようにしたところ，単音節の構音の明瞭度，さらには発語の明瞭度があがることを経験していると述べている。また，井上ら(2012)は, 文字を読むことに困難を抱える子どもは，単語全体として認識する能力の発達の障がいと、音韻意識の障がいの二点が強く影響していることを明らかにした。

一方，斎藤(2002)は，ダウン症児の言語発達における指導研究を調べた結果，ダウン症児者の語彙は高い生活年齢の影響をうけて発達するが，質的に構造を再構築しなければならない構文には遅れが出現し,文法形態素などの省略や誤りが改善しないと指摘している。この問題については, 菅野ら(2003)は，ダウン症候群に関しては，作動記憶のなかでも音韻

ループに問題があることを指摘している。また，湯澤(2011)も同様の指摘をしており，ダウン症は視覚機能に問題を抱えているケースも多く，文字を獲得することや文字を読んで発話を獲得することにも大きな困難を抱えていると考えられる。

そこで，本研究では，視覚における困難さを改善する取り組みとして実績のあるビジョントレーニングによる眼球運動をすることにより，図形，文字言語が正確に模写することができるようになるかを課題とし，模写もしくは形を正確に読み取ることは文字の内容，意味を理解する力へとつながっていくのかどうか検証する。

ビジョントレーニング(Vision training)とは眼球のコントロール能力，焦点合わせ機能，両目の協調機能，動体視力，立体視能力，奥行き認識能力，認知による表象機能などを向上させるトレーニングの総称である。ビジョントレーニングは読み書きの苦手な子どもの視覚機能(ものを見る力)の発達を促すために役立てられている(飯島ら,2019)。

倫理的配慮については，対象者(保護者および本人)に研究の目的，主旨を口頭および書類にて説明し調査は自由意志による参加とした。また研究者が所属する大学の倫理審査委員会の審査・承諾を得て実施した。

方法

対象：ダウン症児(8 歳～16 歳)男子 2 名，女子 6 名
内容：専門家によるビジョントレーニングの指導を行い，トレーニングに即したアプリケーションを含んだ ICT 機器を対象者へ貸し出す。対象児は，保護者の監督の下でトレーニングに取り組んでもらう。アプリケーション動作時間に制限は設けない。
読み書き理解アセスメント： URAWSSⅡ(小中学生の読み書き理解アセスメントテスト)を行った。

結果

ビジョントレーニング指導者の体調問題があり，当初予定していた通りの実施ができなくなったため，予定より実施日をずらして実施した(Figure2-5)。しかし，その後，新型コロナ感染症の問題が発生し，研究計画遂行に支障が出てきたため，実施後の検査対象者を限定して行うこととなった。

URAWSSⅡ検査 1 回目は集団で実施し，Table1 のような結果となった。2 回目は，新型コロナの影響で 2 名しか実施できず，個別実施で行った。実施できた 2 名(ID：4,7)の比較した表は Table2 である。

また，書字については，第 1 回目と第 2 回目のそれぞれの比較を行った。その結果，2 回目の文字の形成のほうが正しく記入できている割合が向上していた。

考察

1 回目の検査実施については，2 回目のビジョントレーニング実施直後に行ったものであるが，おおむね発達状況を反映しているものと考えられる。

知的障がいを伴うダウン症児にとっては，検査時における気分によっても差が大きく影響してしまうことが考えられる。

2 回目については，A 児(11 歳，女児)においては，3 か月間自宅で 1 日 1 回程度 ipad を用いたトレーニングを実施した結果，ID4 番の女児においては書ける文字が増えていた。しかし，大きな変化がみられるほどではなかったため，実施回数を増やしたり，取り組み内容について定期的に専門家から指導を受ける対応が必要であると考えられる。

文字を書くことについては，刺激文を模写するものであるが，1 回目よりも 2 回目の方が文字の形成も丁寧であり，判読可能の割合も増加しているため，目と手の供応作業が向上したことが推測できる(Figure6-7)。

今後の予定

当初計画では，対象者全員に専門家の研修を定期的に受けさせ，子どもへの指導スキルを上げるとともに，専門家からも直接子どもへ指導してもらう予定であった。遠隔指導も難しく，計画通りには実施できなくなったが，各家庭でのビジョントレーニングの実施については継続して行っていた。遠隔指導を工夫する必要がある。

ビジョントレーニングを実施する際，姿勢保持の

状況や集中しやすい環境を整えるために視覚遮蔽をするなどの工夫がどのような影響を与えるのかも検証する必要がある。

ビジョントレーニングがダウン症の発話技法を向上させることについて，まだ明確なエビデンスが得られないため，今後さらに詳しく研究を進めていく必要がある。

引用文献・参考文献

福永 奈穂子・佐藤 愼二(2016).通常学級における平仮名の読みにつまずきのある児童への指導について：低学年を対象にしたアセスメントシートの作成と活用を通して 17,81-89.

井手友美・上地玲子・玉井　浩(2019). ダウン症児のロケア，ダウン症療育研究，12，52-54.

飯島博之・小野 淳・斎藤富由起・北出勝也・竹本晴香・吉田梨乃・江南健志(2019).学校におけるビジョントレーニングの実践と可能性―発達支援とスポーツビジョントレーニング―.日本教育心理学会総会発表論文集 61,26-27.

井上知洋・東原文子・岡崎慎治・前川久男(2012).読み困難児におけるひらがな読字能力と音韻処理能力の関連性の検討―音読潜時と発話時間から―.特殊教育学研究 49(5),435-444.

石田宏代(1999).ダウン症児の発語の明瞭さと音韻意識との関連 36(5),17-23.

上地玲子（2013). ダウン症児を育てる親が利用する社会資源に関する検討 山陽論叢，20，37-48.

上地玲子(2016). ダウン症児の学習効果を高める学習机と椅子の開発，山陽論叢，23，37-47.

上地玲子(2017). 学習机と椅子が発達障害児の着座姿勢と学習活動に及ぼす影響について，山陽論叢，24，17-26.

上地玲子・玉井　浩，井手友美(2018). 口輪筋トレーニングと発達促進, 脳と発達, 50(2), 121-124.

北出勝也(2015). 発達の気になる子の　学習・運動が楽しくなる　ビジョントレーニング（発達障害を考える・心をつなぐ). ナツメ社.

菅野和恵・山根律子(2003).言語発達の障害と作動記憶.特殊教育学研究 41(1),45-52.

前田真理子・小島道生(2019).日本のダウン症児者の平仮名の読み書きに関する研究の成果と課題－海外の先行研究との比較を通して－ 43(1),149-162.

水上美樹・田村文誉・松山美和・菊谷 武(2015).ダウン症候群児の粗大運動能と摂食に関わる口腔異常習癖との関連.日本障害者歯科学会雑誌 36(1),17-24.

定藤容志枝・高杉実奈・石堂圭子・大田尚子・田淵雅美・仁科静江・八木智子・森木陽子・森下晶子・小林朱美・藪木あず沙・岡﨑晴美・上地玲子 (2019). JDS(日本ダウン症協会)岡山支部相談部の取り組み，ダウン症療育研究 12，41-43.

斉藤佐和子(2002).ダウン症児者の言語発達に関する最近の研究.19(1),1-10.

湯澤美紀(2011)ワーキングメモリと発達障害―支援の可能性を探る―.心理学評論 54(1),76-94.

湯澤美紀(2011).ワーキングメモリと発達障害―支援の可能性を探る―.心理学評論 54(1),76-94.



Figure2. ビジョントレーニング指導風景①

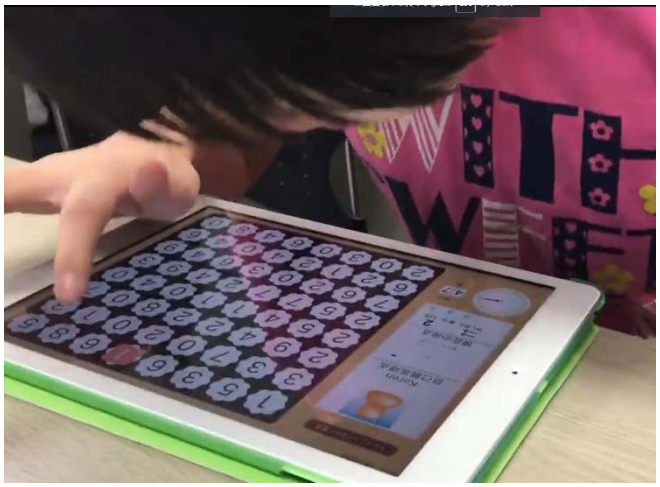


Figure2. ビジョントレーニング指導風景②



Figure2. ビジョントレーニング指導風景③



Figure2. ビジョントレーニング指導風景④

				書き問題			読み課題	読み課題（自分で読んだ後）		読みの介入課題（代読後）		
ID	年齢	性別	利き手	書いた文字数（字）	1分間の書字速度（字）	評価	実施方法	正答数（6問中）	評価	正答数（6問中）	評価	本人の主観評価
1	8	女	右	9	3.00	C	集団実施	0	4正解以下	3	4正解以下	5
2	10	女	右	24	8.00	C	集団実施	2	4正解以下	2	4正解以下	3
3	10	男	右	25	8.33	C	集団実施	1	4正解以下	1	4正解以下	5
4	11	女	右	15	5.00	C	集団実施	0	4正解以下	0	4正解以下	3
5	11	女	右	37	12.33	C	集団実施	4	4正解以下	3	4正解以下	5
6	11	女	右	37	12.33	C	集団実施	3	4正解以下	3	4正解以下	3
7	14	男	右	80	26.67	B	集団実施	0	4正解以下	1	4正解以下	3
8	16	女	右	39	13.00	C	集団実施	3	4正解以下	3	4正解以下	5

Table1. 第 1 回目 URAWSS Ⅱ 実施結果

		書き問題			読み課題	読み課題（自分で読んだ後）		読みの介入課題（代読後）		
ID	実施	書いた文字数（字）	1分間の書字速度（字）	評価	実施方法	正答数（6問中）	評価	正答数（6問中）	評価	本人の主観評価
4	1回目	15	5.00	C	集団実施	0	4正解以下	0	4正解以下	3
	2回目	21	7.00	C	個別実施	0	4正解以下	0	4正解以下	3
7	1回目	80	26.67	B	集団実施	0	4正解以下	1	4正解以下	3
	2回目	78	26.00	B	個別実施	4	4正解以下	4	4正解以下	1

Table2. 第 2 回目 URAWSS Ⅱ 実施結果

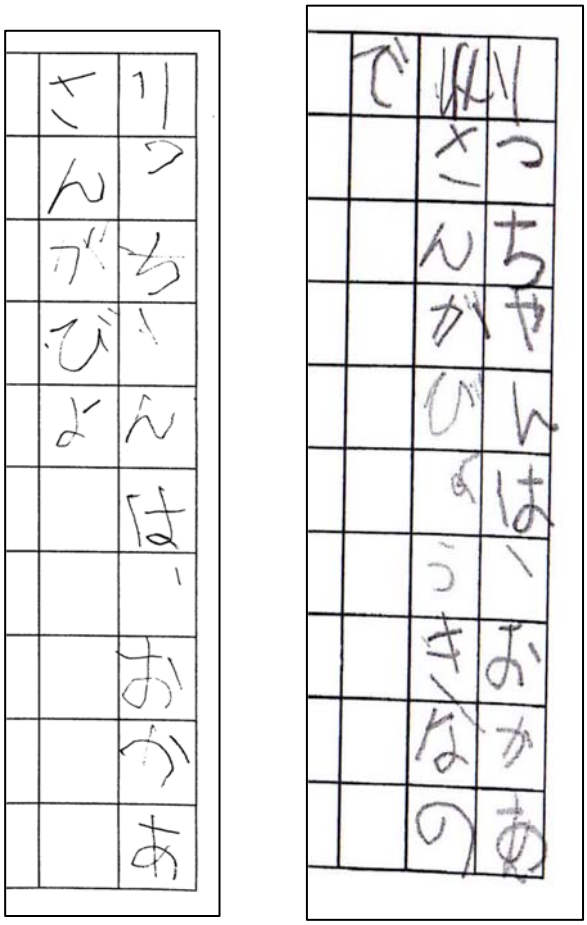


Figure6. ID:4　第１回目(左)と第２回目(右)書字課題

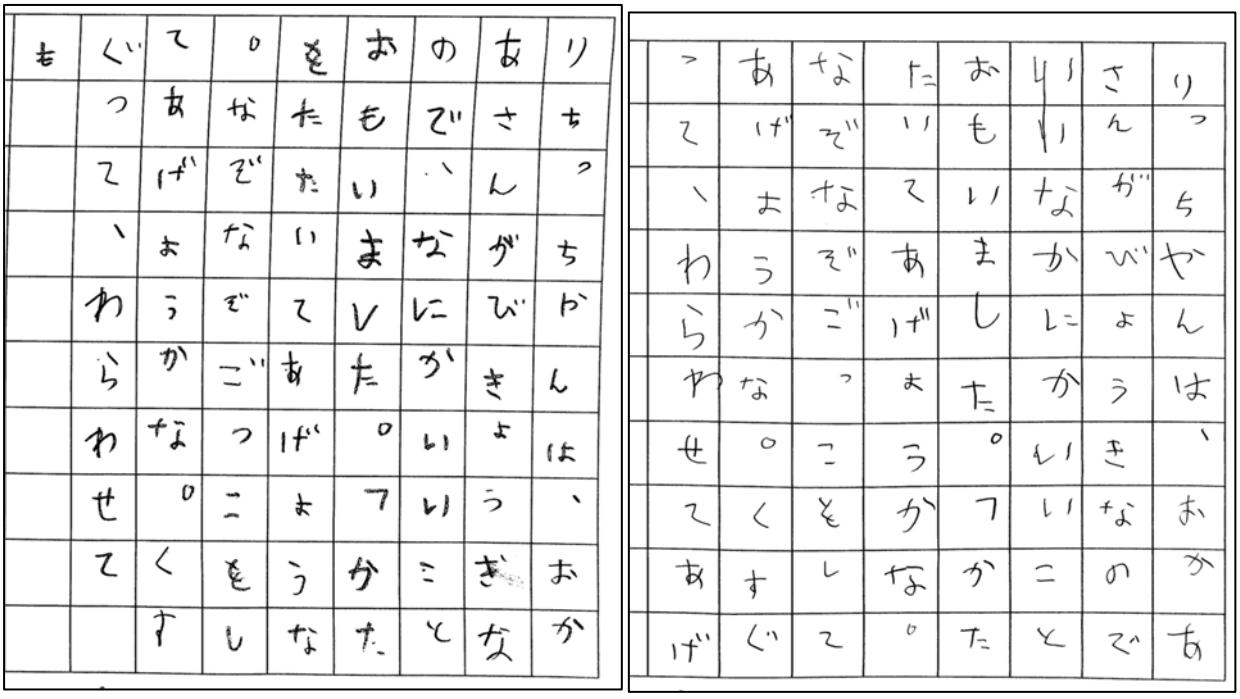


Figure7. ID:7　第１回目(左)と第２回目(右)書字課題

味覚センサーおよびブレスマスを用いた食品の味および香りの立体的評価法の検討

美作大学短期大学部

桑守　正範

味覚を電気信号に変換、数値化する味認識装置を用い、岡山県産農産物（コメ・ユズ）および農産物加工品（ユズ果汁）の味覚を測定した。同時に同一資料を日本原子力機構の開発した香気成分分析装置であるブレスマスを用いて香気成分を測定し、味と香りの立体的評価を行った。

コメの分析は津山市農業振興課が試行している氷温貯蔵の効果を検証することを目的とした。検証の結果、味覚に於いて新米は常温保存米と比較すると苦味雑味（先味）が弱く、塩味（先味）が強い傾向が見られたが、氷温貯蔵を行った米においては新米と同様の傾向が見られるものの、その傾向は常温保存米との中間値であり、味覚に於いては常温保存米と新米の中間程度のバランスであるとの示唆を得た。香りに於いてはベンズズアルデヒドのナッツ様の香気は新米や氷温貯蔵米ではっきりしており、ペンタナールやヘキサナールのような好ましくないとされる臭気は古米で強い事が示唆された。

一方、ユズの分析は美作県民局との連携で、久米南産ユズ果汁の他産地との差、ユズ加工品（ジュース）の原料摘果のタイミングによる味と香りの差を検証した。検証の結果、久米南産ユズは他産地と固有のユズの香りが強く、シメンやクベベンのような木の香りや、ゲラニオールが多く含まれていた。また、10 月下旬の香気の多様性が、11 月以降に失われており、固有のユズの香りは収穫初期のものを原料に用いた加工品に於いて強いことが示唆された。

序論

本研究は平成２９年に日本原子力機構人形峠環境技術センターと美作大学地域生活科学研究所とが提携し、味覚の客観的・立体的評価法を確立し、津山産農産物ならびに農産物加工品の優位性を探ると共に、研究成果を農産物および農産物加工品の品質向上の一助となることを目的として研究を開始した。味覚センサーを用いた味分析は従来多く用いられてきた評価法である官能検査と異なり、電気的に味を数値化するため、食品の評価を目的に導入する施設も増加傾向にある。一方、日本原子力機構の開発したブレスマスは短時間に香気成分を分析可能かつ、これまでの香気成分では不可能であった「高温条件下の香り」分析をも可能とする新しい分析機器である。本研究の新規性はこれまで不可能であった「実際に喫食する温度帯での味と香りの評価」を行う物であり、従来法と比して実際に喫食したデータに近い結果を得ることが出来る方法である。

これまでに津山産農産物では米、ショウガ、ピオーネ、黒豆、栗などを、加工品では小麦加工品や日本酒などの味・香りの評価を行ってきた。昨年までは他県産と津山産のものを比較し、特徴や優位性を検討してきたが、今年度は同一圃場で収穫された農産物を対象に、栽培条件を変化させた農産物を比較することで、より高品質な農産物を収穫するための農法を検討することに注力した。一方で、同一条件で製作した加工品を対象に、製法の一部のみを変化させた加工品を比較することで、より高品質な加工品を生産する加工法も検討した。

具体的には 2019 年度は美作県民局と連携した県北産桧の温度・湿度別香気成分発生状況、ＪＡ勝央と連携した黒大豆の収穫後の味・香りの経時変化、株式会社果楽と連携した岡山県産白桃への加工の及ぼす味覚・香りへの影響などを検証したが、本報告においては助成金を用いて分析を行った津山市で収穫した米の味と香りに及ぼす貯蔵法の影響、および

ユズにおける産地毎の味と香りの差、原料果摘果タイミングによる加工品の味と香りへの検証結果を報告する。

実験方法

試料１．米（コシヒカリ）

岡山県津山市阿波地区では平成10年に同地区で収穫されたコシヒカリを氷温熟成するための専用氷温庫を完成させ、以来収穫後１ヶ月にわたり-5～0℃で保管した米を「氷温熟成米」と称し販売してきた。本年度は氷温貯蔵の味・香りに及ぼす影響の検証を行うことを目的に、同地区収穫コシヒカリのうち、氷温熟成を行った2018年度収穫したもの、常温で通常保管した2018年度収穫のもの、および2019年度収穫直後のものを対象に分析を行った。米は全て玄米の状態で準備を行い、分析当日に精米機で精米を行った。米40gをビーカーに入れ、水60ccを注入し40分間浸漬後、沸騰後に更に10分加熱、10分間放置したものを試料とした。

味覚センサーには冷却後、直接味覚センサーの試料に供した。香気分析においてはビーカー内に充満した香気をシリンジでガスを捕集、装置に導入して測定を行った。

試料２．ユズ果実・果汁加工品

収穫期別に原料ユズを集積し、試料とした。2019年度の試料収穫日はそれぞれ10/23(初期)、11/5(早期)、11/2(最盛期)11/20、12/5(晩期)であった。ユズは生果を手で潰した直後ものを試料に供した。香気分析に於いては先述の果汁をビーカーにラップで封入し、5分待機後に5mlシリンジの針をラップに刺してを用いてガスを捕集し、装置に導入した。

また、果実に関しては比較対象として産地の異なる果実も用意し、同様の測定を行った。産地は高知、徳島であり、収穫時期は11月中旬であった。

ユズ加工品（果汁製品）は久米南JA製、久米南山田製、高知製、徳島製のものを対象とした。久米南ＪＡ製と徳島製のものに関しては加熱処理を行わない製品も測定対象とした。

測定に当たっては各産地の液体ユズ加工品をビーカーに封入し、5分待機後にシリンジにてガスを捕集し、後述のブレスマスに導入して測定を行った。

味覚評価法

味覚はセンサーで電気信号に変換し数値化するインテリジェントセンサーテクノロジー社の味認識装置TS-5000Z[1)2)]を用い、測定を行った。

香り評価法

日本原子力研究開発機構が開発した高感度四重極形質量分析計[3)]を使った「ブレスマス（呼気ガス測定装置）」を用い、試料の香り成分の分析を行った。本機は0.2ml程度のサンプルを注入すると、約10秒で微量なガス成分を高感度（～1ppm）で測定・分析出来、かつ従来法では測定が難しかった加熱状態での香気成分を測定可能である。

結果および考察

米（コシヒカリ）の味と香りの評価

ブレスマスを用いた測定結果を、文献等[4)5)]で調査した炊飯米の特徴的な香気成分と照合した。照合にあたっては、NISTデータベース等で調査した対象物質の基準ピーク等を参考とした。

味覚評価試験結果

味覚センサーによる測定結果を表１に示す。新米は常温保存米と比較して穀物・玄米の呈味である苦味雑味が低かった。一方で塩味・先味として感知されるミネラル感・ボディ感が強く、米の味わいは強かった。氷温貯蔵米は新米と常温保存米の中間値であることが明らかになった。

香り評価試験結果

本年収穫新米、昨年収穫氷温貯蔵米、昨年収穫常温貯蔵米をそれぞれ測定した。炊き立てごはんを特徴づける香気との対比を表２に示す。多様なガス成分が重合して測定されているため、成分の特定や計量は困難であったが存在可能性を示す事が出来た。炊き立てごはんの特徴的な香気のうち、ベンズズアルデヒドのナッツ様の香気は、新米や氷温米ではっ

きりしており、ペンタナールやヘキサナールのような好ましくないとされる香気は、古米で強い可能性が示唆された。

測定された香気を含む多様なガス成分の情報を整理する目的で、統計ソフト(SPSS)を使用して主成分分析を行った。なお、対象は、一般的な空気成分を除くすべてのガス成分を対象とした。計算された第1及び第2主成分の主成分得点を図1に示す。主成分の成分行列の内容から、文献で調査された炊き立てごはんの香気成分のうち、新米や氷温貯蔵米はアセトアルデヒド、ベンズアルデヒド、2-ペンチルフランなど、比較的甘い香気が強い可能性が示された。一方で新米や氷温貯蔵米においては古米で脂肪臭となるオクタナール、デカナール、酢酸、2-メチルプロパナール、ヘプタナール、ベンジルアルコールは弱いことが示唆された。また、これらの傾向は新米で強く、氷温貯蔵米では新米と古米の中間値を示した。

ユズの香りの評価

ブレスマスを用いて得た測定結果を、味香り戦略研究所の GCMS 測定結果（図2）と照合し、照合にあたっては、NIST データベース等で調査した対象物質の基準ピーク等も参考とした。

摘果時期の香りに与える影響

収穫期別(初期 10/23、早期 11/05、最盛期 11/20、晩期 12/5 収穫)の果実香を測定した。GCMS で測定されたユズ加工品香気成分の基準ピークが該当するものを表3に示す。ここでは 10 月下旬の香気の多様性が、11 月以降に失われている可能性が示唆された。また、主成分分析を行った成分得点を図3に示す。主成分の成分行列の内容から、第1主成分には、GCMS で測定されたユズ加工品の香気成分の基準ピークのほとんどが含まれ、総合的なゆずの香りが収穫初期に強い可能性が示唆された。第2主成分はクベベンやシメンのような木の香が強い可能性が示唆された。

ユズ生果の産地別香りの差

11 月中旬に収穫された産地の異なる(徳島、高知、久米南)生果を対象としてブレスマスを用いて香りを測定した。ブレスマスで検出したピークの内、GCMS で測定されたユズ加工品香気成分の基準ピークが該当するものを表4に示す。比較の結果、固有香気成分のうち、α-クベベンが久米南産ユズのみで検出された。また、ユズ生果主成分の成分行列の内容（図4）から、第1主成分には、GCMS で測定されたユズ加工品の香気成分の多くの基準ピークが含まれ、久米南産ゆずは、総合的なユズの香りが強い可能性が示された。第2主成分には、シメンやクベベンのよう木の香りや、ゲラニオールが多く含まれ、木の香りや薔薇のような良い香りの強さを示す可能性が示唆された。

ユズ加工品（果汁製品）産地別香りの差

ユズ加工品（果汁製品）においても生果同様、α-クベベンが久米南産ユズ加工品のみで検出された（表5）。また、ユズ加工品（果汁製品）主成分の成分行列の内容から、第1主成分には、GCMS で測定されたユズ加工品の香気成分の多くの基準ピークが含まれていた。第2主成には酢酸エチルやクベベンの基準ピークが含まれるため、久米南産は、比較的果実の香りや木の香りが強い可能性が示唆された。

参考文献

1)日本暖地畜産学会報 54(1), 49-60, 2011
2)Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology 55(11), 559-565, 2008-11-15
3)Bulletin of the Ibaraki Prefectural Livestock Research Center (49), 26-35, 2017-01
4) 日本食品科学工学会誌 62(2), 95-103, 2015
5) 日本食品工業学会誌 16(5), 216-218, 1969

表 1．保存状態が味覚に及ぼす影響

味推定値(補間差分)

常温保存米を基準(ゼロ)とした場合の値です。
※濃度差約20%が大多数の人が異なる味わいと感じる濃度差です。
味覚の鋭い人は0.5程度(約10%)でも認識可能である。後味はその限りではない。

『常温保存米』を基準とした場合

【ﾓﾁ・ｱﾐﾛﾍﾟｸﾁﾝ系の呈味】　【ﾐﾈﾗﾙ感・ﾎﾞﾃﾞｨ感】
【穀物・玄米の呈味】　【まろやかさ】

サンプル	先味							
	酸味A	苦味雑味／薬	苦味雑味／食	渋味刺激	旨味	塩味	甘味	酸味B
元年玄米	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
津山阿波コシ39年(新米)	-0.92	-1.00	-2.91	-0.90	0.12	1.56	-13.08	4.16
元年氷温米	1.25	0.55	-0.76	-0.40	0.17	0.76	-2.83	1.01

サンプル	後味				
	にがり系苦味	苦味／薬	苦味／食	渋味	旨味ｺｸ
元年玄米	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
津山阿波コシ39年(新米)	0.10	-0.78	-0.23	-0.17	-0.15
元年氷温米	0.00	0.13	0.09	0.01	0.01

表 2．保存状態が炊きたてご飯の特徴的香気成分組成に及ぼす影響

可能性のある香気成分	基準ピーク	種類		
		新米	氷温米	古米
アセトアルデヒド	29	2	0	2
酢酸、2-メチルプロパナール、オクタナール、デカナール	43	0	2	2
ブチルアルデヒド、3-メチルブタナール、ヘキサナール、ペンタナール	44	0	0	1
ペンタン酸、3-メチルブタン酸、ヘキサン酸	60	1	0	1
ヘプタナール	70	0	0	1
ベンズアルデヒド	77	2	1	0
ベンジルアルコール	79	0	0	2
2-ペンチルフラン、trans,trans-2,4-デカジエナール	81	1	1	

表 3．収穫時期がユズ果実香成分組成に及ぼす影響

可能性のある香気成分	基準ピーク	収穫日			
		10/23	11/05	11/20	12/05
酢酸エチル	43	3	0	2	2
リモネン	68	3	3	1	3
ゲラニオール	69	3	0	0	0
リナロール	71	0	0	0	0
α-ピネンあるいはβ-ピネン 3-カレン γ-テルピネン β-カリオフィレン	93	3	2	3	3
p-シメン	119	3	0	1	0
δ-エレメン	121	3	1	1	0
α-クベベン	161	2	0	2	0

表４．ユズ生果の産地による香り成分の差

可能性のある香気成分	基準ピーク	産地		
		徳島	高知	久米南
酢酸エチル	43	3	3	3
リモネン	68	3	3	3
ゲラニオール	69	2	2	2
リナロール	71	0	3	1
α-ピネンあるいはβ-ピネン 3-カレン γ-テルピネン β-カリオフィレン	93	3	2	1
p-シメン	119	3	3	3
δ-エレメン	121	3	3	3
α-クベベン	161	0	0	2

表５．ユズ加工品（果汁製品）の製造地別香り成分の差

可能性のある香気成分	基準ピーク	加工品					
		久米南 JA	久米南 山田	久米南 加熱	高知 加熱	徳島	徳島 加熱
酢酸エチル	43	○	○	○	○	○	○
リモネン	68	○	○	○	○	○	○
ゲラニオール	69	○	—	—	○	○	○
リナロール	71		○	○		○	○
α-ピネンあるいはβ-ピネン 3-カレン γ-テルピネン β-カリオフィレン	93	○	○		○	○	
p-シメン	119	○	○	○	○	○	○
δ-エレメン	121	○	○	○	○	○	○
α-クベベン	161	○	—	○			

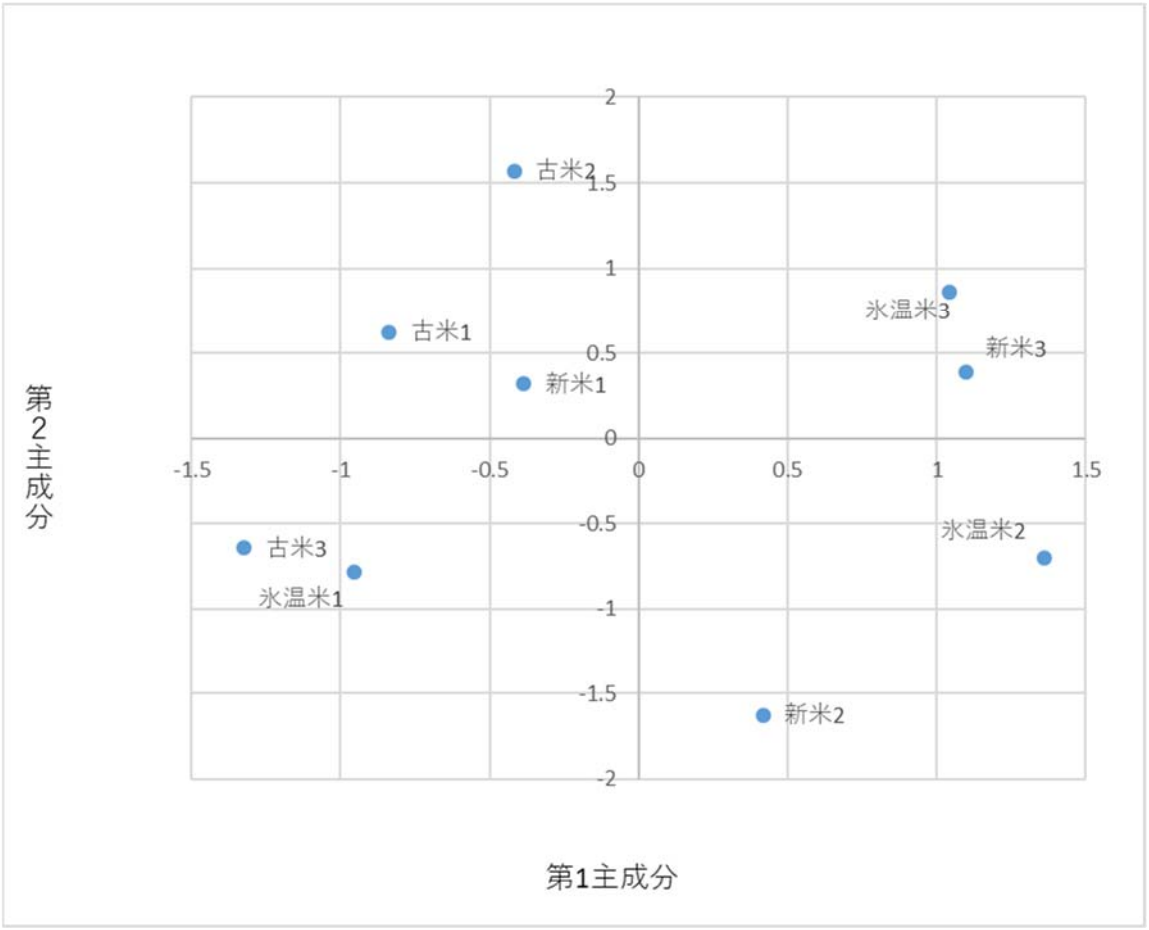


図１．保存状態が炊きたてご飯の主成分得点に及ぼす影響

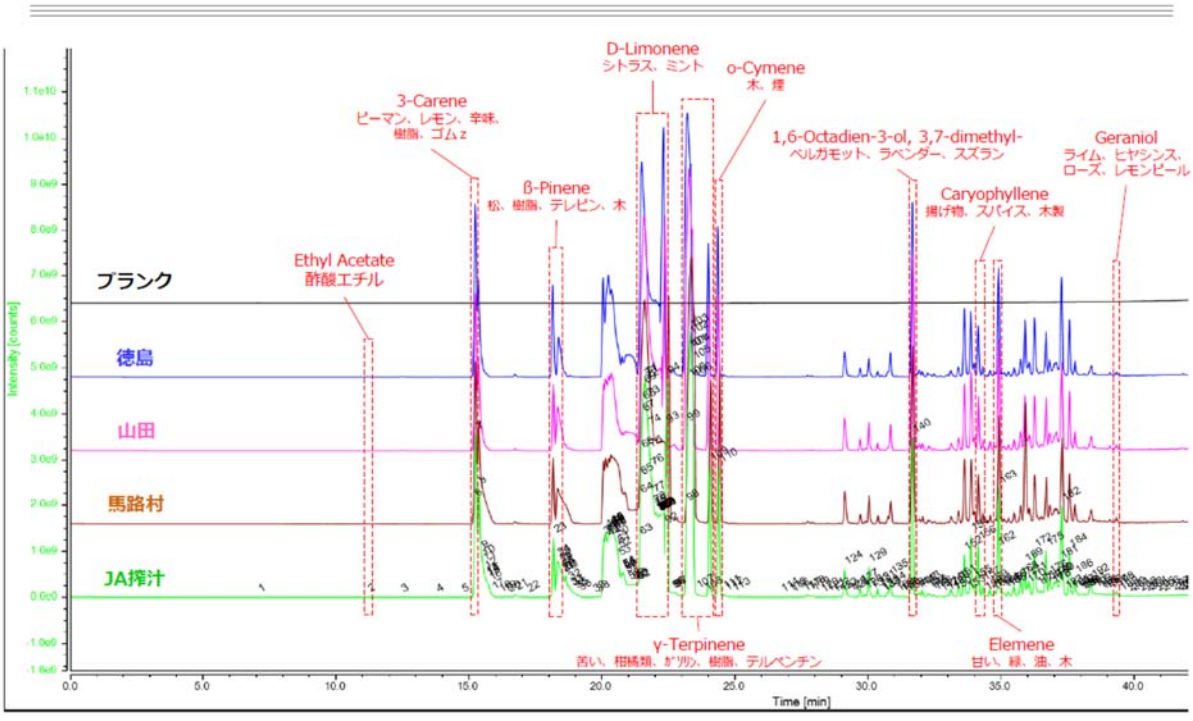


図２．ユズ果汁の産地の香り成分のＧＣＭＳ測定結果

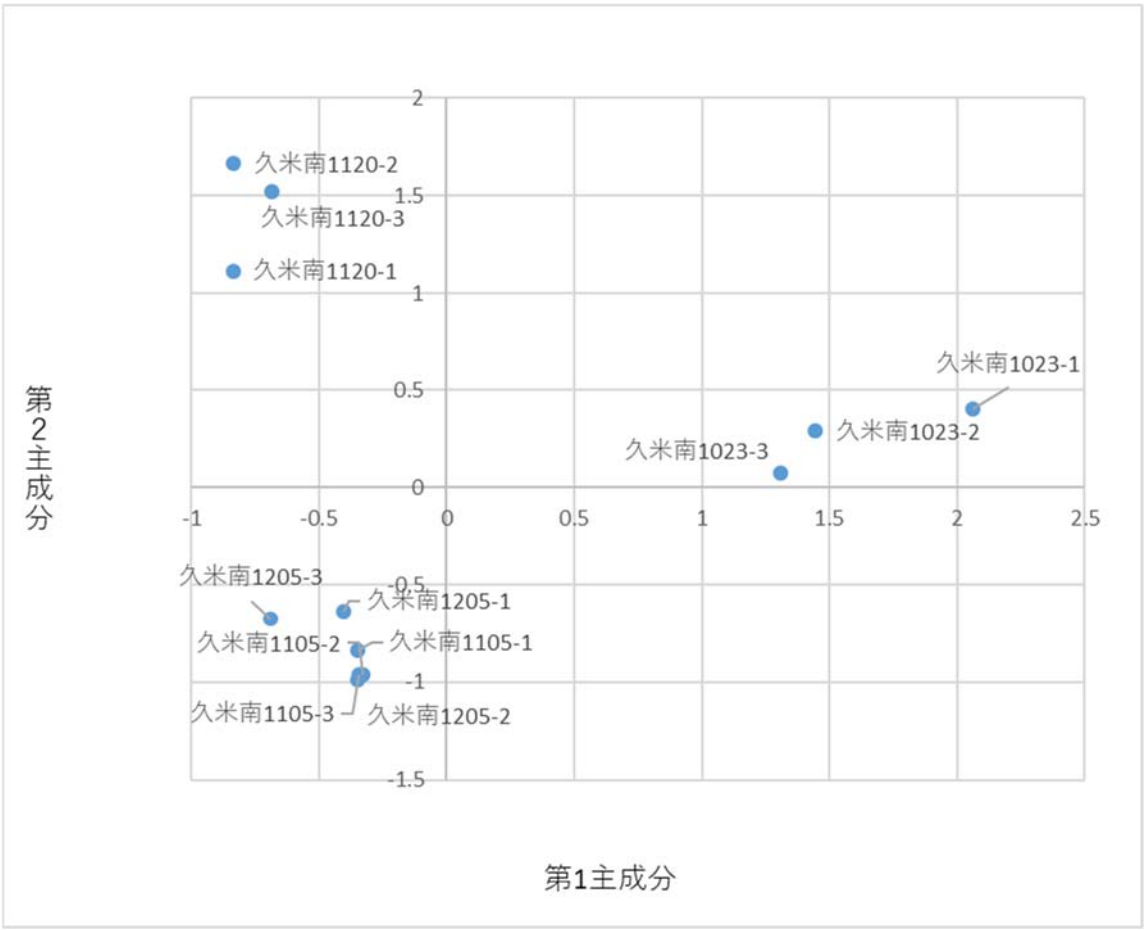


図３．摘果期の及ぼすユズ果汁香り成分への影響

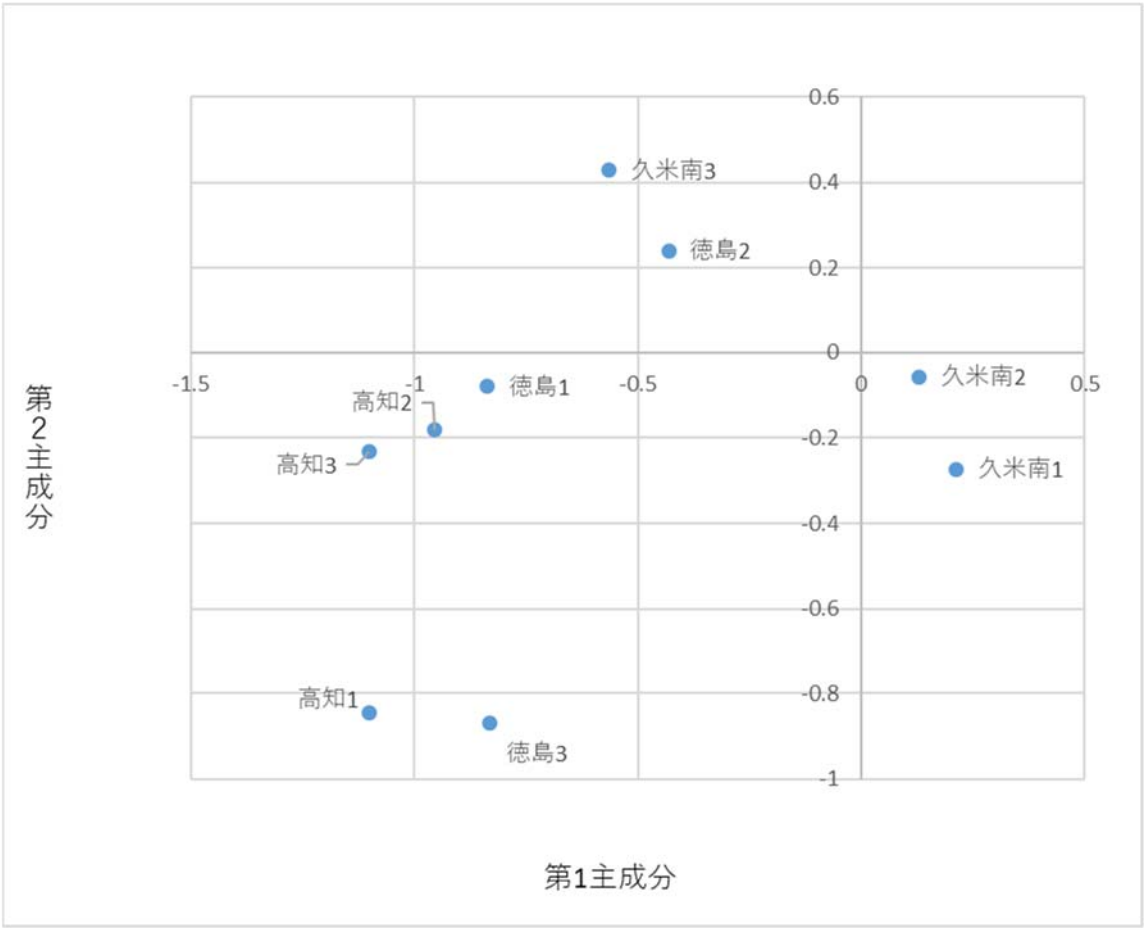


図４．産地の異なる（久米南、高知、徳島産）ユズ生果の香りの差

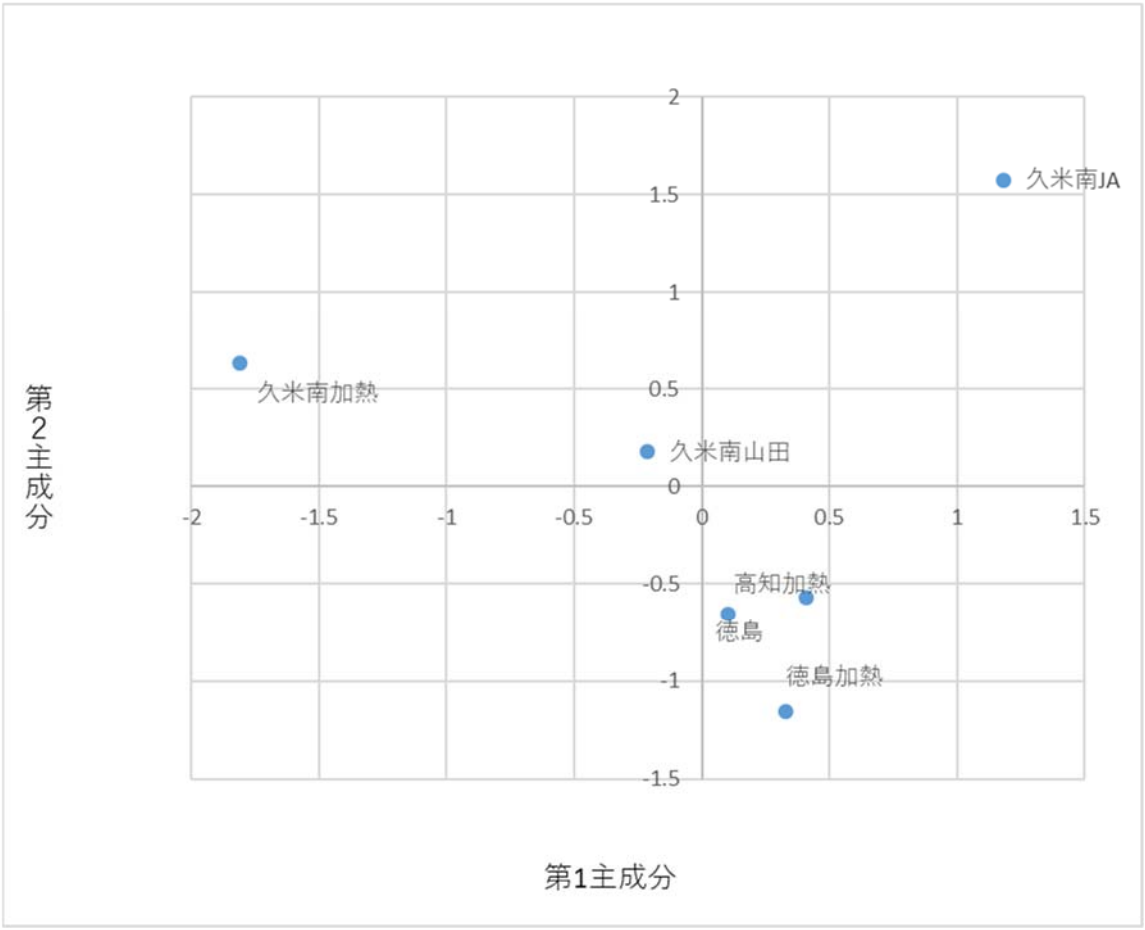


図５．産地の異なる（久米南、高知、徳島産）ユズ加工品（果汁製品）の香りの差

プレゴールデンエイジ期におけるキンダートーネン（子供体操）運動学習効果の科学的検証およびSECIモデルによるナレッジ・マネジメント導入に関する研究（1年目）

１．中国学園大学、　２．摂南大学、　３．川崎医療福祉大学

佐々木　公之[1]、大田　住吉[2]、　桃原　司[3]

（概要）

子供にとって6〜12歳の時期はゴールデンエイジと呼ばれ、神経系の発達がほぼ完成に近づく時期とされて多くの研究がなされている。しかし、実はこの年齢に到達する「前の年齢期（プレゴールデンエイジ、1歳半〜5歳)」に、いかに子供の自主性、積極性、協調性を育成・支援できるかが、その後の運動能力を左右する大きな分岐点となる。しかしながら、このプレゴールデンエイジ期において、どのような運動学習が有効であるかについては、従来の先行研究では十分明らかにされてこなかった。

本研究は、プレゴールデンエイジ期にフォーカスし、「キンダートーネン（ドイツ式子供体操）運動学習」による運動効果について、科学的に測定・検証するものである。具体的には、研究1年目として、日本に4教室あるキンダートーネン教室へのヒアリング調査および保護者へのアンケート調査等を行い、地域性分析およびBefore/After 比較分析を行った。その結果、通学前と現在を比較して、「運動嫌いの克服」「運動能力、体力」「社会性（自主性など)」の各項目で改善、向上していることが明らかになった。

Ⅰ．緒言（本研究の背景）

幼児期（1歳半〜5歳）の運動は、将来の運動能力を大きく左右すると言われるにもかかわらず、保護者自身の認識不足および近年の社会情勢等から幼児期の身体活動が軽視される傾向がある。

文部科学省が実施した「体力向上の基礎を培うための幼児期における実践活動の在り方に関する研究」では、幼児の身体を動かす機会の減少傾向がうかがえる結果となったと報告されている[1)]。同省は、「社会環境や生活様式の変化により、子供の遊ぶ場所、遊ぶ仲間、遊ぶ時間が減少し、また交通事故や児童犯罪への懸念などが、子供の身体を動かして遊ぶ機会の減少を招いている」[2)]と指摘している。また、同省が示す「幼児期運動指針」によると、幼児が主体的に体を動かして遊ぶ機会が減少することで、以下のことが影響するとしている。

・児童期、青年期への運動やスポーツに親しむ資質や能力の育成の阻害
・意欲や気力の減弱
・対人関係などコミュニケーションをうまく構築できない
・子供の心の発達への影響

そのため、幼児期の具体的な運動提案として、以下を推奨している。

(1)　3〜4歳頃は、自分の体の動きをコントロールしながら、身体感覚を高め、より巧みな動きを獲得することができる時期である。この年齢児は、室内での巧技台やマットなどの遊具の活用を通して、全身を使って遊ぶことを推奨する。

(2)　4〜5歳頃は、全身のバランスをとる能力が発達し、身近にある用具を使って操作するような動きも上手になっていく時期であり、用具などを操作する動きを推奨する。



写真１　幼児期の運動

子供にとって、ゴールデンエイジといわれる6〜12歳の時期は神経系の発達がほぼ完成に近づくとされ、多くの研究がなされている。しかし、実はこの年齢に到達する「前の年齢期（プレゴールデンエイジ：1歳半〜5歳)」において、いかに子供自身の自主性、積極性、協調性を育成・支援できるかが、その後の運動能力を左右する大きな分岐点となる。

しかしながら、プレゴールデンエイジ期において、

どのような運動学習が有効であるかについては、従来の先行研究では十分に示されてこなかった。

Ⅱ．本研究の目的および調査手法

本研究は、プレゴールデンエイジ期にフォーカスし、「キンダートーネン（ドイツ式子供体操）運動学習」による運動効果について科学的に測定・検証することを目的としている。キンダートーネン（Kinder Turnen、以下、KT）とは、ドイツ体操をもとに生まれた200年以上の歴史を持つ子供向けの運動学習であり、Kinder はドイツ語で「子供」、Turnen は「体操」を意味する。



写真２　N 社の KT 運動教室（広島市）

具体的には、中国・近畿地区の 4 教室（岡山市、広島市、宝塚市、伊丹市）で KT 運動学習教室を運営する㈱エヌ・シー・ピー（岡山市北区、1980 年創業、以下、「N 社」）と連携・協力し、各教室に通う幼児・児童を対象に、その学習効果を検証した。N 社は、1994 年より 25 年間にわたり、「ドイツ体操」をもとに、総勢約 10,000 人の子供たちを指導した実績がある。

N 社の KT 運動学習教室の特徴は、以下の 4 点である。

(1) 1 歳半から小学 6 年生まで A～E の 5 つのクラスに分け（**図 1** 参照）、年齢や個々人の成長度にそって段階的な指導を徹底する。

(2) 天井から吊り下げたロープやリング、助木、平均台、ジャングルジム、すべり台など、ドイツやヨーロッパ各地から輸入した自然素材の多彩な遊具を組み合わせ、敏捷性や関節機能、筋肉・骨の発達を促す等の運動が自然とできるように工夫する。



図１　クラス分け



写真３　N 社の KT 運動教室（伊丹市）

(3) 個々人の運動能力向上に加え、友達との関わりや集団ルールなど、他者との協調性やコミュニケーション能力向上を重視する。

(4) 「できる」「できない」という進級システムを設けず、子供たちが評価ストレスなく、伸び伸びと「頑張る気持ち」を醸成する。

Ⅲ．アンケート調査による Before/ After 比較分析

本年度は研究 1 年目として、前章で述べた N 社の KT 運動学習がどのような効果をもたらしているのかについて、4 教室へのヒアリング調査および同教室に通う幼児・児童の保護者を対象としたアンケート調査を実施した。アンケート調査は、無記名とし、計 259 件（岡山教室 n =164，広島教室 n =95）の有効回答を得た。



写真４　N 社との定例ミーティング（岡山市）

なお、調査項目については、N 社担当者らと定例的なミーティング（**写真４**）を重ね、協議した。主なアンケート内容は、以下の通りである（**図２**参照）。

① KT 教室への通学手段、通学の目的は何か

② KT 教室通学前(Before)と現在(After)を比較し、運動嫌いが解消できたか、運動好きになったのか

③ KT 教室通学により子供の運動能力（走る、跳ぶ、ボールを投げる）、体力（筋力、持久力、柔

軟性、巧緻性）などの身体的能力が向上したか

④　KT 教室通学により子供の自主性、協調性、コミュニケーション能力など社会性が成長したか

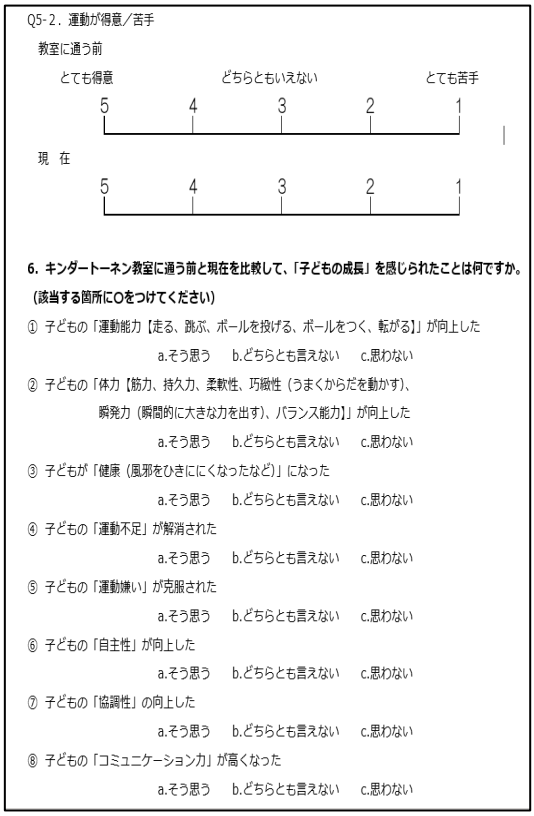


図２　アンケート調査項目（抜粋）

Ⅳ．結果の検証

アンケート調査の主な結果は、以下の通りである。

①　KT 教室への通学の目的

アンケート調査内容の一部に、KT 運動学習への通学の目的として、岡山・広島両教室ともに、運動能力の向上、体力づくり、協調性の向上、集団行動ができるように、の順となった。

ただし、岡山教室では、広島教室に比べ「子供の運動不足解消」が若干高い数値になるなど、地域性の違いがみられた（**図３**参照）。

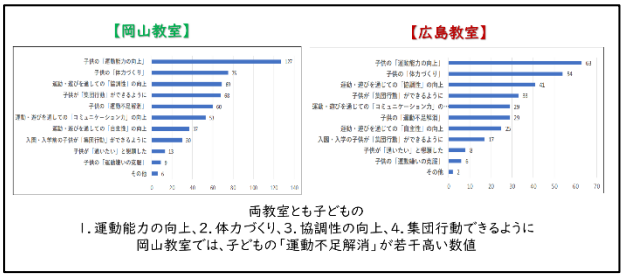


図３　KT 教室への通学の目的（複数回答あり）

②　KT 教室通学前(Before)と現在(After)を比較し、運動好きになったか

通学前と現在を比較し、「運動が好きになった」との回答が、岡山教室で 1.16 倍、広島教室で 1.13 倍となった(注)（**図４**参照）。

（注）各点数×回答数を集計した総合計による比較。

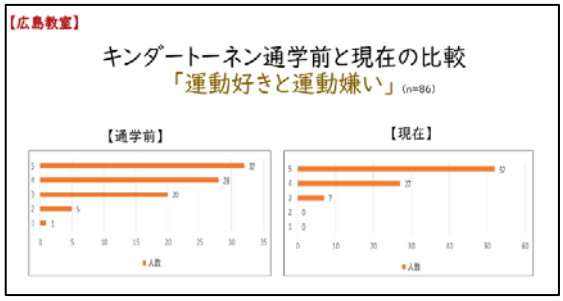
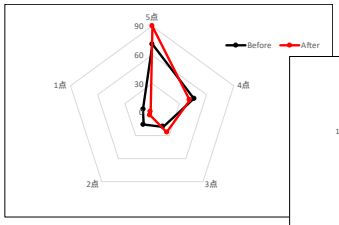


図４　運動が好きか、嫌いか（広島教室）

③　KT 教室通学前(Before)と現在(After)を比較し、運動が得意 or 苦手になったか

通学前と現在を比較し運動が得意か苦手かの質問に対して、岡山教室で 1.10 倍、広島教室で 1.49 倍と運動が得意へと上昇する結果となった(**図５**参照)。

＜岡山教室＞



＜広島教室＞



図５　運動が得意か、苦手か

④　KT 教室通学により子供の運動能力(走る、跳ぶ、ボールを投げる、ボールをつく、転がる）が向上したか

両教室を合わせて、約 78%が「運動能力が向上した」との回答を得た。内訳として、岡山教室約 75%、広島教室 84%であった(**図６参照**)。

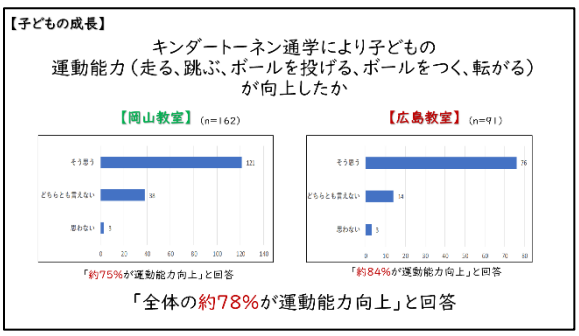


図６　運動能力が向上したか

⑤　通学により子供の体力（筋力、持久力、柔軟性など）が向上したか

両教室を合わせて、約 75%が「体力が向上した」との回答を得た。内訳として、岡山教室約 72%、広島教室 82%であつた（図７参照）。

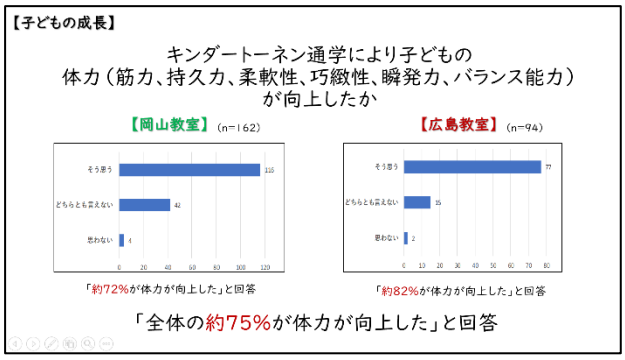


図７　体力が向上したか

⑥　子供が「健康（風邪をひきにくなったなど）」になったか

両教室を合わせて、約 67%が「健康になった」との回答を得た。内訳として、岡山教室約 82%、広島教室 62%であった（図８参照）。

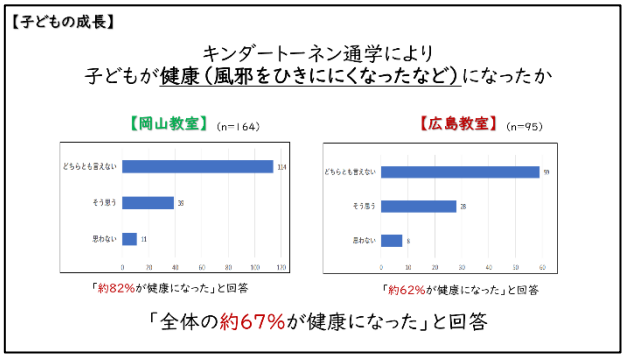


図８　子供が健康になったか

⑦　子供の「運動不足」が解消されたか

両教室を合わせて、約 69%が「運動不足が解消された」との回答を得た。内訳として、岡山教室約 66%、広島教室 74%であった（図９参照）。

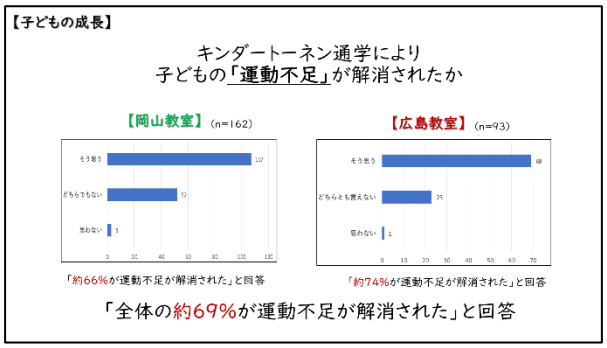


図９　運動不足が解消されたか

⑧　子供の「運動嫌い」が克服されたか

両教室を合わせて、約 52%が「運動嫌いが解消された」との回答を得た。内訳として、岡山教室約 55%、広島教室 49%であった（図 10 参照）。

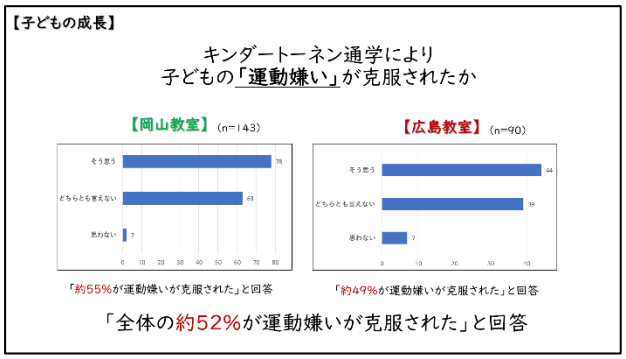


図 10　運動嫌いが解消されたか

⑨　子供の「自主性」が向上したか

両教室を合わせて、約 50%が「自主性が向上した」との回答を得た。内訳として、岡山教室約 47%、広島教室 54%であった（図 11 参照）。

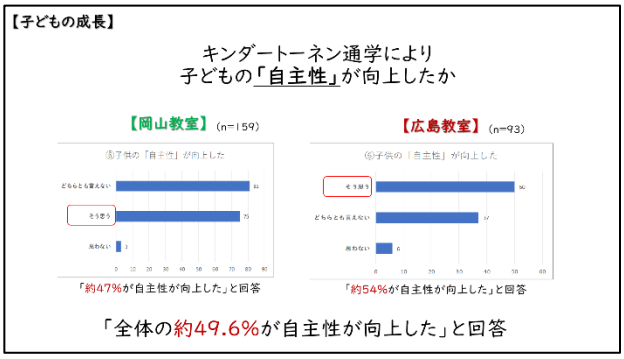


図 11　自主性が向上したか

⑩　子供の「協調性」が向上したか

両教室を合わせて、約 56%が「協調性が向上した」との回答を得た。内訳として、岡山教室約 56%、広島教室 55%であった（図 12 参照）。

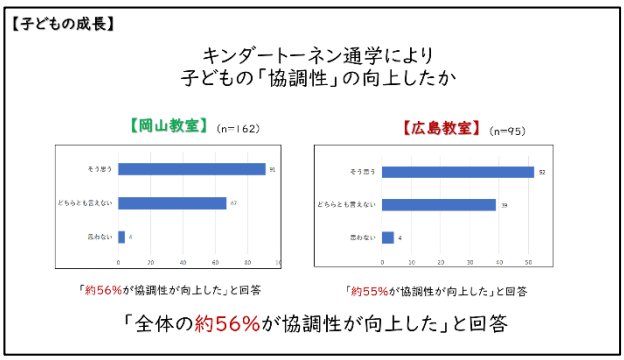


図 12　協調性が向上したか

⑪ 子供の「コミュニケーション力」が高くなったか

両教室を合わせて、約 52%が「コミュニケーション力が向上した」との回答を得た。内訳として、岡山教室約 52%、広島教室 52%であった（図 13 参照）。

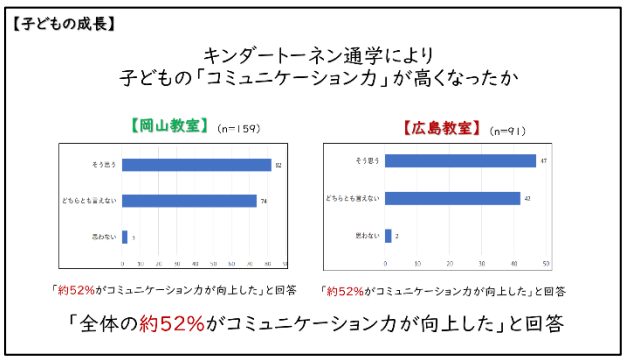


図 13　コミュニケーション力が向上したか

⑫ KT 教室の「良い点」は何か？（複数回答あり）

両教室を合わせて、「楽しく学べる」、「スタッフが優しい」、「スタッフと子供との間でコミュニケーションがとりやすい」、「鉄棒などの器具が充実している」との回答が多かった（図 14 参照）。

一方で、KT 運動教室の特徴である「木製遊具を使用している」は、岡山教室で 6 番目、広島教室で 5 番目に多い回答となった。また、岡山教室で 2 番目に多い「少人数指導制度」が、広島教室では 6 番目となった。

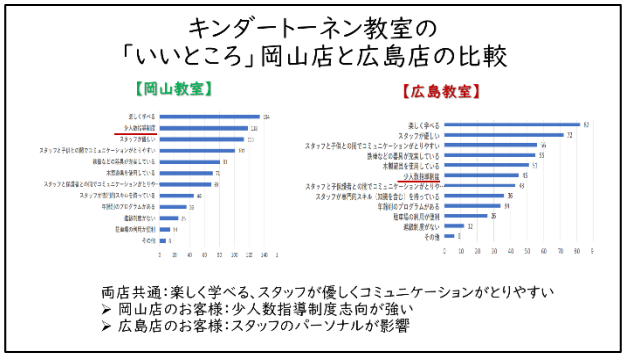


図 14　KT 教室の良い点

V．考察

本年度は、研究 1 年目として、「プレゴールデンエイジ期における KT 運動学習による効果」および「KT 運動学習効果の地域性分析」について、保護者へのアンケート調査を実施した。その結果、以下の 4 点が検証された。

(1) 子供を KT 運動教室へ通わせる理由としては、岡山教室・広島教室ともにおおよそ変わりはなく、①子供の運動能力や体力づくり、運動不足解消などの体力面と、②他者との協調性や集団行動、コミュニケーション力の向上など社会的スキルの向上、の 2 点を目的に通わせていることが分かった。

(2) KT 運動教室通学前と通学後の Before/ After 比較では、両教室とも以前より「運動が得意になった」、「運動が好きになった」との回答が多かった。

この理由として、KT 運動教室では個人の発育発達に合わせた段階的な運動プログラムを提供しており、こうした取り組みによって子供たちの運動能力をうまく高めることができ、且つ子供たちに小さな成功体験を積み重ねさせることで「運動が好きになった」との回答が多くみられたと考えられる。

しかし一方で、子供の「運動嫌いが克服された」と回答したのは約半数程度であった。これについては、上記の回答との間に相違がみられるが、どのような運動が嫌いなのか、なぜ嫌いなのかなど、今後詳細に調査することによって対処法を見出すことができると考えている。

(3) KT 運動教室を通じて、約 75%以上の子供たちの運動能力と体力が向上したと考えられる。とくに、広島教室では運動能力・体力ともに 80%以上向上する結果となり、KT 運動がプレゴールデンエイジの運動能力・体力の向上に一定の効果があると言える。しかし一方で、広島教室では「健康になった（62%）」「運動嫌いが克服した（49%）」と、岡山教室に比べて高い数値になっていない。このことから広島教室には、もともと健康状態には問題がない子供、そして運動が得意ではない子供が多いのではないかと考えられる。

(4) アンケート項目の「KT 運動を通じて自主性、協調性、コミュニケーション能力など社会性が成長した」については、岡山教室・広島教室ともにほぼ 50%前後と、体力的な向上に比べて低い結果となった。しかし一方で、約半数の保護者が、KT 運動を通じて社会性が向上したと考えており、効果がないと断言することは出来ない。つまり、身体能力など外見的な成長に比べると、子供の内面的

な社会性の成長を定量的に把握することは容易ではないため、低い数値となったと推測される。

Ⅵ. 最後に

本年度は、3 年間の研究計画での 1 年目の研究結果であった。主に、N 社の 4 教室の指導スタッフへのインタビュー調査と KT 運動教室通学者の保護者へのアンケート調査であり、子供たちの体力や身体能力の数値データを直接測定したものではない。

次年度以降については、KT 教室通学者の子供たちを対象にした体力測定データ分析やインタビュー調査などを通じて、KT 運動教室の効果について、さらに科学的に検証する。

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）ウエスコ振興財団の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。

また、ご多用の中、アンケート調査にご協力頂いた KT 運動教室の保護者の皆様にも厚く御礼申し上げます。

Ⅶ. 参考文献

１）平成 30 年度体力・運動能力調査結果の概要及び報告書について　Ⅱ調査結果の概要
https://www.mext.go.jp/prev_sports/comp/b_menu/other/__icsFiles/afieldfile/2019/10/15/1421922_3.pdf　2020 年 3 月 6 日

２）文部科学省「幼児期運動指針」
,https://www.mext.go.jp/a_menu/sports/undousisin/1319771.htm,2020/02/28

カルバペネム耐性細菌の駆除を目指したファージ療法の開発

中国学園大学 現代生活学部 人間栄養学科

川野 光興

本研究では、大腸菌やサルモネラ菌に対して生育阻害効果を示すRNA配列を取得することを目指してスクリーニングを行った。まず、24塩基のランダム配列を含むインサート配列をPCRによって調整した。次に、その配列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、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、大腸菌とサルモネラ菌において増殖抑制効果を示す人工ランダムRNA配列を複数同定することができた。これらの配列を決定したところ、グアニン塩基（G）を優位に多く含んでいることがわかった。そこで、16塩基から24塩基までの連続グアニン塩基を含むRNA配列を作製して生育阻害効果を調べたところ、グアニンが20回連続している配列を含むRNAにおいて最も強い生育抑制効果を認めた。この結果、世界で初めてグアニンの連続配列を用いた抗菌作用を得ることができた。さらに、これらファージミドを含むファージライセートを用いてファージ感染によりファージミドを細菌内に導入したところ、同定したRNA配列の発現によりカルバペネム耐性大腸菌の生育を抑制することができた。

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。そのなか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 antisense RNA (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 のみによって行われるため、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、我々は大腸菌やサルモネラ菌の生育阻害を誘導する塩基配列をスクリーニングにより取得することを目指して研究を行った。そして、これらのランダム RNA を含む配列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カルバペネム耐性大腸菌の生育が阻害されるか調べた。

2. 材料と方法

1) ランダム配列プライマー

・EcoN24SpeI（鋳型プライマー）

5′-GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTACTAGTAGCTGCAGGCATGCAAGCTT-3′

鋳型プライマーとして、インサート作製において使用した。

・EcoNotXbaI-F3（FWD プライマー）

5′-CTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAG-3′

FWD プライマーとして、インサート作製において使用した。

・SphPstSpeI-R1（REV プライマー）

5′-CTTCGCATGCCTGCAGCTACTAGTA-3′

REV プライマーとして、インサート作製において使用した。

2) インサート DNA 作製

ベクターに導入するためのインサート DNA として EcoN24SpeIを鋳型として作製した（図 1）。



図 1：インサート DNA 部位の塩基配列

PCR チューブに水を 13.5 µl、EcoN24SpeI を 0.5 µl、EcoNotXbaI-F3（FWD プライマー）を 0.5 µl、SphPstSpeI-R1（REV プライマー）を 0.5 µl、2×PrimeSTAR® Max Premix を 15 µl 混ぜ、PCR 反応を行った。EcoN24SpeI は、濃度が濃いと鋳型プライマー同士で結合する可能性が高くなる。そのため、20 µM, 2 µM, 2×10^{-1} µM, 2×10^{-2} µM, 2×10^{-4} µM, 2×10^{-6} µM の EcoN24SpeI を作製し比較した。PCR 反応は、98ºC で 10 秒間、60ºC で 5 秒間、72ºC で 5 秒間の 3 工程を 35 サイクルし、4ºC で反応を終了させた。PCR 反応後にカラム精製を行った。1.5 ml チューブに PCR 反応液（2×10^{-1} µM, 2×10^{-2} µM, 2×10^{-4} µM, 2×10^{-6} µM の EcoN24SpeI）を各 25 µl（計 100 µl）移し、Buffer NT1 を 200 µl 加えた。この溶液を 2 ml コレクションチューブにセットした NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column を用いて精製し、1.5 ml チューブに溜まったろ液をインサート DNA とした。インサート DNA の濃度を測定し、ベクターに導入するために制限酵素で末端を処理した。水を 18 µl、インサート DNA を 7 µl、CutSmart を 3 µl (10×buffer)、*Eco*RI-HF を 1 µl、*Spe*I を 1 µl 混ぜ、37ºC で 30 分間反応させ、制限酵素処理したインサート DNA とした。制限処理溶液を 15 µl、6×orangeG を 3 µl 混ぜ、3.2%アガロースゲルを用いて、100 V で 30 分間泳動した。ゲルをエチジウムブロマイドにより染色し、バンドを確認した。

3) 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。

4) プラスミド pMKN104-N24

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 24 塩基からなるランダム配列を含む約 140 塩基の RNA を発現するプラスミドである。

5) プラスミド pMKN104-G_{16}, $-G_{18}$, $-G_{20}$, $-G_{22}$, $-G_{24}$

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 G が 16 回～24 回連続した RNA を含む約 140 塩基の RNA を発現するプラスミドである。

6) 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 25 ml の培地を入れ、固まるまで静置し、4°C で保管した。

7) 増殖曲線の作製

終濃度 0.2% のアラビノースを加えた pMKN104-N24 プラスミドを保持する大腸菌 TOP10 の生育抑制効果を増殖曲線で確認した。培養チューブに、LB 培地を 2 ml、クロラムフェニコール溶液を 2 μl 加え、それぞれの単一なコロニーを懸濁し、37ºC で一晩振とう培養したものを前培養液とした。50 ml チューブに、LB 培地を 20 ml、クロラムフェニコール溶液を 20 μl、前培養液を 100 μl、20%アラビノースを終濃度 0.2%量加え、37ºC で振とう培養した。1 時間ごとに OD_{600} の吸光度を測り、24 時間後の濁度も測定した。

8) ファージミドアッセイ

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る、アラビノース入りプレート上での生育阻害効果を確認した。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

PCR にて 24 塩基ランダム配列を含むインサートを作製し、それらを pMKN104 に挿入後、エレクトロポレーション法によって大腸菌株 TOP10 の形質転換を行った。回復培養液を LB+Cm プレートにそれぞれ塗布し、954 種類の pMKN104-N24 塩基ランダム配列を含む形質転換体を得ることができた。次に、954 種類のコロニーを LB+Cm プレートと LB+Cm+Ara プレートに塗布することで生育の違いを比較した。アラビノース存在下では、転写が促進されることで、RNA の働きにより、生育抑制がみられるコロニーを得ることができると考えられた。この 2 種類のプレート上のコロニーを比較し、LB+Cm+Ara プレート上で生育抑制がみられたコロニーを 52 種類得た。シングルコロニーストリークで生育抑制がみられた 52 種類と生育抑制がみられなかった 15 種類のコロニーを LB+Cm プレートと LB+Cm+Ara プレートにシングルコロニーアイソレーションした。得られたコロニーを比較し生育抑制の強さを–、+、++、+++の 4 段階で比較した。–はコロニーが少し小さくなったが生育抑制とまではいかないもの、+は生育抑制が少し感じられるもの、++はコロニーは減ったが+++とまではいかないもの、+++はほとんどコロニーがみられないものとして目視で判断した。その結果、–が 41 種類、+が 13 種類、++が 10 種類、+++が 3 種類という結果となった。

シングルコロニーアイソレーションをした 67 種類のコロニーをコロニーPCR し、電気泳動でランダムな 24 塩基（N24）が含まれているか確認した。ストリークで生育抑制がみられた 52 種類とストリークで生育抑制がみられなかった 15 種類のうち、電気泳動で 24 塩基が含まれていると判断した 11 種類のシークエンス解析を行った。生育抑制の強さと

ランダム塩基配列を確認したところ、シングルコロニーアイソレーションで–と+以上ではグアニン塩基（G）の数に優位な違いがみられた。このことから、ランダムな24塩基（N24）の中にグアニン塩基（G）が多く含まれていると生育抑制が強くなるのではないかと推測された。

ストリークで生育抑制がみられた 52 種類とストリークで生育抑制がみられなかった15種類のうち、電気泳動で24塩基が含まれていると判断した11種類を用いてさらに実験を行った。pMKN104-no insert と 63 種類の N24 を用いて、増殖曲線による生育抑制の強さを調べた（表 1、図 2）。シングルコロニーアイソレーションでみられた生育抑制の強さに比例して増殖曲線の生育抑制の強さがみられた。

表 1：生育阻害効果とランダム配列の塩基配列

strain	生育抑制	塩基配列
pMKN104-no insert/TOP10		
pMKN104-N24-5/TOP10	+++	TCGGCGCTGGGGGGAGCTATATTTG
pMKN104-N24-29/TOP10	+++	CTATTCCTGGTTAGCTATACAGTC
pMKN104-N24-35/TOP10	+++	AACGATCCTAGGGGGGGGGGTTAT
pMKN104-N24-9/TOP10	++	CAACGTTTAGAGAGGTTCCTTTGG
pMKN104-N24-10/TOP10	++	ACTTCGATGGGGGGCTTCAGTTTG
pMKN104-N24-11/TOP10	++	TTTACCTCGGGACCTTTGGGTCAT
pMKN104-N24-12/TOP10	++	GTTAGGGGAGCAGGATTAGGAGCG
pMKN104-N24-25/TOP10	++	GGAATGGGGTTCAGTGGGAATTTT
pMKN104-N24-27/TOP10	++	ATGTGTCGGATCAGTACTTTTTGT
pMKN104-N24-30/TOP10	++	GGCGTTCTATAGGAGGGGCAGTTG
pMKN104-N24-31/TOP10	++	GGTCTTCAGGACCATCGGTGGTGG
pMKN104-N24-38/TOP10	++	TCACTATCGACGGAGGCTATTATA
pMKN104-N24-39/TOP10	++	ATAGCGGGGGAGGGTGCGTATTGT
pMKN104-N24-53/TOP10	–	GTCCTTAGTGTATCCACTATTTCA
pMKN104-N24-56/TOP10	–	CTAACTGGCAACTTGGTTGTCGGC
pMKN104-N24-57/TOP10	–	TGTATCCAAGGTCGACTTTCTCAT
pMKN104-N24-58/TOP10	–	GTAGGCCTTGTAGGTTTTTTTTCG
pMKN104-N24-60/TOP10	–	TCAATCGTCTTTCTTTCGAGCACA
pMKN104-N24-61/TOP10	–	TGTTCAACTCAGACTTTATTAGGT
pMKN104-N24-62/TOP10	–	CTCTTTGTGCTTGTCCTGACAAAT
pMKN104-N24-64/TOP10	–	TTTTTTCTTGCATCCGAGTCCTTT
pMKN104-N24-65/TOP10	–	ATCCTTCGATGCCTCGACTCGTC
pMKN104-N24-66/TOP10	–	GTAGCCCTAGTCTATCGGCCTGTT
pMKN104-N24-67/TOP10	–	TGACTACTAATGCACCGCGCGATA

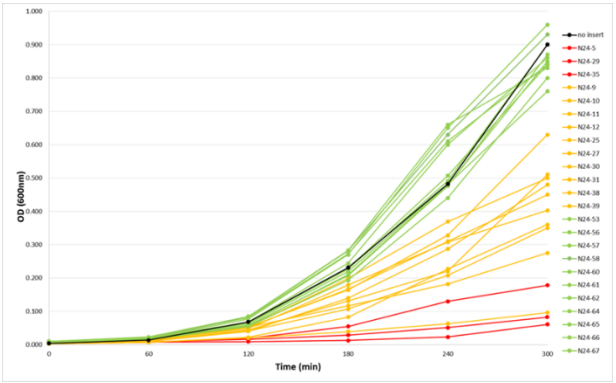


図 2：増殖曲線による生育阻害効果の比較

大腸菌株以外でも、今回最も生育阻害効果の強かった pMKN104-N24-5 から転写された RNA による生育阻害が起きるかを調べるために、サルモネラ菌株を形質転換して確認した。増殖曲線により pMKN104-N24-5 では、サルモネラ菌株でも生育抑制がみられた。このことから、大腸菌株やサルモネラ菌株による菌株特有の生育抑制ではないことが確認でき、プラスミド pMKN104-N24-5 による効果だと考えられた。

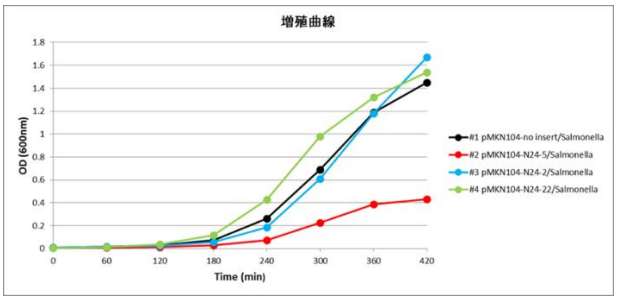
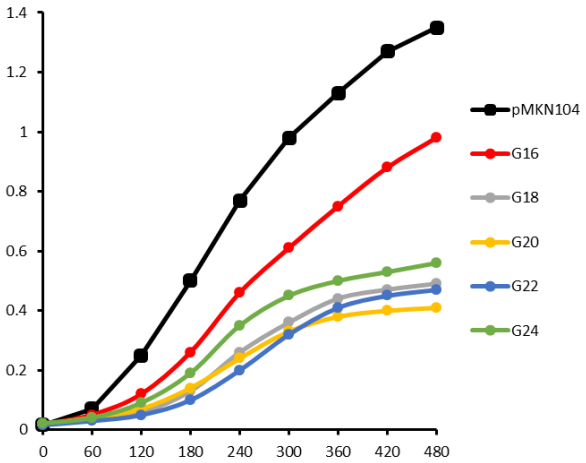


図 3：サルモネラ菌における生育抑制効果

生育阻害効果を示すランダム配列中に G 配列が優位に多く含まれていたことから、G が 16 回～24 回連続した配列を含む pMKN104 を作製して生育阻害効果を調べた。その結果、連続した G 配列を含む RNA によって生育阻害が生じることが明らかになった。特に、G が 20 回連続したものが最も強い生育抑制効果を示した[5]。



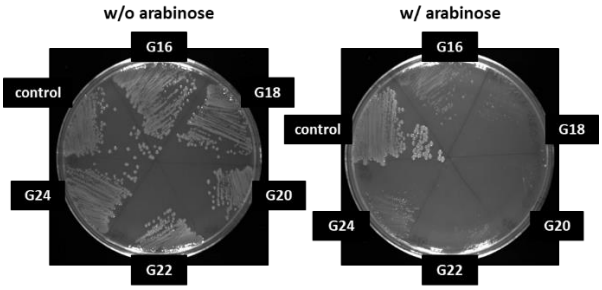


図 4：G の連続配列 RNA 発現による生育阻害効果

ファージミドを用いてファージアッセイを行ったところ、*rplN* mRNA に対する asRNA を発現する pMKN104-ArplNU と、ランダム配列のスクリーニングによって得られた pMKN104-N24-5 において強い生育阻害がみられた。アラビノース存在下において、pMKN104-ArplNU ではコロニー数が約 0.19%に、pMKN104-N24-5 では約 0.04%に減少した（図 5）。この結果から、これらの pMKN104 ファージミド保持ファージの感染によって細胞内にこれら遺伝子が導入され、アラビノースによって誘導された RNA により、大腸菌に生育阻害を引き起こしたと考えられる。

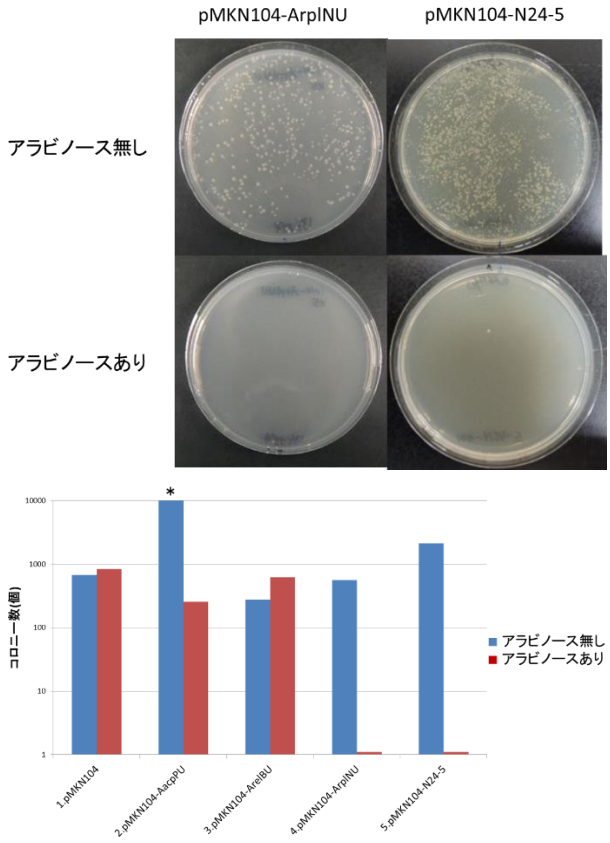


図 5：ファージミド感染による生育抑制効果

以上の結果から、G 配列を多く含む RNA を発現するファージミド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、多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、新規の多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アンチセンス RNA を同定することもできた（投稿準備中）。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。

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。

5. 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)

[5]. Kawano M, Morohashi S, Oda K, Ishikawa M, Fujita S, Saito M. Artificial small RNA-mediated growth inhibition in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Biochem Biophys Res Commun. 521(3):577-583 (2020)

新規ゲノム編集法によるアルポート症候群モデルラット作製と病態解析

重井医学研究所分子遺伝部門

古家野　孝行

家族遺伝性の腎疾患であるアルポート症候群は、根本的な治療法が存在せず、創薬の基盤となる分子レベルでの病態の理解は進んでいない。その要因の一つとして、有用な研究モデル動物が存在しないことが挙げられる。近年のゲノム編集技術の爆発的な進歩により、動物個体における遺伝子操作は、以前に比べ容易になってきている。しかしながら、依然として、高度な技術や知識を要するのが現状である。本研究では、簡便なゲノム編集個体作製法である GONAD 法（Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery）を基盤とし、新たなゲノム操作法の確立を目指し、検討を行った。さらに、rGONAD 法を用いて、新規アルポートモデルラットの作製に成功した。本モデルラットは、タンパク尿の増加、腎臓の糸球体の構造異常など、アルポート症候群の患者で診られる所見に非常に類似した表現型を示した。新規モデルラットはアルポート症候群の発症の分子機構の解明に非常に有用であると考えられ、今後の研究の発展が期待される。

【はじめに】

慢性腎臓病は新たな国民病とも言われるほど、患者数が増加傾向にある。遺伝性腎疾患の一つ、アルポート症候群（以下、アルポート）は国の難病指定を受けている。患者の多くは末期腎不全に至り、透析治療が必要となる家族遺伝性疾患である。腎臓の基底膜を構成するⅣ型コラーゲンの変異、特に X 染色体上にコードされた Col4α5 に変異に起因する。原因遺伝子は同定されているが、有用なモデル動物が存在せず、治療の基盤となる病態進行の分子メカニズムは不明である。研究の進展を遅らせている要因の一つとして、有用な病態モデル動物が存在せず、解析が困難であることが挙げられる。

近年の CRISPR/Cas9 に代表される、ゲノム編集技術の発展は目覚しい。特に、マウスやラットのようなモデル動物においては、効率的に遺伝子破壊や任意配列の挿入が可能となり、分子生物学および遺伝学的な基礎研究において必要不可欠な研究ツールとなっている。また、疾患の原因遺伝子の同定や疾患モデル動物の作製、さらには、直接的な治療に向けた研究など、医薬、創薬研究においても中心的な存在である。しかし一方で、動物個体における実際の実験過程においては、ES 細胞や受精卵の生体外での取り扱いが必須であり、熟練の技術、高額な実験器具が必要である。より簡便で、効率的な動物個体における遺伝子改変技術は、動物を用いた幅広い研究分野に求められている。われわれはこれまでに、マウスにおいて受精卵を体内から取り出すことなく、生体外での操作を必要としないゲノム編集動物作製法、*i*-GONAD 法（improved-Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery）を開発している[1]。さらに、本技術を応用し、受精卵の取り扱いが困難な動物種であるラットにおいても有用であることを見出し、rGONAD 法（Rat *i*-GONAD）を開発した[2]。しかしながら、現在の方法では、数十塩基の短い配列しか挿入することができず、分子生物学的な研究分野で幅広く利用されている蛍光タンパク（GFP など）や Cre-LoxP システムなど長い配列を挿入することは困難である。

本研究では、より簡便で高効率な新規ゲノム編集法の開発に取り組むと共に、新規アルポートモデルラットを作製し、その病態の解析を行った。

【方法】

1．　動物

動物は 12：12-h の明暗時間で飼育した。ICR マウスを用いて実験条件の検討を行った。基本的には *i*-GONAD 法の条件に従い行った[1]。WKY ラットを用いて、*clo4a5* ノックアウトラットを作製した。基本的な条件は、rGONAD 法に従い行った[2]。目

的の遺伝子改変の確認はゲノム PCR と DNA シークエンスにより行った。

２．　免疫染色

採取した腎臓は 5μm の厚さで凍結切片を作製した。サンプルをアセトンで室温、10 分の条件において固定した。5%血清/TBST で 30 分間室温でブロッキングし、一次抗体と反応させた。その後、Alexa Fluor 標識された二次抗体と反応させ、共焦点顕微鏡（オリンパス、FV1200）を用いて観察した。

３．　尿検査

採尿ケージにラットを入れ、16 時間畜尿し、尿中のタンパク量を、スルホサリチル酸法により測定した。

【結果】

１．新規ゲノム編集法開発に向けた試み

我々が開発した GONAD 法を基に、より簡便に効率的に長鎖 DNA をゲノム上に挿入できる方法に取り組んだ（図１）。飼育の容易さや産子数を考え、初めに ICR マウスを用いて検討を行った。これまでに、20 塩基の配列の挿入に成功している遺伝子座[3]への GFP の挿入を試みた。DNA の状態を一本鎖 DNA や PCR 産物等へと変更しながら実験を試みたが、最適な条件は見いだせなかった。また、インジェクションのタイミングを変更（E0.7、1.5 等）し、受精卵の状況における影響を考慮しながら実験を繰り返したが、完全長をノックインできる条件は本期間中には見いだせなかった。

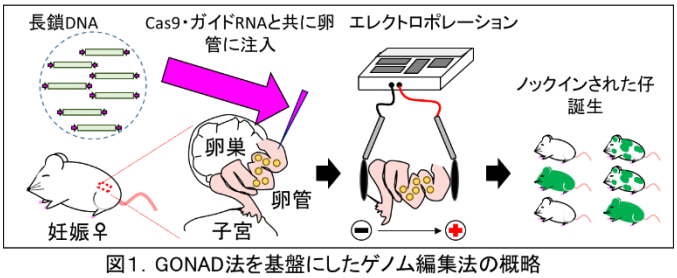


図1. GONAD法を基盤にしたゲノム編集法の概略

２．新規アルポートモデルラットの病態解析

これまで、アルポートのモデルとしてマウスが主に使用されてきた[4]。しかし、体の大きさが小さく、尿量が少ないため、尿検査によるタンパク尿の測定が困難であった。我々は、詳細なメカニズムの解明のため、体のサイズが大きく、より尿検査や血液検査など生理検査の行いやすい、ラットにおけるモデルの創出を試みた。ラットにおいては、ゲノム操作が困難であったため、アルポートのモデルとしては利用されていない。我々が開発した rGONAD 法[2]によって、X 染色体上に存在する *Col4a5* 遺伝子の開始コドン後に、停止コドンが組み込まれるように鋳型 DNA を調整し、*col4a5* ノックアウトラットを作製した。まず、HE 染色によって、腎臓の形態を観察したところ、糸球体および尿細管の構造異常が見られた（図１）。次に、Ⅳ型コラーゲンのたんぱく質としての挙動を免疫染色によって確かめた。野生型のラットの腎臓においては、Ⅳ型コラーゲンは、糸球体基底膜に存在するが、*col4a5* ノックアウトラットにおいては、その局在が失われ、さらに、糸球体の構造も明らかに異常であった（図２）。さらに、*col4a5* 変異による尿中タンパク量の顕著な増加が見られた（図３）。以上の結果より、*col4a5* ノックアウトラットにより、ヒトのアルポートと同様な症状が見られ、新たな疾患モデルの作製に成功した。

【考察】

長鎖塩基配列を簡便にゲノム編集可能な新技術の確立を目指し研究を行った。残念ながら、本研究期間での確立には至らなかった。しかし、部分的な配列の取り込みが確認できるなど改善は見られた。相同配列の工夫や、安定的に DNA を核内へ取り込ませるための条件をさらに模索する必要がある。今後も研究を継続し、新規ゲノム編集法を確立していきたい。また、本研究では、これまでのゲノム編集技術（rGONAD 法）を利用し、*col4a5* ノックアウトラットを作製した。作製したノックアウトラットはアルポートの患者に診られる、顕著なたんぱく尿の増加、糸球体構造の異常が確認された。これらの結果は、ノックアウトラットがアルポートの有用なモデル動物となりうることを示している。今後、この *col4a5* ノックアウトラットを用いて、疾患の分子基盤を明らかにし、治療薬探索など、ヒトの治療への応用を模索していきたい。

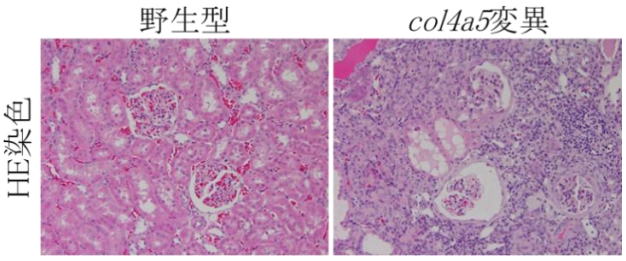


図2. *col4a5*変異体の腎臓形態

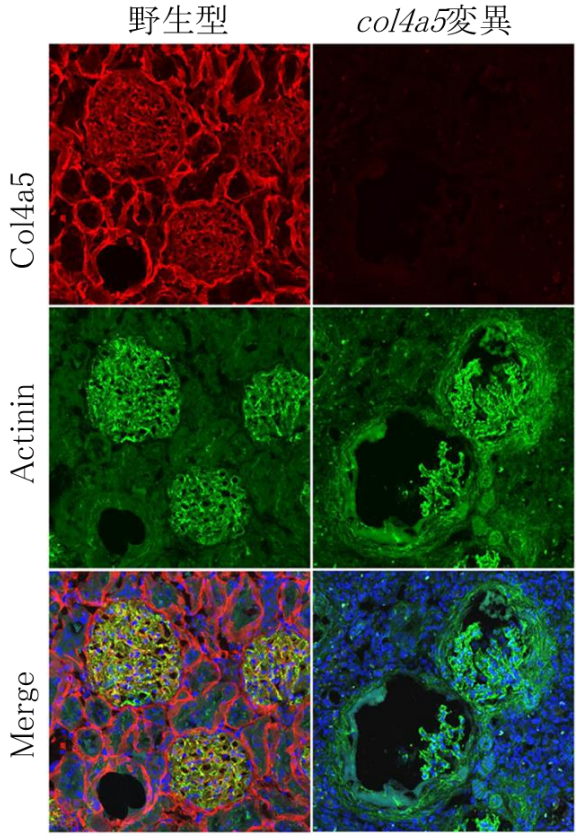


図3. Col4a5抗体による免疫染色

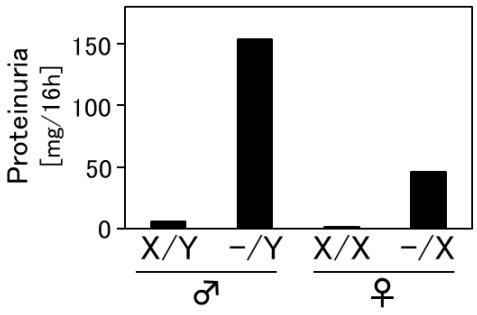


図4. 尿中タンパク量の測定

【謝辞】

本研究遂行にあたり、公益財団法人ウエスコ学術振興財団に研究助成を賜り、深く感謝いたします。

【参考文献】

1. Ohtsuka M, Sato M, Miura H, Takabayashi S, Matsuyama M, Koyano T, Arifin N, Nakamura S, Wada K, Gurumurthy CB: **i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases.** *Genome Biol* 2018, **19**(1):25.
2. Kobayashi T, Namba M, Koyano T, Fukushima M, Sato M, Ohtsuka M, Matsuyama M: **Successful production of genome-edited rats by the rGONAD method.** *BMC Biotechnol* 2018, **18**(1):19.
3. Koyano T, Namba M, Kobayashi T, Nakakuni K, Nakano D, Fukushima M, Nishiyama A, Matsuyama M: **The p21 dependent G2 arrest of the cell cycle in epithelial tubular cells links to the early stage of renal fibrosis.** *Sci Rep* 2019, **9**(1):12059.
4. Rheault MN, Kren SM, Thielen BK, Mesa HA, Crosson JT, Thomas W, Sado Y, Kashtan CE, Segal Y: **Mouse model of X-linked Alport syndrome.** *J Am Soc Nephrol* 2004, **15**(6):1466-1474.

令和元年度　海外渡航報告書

岡山大学大学院　環境生命科学研究科

本田　恭子

●渡航目的と渡航先，日程

第 83 回アメリカ農村社会学会（Rural Sociological Society）年次大会での研究発表のため，2019 年 8 月 7 日から 11 日にかけて，アメリカ合衆国（以下，「アメリカ」とする）バージニア州リッチモンド市に渡航した。

●研究発表のタイトルおよび概要

タイトル　Energizing communities by buildings partnerships with external actors:
Case studies of small-scale hydropower projects in Japan
（外部アクターとの連携で築くコミュニティ主体のエネルギー：日本の小水力発電プロジェクトの事例）

概要　再生可能エネルギー（以下，「再エネ」とする）の中でも水力発電の歴史は古く，1960 年初頭までは日本の電力供給の主力を担っていた。中国地方では，1950～60 年代に小水力発電所（出力 1,000kW 以下の水力発電所）の建設が盛んになったが，これらは農村が主導して建設され，発電収益は地域振興に使われてきた。

本報告では，これら中国地方の小水力発電の事業者のうち，電化農業協同組合（以下，「電化農協」とする）に焦点をあてている。電化農協は発電事業を行うために農家が出資・設立した協同組合であり，近年，欧米で提唱されているコミュニティ・エネルギー（地域主導・地域貢献型の再エネ）の理念を体現した組織である。本報告では，電化農協の設立経緯と地域とのかかわり，近年の動向を整理することにより，コミュニティが主体となって小水力発電を導入する上で重要な条件を検討した。

中国地方には電化農協が 6 事業者存在する（鳥取県 4 事業者，広島県 2 事業者）。このうち鳥取県の事業者（A～D）と関連団体（鳥取県小水力発電協会）に対して，2017 年 8 月～11 月に聞き取り調査を行った。

その結果，事業者間で，発電所に対する住民の認識と地域との関係，地域への収益還元の程度が異なっていた。また，2012 年の固定価格買取制度成立以降，中国地方の小水力発電の大多数が発電設備を改修していたが，資金力に乏しい電化農協の多くは設備改修ができなかった。そこで，地域外の企業と連携し，発電施設を改修する電化農協が出現している。

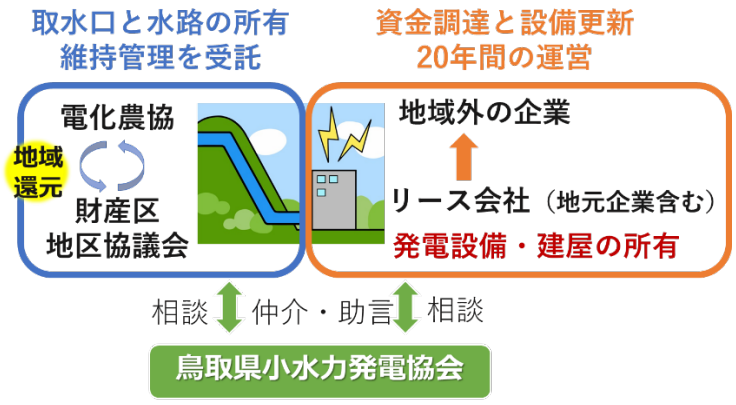


図 1　発電所改修にかかる事業者・地域と地域外の企業の連携

図1のとおり，地域外の会社が資金調達と設備更新，改修後20年間の運営を行うかわりに，電化農協は水利施設の維持管理を受託し，受託料から地域還元を行う。農村部では人口減少と高齢化が著しく，住民だけで小水力発電所にかかる資金を調達し専門知識を習得することは難しい。しかし，長年地域に住み，天候や地形に詳しい住民は，発電用水や水利施設の管理を担うことができる。本報告で取り上げた事例のように，農村住民と外部アクターが共に利益を得られるような事業スキームを構築することによって，地域貢献型の再エネが普及することが期待される。また，コミュニティが外部アクターと連携する際には，発電事業や土木工事などについての専門知識を持つ第三者の仲介が重要であることが指摘できる。

●大会印象記

今年度のアメリカ農村社会学会年次大会は，ケンタッキー大学のKeiko Tanaka教授が会長を務めていることから，Tanaka教授と交流の深い日本人研究者が多く参加した。

報告者の渡航の主要な目的は，アメリカの研究者との交流である。報告者の研究対象である中国地方の小水力発電所の多くは，農山漁村電気導入促進法がきっかけとなって建設されたが，この法律はアメリカの類似の制度が基となっている。アメリカでは，電力供給のために住民が協同組合を設立する事例が多く，これらに関する論文も公表されている。そこで，更なる研究発展に向けて，現地の研究者と交流したいと考えた。

今年度の大会では，再エネに関するセッションが設けられていた。アメリカの再エネは太陽光発電と風力発電が中心であり，特に風力発電は地理的条件から中西部に多く分布する。セッションでは，景観への悪影響が懸念される事例の存在や，風力発電の分布とマイノリティ（ヒスパニック系住民）の居住地域との関連性が報告されていた。アメリカでは，再エネをいかに普及するかではなく，再エネが一定程度普及している状況をふまえて，どのような普及が望ましいかを具体的に議論する段階に入っていることを実感した。セッションの報告者と再エネに対する欧米と日本の現状の違いについて意見交換を行い，セッション後には英文雑誌への投稿のコツなども教わり，英文雑誌への投稿を強く勧められた。再エネと一口に言っても，水力発電と風力発電では事情が異なり，制度の異なる国の間での単純な比較は難しい。しかし，日本の事例に対する海外のニーズは想像以上に高いことを感じたため，国際学会での研究発表や英文雑誌への投稿を通じて，海外の研究者との交流を続けたい。

平成 31 年度　海外渡航報告書

岡山大学資源植物科学研究所

佐藤　有希代

（概要）第 38 回米国ウイルス学会議 (ASV2019) に参加し，研究発表を行った．本会議は，American Society for Virology (アメリカウイルス学会) が主催する，ウイルス学関連で最大クラスの国際学会である．例年 1000 人以上の参加が見られる．本年度の会議は，2019 年 7 月 20 日から 24 日にかけて，アメリカ合衆国ミネソタ州ミネアポリスのミネソタ大学 (図 1) において開催された．本年度には，561 題の口頭発表，406 題のポスター発表，ならびに，基調講演を含む 21 題の招待講演が催された．例年通り，動物感染性ウイルスを主として，植物・菌類・細菌ウイルスなど，多様なウイルス各々を研究対象とする学者・学生が一堂に会していた．私は，自身の菌類ウイルス研究に関する口頭発表を行うとともに，様々なウイルスに関する最先端の知見・研究技術の情報を収集した．

■日程

7 月 19 日	移動 (岡山→羽田→ミネアポリス)
7 月 20-24 日	ASV2019 における自身の研究発表，聴講による情報収集
7 月 25-26 日	移動 (ミネアポリス→羽田→岡山)

■研究発表と議論の内容

私は，“Virus Discovery (ウイルスの発見)”というセッションにおいて，“Characterization of a novel fungal polymycovirus with a potential neo-lifestyle (新しい生活スタイルを持ち得る，新規の菌類ポリマイコウイルスの特徴解析)”という演題で，口頭発表を行った．本セッションは，動物ウイルスを主対象とした講演 7 題，植物ウイルスの講演 1 題，ならびに，自身の講演を含む菌類ウイルスの講演 2 題から構成されていた．このため本会場では，各宿主に感染するウイルスの研究者が集まり，宿主生物種の壁を越えた，ウイルスの普遍性を捉える議論が展開されていた．

私の発表では，RNA ウイルスの分化原理を探る上で有用な材料となり得る，新規の菌類ウイルスを単離したことを報告した．これは，私の所属する研究室とパキスタン国立科学技術大学・国立農業研究センターとの国際共同研究成果である．菌類ウイルスは，多細胞真核生物を宿主とするウイルスのモデル，ならびに，農作物の糸状菌病害をコントロールする手段として重要であると考えられている．そこで我々は，次世代シークエンサー技術を利用して，パキスタンの植物病原性糸状菌に感染している新規ウイルスをハイスループット探索した．その結果，*Fusarium oxysporum* (フザリウム萎凋病菌) から“ポリマイコウイルス (PmV)”の新規近縁種を単離した．PmV とは，新しいウイルス科として分類することが提唱されている，ウイルス学上極めてユニークな菌類ウイルスの系統群である． PmV は，3 つの RNA ウイルス大分類 [プラス鎖 RNA ウイルス (ノロウイルスなど)，マイナス鎖 RNA ウイルス (インフルエンザウイルスなど)，2 本鎖 RNA ウイルス (レオウイルスなど)] の境界に位置する謎多きウイルス群として知られている．現在までに，ゲノム RNA 分節が 4~8 本にわたる PmV 種が見つかっている．一方で，我々が単離した Fusarium oxysporum polymycovirus 1 (FoPmV1) は，少なくとも 11 分節のゲノム RNA を有していた．11 本というゲノム分節数は，乳幼児下痢症の原因等として知られるレオウイルス (9~12 分節) と並んで，既知の RNA ウイルスで最大クラスである．レオウイルスでは，全ゲノム分節が一つのウイルス粒子に包含されていることが知られている．一方で，汎用

法により FoPmV1 のウイルス粒子精製を試みたところ，FoPmV1 は，一般的なウイルス粒子画分とは全く異なる画分に分画された．すなわち，FoPmV1 は，典型的なウイルス粒子を形成しない可能性が考えられた．なぜ近縁 PmV 間で，これだけゲノム分節数が多様化しているのか? また，FoPmV1 は，典型的な粒子を持たずに，どのように 11 本もの分節ゲノムを維持しているのか? これらの疑問は，ウイルス学上普遍的に興味深い，今後の研究課題と捉えられる．実際に質疑応答において，動植物のウイルス学者の方々から，11 本のゲノム分節の必要性・細胞内局在や，ウイルス実体の詳細な性質について質問を頂いた．発表後には，質問をくださった方とさらに交流し，今後の具体的な解析方策について，議論を深めることができた．

また会期中に，Valerian Dolja 博士と夕食を共にし，濃密に議論を交わす機会を得た．Dolja 博士は，20 年以上前から，RNA ウイルスの大進化議論を世界的に牽引してきた存在である．近年には，バイオインフォマティクス技術を駆使して，全ての RNA ウイルス科を包括する分子系統樹を描くなど，網羅的かつ俯瞰的に RNA ウイルスについて熟知されている．そんな Dolja 博士に我々の研究成果を紹介したところ，非常に興味を持ってくださり，「原著論文として投稿する際には，ぜひ私を査読者に推薦してほしい」と言ってくださった．現在私は，本学術会議において発表した研究成果を，原著論文としてまとめる作業に取り掛かっている．Dolja 博士と具体的な約束を取りかわせたことは，本論文を推敲する上で大変有意義となるだろう．

■情報収集

5 日間にわたった本学術会議において，4 日目までは朝 8 時台から夜 22 時までにわたる終日，最終日には午前中いっぱいを通して，学術研究発表が行われた．午前中には，大講堂 (図 2) において全員が聴講するシンポジウム (招待講演) が催された．午後には，約 10 会場における同時並行での口頭発表や，大会場でのポスター発表が行われた．各発表では，次世代シークエンサーなどを用いる新たな解析手法を活用した研究が数多く見られた．研究対象となるウイルスや宿主こそ異なるものの，これらの解析技術の情報は，自身の研究を発展させる方策を考える上で大変参考になった．また，菌類ウイルスに限らず多様なウイルスの最新研究知見を聴講したことは，自身の研究に関する謎 (例えば，FoPmV1 は，どのように宿主の抗ウイルス免疫を免れているのかといった点) を紐解く仮説を思案するための好機となった．

■謝辞

以上のように，ウエスコ学術振興財団「海外渡航費助成」を賜り，渡航を支援していただいたことは，研究を進展させる契機となりました．ここに厚く御礼申し上げます．



図 1. 会場 (ミネソタ大学) の一景


図 2. シンポジウム会場前での撮影
(会場内は撮影禁止)

令和元年度　海外渡航報告書

岡山大学　自然生命科学研究支援センター

寺東　宏明

私は日頃の研究成果の発表と関連する研究の最新情報を入手するため、令和元年 8 月 25～29 日に英国マンチェスター市マンチェスター国際会議場（図 1）にて行われた第 16 回国際放射線学会（16th International Congress of Radiation Research：http://icrr2019manchester.com）に参加した。この学会は 4 年ごとに世界各国を巡回して行われる放射線関連研究では最大の国際学会である。今回の主要な日程は以下の通りである。

Sunday, August 25, 2019

Workshop 1: Xstrahl's SARRP user meeting

Workshop 2: Extracellular vesicles in mediating bystander and systemic RT effects

Plenary lecture 1: Bad Neighbours: the intersection of hypoxia and genetic instability within tumours

Monday, August 26, 2019

Plenary lecture 2: Metabolic dysregulation in radiation fibrosis

Workshop 3: Nanomedicine for Radiation Therapy and Beyond: State of the State and Opportunities Within Reach

Parallel sessions, poster session, and award lectures

Workshop 4: Radiation effect on CNS during infancy: Underlying mechanisms and implications on quality of life in adult and ageing

Tuesday, August 27, 2019

Parallel teaching sessions

Workshop 5: International symposium on chromosomal aberrations ISCA12

Parallel sessions and poster session

Plenary lecture 3: From Earth to Mars and back again: How the brain responds to clinical and deep space radiation exposure

Wednesday, August 28, 2019

Parallel teaching sessions

Parallel sessions, poster session, and award lectures

Workshop 6: Radiobiology meets radioecology: Evidence for transgenerational and "memory" effects after low doses of ionising radiation

Plenary lecture 4: Cancer risks from radiation: Oncogenic mutation theories may not apply when human epidemiology data is compared to animal data

Workshop 7: Molecular and clinical aspects of individual radiosensitivity

Thursday, August 29, 2019

Parallel sessions

ICRR 2023 & Congress close

私は全日程に参加し、ポスターセッションにて以下 2 題の研究発表を行った。

① Terato H, Tokuyama Y, Mori K, Yasuda H, Yields of DNA damage in the cells irradiated with low dose rate gamma-rays.

② Kataoka T, Kanzaki N, Sakoda A, Ishida T, Tanaka H, Hanamoto K, Terato H, Mitsunobu F, Yamaoka K, Basic study on suppression effects of active oxygen diseases by radon inhalation and its mechanism.

①は私の主たる研究成果で、低線量放射線の生物影響を DNA 損傷生成の観点から解析したものである（図 2）。現在、100 mGy 以下の低線量域における放射線影響が実際に存在するかどうかが放射線生物学の分野でホットなトピックとなっており、日本でも福島原発事故の周辺地域における低線量被ばくの可能性から興味が持たれている分野である。私は、広島大学原爆放射線医科学研究所に設置された低線量率ガンマ線照射装置を用いた細胞照射実験により、低線量域においても DNA 損傷は発生していること、また、DNA 修復活性の有無によって生物影響が変化することを報告した。②は共同研究者として参画している研究テーマで、ラドンの生物影響において活性酸素の発生が関与していることを明らかにしたものである。

他の講演のトピックとしては、近年、新たながん治療手法として期待されている重粒子放射線の生物影響を長年研究してきた Prof. Penny Jeggo（UK）の ARR Weiss Medal 受賞講演、放射線特異的な DNA 損傷形態であるクラスターDNA 損傷（損傷のクラスター、すなわち局在する複数損傷の集団）の著名な研究者である Prof. Markus Löbrich の The Bacq and Alexander Award 受賞講演が興味深いものであった。特に、後者に関してはクラスター DNA 損傷の一形態である DNA 二本鎖切断（DSB：Double Strand Break）のクラスター発生（クラスターDSB）の概念について新しい知見が示された。また、中村典博士（放射線影響研究所）が 4 日目の Plenary lecture 4 にて講演を行ったが、原爆被爆者の晩発効果（主として放射線発がん）の発生機構が、巷間言われている DNA 損傷由来の遺伝子変異ではなく老化促進ではないかというユニークな理論を公表して興味深い議論が戦わされたことが印象に残った（図 3）。会場では他の参加者の研究発表の閲覧と質問、情報交換を多数行ない、今回の学会発表参加は私の研究の今後の発展に極めて有意義であった。今後はこの学会参加で得た情報やサジェッションを糧により一層研究に邁進し、放射線生物学の発展に寄与したいと考えるものである。最後に、本学会参加をご支援いただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に感謝申し上げる。

今回の行程：

8 月 24 日：岡山→（JR 山陽新幹線・関空特急）→関西空港→（フィンエアーAY078 便）→ヘルシンキ空港→（フィンエアーAY1365 便）→マンチェスター空港→ブリタニアホテルマンチェスター（5 泊）

8 月 25～28 日：学会参加

8 月 29 日：学会参加→マンチェスター空港→（フィンエアーAY1366 便）→ヘルシンキ空港

8 月 30 日：ヘルシンキ空港→（フィンエアーAY067 便）→関西空港→（JR 関空特急・山陽新幹線）→岡山



図 1：マンチェスター国際会議場

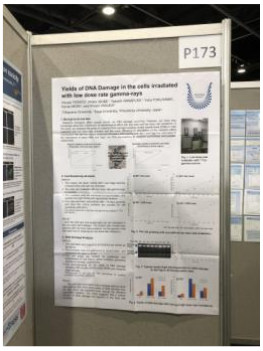


図 2：ポスター発表



図 3：講演会場風景

平成３１年度　海外渡航報告書

（所　属）就実大学　薬学部　薬学科

（氏　名）山田　陽一

アメリカ微生物学会（American Society for Microbiology（ASM））の総会である ASM microbe 2019 に参加し、研究発表、意見交換を行った。

ASM は世界中に 50000 人を超える会員を有しており、ASM microbe は微生物分野における世界で最大の総会となる。ASM microbe 2019 では微生物に関する発表（口頭、ポスター）、レクチャー、ショートプレゼンテーション、ディスカッションなどが行われた。また、その内容は Antimicrobial Agents and Resistance, Applied and Environmental Science, Clinical Infections and Vaccines, Clinical and Public Health Microbiology, Ecology, Evolution and Biodiversity, Host-Microbe Biology, Molecular Biology and Physiology, Profession of Microbiology など多岐にわたった。50 の meeting、850 の symposium、200 の workshops、3000 のポスター発表など、大規模であった。

私は Applied and Environmental Science の領域において「Anti-microbial and Anti-biofilm Effect of Underwater Electric Discharge (UED)」と題して、新規殺菌・消毒法に関するポスター発表を行ってきた。微生物による食品・環境汚染や感染症は重大な問題であり、簡単で便利な殺菌・消毒法の開発が望まれている。そこで、本発表では近年開発された「水中放電(UED)」の微生物（細菌、真菌）に対する殺菌効果、バイオフィルム除去効果を、水中放電水で長時間（20 時間程度）と直接放電で短時間（数分程度）の 2 条件において評価を行った。その結果、水中放電水では過酸化水素水と同等、直接放電ではさらに強力な殺菌作用が示された。この結果より、水中放電では殺菌成分として過酸化水素とヒドロキシラジカルの 2 種類が生成されると考えられた。さらに微生物（細菌、真菌）の物体表面への定着に関与する粘性物質であるバイオフィルムの除去効果は、数十分の直接放電で約 80%程度であることを示した。バイオフィルムは強固な構造体のため除去が困難であり、この結果は説明を聞きに来た人々を驚かせた。大学、企業、雑誌関係などの多くの先生方に興味を持っていただき、様々な質問を受けることで、有用なディスカッションが行えた。また、今後の研究の方向性を考える上でも非常に有益であった。

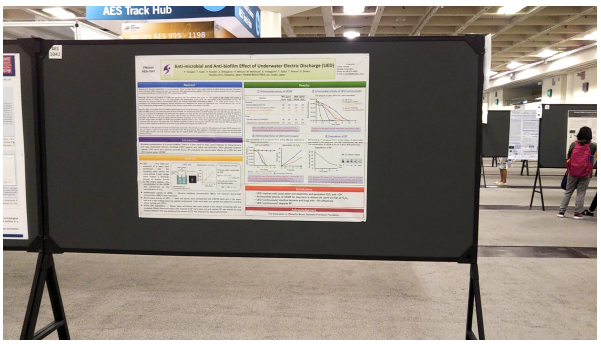


図 1.　発表ポスター

以下に ASM microbe 2019 の情報を記載する。

主催団体；American Society for Microbiology

後援企業；Astellas, Qiagen, Biofire, Roche, T2 Biosystems, ATCC, HOLOGIC, BD, Luminex など

日程；2019/6/20 ～ 2019/6/24

発表分野；Antimicrobial Agents and Resistance, Applied and Environmental Science, Clinical Infections and Vaccines, Clinical and Public Health Microbiology, Ecology, Evolution and Biodiversity, Host-Microbe Biology, Molecular Biology and Physiology, Profession of Microbiology

会場；Moscone Center, 747 Howard Street, 5th Flr. at the corner of Third & Howard streets San Francisco, CA 94103, USA

プログラム；

6/20 Courses and Workshops, Sessions, Industry & Science Events

6/21 Meet the Experts, Poster Presentations, Industry & Science Showcases, Tech Talks, Symposia/Concurrent Sessions

6/22 Meet the Experts, Poster Presentations, Industry & Science Showcases, Tech Talks, Symposia/Concurrent Sessions, President’s Forum



図 2.　会場の様子

6/23 Symposia, Poster Presentations, Industry & Science Showcases, Tech Talks, Symposia/Concurrent Sessions, Keynote

6/24 Meet the Experts, Symposia

最後に、本発表の渡航にあたり、海外渡航費助成費金を賜り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。

令和元年度　海外渡航報告書

川崎医療福祉大学

三田　岳彦

参加学会名：The World Congress of the International Association for the Scientific Study of Intellectual and Developmental Disabilities, 2019

会場：スコットランドエキシビション&カンファレンスセンター(SEC) (Exhibition Way, Glasgow G3 8YW UK)
期間：2019年8月5日（月）～8月10日（土）(6日間)

発表概要

演題：　Annual trend of the number of people with disabilities in Japan
発表者：　Takehiko Mita
要約：　我が国の約2,400人の国勢調査対象地域に居住する在宅障害者の2016年までのデータを用いて身体的および知的/発達障害のある人々の年次傾向および特徴を明らかにすることを目的とした。身体障害のある人の数は512,000人（1951年）から4,287,000人（2016年）に増加した（そのうちの約73%が65歳以上)。これらはこの期間の高齢化率の推移と相関している。知的障害および発達障害のある人々の数は、284,000人(1990年)から962,000人（2016年）に増加した（そのうちの約83%が65歳未満)。身体障害者数の増加は、主に日本における高齢者の増加によるものである。知的障害および発達障害のある人の増加は、主に発達障害者支援法（2005年）およびDSM 5の公表による診断基準の変更によるものと推察される。なお、発達障害者支援法にはトゥレット症候群や吃音（症）も含まれていることも注目すべき点である。

得られた知見

8月8日（木）の12:30～14:00まで、Poster Session 3: Comparative Policy and Practice, Profound Intellectual and Multiple Disabilities, Diverse Topicsにおいて発表をおこない、チリ、スエーデン、スコットランド、日本からの参加者と議論することができた。主な意見とコメントは以下のとおり。
■チリにいておいても障害者統計は正確さを欠いており、とくにsocial psychological disability(社会心理学的な障害）が増えてきているものの社会サービスが行き届いていないということであった。ICF（国際生活機能分類）の必要性についても指摘していた。
■スエーデンでは、加齢に伴う障害者の増加は日本と同じ傾向だが、自閉症をもつ人の数は近年減少傾向ということであった。また、障害をもつ子供の家族への支援の重要性を指摘していた。また、スエーデンにおいては障害福祉サービスの受給資格認定のプロセスに心理士の関与が強くあることも印象的であった。



写真1. 他国研究者とポスターセッションにて

まとめ

我が国の障害者統計をより正確なものにするには現行の障害者手帳に拠らない国際的な基準を導入すべきである。とくに発達障害者の診断およびサービス支給決定には心理士の関与が必要である。医師のみによる診断が過剰診断および誤診断を助長するかもしれない。

謝辞

本研究発表および渡航について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心より感謝申しあげます。

令和元年度　海外渡航報告書

川崎医療福祉大学　医療技術学部

矢納　陽

１．はじめに

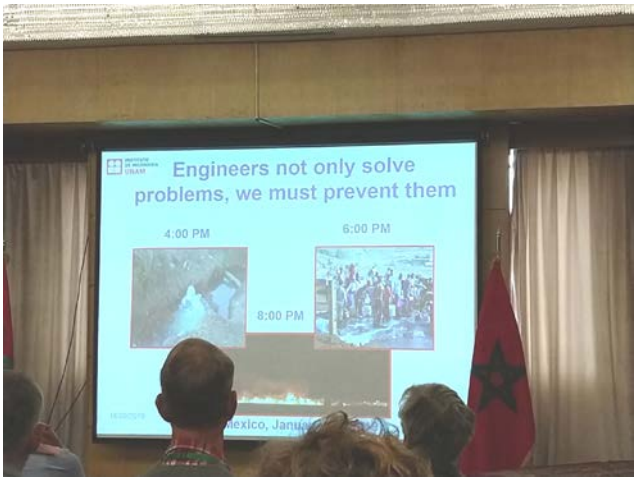
このたび，本助成事業により国際会議にて研究発表する機会を与えていただきました．貴重な経験をすることができ，大変うれしく思います．本当にありがとうございました．以下では，国際会議への参加および発表に関する報告を記します．

２．国際会議の概要

国際会議名　4th International Conference on Control and Fault-Tolerant Systems (SysTol'19)
渡航先　カサブランカ（モロッコ）
期間　2019年9月18日～9月20日
主催団体　SysTol Association

本会議は2010年にフランスで初開催された．その後，同国（2013年），スペイン（2016年）での開催を経て，今回の開催に至っている．今回の会議ではおよそ30の国と地域から論文が投稿され，その件数は100件であった．このうち掲載された論文数は70件とのことである．また，すべての論文に2名以上の査読者が割り当てられていた．著者の国別内訳はフランス，イタリア，ポルトガル，ドイツ，スペイン，イギリス，フィンランド，デンマークなどヨーロッパ諸国だけでなく，開催国のモロッコやトルコ，カタール，ロシア，ルーマニア，さらにメキシコやアルゼンチンといった国々からの参加もあった．日本以外のアジアの国では中国やインドからの発表があった．



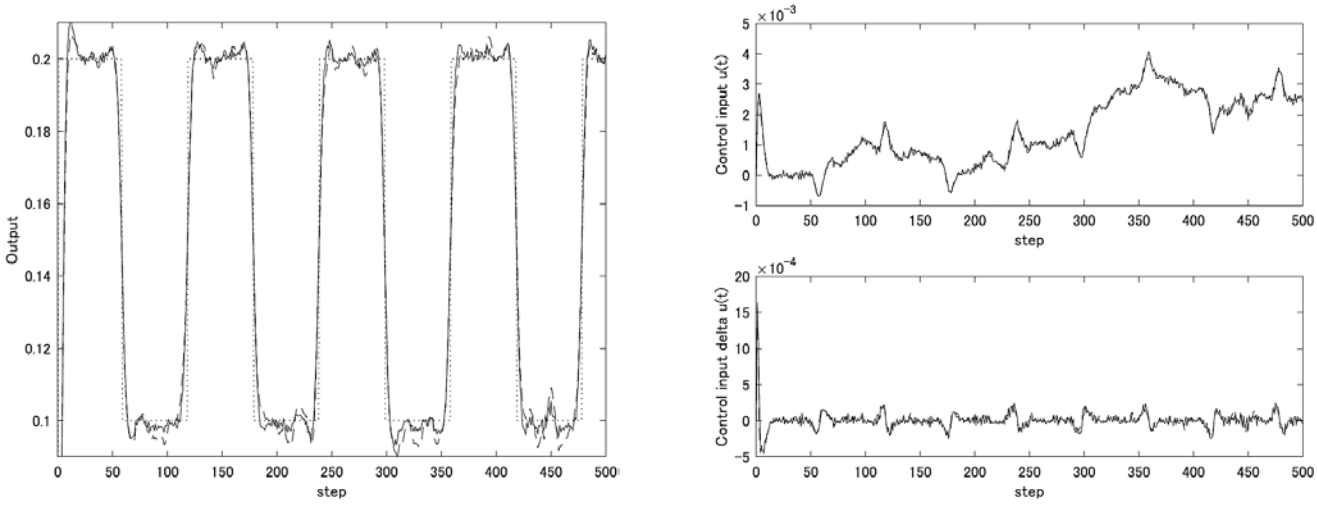


会議の様子（左：オープニングセレモニー．右：基調講演）

３．研究発表の内容ならびに他の研究等について

会議3日目に，Control Design（制御設計）というセッションにて「A Study on Extension of Self-Tuning Generalized Predictive Control（セルフチューニング一般化予測制御法の一検討）」という演題の発表を行った．発表の際，(1)新たに設計パラメータを導入するとノイズが低減できる理由や(2)制御則に導入した新しい

信号を発見的に見つけられた理由について質問を受けた．これに対し，(1)新しく導入した設計パラメータはノイズと出力に関する伝達関数に現れる．したがって，このパラメータを適切に設計することができれば，数値例のように出力に現れるノイズの影響を小さくできることや(2)これまで行ってきた既約分解表現を利用して制御則を拡張する研究に基づき，それを用いなくても同じような制御則の表現が得られるのではないかと考えた結果，今回の信号を提案したと回答した．さらに，下水道の氾濫を制御する手法の比較に関する発表について意見交換を行った．具体的には，制御手法の計算時間がどの手法もそれほど大きくないにも関わらず，当該発表で比較した意味について質問を行ったところ，下水道のネットワークがより複雑になると計算時間に顕著な違いが現れるという回答を得た．さらに「Fault Resilient Control of Collaborative Unmanned Aerial Systems」という基調講演で協調型無人航空機システムの故障回復制御に関する紹介がなされた．具体的には，故障した無人航空機が受け持っていた監視領域を他の無人航空機にカバーさせるためにボロノイ図を利用するというものであった．また，トルコやロシアから参加した研究者らと昼食を共にする機会があり，簡単ではあるがトルコでの研究職に関する状況を教えていただいた．



数値例（左：提案法（実線）の制御量は従来法（破線）よりも制御結果のばらつきを抑えられる．右：制御入力）

４．おわりに

本助成事業のおかげで研究発表をすることができました．重ねてお礼申し上げます．自分の研究発表だけでなく，他の研究も聴講でき，大変良い刺激を与えられました．今後も自分の研究領域を掘り下げるだけでなく，他領域との融合も踏まえて，地域の発展に寄与できる研究の推進を目指していきたいと思います．ありがとうございました．

以上