令和３年度研究費助成　研究成果報告書集

研究成果報告書　目次

■ 悪性神経膠腫に対する新規遺伝子療法の効果予測因子の解明
岡山大学病院　脳神経外科　医員　大谷　理浩 …… 1

■ 口腔癌の細胞外小胞を介したシスプラチン耐性獲得機構の解明
岡山大学病院　口腔外科　医員　小野　喜章 …… 4

■ 好中球による酸化ストレスが規定する腎虚血再灌流障害の病態解明
岡山大学病院　泌尿器科　医員　丸山　雄樹 …… 7

■ 低酸素誘導因子による組織寛容性導入･維持を用いた移植片対宿主病の予防･治療法の開発
岡山大学病院　血液・腫瘍内科　助教　藤原　英晃 …… 9

■ キサンチン酸化酵素阻害薬による抗酸化作用は肝臓･血管系を保護する
岡山大学大学院　保健学研究科　准教授　渡辺　彰吾 …… 12

■ 温熱抵抗性に関与する SAFB 顆粒を標的にした新規温熱増感剤の開発
岡山大学大学院　ヘルスシステム統合科学研究科　助教　渡邉　和則 …… 18

■ 免疫機能を内包する人工リンパ節の構築
岡山大学大学院　ヘルスシステム統合科学研究科　助教　曲　正樹 …… 23

■ がん特異的糖代謝バランスを標的とした新規がん治療法の開発
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 …… 27

■ 近赤外吸収を示す含カルバゾールポルフィリン多量体の開発
岡山大学大学院　自然科学研究科　助教　前田　千尋 …… 30

■ 各種ベントナイト材料の膨潤特性に及ぼす温度の影響に関する熱力学的研究
岡山大学大学院　自然科学研究科　准教授　佐藤　治夫 …… 33

■ 計算機解析と実測との比較による貯水池の地形変化の解析手法実用化研究【特定研究分野 A】
岡山大学大学院　自然科学研究科　講師　神保　秀司 …… 39

■ 都市マネジメントを想定した建築景観デザインのあり方に関する研究
岡山大学大学院　環境生命科学研究科　准教授　堀　裕典 …… 42

■ 斜面安定性向上のための疎水性鉄鋼水砕スラグの適用性評価
岡山大学大学院　環境生命科学研究科　准教授　金　秉洙 …… 48

■ ＡＬＢ計測による３次元河道条件の推定と旭川分流堰周辺の洪水流解析への応用【特定研究分野 A】
岡山大学大学院　環境生命科学研究科　准教授　吉田　圭介 …… 54

■ 飼料用生菌剤への応用に向けた高免疫賦活化能を有するバクテリオシン産生乳酸菌の選抜と評価
岡山大学大学院　環境生命科学研究科　准教授　畑生　俊光 …… 60

■ フラボノイド代謝変換物の同定と生理活性評価
岡山大学大学院　環境生命科学研究科　助教　中村　俊之 …… 63

■ 日本における大統領制化のダイナミクス－安倍政権下の自民党政策会議の分析［※その他分野］
岡山大学学術研究院　社会文化科学学域　特任助教　朴　志善 …… 66

■ 炎症誘導性脂質メディエーター合成系を標的としたジオスゲニンの抗炎症効果
岡山県立大学　保健福祉学部　助教　津嘉山　泉 …… 70

■ 人とロボットの瞬時接触動作が生み出す身体的インタラクション特性の解析
岡山県立大学　情報工学部　助教　太田　俊介 …… 75

■ プロジェクトを跨いだソースコード片の不具合潜在性予測手法の有用性に関する調査
岡山県立大学　情報工学部　准教授　天嵜　聡介 …… 80

■ 不整地における農業用トラクタの挙動解析
岡山県立大学　情報工学部　助教　泉　晋作 …… 86

■ 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 …… 89

■ マスク着用下における様々な条件での歩行が歩容および注意に及ぼす影響
岡山県立大学　情報工学部　准教授　大下　和茂 …… 93

■ エリアリノベーション時代の地域建設業の役割と業態に関する研究
岡山県立大学　デザイン学部　准教授　穂苅　耕介 …… 99

■ 閑谷学校の水利技術と学びの場について-閑谷学校の環境技術に関する研究
岡山県立大学　デザイン学部　教授　向山　徹 ……105

■ 家庭で発生する食品廃棄物の不可食部による布帛への染色［※その他分野］
岡山県立大学　デザイン学部　助教　岡本　汐加 ……110

■ 銀河中心方向から飛来する軽い暗黒物質検出の理論的研究
岡山理科大学　理学部　講師　長尾　桂子 ……116

■ 森林散策と都市散策における尿中タンパク質と脂質の酸化修飾バイオマーカーの比較研究
岡山理科大学　理学部　教授　汪　達紘 ……119

■ 原生生物の細胞内共生現象を応用した新規生体触媒の創製と有用物質生産への応用
岡山理科大学　理学部　教授　石原　浩二 ……123

■ 環境調和型オレフィン合成を活用した光電変換用色素の創製
岡山理科大学　工学部　教授　折田　明浩 ……128

■ 細胞死抑制技術を駆使した高機能立体組織の作製と応用性の検討
岡山理科大学　工学部　准教授　神吉　けい太 ……133

■ イナミンの渡環反応を利用した含窒素パイ共役系化合物の合成－新奇含窒素ナノグラフェン創出への挑戦－
岡山理科大学　工学部　講師　奥田　靖浩 ……135

■ アブラボテ属のタナゴ類 2 種の自然分布域における交雑
岡山理科大学　生物地球学部　准教授　武山　智博 ……140

■ 交通障害を引き起こす突発的な濃霧の予測可能性
岡山理科大学　生物地球学部　教授　大橋　唯太 ……144

■ ウシの乳汁中上皮細胞解析で明らかにする泌乳量と乳腺分化の関係
岡山理科大学　獣医学部　講師　佐伯　亘平 ……150

■ オートリソソーム形成における認知症原因タンパク質プログラニュリンの役割
岡山理科大学　獣医学部　助教　田中　良法 ……153

■ 自然由来メゾスコーピック構造体を用いた神経変性疾患関連因子の分解技術の開発
岡山理科大学　獣医学部　准教授　作道　章一 ……157

■ モンゴル国南ゴビ県南東部シャルツァフにおける小型獣脚類の集団行動解析
岡山理科大学　研究･社会連携機構　特担教授　石垣　忍 ･･･････161

■ ビスシリル置換ピリジンの白金錯体触媒反応
倉敷芸術科学大学　生命科学部　教授　仲　章伸 ･･･････166

■ ママカリの資源回復と食文化の保護･継承のための分子遺伝学的研究
倉敷芸術科学大学　生命科学部　准教授　山野　ひとみ ･･･････170

■ 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：抗うつ作用の機序の解明
倉敷芸術科学大学　生命科学部　教授　岡田　誠剛 ･･･････176

■ スポーツ現場で筋音図･筋電図をコンディショニングに活用する
倉敷芸術科学大学　生命科学部　准教授　枝松　千尋 ･･･････179

■ 避難行動促進におけるメカニズムの解明－生理心理学的アプローチを用いて－【特定研究分野 A】
吉備国際大学　心理学部　准教授　橋本　翠 ･･･････183

■ 硫化チタンを介した熱分解反応によるチタン製造プロセスの検証
津山工業高等専門学校　総合理工学科　准教授　関　一郎 ･･･････185

■ 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　講師　野中　摂護 ･･･････187

■ 放線菌における Sec 系分泌促進因子の探索
岡山県農林水産総合センター　生物科学研究所　流動研究員　楊　霊麗 ･･･････193

■ 日本の伝統食材サトイモを疫病から守る!RNAseq による防御マーカーの作製と免疫力の向上による防除技術の開発
岡山県農林水産総合センター　生物科学研究所　流動研究員　鳴坂　真理 ･･･････196

■ ナス病原性に重要な青枯病菌エフェクターの同定と耐病性母本選抜
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　向原　隆文 ･･･････201

■ 多様な白花モモが生まれた遺伝的要因の解明
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　小田　賢司 ･･･････205

■ DAMPs ネットワークによる炎症性疾患の制御メカニズムの解明
就実大学　薬学部　講師　渡邉　政博 ･･･････210

■ 米由来ペプチドの神経毒性軽減効果の検討
就実大学　薬学部　教授　守谷　智恵 ･･･････214

■ 体力科学的観点から考える岡山県内「防災教育」ガイドラインの提案【特定研究分野 A】
就実大学　教育学部　准教授　飯田　智行 ･･･････218

■ 中高齢者のフレイル予防に資する身体活動条件の解明～心疾患患者を対象とした縦断研究～
就実大学　教育学部　講師　森村　和浩 ･･･････223

■ サルコペニアを対象とする健康寿命延伸薬の開発
川崎医科大学　神経内科学　教授　砂田　芳秀 ･･･････227

■ 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 ･･･････230

■ 抗肺線維化分子としての脂質メディエーター分解酵素の発生工学的研究
川崎医科大学　薬理学　教授　岡本　安雄 ･･･････233

■ 慢性炎症と骨細胞様細胞が血管石灰化を誘導する機序の解明、及びその進展抑制法の開発
川崎医科大学　リウマチ・膠原病学　臨床助教　浅野　澄恵 ……236

■ 海馬神経回路のシナプス形成を制御する分子機構の解明
川崎医科大学　解剖学　准教授　林　周一 ……239

■ 嗅覚障害の観点から考察する嗅覚調整機能
川崎医療福祉大学　臨床検査学科　教授　清蔭　恵美 ……242

■ T リンパ球由来アセチルコリンと運動による降圧に関する基礎的研究ー乳酸に着目してー
川崎医療福祉大学　健康体育学科　助教　山形　高司 ……246

■ 岡山県の医療機関における DPC データを用いた ICD コーディングの精度検証 －肺炎の詳細不明コードの場合－
川崎医療福祉大学　医療情報学科　助教　樫村　菜穂 ……249

■ 岡山県の MDC 別患者の要介護度分析
川崎医療福祉大学　医療情報学科　助教　大井　悠成 ……255

■ 肥満後の食餌変調が腸内環境と骨格筋の炎症状態に及ぼす影響
川崎医療福祉大学　健康体育学科　助教　川島　将人 ……261

■ 砂防法の政策効果と課題【特定研究分野 A】
山陽学園大学　地域マネジメント学部　准教授　澤　俊晴 ……265

■ 保育士のキャリア・パースペクティマップの作成と離職防止介入策の考案［※その他分野］
山陽学園大学　総合人間学部　准教授　松浦　美晴 ……271

■ タカキビプロシアニジンと澱粉との加熱調理に伴うアミロース消化の低下
山陽学園短期大学　健康栄養学科　教授　廣田　幸子 ……276

■ プレゴールデンエイジ期におけるキンダートーネン運動学習効果の科学的検証（3 年目）［※その他分野］
中国学園大学　国際教養学部　准教授　佐々木　公之 ……282

■ QGIS を用いた小田川上流地域の空間データ分析【特定研究分野 A】
中国学園大学　情報ビジネス科　講師　藤本　宏美 ……288

■ 「速く走る」走り方指導法の開発
環太平洋大学　体育学部　講師　梶谷　亮輔 ……293

■ 女性アスリートの月経随伴症状を含むコンディションの実態調査～若年層から始まる女性アスリートのための健康教育構築に向けて～
環太平洋大学　体育学部　准教授　前川　真姫 ……297

■ 終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践に関する研究
新見公立大学　健康科学部　助教　安藤　亮 ……301

■ 大原美術館所蔵の油彩作品を対象とした光学調査を基にした研究【特定研究分野 B】
公益財団法人大原美術館　学芸課　学芸統括　柳沢　秀行 ……306

■ 斜面崩壊の規模を予測するための崩壊土砂層厚の分布調査手法に関する研究【特定研究分野 A】
統合物性モデル技術研究組合　理事長　西垣　誠 ……309

悪性神経膠腫に対する新規遺伝子療法の効果予測因子の解明

岡山大学病院　脳神経外科

大谷　理浩

（概要）

悪性神経膠腫は脳腫瘍の中でも最も予後不良な疾患で、新規治療の開発が急務である。ウイルスを用いた免疫療法は悪性神経膠腫に対する新規免疫療法として着目されており、日本国内外で臨床試験が行われている。当院では 2019 年より悪性神経膠腫に対するアデノウイルスを用いた Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC)遺伝子治療(第Ⅰ/Ⅱa 臨床試験)を開始し、効果および安全性を確認する試験を実施中である。この遺伝子治療製剤は、アデノウイルスにがん抑制遺伝子である REIC を組み込んだ非増殖型アデノウイルスである。我々の前臨床データでは、腫瘍細胞の増殖を抑えて担腫瘍マウスの生存期間を延長するとともに、immunogenic cell death を介して抗腫瘍免疫を誘導することが確認された。本研究では、第Ⅰ/Ⅱa 臨床試験検体を用いて Ad-SGE-REIC 投与前後における免疫細胞浸潤と遺伝子発現変化に関する解析を行っており、その治療効果との関連を評価している。

1. 研究の背景と目的

神経膠腫は原発性脳腫瘍において最も頻度の高い腫瘍の一つであり、近年の高齢化に伴って患者数も増加している。神経膠腫はその悪性度によって WHO grade 2～4 に分類されるが、とくに膠芽腫(WHO grade 4)は脳腫瘍の中でも最も予後不良な疾患で、現行の標準治療である手術、放射線治療、化学療法を行った場合でも生存期間中央値は 2 年未満である。このため、新たな治療法の開発が急務である。

免疫チェックポイント阻害薬に代表される、がんに対する免疫療法は近年非常に着目されているが、膠芽腫においては免疫チェックポイント阻害薬の有用性は示されなかった。その理由の一つとして、膠芽腫の腫瘍微小環境は、抗腫瘍免疫に寄与する腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes, TILs)が少なく、抗腫瘍免疫を抑制する免疫抑制型マクロファージ(M2 マクロファージ)が多い、いわゆる immune cold な状態であることが知られている。一方、ウイルスを用いた免疫療法は悪性黒色腫に対して 2015 年に米国 FDA で承認となり、膠芽腫に対しても様々な臨床試験が行われている[1 2 3]。ウイルスを用いた免疫療法には、1) 直接的な腫瘍細胞へのダメージのほか、2) 抗腫瘍免疫の誘導、3) がん抑制遺伝子などのベクターとしての機能があり、immune cold tumor を immune hot tumor に変えることが報告されている。我々もこれまでに様々なウイルスを用いて膠芽腫前臨床モデルに対する治療研究を行ってきた[4 5 6 7]。特に、がん抑制遺伝子である REIC 遺伝子を搭載したアデノウイルス(Ad-SGE-REIC)は岡山大学で開発された新規治療であり、担腫瘍マウスモデルにおいて有意な生存期間の延長や免疫細胞浸潤が認められた(図 1)[5]。この結果をもとに、現在われわれは再発もしくは進行性のテント上悪性神経膠腫に対して Ad-SGE-REIC を投与する第Ⅰ/Ⅱa 相臨床試験を行っている(jRCT2063190013)[8]。本研究では、担腫瘍マウスモデルを用いた網羅的遺伝子発現解析により、腫瘍微小環境の変化に着目して解析を行った。さらに、臨床検体を用いて投与前後の免疫細胞浸潤の評価を試みた。

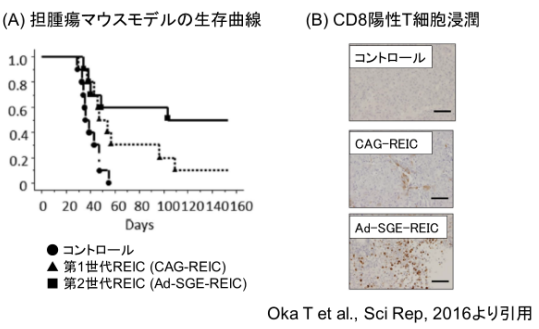


図1. Ad-SGE-REIC投与による生存期間の延長と、免疫細胞浸潤

2. 研究方法

担腫瘍マウスモデルに対して Ad-SGE-REIC 投与群と非投与群を作成し、網羅的遺伝子発現解析を用いて、腫瘍微小環境の変化を比較した。

更に、第Ⅰ/Ⅱa 相臨床試験検体を用いて、投与前後での免疫細胞浸潤等の評価を行った。本試験は、再発もしくは進行性のテント上悪性神経膠腫に対して、定位脳手術により 2 週間の間隔をあけて計 2 回の Ad-SGE-REIC 投与を行い(図 2)、安全性を評価する第Ⅰ/Ⅱa 相臨床試験である。

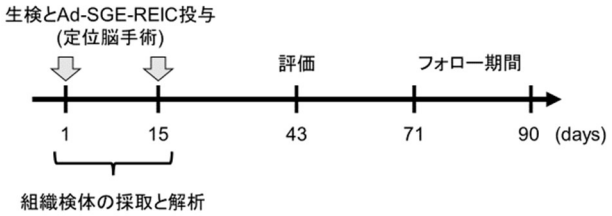


図2. Ad-SGE-REICを用いた悪性神経膠腫に対する治療

3. 結果

まず、担腫瘍マウスモデルを用いた網羅的遺伝子発現解析結果をもとに、Ad-SGE-REIC 投与後に発現が上昇する遺伝子に着目した。約 900 個の遺伝子が発現上昇しており、これを用いてパスウェイ解析を行った（図 3、投稿中データ)。その結果、変化のあった 14 個の経路のうち 5 つの経路が腫瘍免疫に関連した経路であり、Ad-SGE-REIC による強い抗腫瘍免疫の誘導が示唆された。特に TNF-alpha 経路や Notch 経路など、マクロファージや TILs の分化に関連する経路が変化しており、Ad-SGE-REIC によって腫瘍微小環境が変化したことが考えられた。

1	NOTCH signaling
2	Dopaminergic neurogenesis
3	IL2 signaling pathway
4	GPCRFs, class C metabotropics glutamate, pheromone
5	Adipogenesis genes
6	TYROBP causal network
7	SIDS susceptibility pathways
8	Retinol metabolism
9	Neural crest differentiation
10	Leptin insulin overlap
11	TNF-alpha NF-kB signaling pathway
12	Delta-Notch signaling pathway
13	Heart development
14	IL-7 signaling pathway

Hattori Y et al., in revisionより引用

図3. Ad-SGE-REIC投与後に変動する経路

現在は、免疫細胞浸潤について免疫染色を用いて評価を行っている。

4. 考察と今後の展望

悪性神経膠腫に対するウイルス療法は、新規治療法として非常に期待されており、本邦でも 2021 年にテセルパツレブが期限付き承認となった。Ad-SGE-REIC はアデノウイルスにがん抑制遺伝子遺伝子である REIC 遺伝子を搭載しており、腫瘍細胞が死滅する際に放出される damage-associated molecular patterns などを介して強力な抗腫瘍免疫を誘導する機序が考えられている [9]。我々も膠芽腫前臨床モデルにおいて Ad-SGE-REIC 投与による抗腫瘍免疫の誘導を報告してきたが、今回の研究でも強い抗腫瘍免疫の誘導が確認された。悪性神経膠腫における免疫細胞浸潤とウイルス療法の効果が関連することが報告されており [10]、Ad-SGE-REIC による強い抗腫瘍免疫の誘導も治療効果に関連することが期待される。

本臨床試験の症例登録は順調に進んでおり、全症例のデータ固定後に、Ad-SGE-REIC による治療効果と抗腫瘍免疫の関連性を評価する予定である。さらに、今回の解析によって TILs の関与が示唆されたが、今後は single cell RNA-sequencing を用いて TILs を含む腫瘍微小環境の詳細な変化を解明していく予定である。また、他の癌腫においては腫瘍細胞における遺伝子異常と免疫療法の効果が関連することが知られており、本研究においても target sequencing や whole exome sequencing を組み合わせることで、治療効果との関連を検討する予定である。悪性神経膠腫に対するウイルスを用いた免疫療法において上述のような詳細な解析を行った報告はなく、今回の結果は悪性神経膠腫に対する免疫療法の機序解明や新規治療の開発に役立つと考えられる。

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謝したします。

参考文献

1. Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, 2nd, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018; 379(2):150-161.
2. Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, et al. Phase I Study of DNX-2401 (Delta-24-RGD) Oncolytic Adenovirus: Replication and Immunotherapeutic Effects in Recurrent Malignant Glioma. *J Clin Oncol.* 2018; 36(14):1419-1427.
3. Otani Y, Yoo JY, Shimizu T, Kurozumi K, Date I, Kaur B. Implications of immune cells in oncolytic herpes simplex virotherapy for glioma. *Brain Tumor Pathol.* 2022.
4. Shimazu Y, Kurozumi K, Ichikawa T, et al. Integrin antagonist augments the therapeutic effect of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy for malignant glioma. *Gene Ther.* 2015; 22(2):146-154.
5. Oka T, Kurozumi K, Shimazu Y, et al. A super gene expression system enhances the anti-glioma effects of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy. *Sci Rep.* 2016; 6:33319.
6. Otani Y, Yoo JY, Chao S, et al. Oncolytic HSV-Infected Glioma Cells Activate NOTCH in Adjacent Tumor Cells Sensitizing Tumors to Gamma Secretase Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2020; 26(10):2381-2392.
7. Otani Y, Yoo JY, Lewis CT, et al. NOTCH-Induced MDSC Recruitment after oHSV Virotherapy in CNS Cancer Models Modulates Antitumor Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2022; 28(7):1460-1473.
8. Kurozumi K, Fujii K, Shimazu Y, et al. Study protocol of a Phase I/IIa clinical trial of Ad-SGE-REIC for treatment of recurrent malignant glioma. *Future Oncol.* 2020; 16(6):151-159.
9. Araki K, Yamamuro N, Tomonobu N, Kumon H. REIC/Dkk-3 Gene Therapy Induces Immunogenic Cell Death in a Mouse Model of Malignant Mesothelioma. *Anticancer Res.* 2021; 41(10):4837-4855.
10. Miller KE, Cassady KA, Roth JC, et al. Immune Activity and Response Differences of Oncolytic Viral Therapy in Recurrent Glioblastoma: Gene Expression Analyses of a Phase IB Study. *Clin Cancer Res.* 2022; 28(3):498-506.

口腔癌の細胞外小胞を介したシスプラチン耐性獲得機構の解明

岡山大学病院　口腔外科

小野　喜章

口腔癌の進行例や再発例の多くはシスプラチン（CDDP）を用いた化学療法に耐性を示し，予後は不良である．CDDP の耐性を獲得するメカニズムに関して様々な報告があるものの，実際の治療において CDDP に対する耐性の多くは多因子性と考えられている．そのため有害事象の軽減や個別化治療などの観点から，新たなメカニズムの解明や新規治療標的の探究が求められている．

近年，エクソソームをはじめとする細胞外小胞（EV）が多くのがん種における治療抵抗性の主要な調節因子として注目されている．抗癌剤の細胞外への排出や，細胞性質変化の誘導に働くことが報告されているが，口腔癌の CDDP 耐性獲得機構に EV が関与していることを示した報告は少ない．また，口腔癌細胞の分泌する EV が，どのように CDDP 耐性獲得に働くのか，という課題が存在している．本研究では口腔癌から採取した EV を用い，口腔癌の薬剤耐性メカニズムにおける EV の果たす役割について明らかにする．さらに，EV 中における薬剤耐性関連分子を明らかにし，薬剤耐性を克服する新たな治療法の探索を行う．

【諸言】

口腔癌の治療には，外科療法，放射線治療，化学療法，免疫療法があり，主にこれらを組み合わせた集学的治療が行われている．しかし，これらの治療法の進歩にかかわらず，近年の口腔癌の治療成績はほとんど向上していない．その原因の一つとして，抗癌剤に対する治療抵抗性が挙げられる．癌の進行過程において，癌細胞は浸潤･転移形質，幹細胞性および薬剤耐性を獲得する．しかしながら，どのような微小環境の変化と連動して，治療抵抗性獲得に関与するのか未だ不明な点が多い．口腔癌を含む頭頸部癌領域に対する薬物療法はシスプラチン（CDDP）の導入によって急速に進歩してきた．CDDP は細胞における DNA 損傷，複製の障害，転写阻害および細胞周期の停止をもたらしアポトーシスを引き起こすことで，抗癌作用を誘導する．しかし，口腔癌の進行例や再発例の多くは CDDP を用いた化学療法に耐性を示し，予後は不良である．CDDP に対する薬剤耐性機構としては細胞内蓄積機構，細胞質内解毒機構，DNA 修復機構などが報告されている．こうした CDDP への耐性を獲得するメカニズムに関して様々な報告があるものの，実際の治療において CDDP に対する耐性の多くは多因子性に認められる．また，治療が進むにつれ，より腫瘍の薬剤耐性が高く広範になる．有害事象の軽減や個別化治療などの観点からも，新たなメカニズムの解明や新規治療標的の探究が求められている．近年，エクソソームをはじめとする細胞外小胞（EV）が多くのがん種における治療抵抗性の主要な調節因子として注目されている．抗癌剤の細胞外への排出や，細胞性質変化の誘導に働くことが報告されているが，口腔癌の CDDP 耐性獲得機構に EV が関与していることを示した報告は少ない．また，口腔癌細胞の分泌する EV が，どのように CDDP 耐性獲得に働くのか，という課題が存在している．申請者の予備的実験から，CDDP 耐性口腔癌細胞から精製した EV を CDDP 感受性口腔癌細胞に添加することでこのレシピエントの細胞が CDDP 耐性能を獲得したこと（図 1），そして口腔癌細胞に EV 分泌阻害剤を作用させることで，

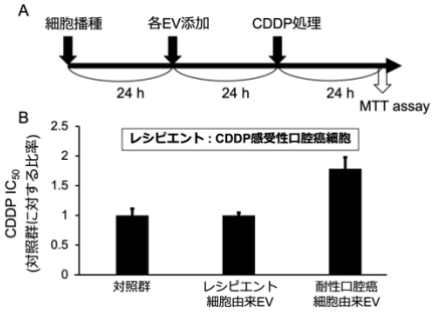


図 1：EV 添加による CDDP 感受性の変化
A. 細胞播種から CDDP IC50 値算出までのタイムスケジュール
B. CDDP 耐性口腔癌細胞由来 EV の添加によりレシピエント細胞の CDDP 耐性が増強した

CDDP に対する感受性が増強されたこと（図 2）から口腔癌における EV の CDDP 耐性への影響は十分

考えられうるものである．本研究では口腔癌から採取した EV を用い，口腔癌の薬剤耐性メカニズムにおける EV の果たす役割について明らかにする．さらに，EV 中における薬剤耐性関連分子を明らかにし，薬剤耐性を克服する新たな治療法の探索を行う．

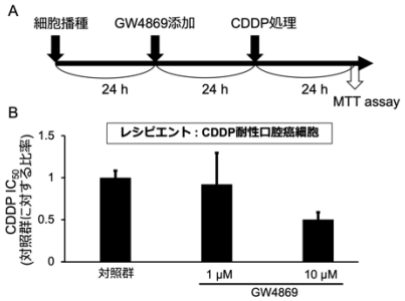


図 2：EV 分泌阻害剤による CDDP 感受性の変化
A. 細胞播種から CDDP IC50 値算出までのタイムスケジュール
B. EV 分泌阻害剤 (GW4869) の添加によりレシピエント細胞の CDDP 感受性が増強した

【方法】

本研究の目的は，口腔癌細胞および腫瘍微小環境において EV が薬剤耐性に働くメカニズムおよび関連する新規の分子の探索である．そこでまずは口腔癌細胞の CDDP 耐性株の樹立を試みた．その後，細胞内および EV 内のタンパク質発現の差異が耐性化機構に関与すると仮説を立て，タンパク質発現解析を行なった．その結果をもとに耐性化に関連する候補となる分子の機能解析を行った．下記に具体的な研究方法を示す．

1. CDDP 耐性株の樹立

口腔癌細胞株 SAS を CDDP 低濃度添加培地で持続培養し，CDDP 耐性細胞株を樹立した．耐性獲得や殺細胞効果増強は MTT assay で評価した．また，耐性獲得の指標として，アポトーシス関連分子 Caspase-3 とその活性化分子および銅トランスポーターATP7A, ATP7B, CTR1 を用いたウェスタンブロット（WB）法により解析し相対比較した．

2. EV の精製，動態解析

口腔癌細胞培養上清からの EV 精製にはポリマー沈殿法を応用した．さらに，EV 基本性状解析には粒子径分布解析，タンパク質濃度測定，電子顕微鏡を用いた．さらに，精製した EV を蛍光標識し，受容細胞へ取り込ませることで，細胞内動態解析を行った．

3. 機能抑制解析

方法 1. にて検証した銅トランスポーターのうち，最も発現に差異のあった分子について，短鎖ヘアピン RNA (shRNA) を介したノックダウンを行い，EV 分泌および機能変化について検証した．

4. EV 分泌抑制解析

ホスホジエステラーゼ (N-SMase) 阻害剤 GW4869 を SAS に作用させることで，EV 分泌能および銅トランスポーター発現に与える影響について検証した．

【結果】

CDDP を添加した培地にて SAS 細胞の持続培養を行い，耐性株を作成した（SAS-R）．その結果，CDDP への耐性度は IC50 で 2-3 倍程度となった (図 3A)．両細胞に対して同濃度の CDDP を曝露させたところ，SAS-R 細胞は SAS 細胞と比べてアポトーシス誘導因子である Caspase-3 の活性化 (Cleaved caspase-3 の発現）が抑制された（図 3B)．また，近年 CDDP の細胞内流出入に銅トランスポーターの関与が報告されている．なかでも，SAS-R 細胞は SAS 細胞と比べて ATP7B の有意な発現増強を認めていた（図 3C)．以上から，CDDP 耐性機構に，ATP7B の発現増強が関連していることが示唆された．

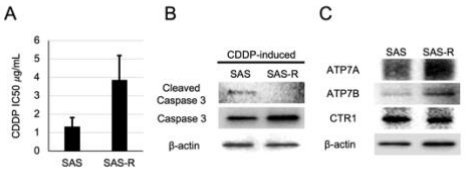


図 3：CDDP 耐性口腔癌細胞株の樹立
A. 親株と耐性株の CDDP に対する IC50 比較
B. 親株と耐性株の CDDP 曝露時の Caspase-3 活性化比較
C. 親株と耐性株の銅トランスポーター発現比較

次に，両細胞の培養上清から EV 精製を行なった．電子顕微鏡撮影および粒子径分布測定の両解析において，50-200 nm 範囲内の粒子サイズの EV を精製できていることを確認した（図 4)．これら EV を ExoGlow-EV Labeling Kit (SBI 社）を用いて蛍光標識し，濃度別に培養細胞に添加したところ，濃度依存的に細胞内への EV 取り込みが促進する傾向であった（図 5)．これら EV 精製法および解析法について，今後も応用していく予定である．

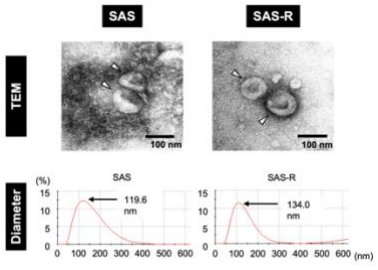


図 4：EV 基本性状解析
上段：透過型電子顕微鏡像，下段：粒子径分布解析

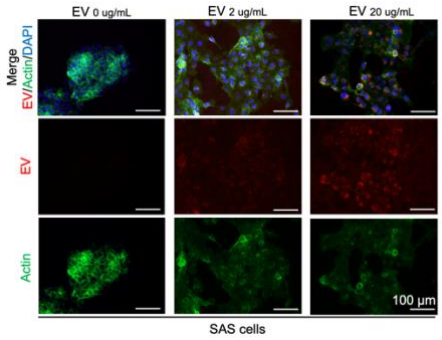


図 5：蛍光標識した EV の細胞内取り込み像

ATP7B 発現が CDDP 感受性および EV 分泌能に影響するか調べるため，ATP7B ノックダウン SAS を樹立したところ、対照群と比べて CDDP に

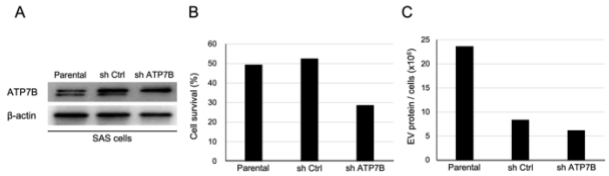


図 6：shRNA 導入による ATP7B ノックダウン細胞株の樹立
A. WB 法を用いた ATP7B ノックダウン効率の検証
B. ATP7B ノックダウンによる CDDP IC50 曝露時の細胞生存率比較
C. ATP7B ノックダウンによる EV 分泌能変化の検証

対する感受性の上昇を認めた（図 6）．さらに，EV 分泌能の低下傾向を認めた（図 6）．

EV 生成を阻害する働きを示す GW4869 を SAS に作用させたところ，対照群と比較して，EV 中の cargo protein（CD9, EpCAM）の減少および細胞内 ATP7B の発現低下を認めた（図 7）．以上より，ATP7B 発現と EV 分泌能は関与していることが示唆された．

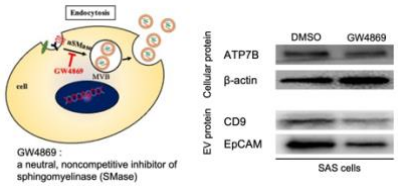


図 7：EV 分泌阻害剤による細胞内 ATP7B および EV 内 cargo protein の発現変化

【考察・今後の展望】

EV の研究は，主に癌の分野において，疾患のメカニズム解明から診断，治療までの苛烈な競争が世界中で繰り広げられており，年々関連する文献報告が急速に増えている．細胞内成分の放出機構である EV は，細胞間相互作用の媒体として重要であり，癌の悪性度進行に関与することが明らかとなっている．特に，化学療法に伴って腫瘍微小環境の間質細胞から分泌される EV により癌細胞の薬剤耐性・幹細胞性が誘導されること，癌細胞が分泌する EV が癌の転移先のニッチ形成に関わることや抗癌剤の細胞外排出に関与することなどが報告されている（図 8）．

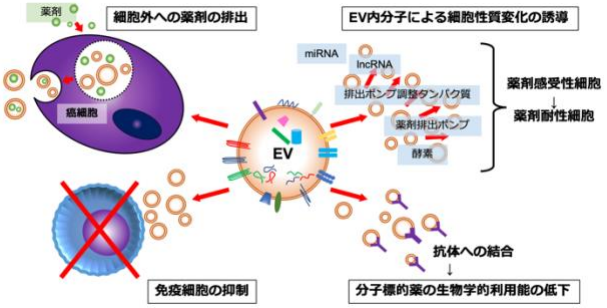


図 8：EV を介した薬剤耐性化メカニズム

また，EV 内の含有物を調べることによる癌診断マーカーとしての実用性についても多くの研究者が着目している．しかしながら，口腔癌の悪性度進展に伴う EV の分子機序や機能の詳細は未解決の問題として残っており，関連する報告は少ない．本研究では腫瘍微小環境における EV を介した薬剤耐性獲得メカニズムを解明するだけでなく，口腔癌進展における画期的なバイオマーカー開発においても重要な意味を有する．口腔癌における新規治療方法の開発につながる重要な成果となると確信している．

近年，銅トランスポーターの CDDP 細胞内流出入への関与が注目され，その報告は散見されるが，EV との関連についての報告は未だなく，本研究の着眼点は新規性が高いと考える．現在も上記の結果につづく研究成果を出すべく，本研究プロジェクトは継続中である．また，本研究における成果を遅滞無く世界へ発信するために，現在進行中のプロジェクトの先行研究データについては国際専門誌へ投稿準備中である．論文発表後に，研究成果は当研究室のホームページおよび岡山大学発信のプレスリリース記事に掲載する予定である．

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いたします．なお本研究は JSPS 科研費 21K17115 の助成も受けております．

好中球による酸化ストレスが規定する腎虚血再灌流障害の病態解明

岡山大学　泌尿器科

丸山　雄樹

腎虚血再灌流障害は限局性腎癌手術や腎移植術において避けて通れない病態であり重大な組織障害をもたらす。その組織障害には酸化ストレスを介する好中球浸潤が主要な役割を果たしており、再灌流直後の好中球動態の解明が急務である。我々はこれまで好中球浸潤を阻害することで組織障害が緩和される事を明らかにするとともに、2 光子レーザー顕微鏡を用いた生体マウス腎での好中球 in vivo リアルタイムイメージング(iRI)を確立した。今回の研究では、酸化ストレスに対して血管内皮保護作用を有する一酸化窒素(NO)に着目し、血管内皮障害モデルマウス(eNOS-KO マウス)を用いた iRI により、好中球動態の解明を行った。iRI において、wild-type マウス(WT)と比べ eNOS-KO マウスで糸球体への好中球流入が増加し、タダラフィルの投与により WT マウス、eNOS マウスともに軽減することを見出した。腎組織を用いたフローサイトメトリーにおいてもタダラフィルの投与は好中球浸潤を軽減した。これらの研究成果より、好中球を介した酸化ストレスにおける血管内皮機能保護が重要であり、より有効な治療戦略の開発が期待され、タダラフィルのその候補として期待できる。

はじめに

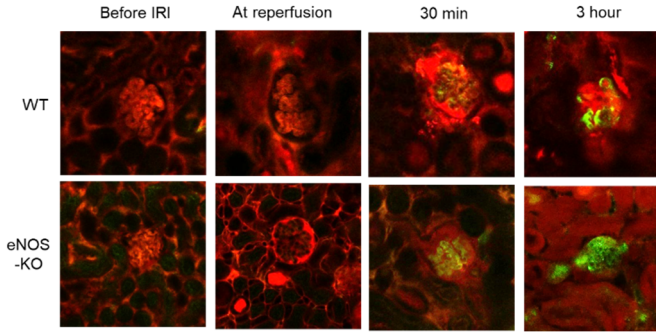
近年、腎機能温存がますますの注目を集めており、腎機能に直結する病態を多く有する泌尿器科領域においては、急性腎障害の制御および治療はその重要性を増している。とりわけ、腎移植術や限局性腎癌手術において腎虚血再灌流障害は避けて通れない病態であり、腎予後に重大な影響を与える組織障害を引き起こす。腎虚血により低酸素状態に陥った血管内皮細胞は、再灌流後数分以内に TNF-αや IL-1 などのサイトカインを数多く産生し、続いて IL-8、CXCL1/KC、CXCL2/MIP-2 などの好中球遊走因子が産生する。こうして浸潤した好中球は、活性酸素種やサイトカインの放出を通じて､強力な炎症を惹起し、組織障害をもたらし、間質の線維化に伴いさらなる腎組織の低酸素状態が進行するという、増悪ループに突入する。このように好中球の浸潤は腎虚血再灌流において主要な役割を担っており、その動態を解明する事は極めて重要である。我々はこれまで、好中球浸潤を阻害することにより組織障害が緩和されることを明らかにしてきた。さらに、多光子レーザー顕微鏡を用いた生体マウス腎内での好中球の in vivo リアルタイムイメージング(iRI) 技術を確立することで、生きた同一個体での再灌流後の血流および好中球動態のリアルタイムな観察が可能となり、より生体内での自然な反応に近い評価が可能となった。本研究では、iRI 技術を用いて好中球動態と参加ストレスへの防衛機構である血管内皮機能に着目した解析を行った。

研究の成果

好中球を介しての酸化ストレスへの血管内皮保護には一酸化窒素(NO)が重要な役割を担っており、グアニル酸シクラーゼが活性化し、cGMP を産生することで、細胞内の Ca 濃度を低下させ、血管平滑筋を弛緩作用、血管内皮機能を改善させる。NO は NOS 経路によって生み出されるが、血管内皮においては、内皮型 NOS(eNOS)が主に分布しており、今回の研究ではまず、C57/BL/6J マウス(WT)と血管内皮障害モデルマウスとして eNOS-knockout マウス(eNOS-KO)を用いて、好中球動態を観察した。

iRI では、図 1 のように、虚血再灌流後に eNOS-KO マウスにおいてより多くの好中球が糸球体に trap され、3 時間後には尿細管内にも好中球が流入している様子が確認できた。

図 1：腎虚血再灌流前後の糸球体における好中球流入の経時的推移



続いて、血管内皮保護剤の候補としてタダラフィル(PDE-5 阻害薬)を WT、eNOS-KO マウスに投与し、糸球体への好中球流入の変化を解析した。タダラフィルは cGMP を分解する PDE-5 を阻害し、NOS 経路を upregulation することで血管内皮機能を改善させるとされており、腎虚血再灌流障害においても保護作用を有するという報告がある。本研究においても、タダラフィル内服により、WT、eNOS-KO マウスともに糸球体への好中球の流入が減少し(図 2)、再灌流 1 時間後の糸球体内の好中球陽性体積を有意に減少させた(図 3)。また、腎組織を用いた好中球の FACS においても、WT、eNOS-KO マウス共に、タダラフィル投与により腎組織全体における好中球の割合の有意な低下を認めた。これらの結果により、血管内皮障害を有する場合、好中球を介した酸化ストレスが増加する事、また、タダラフィルは eNOS 欠損状態においても腎保護作用をゆうすることが示唆された。

今後の展望

今後はリアルタイムイメージング技術を活かして腎虚血再灌流後の好中球動態のさらなる解析を行うと共に、好中球だけでなく、マクロファージや活性酸素種等のイメージングにも発展させていき、血管内皮保護材を用いた新規腎障害治療法としての可能性を探索する予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援賜りました公益財団法人ウエスコ学術振興財団に深く感謝申し上げます。

図 2：PDE5 投与による糸球体における好中球流入の経時的推移

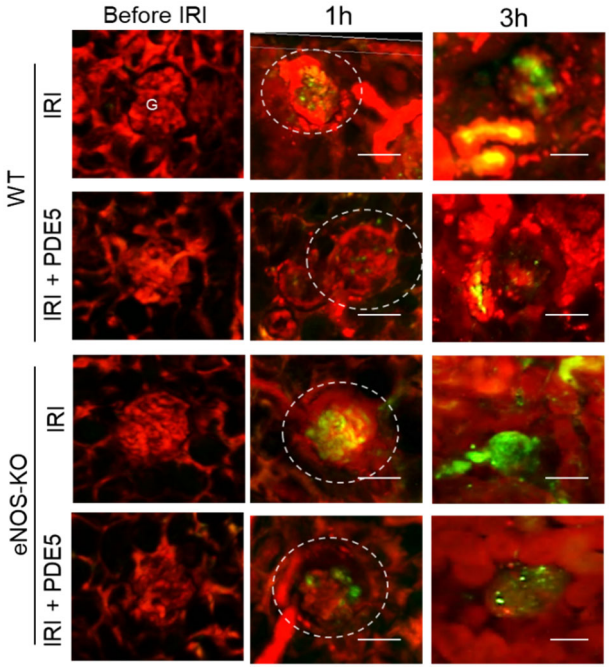


図 3：糸球体内の好中球陽性体積(再灌流 1 時間)

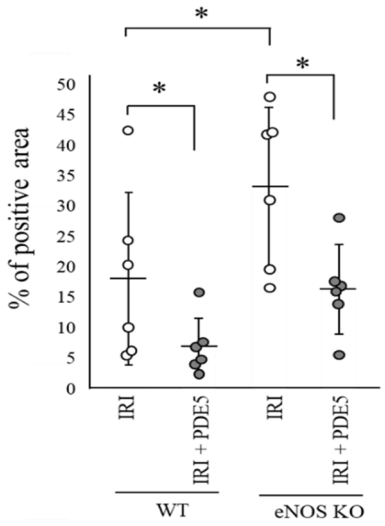
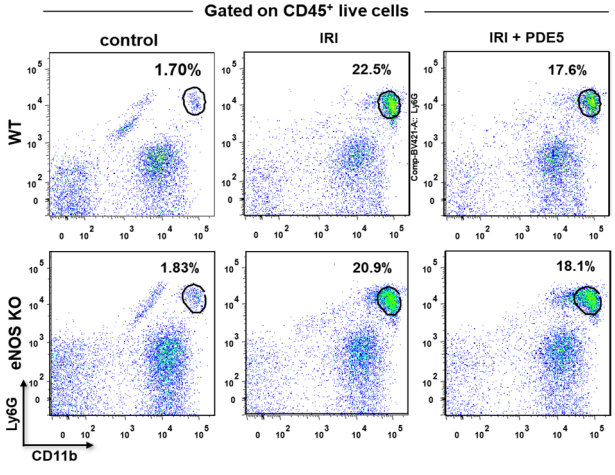


図 4：腎組織内好中球フローサイトメトリー



低酸素誘導因子による組織寛容性導入・維持を用いた移植片対宿主病の予防・治療法の開発

岡山大学病院　血液・腫瘍内科

藤原　英晃

加齢に伴う造血幹細胞の遺伝子異常のため、高齢化社会では白血病などの血液悪性疾患が増加し、寿命を短縮させる重大な要因である。同種造血幹細胞移植（以下 同種移植）は、血液悪性疾患に治癒をもたらす根治的治療法だが、重篤な合併症として、ドナーの T 細胞が患者の正常臓器を攻撃する移植片対宿主病（以下 GVHD）と呼ばれる免疫反応が約 4 割の患者に起こる。GVHD が発症すると皮膚、肝臓、腸管が障害され、特に腸管は致死的となるため、移植成功への最大の障壁となっている。T 細胞を抑制する免疫抑制剤が GVHD の治療に用いられるが、その効果は限定的であり、かつ免疫力の低下が白血病の再発につながるため、新たな治療法の開発が喫緊の課題となっている。本研究において、腸管 GVHD では腸管内酸素濃度の上昇を認め、腸管上皮細胞において組織恒常性へ寄与する低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor: 以下 HIF）の発現低下が起きていることを見出した。これは従来の免疫抑制療法と異なり HIF を標的とした組織耐性をもたらす GVHD 予防・治療法として今後の発展が期待できるものと思われる。

はじめに

加齢に伴う造血幹細胞の遺伝子異常のため、高齢化社会では白血病などの血液悪性疾患が増加し、寿命を短縮させる重大な要因である。同種造血幹細胞移植（以下 同種移植）は、血液悪性疾患に治癒をもたらす根治的治療法だが、重篤な合併症として、ドナーの T 細胞が患者の正常臓器を攻撃する移植片対宿主病（以下 GVHD）と呼ばれる免疫反応が約 4 割の患者に起こる。GVHD が発症すると皮膚、肝臓、腸管が障害され、特に腸管は致死的となるため、移植成功への最大の障壁となっている。T 細胞を抑制する免疫抑制剤が GVHD の治療に用いられるが、その効果は限定的であり、かつ免疫力の低下が白血病の再発に繋がるため、新たな治療法の開発が喫緊の課題となっている。しかし、治療法開発のための GVHD の病態解明はまだ十分ではなく、なぜ皮膚、肝臓、腸管が障害され他の臓器が障害されないのか全く不明である。特に、致死的となりうる腸管 GVHD に関しては国内外において腸内細菌叢の乱れ dysbiosis と GVHD の関連性が近年着目されているが、その機序は依然として不明である。申請者は GVHD が発症し dysbiosis を起こした場合、腸内細菌叢由来の代謝産物である短鎖脂肪酸が減少していること（Mathewson ND., *Nat Immunol 2016*）、腸管上皮細胞におけるインフラマソームの活性化が、細胞障害を軽減し GVHD を改善することを明らかにした（Fujiwara H., *Nat Commun 2018*、Toubai T., *Nat Microbiology 2019*）。また、これまで解明されていなかった dysbiosis の発症原因として、T 細胞による腸管細胞のミトコンドリア障害に端を発する酸素利用エネルギー産生障害が原因であることを明らかにしている（Fujiwara H., *Nat Immunol 2021*）。つまり、腸管上皮細胞のミトコンドリア障害→dysbiosis→短鎖脂肪酸の減少→インフラマソームの不活性化→腸管細胞の恒常性の破綻→GVHD 増悪/治療抵抗性への一連の流れを解明し、腸管 GVHD の詳細なメカニズムを明らかにしている。この組織に起こる変化に介入し、組織恒常性を維持する治療法を開発することで、免疫細胞による障害に対して「組織耐性」を上げ、免疫細胞の抑制を最小限にすることで GVHD 予防・治療を行いかつ移植片対白血病効果（以下 GVL 効果）を可能にできるのではないかと考える（図 1）。本研究では、腸管上皮細胞のミトコンドリア障害による酸素消費量低下が細胞および組織に及ぼす影響に着目し、特に腸管内

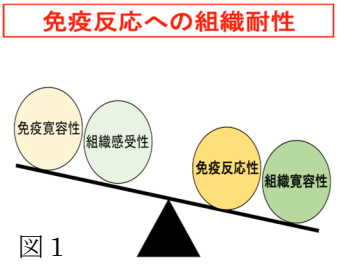


図 1

酸素濃度変化による低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor: 以下 HIF) 機能不全が、免疫細胞に対する組織寛容不全につながるという観点から、従来の免疫抑制療法と異なるHIFを標的とした組織寛容性をもたらす治療方法の確立を目的とする(図 2)。

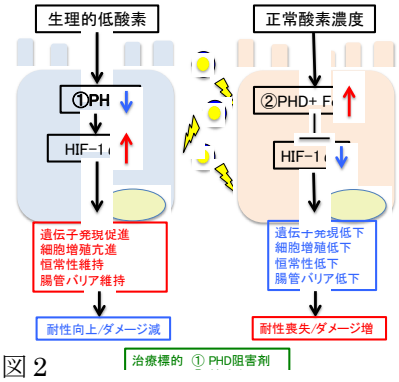
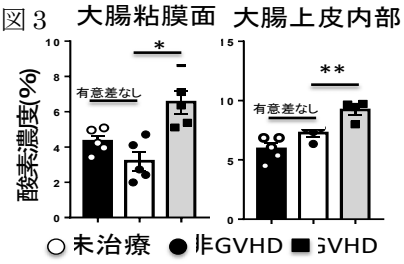


図 2

結果

①腸管内腔及び腸上皮細胞における酸素濃度の検討；GVHD モデルマウスを用いて腸管内腔及び腸上皮細胞における酸素濃度を測定した。腸管内腔酸素濃度を測定するため、麻酔下に内視鏡及び酸素濃度センサーを用いて腸管内腔の酸素濃度を測定したところ、未治療及び非 GVHD マウスと比較して GVHD マウスでは腸管内腔の酸素濃度の上昇を認めた（図 3)。また、先行研究から、GVHD マウスの腸上皮細胞におけるミトコンドリア呼吸不全が判明しており、酸素濃度上昇の原因として腸上皮細胞内の酸素濃度上昇が考えられた。このため、組織酸素濃度を測定するため、低酸素濃度組織を染色可能とする低酸素染色をおこなった。非GVHD マウスと比較し GVHD マウスでは低酸素染色が認められず、酸素濃度の上昇が確認された（図 4)。

図 3



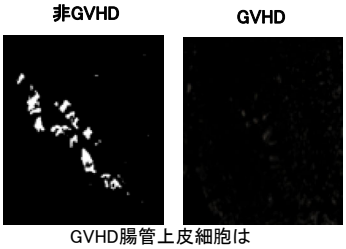
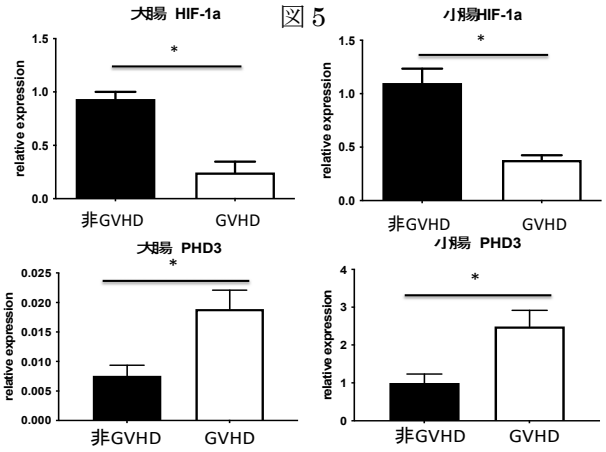


図 4

GVHD腸管上皮細胞は
生理的低酸素状態(白色)を消失する

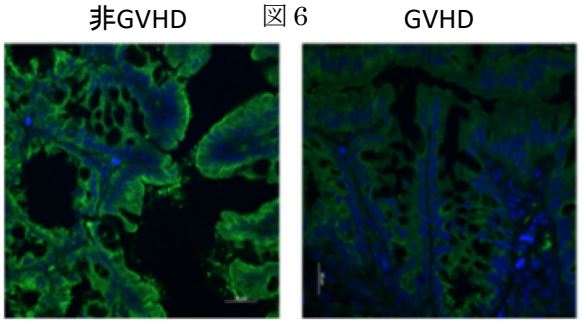
②腸上皮細胞の PHD/HIF の遺伝子発現及び蛋白発現の検討；これまでの検討から腸上皮細胞における酸素濃度上昇により HIF の発現低下並びに HIF 蛋白の分解を促進させる Prolylhydroxylase domain enzymes (PHDs)の影響が考えら得たため、GVHD マウスの腸上皮細胞を単離し HIF 並びに PHD の遺伝子発現を PCR で確認したところ、非 GVHD マウスと比較して GVHD マウスでは HIF の発現が低下している一方で PHD の発現が上昇していた（図 5)。

図 5

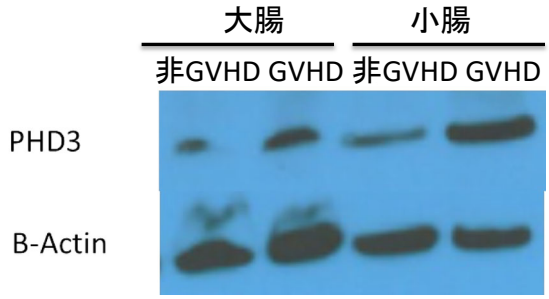


さらに蛋白発現を確認する目的で HIF 蛋白を免疫染色を用いて、PHD 蛋白を Western blot 法を用いて検討した。HIF 蛋白は非 GVHD マウスと比較して GVHD マウスでは発現の低下を認め、PHD 蛋白は GVHD マウスで増加していた(図 6)。これらの結果から GVHD における HIF 機能低下が考えられた。

図 6



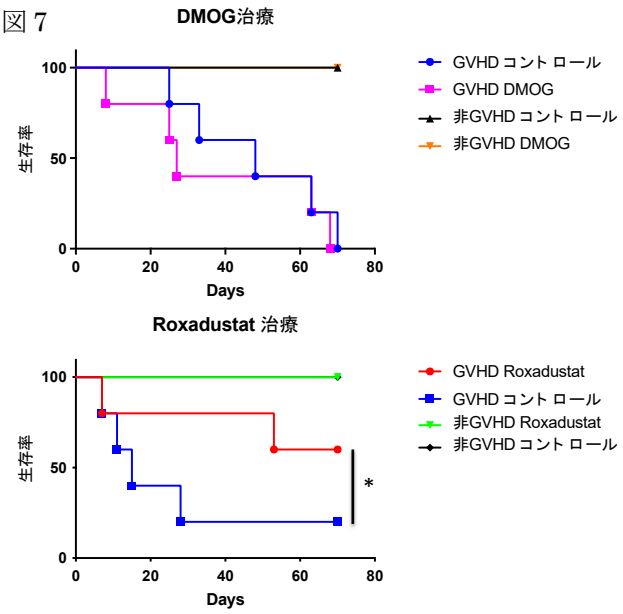
GVHD腸管上皮はHIF蛋白発現(緑色)が低下する



③薬理学的 PHD 阻害の検討（図 2）；上記の結果から PHD 阻害による HIF 発現の増加は腸上皮細胞の組織恒常性を維持し、同種反応性 T 細胞による細胞障害を低減できる可能性が考えられた。このため GVHD マウスモデルにおいて古典的 PHD 阻害剤である Dimethyloxalylglycine (DMOG) 及び新規 PHD 阻害薬

である Roxadustat を用いて *in Vivo* の効果を検討した。DMOG は腹腔内投与のため、GVHD マウスへの負担が強く、その効果は確認されなかったが、経口薬である Roxadustat を投与した GVHD マウスは対照群と比較して GVHD の軽症化を認め、生存率の改善も得られた（図 7）。

図 7



これらの結果から、PHD 阻害剤による HIF 発現上昇は組織恒常性を改善し、同種反応性 T 細胞による組織障害に対する耐性を誘導することで組織保護作用を呈することが考えられる。今後は、Roxadustat が及ぼす影響を、腸管組織のみならず T 細胞やその他組織において検討する予定としている。

謝辞

本研究の推進に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。

キサンチン酸化酵素阻害薬による抗酸化作用は肝臓・血管系を保護する

岡山大学大学院保健学研究科検査技術科学専攻

渡辺　彰吾

（概要）近年，尿酸上昇が非アルコール性脂肪肝炎（NASH）や動脈硬化の病因となりうる根拠として，キサンチン酸化酵素（XO）が注目されている。XO は，肝臓，腎臓，血管内皮などの様々な臓器で働き，尿酸が産生される過程で酸化ストレス源である活性酸素種を発生させることが明らかとなっている。それらを阻害する XO 阻害薬は，尿酸や酸化ストレスの減少を介して，NASH や動脈硬化にも奏功する可能性が示唆されている。本研究では，高フルクトースを負荷することで尿酸や酸化ストレスを上昇させた脳卒中易発性自然発症高血圧モデルラット（SHRSP5/Dmcr）を用いて，XO 阻害薬フェブキソスタットの NASH および動脈硬化に対する抗酸化作用を検討した。結果として，フェブキソスタットは XO を阻害することにより，尿酸産生を抑制することで，その過程で発生する活性酸素種を低下させ，抗酸化因子を増強させた。それにより，肝臓においては，肝臓の炎症および白色肥大化の抑制，線維化，脂肪滴の減少につながった。また，血管においては腸間膜動脈の脂質沈着の抑制，LDL コレステロールの減少，血管内皮機能の悪化抑制が確認された。

【緒言】

非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis; NASH）は，患者の 20-30%が約 10 年で肝硬変や肝癌に進行するため，早期治療が必要とされる。しかし，NASH には未だ治療薬が開発されていないのが現状であり，早急な治療法の探索が求められている。NASH の発症にはいくつかの危険因子の関与が考えられているが，その原因のひとつとして尿酸が注目されている。近年の研究では，フルクトースが尿酸を増加させることで炎症やインスリン抵抗性を引き起こし，肝臓への脂質沈着を促進するとの報告もある。また，血管系でも，尿酸が深く関わっていると示唆されており，尿酸値と心血管疾患の罹患率の疫学調査においても，正の相関関係が認められる。さらに，尿酸が血管内皮にも作用し，動脈硬化を惹起することも報告された。しかしながら，尿酸値は肥満，高血圧，糖尿病などの動脈硬化の進展と関係する種々の因子によって影響を受けるため，尿酸上昇が動脈硬化発症の直接的な危険因子であり，介入すべきターゲットであるか否かは未だに意見が分かれている。そのような背景の中，尿酸上昇が NASH や動脈硬化の病因となりうる根拠として，キサンチン酸化酵素（xanthine oxidase; XO）が注目されている。XO は，肝臓，腎臓，血管内皮，脂肪組織などの様々な臓器で働き，尿酸が産生する過程で活性酸素種を生じることが明らかとなっている。活性酸素種には，スーパーオキシド（O_2^-）や過酸化水素（H_2O_2）などがあり，これらが過剰に増加した状態を酸化ストレスという。つまり，尿酸の増加に伴い，酸化ストレスも上昇するため，XO は尿酸だけでなく酸化ストレスにも深く関与している。このことから，尿酸や酸化ストレスを抑制するために，それを阻害する XO 阻害薬が期待されている。

本研究では，XO 阻害薬として高尿酸血症の治療薬であるフェブキソスタット（Febuxostat）を用いて実験を行った。フェブキソスタットは，他の XO 阻害薬に比べて XO の阻害率が高く，すでに臨床でも用いられている新規の XO 阻害薬である。そのため，フェブキソスタットが NASH や動脈硬化に奏功することが明らかとなれば，未だ有効な治療薬が臨床応用されていない NASH の発症や予後を改善できる可能性もある。そこで我々は，高フルクトース（Fructose）を負荷することで尿酸や酸化ストレスを上昇させた脳卒中易発性自然発症高血圧モデルラット（stroke-prone spontaneously hypertensive rat 5; SHRSP5/Dmcr）に，フェブキソスタットを投与して、NASH と動脈硬化に対する抗酸化作用について検討した。

【方法】

1. 動物

実験には雄の SHRSP5/Dmcr ラット（以下，SHRSP5）を使用した。SHRSP5 は，新たに確立された脳卒中易発性自然発症高血圧ラットのモデルであり，高脂肪・高コレステロール（high-fat and high-cholesterol; HFC）食を与えた SHRSP5 は，ヒトの NASH に類似した病態を有する。SHR 等疾患モデル共同研究会より，雄性の SHRSP5（n＝15）を入手した。13 週齢時点の体重，血圧，摂食量にそれぞれ有意差が生じないよう以下の 3 群に分け，14 週齢時に普通（stroke-prone; SP）食から HFC 食へ食餌を変更した。

・SHRSP5＋HFC 食・・・・・・Cont 群（n＝5）

・SHRSP5＋HFC 食＋フルクトース・・・・・・・・Fru 群（n＝5）

・SHRSP5＋HFC 食＋フルクトース＋フェブキソスタット・・・・・・・・・・Feb 群（n＝5）

Fru 群にはフルクトース負荷を開始した(糖負荷)。また，Feb 群では糖負荷を行うと同時に，フェブキソスタットの腹腔内投与を行った。フルクトースは 100 g/L（10%）のフルクトース水溶液を飲料水とし，40 mL/day の用量で負荷した。フェブキソスタットは 1 mg/kg/day の用量で溶媒（リン酸緩衝生理食塩水で調製した 6%ジメチルスルホキシド）に溶解し，腹腔内投与を実施した。総摂取量は，14 週齢から 24 週齢まで 3 群間で有意差が生じないように 900-1000 g の HFC 食を与えた。

2. 生理学的検討

体重は，14 週齢と 24 週齢時に測定し，体重変化を比較した。収縮期血圧は，非観血血圧測定装置を用いて，tail-cuff 法により，隔週で測定した。

3. 解剖および生化学的検討

採血は，ペントバルビタールナトリウムを 48.6 mg/kg の用量で腹腔内投与による麻酔下のもと行った。採血管は EDTA-2Na 入りの真空採血管を用いた。採取した血液は，ただちに遠心分離機で血漿を分離し（3,000 rpm，4°C，15 分間），－80°Cで保存した。すべての検体が揃った後，株式会社 SRL 社へ生化学検査を委託した。

すべてのラットを安楽死させた後，肝臓と大動脈を摘出し，重量を測定した。肝臓は病理組織学的染色のために切片にし，肝臓内の TG や酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒド(malondialdehyde; MDA）の測定や遺伝子解析に使用した。大動脈は内皮機能の評価のために 2 mm の輪切りにした。また，腸間膜動脈と腸間膜脂肪を分離し，腸間膜動脈の Oil red O 染色を行った。

4. 糖代謝

25 週齢時に一晩絶食後，OGTT を実施した。水は自由摂取とした。小動物実験用簡易吸入麻酔装置を使用し，ラットをイソフルランで麻酔した後，蒸留水で調製したグルコース水溶液を 3 mL/kg の容量でゾンデ法により強制投与した。グルコース水溶液投与直前，15 分後，30 分後，60 分後および 120 分後に尾静脈に 23 G 注射針を刺して少量採血し，簡易血糖測定器を用いて測定した。ITT も同様に，25 週齢において一晩絶食後に実施した。水は自由摂取とした。イソフルランで麻酔したラットに，生理食塩水で調製したインスリン溶液を 1 mL/kg の容量で腹腔内投与し，OGTT と同様に測定した。OGTT および ITT における曲線下面積（area under the curve; AUC）は，台形法を用いて推定した。

5. 血管内皮機能

各ラットの大動脈の内皮機能を評価するために，腹部大動脈のリング標本を作製した。単離した腹部大動脈を輪切りにしてリング標本を作製し，蒸留水(distilled water; DW）で溶解したクレブス・ヘンゼライト液に保存した。採取後速やかに，クレブス・ヘンゼライト液を満たしたマグヌス実験装置の 5 mL 恒温槽にリング標本を静置し，0.5 g の張力で 60 分間の平衡化を行った。その後，恒温槽に血管収縮剤であるプロスタグランジン F2α（PGF2α：28 μM）を加え，プラトーに達したところでアセチルコリン（10^{-10}-10^{-4} M）を添加し，濃度反応曲線を得た。血管弛緩反応は，PGF2α による収縮の緩和

率で表した。

6. 病理学的検討

肝臓は 10%ホルマリン溶液で 48 時間振盪固定し，パラフィン包埋後，4 μm の厚さで薄切した。その後 Masson-Trichrome 染色を行い，線維化を定量分析により評価した。また，HFC 食によって誘発される肝細胞の変化をスコア化するために，NASH Clinical Research Network のスコアリングシステムに従って，NAFLD activity score (NAS score) を算出した。NAS score は Masson-Trichrome 染色における病理染色像にて，脂肪変性（steatosis; 5%未満 = スコア 0，5-33% = スコア 1，33-66% = スコア 2，67%以上 = スコア 3)，風船様肝細胞 (hepatocyte ballooning; なし = スコア 0，肝細胞 5 個以下のバルーン化 = スコア 1, 肝細胞 6 個以上のバルーン化 = スコア 2)，炎症性細胞浸潤 (inflammation; なし= スコア 0, 1 foci = スコア 1, 2-4 foci = スコア 2， 5 foci 以上= スコア 3）の 3 項目の合計により評価を行い，上記の分類に従ってスコア化した。3 項目の合計が 5-8 点で NASH，3-4 点で境界型, 0-3 点は non-NASH として判定した。すべての画像はオールインワン蛍光顕微鏡で撮影した。また，肝線維化の面積における定量分析は，BZ-X Analyzer ソフトウェアで行った。

7. 遺伝子解析

RNase Mini Kit を用いて，凍結保存した肝臓（30 mg）から全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA（肝臓: 1000 ng）を PrimerScript RT Reagent Kit を用いて逆転写をした。定量的 PCR 分析は FastStart Essential DNA Green Master および LightCycler 96 Instrument system を用いて行った。内部標準には，グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH）を用いた。

8. XO 活性

Xanthine Oxidase Activity Assay Kit を用いて，生成した過酸化水素に比例した比色法（570 nm）によって, 凍結保存した肝臓（50 mg）から XO 活性を測定した。

【結果】

1. 生理学的検討

14 週齢時の体重を基準とし，24 週齢時点での体重変化の割合を比較したところ，Feb 群では Fru 群と比較して体重増加が有意に抑制された。収縮期血圧は，Feb 群では 19 週齢以降において，Fru 群との間に有意差が認められたが，3 群ともに一定の血圧推移を示した。

2. 糖代謝の解析

1) OGTT，ITT

OGTT，ITT ともに，0 分から 120 分においての血糖値変動曲線と，血糖曲線下面積（AUC）を算出した。OGTT について, Fru 群の曲線と比較して，Feb 群では最大血糖値が低く，血糖値低下の開始時間も早かった。AUC においても，Fru 群と比較して Feb 群では有意な低下が認められた。ITT は各群間で有意差は見られなかったが，Feb 群では Cont 群と似た推移で血糖値が経時的に低下した。また，AUC においても，OGTT と同様に Feb 群で低下傾向を示した。採血時に採取した血中の空腹時血糖は，Fru 群と比べ Feb 群で有意に低下した。また，インスリン値や HOMA-IR も，3 群の中で Feb 群が最も低下していた。

3. 酵素活性・遺伝子解析

1) XO 活性

肝内の XO 活性は Fru 群と比べ，Feb 群で有意に抑制された。抗酸化物質である CAT と GPx-1 は，Fru 群と比較し Feb 群で有意に高値を示した。酸化ストレスマーカーの MDA は，Fru 群と比較し Feb 群で有意に抑制された。また, 酸化反応酵素の NOX2 と CYP2E1 も有意差はないものの，Fru 群と比較して Feb 群では抑制傾向にあった。

2) 炎症性サイトカイン

炎症性サイトカインである MCP-1 と TNF-α の発現量は，Fru 群と比較して Feb 群では有意に抑

制された。同じく炎症性サイトカインの NF κ B は，Feb 群での抑制に有意差はなかったが，低下傾向を示した。

4. 肝臓の病態解析

1）肝臓の肉眼的・病理的所見

解剖時の肉眼的所見では，Feb 群には Fru 群のような顕著な肝臓の白色肥大化や肝表面の凹凸は認められなかった（図 1A)。脛骨長補正した肝重量においては，有意差はないものの，Fru 群と比較して Feb 群では低下傾向にあった（図 1B)。NAS score を用いて，それぞれの群の NASH 病態をスコア化したところ，Cont 群と Fru 群は 5 点以上であったため NASH，Feb 群では 3 点以上 4 点以下であったため境界型と判定した（図 1C)。NAS score の判定項目にある脂肪変性，風船様肝細胞，炎症性細胞浸潤のスコアは，特に脂肪変性において Feb 群では他の 2 群に比べて有意に低下していた。風船様肝細胞の項目は，Feb 群でも多くの肝細胞のバルーニングがみられたが，炎症性細胞浸潤においては，有意差はつかないものの他の 2 群に比べて Feb 群で低下していた（図 1D)。

Masson-Trichrome 染色における病理染色像では，肝細胞のバルーニングはすべての群で確認されたが，Fru 群で認められた広範囲の線維化が Feb 群では抑制された。病理染色像において肝臓の線維化定量を行ったところ，Fru 群と比較して Feb 群では有意に線維化の面積比率が低下していた。病理染色像内の脂肪滴においても，Fru 群では主に線維化領域で顕著に脂肪滴が認められたが，Feb 群ではほとんど認められなかった。肝臓内の脂肪蓄積を定量解析するために肝臓内の TG を定量したところ，Fru 群と比較して Feb 群では有意に低値を示した。

2）生化学的解析

肝機能指標である血中の AST は，Fru 群と比較して Feb 群で有意に低値を示した。同じく ALT においても，Cont 群と同程度に Feb 群では低値を示した。血中の尿酸は，Fru 群と比較して Feb 群で有意に低下していた。

5. 血管の病態解析

1）腸間膜動脈の Oil red O 染色

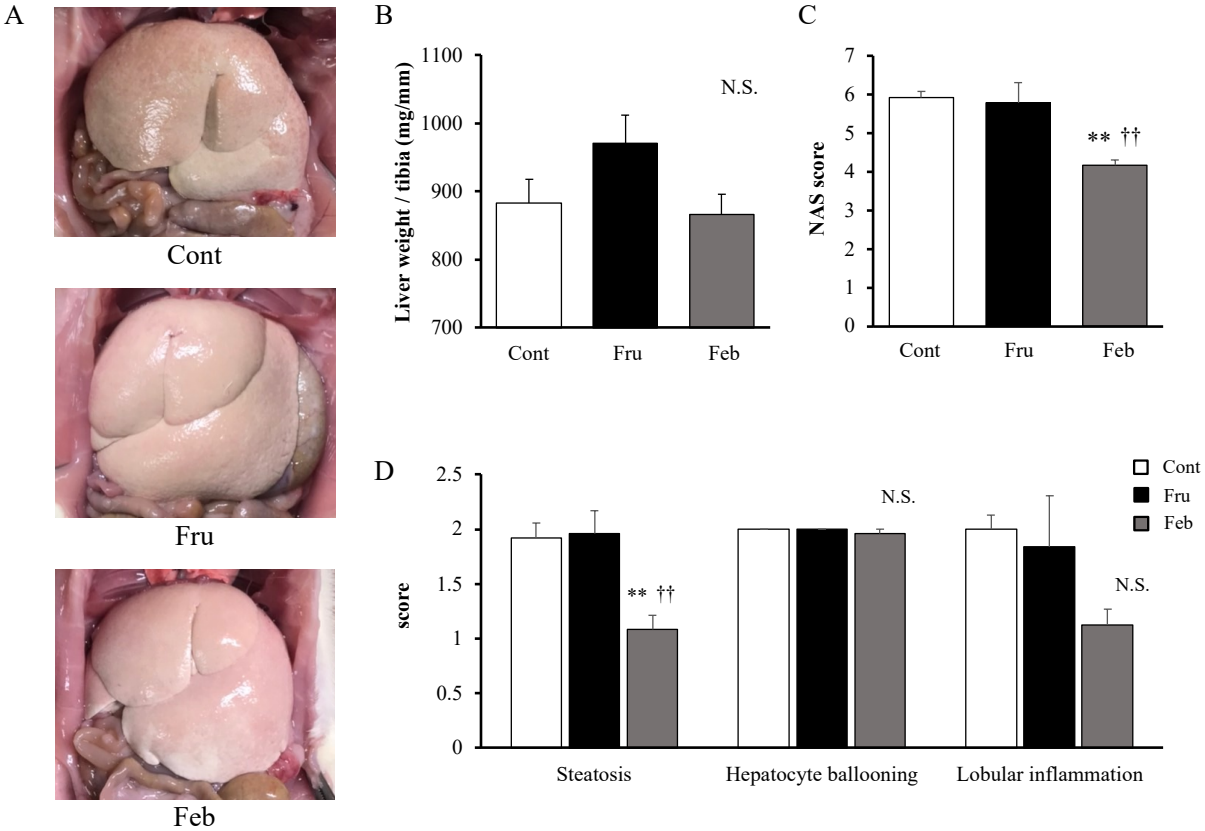


図1　　肝臓の肉眼的所見

Oil red O 染色を行った腸間膜動脈において，Fru 群では全体的に多くの脂質沈着がみられたが，Feb 群では脂質沈着が抑えられた（図 7A)。また，腸間膜動脈の脂質沈着定量解析においても，Fru 群と比較して Feb 群では有意に減少した（図 2B)。

2）生化学的解析

血中の総コレステロール，LDL コレステロール，HDL コレステロールは Fru 群に比べて Feb 群で有意に低値であった。LDL / HDL コレステロール比においては，Feb 群は Cont 群と同程度ではあったが，Fru 群と比較すると有意に高値となった。血中の TG は，Fru 群に比べて Feb 群で抑制された。

3）血管内皮機能検査

血管内皮機能は，Fru 群と比較して Feb 群では有意な弛緩反応がみられ，Cont 群と同程度にまで弛緩し，血管内皮機能の改善が認められた（図 2C)。

【考察】

Feb 群に投与したフェブキソスタットは，肝内の XO 活性を抑制した。尿酸代謝経路において XO は，ヒポキサンチンからキサンチン，キサンチンから尿酸に変換する過程で関与している。そのため，XO 活性を抑制することで，尿酸が産生されにくくなり，その過程で発生する活性酸素種も減少する。本研究でも，Feb 群において尿酸値が減少し，酸化ストレス関連遺伝子発現は低値を，抗酸化ストレス関連遺伝子発現は高値を示した。これは，フェブキソスタットが XO を阻害したことにより，尿酸への代謝経路の進行が抑えられ，同時に発生する活性酸素種も減少したためであると考えられる。

肝臓においては，SHRSP5 は HFC 食を給餌することで，NASH 病態を発症する。NASH を発症すると，肝臓の肉眼的所見において白色肥大化，肝表面の凹凸が確認され，病理染色においては，脂肪変性，風船様肝細胞，炎症性細胞浸潤，および線維化がみられる。本研究においては，HFC 食に加えたフルクトースの負荷により，脂肪変性，風船様肝細胞，炎症性細胞浸潤の 3 項目から評価される NAS score において，スコア 5 点以上で NASH と判定され，特に白色肥大化や肝表面の凹凸が著しくなり，脂肪滴の沈着や線維化領域がより広範囲に広がっていた。これは，フルクトースがフルクトース 1 リン酸を生じ

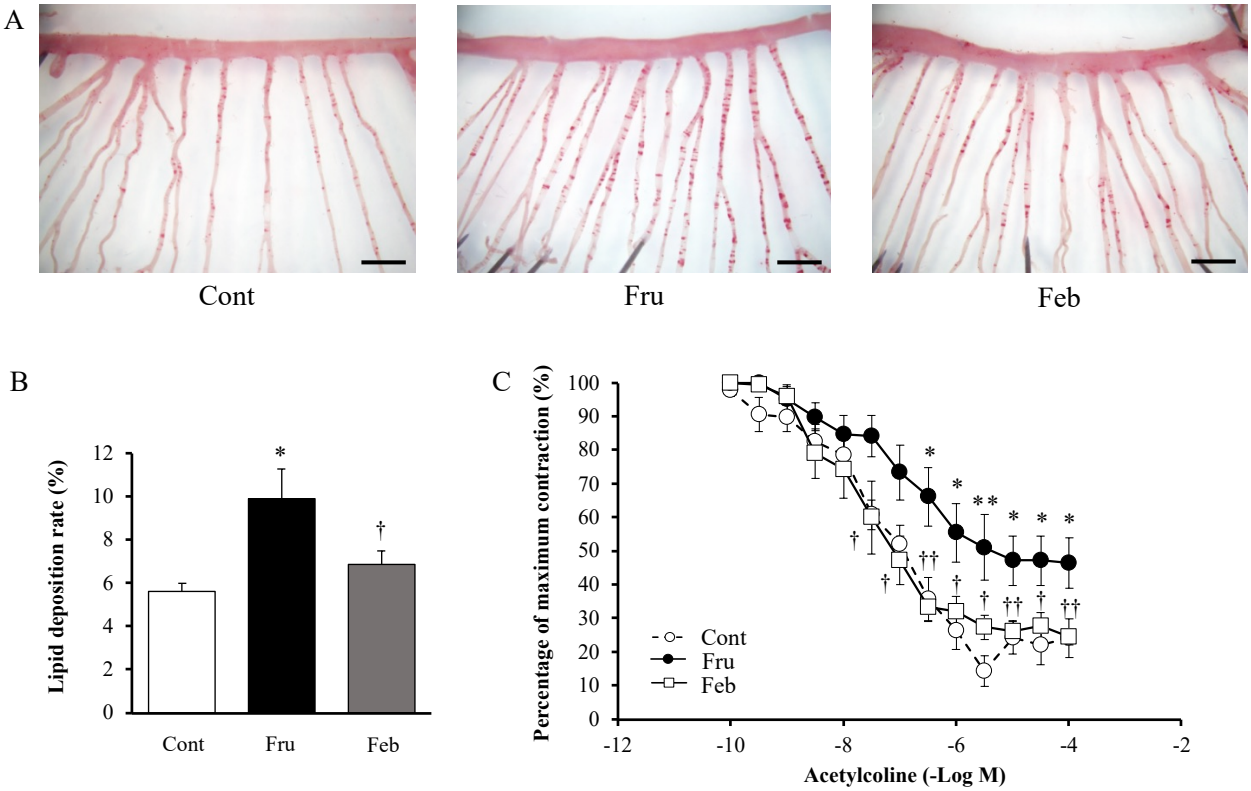


図2　　血管の病態解析

る際に ATP が ADP に変換され，AMP，イノシン 1 リン酸，イノシン，ヒポキサンチン，キサンチンへと代謝され，最終的に産生された尿酸や酸化ストレスにより，炎症やインスリン抵抗性を引き起こしたからと考えられる。近年の研究では，尿酸上昇がインスリンシグナル伝達に関与するインスリン受容体基質 1 (insulin receptor substrate 1; IRS-1) を直接的に阻害してインスリン抵抗性を誘導するとの報告や，酸化ストレスが TNF-α による IRS-1 の阻害に関与しているとも考えられている。また，インスリン抵抗性が惹起されることにより肝臓の病態が悪化すると報告されており，NASH と糖代謝が深く関与していることが示唆される。本研究においても，Fru 群では, OGTT, ITT, 血糖値, インスリン値, HOMA-IR の結果から軽度の耐糖能異常およびインスリン抵抗性が認められた。

フェブキソスタットは, XO 阻害効果により尿酸と酸化ストレスを減少し，それ以降に続く炎症やインスリン抵抗性の悪化を防ぐことで，肝臓の保護効果を発揮すると考えられる。実際に Feb 群では，炎症性サイトカインの遺伝子発現が抑制され，糖代謝指標においてもインスリン抵抗性は認められなかった。また，肝臓の病態所見においても，一部を除き白色化は認められず，表面の凹凸や脂肪滴，線維化も少なかった。NAS score においても，Feb 群ではスコアは 3-4 点の間で NASH と非 NASH の境界型となった。Feb 群の NAS score が改善したのは，脂肪変性の差が顕著であったことや，有意差はつかなかったものの炎症性細胞の浸潤が Feb 群で抑制されていたことなどが理由として挙げられる。くわえて，血中の生化学的な肝機能指標（AST，ALT）も Feb 群で減少傾向にあった。これらの結果から，フェブキソスタットは肝臓での尿酸産生と活性酸素種の発生を阻害し，インスリン抵抗性を抑制することにより，肝臓での炎症を抑え，NASH 病態の悪化を予防したと考えられる。

一方で、血管内皮機能障害は動脈硬化の初期に起こる病態で，その後傷害された内皮細胞の隙間からコレステロールが入り込むことで，アテローム性プラークが形成され，動脈硬化の進行，心血管疾患への合併症につながっていく。血管内皮細胞から放出される一酸化窒素（nitric oxide; NO）は中膜にある平滑筋に作用して血管を拡張するだけではなく，マクロファージやコレステロールが血管内に侵入するきっかけとなる細胞間接着因子（ICAM-1, VCAM-1 など）の活性を抑制する血管内皮保護効果を有する。つまり，血管内皮細胞が NO を十分に放出できるかが動脈硬化を防ぐ上で重要となる。NO はさまざまな経路に関与しているが，インスリンシグナルにも重要な役割を担っている。インスリンが作用するためには，インスリンがインスリン受容体に結合し，インスリン受容体基質である IRS-1 と相互作用をとる過程でチロシンリン酸化を受けることが必要となる。その後，PI-3 キナーゼと Akt が活性化すると，細胞内へのグルコース輸送や NO の活性化などの複数の代謝が引き起こる。しかし，インスリン抵抗性を背景に持つ糖尿病や高尿酸血症においては，IRS-1 が障害されることでその後の経路が活性化されないため，血管内皮細胞の NO 合成が低下し，動脈硬化につながると考えられる。本研究で実施した血管内皮機能評価では，Feb 群では Fru 群と比較して血管内皮依存性のアセチルコリン応答が良くなり，NO による血管拡張能の改善が認められた。また，動脈硬化に直接関係する血中の LDL-コレステロール値，総コレステロール値，TG 値も Feb 群で減少した。フェブキソスタットによる血中の脂質を調節するメカニズムは未だ明らかとされていないが，フェブキソスタットを投与した他の先行研究においても，本研究と同様に脂質やコレステロール産生の低下が報告されていることから，フェブキソスタットは抗酸化作用や抗炎症作用を介して肝臓での脂質代謝を調節している可能性がある。実際に，腸間膜動脈の Oil red O 染色像においては，Fru 群では腸間膜動脈の脂質沈着が顕著であったが，Feb 群では脂質沈着が減少した。これはフェブキソスタットの投与による脂質・コレステロール合成の低減と血管内皮機能の改善の相乗効果が動脈硬化に奏功したと考えられる。

温熱抵抗性に関与するSAFB顆粒を標的にした新規温熱増感剤の開発

岡山大学学術研究院ヘルスシステム統合科学学域

渡邉　和則

（概要）

がん治療法であるハイパーサーミアは、疾患部位を43度程度に加温することでがん細胞を死滅させ、治療を行う方法である。また、ハイパーサーミアは放射線療法化学療法と併用することで治療効果が上昇する。しかしながら、細胞が持つ温熱抵抗機構により治療効果が低減してしまう。

温熱抵抗機構の1つとして核内ストレス顆粒 (nuclear stress bodies; nSBs) の形成がある。これまでに TRPV1 アンタゴニストである SB366791 を用いて nSBs 構成タンパク質である HSF1, SAFB 顆粒の形成を抑制すると温熱による細胞死を増強することができる、つまり SB366791 は温熱増感効果を示すことを明らかにしている。しかしながら、SB366791 による温熱増感効果は低い。そこで本研究では、高い SAFB 顆粒形成抑制能を持つことで高い温熱増感効果を示す新規温熱増感剤の開発を試みた。

まず化合物ライブラリーにある 2000 化合物の中から、温熱による細胞増殖抑制を増強する化合物の同定を試みた。その結果、温熱処理時にのみ化合物を存在させることで SAFB 顆粒の形成を抑制し、温熱増感効果を示した化合物として 4 化合物を同定した。また、温熱処理及びその後の培養に化合物を存在させることで SAFB 顆粒の形成を抑制し、温熱増感効果を示した化合物を1つ同定した。これら 5 つの化合物は SAFB 顆粒形成抑制を介した新規温熱増感剤であることが示唆された。

【はじめに】

がん治療法の1つとして温熱療法（ハイパーサーミア）がある。がん細胞は42.5度以上になると死滅する。この特徴を利用して、ハイパーサーミアでは疾患部位を 43 度程度に加温することでがん細胞を死滅させ、がん治療を行う[1]。また、ハイパーサーミアは放射線療法や化学療法よりも重篤な副作用が小さい特徴がある。

小さい副作用以外のハイパーサーミアの特徴として、ハイパーサーミアと放射線療法を併用することで治療効果が上昇することが報告されている。また、化学療法との併用療法も治療効果を上昇させることができる。例えば、シスプラチンや 5-FU などの抗がん剤の効果を増幅させることができる。

このようにハイパーサーミアはがん治療法としては有用であるが、一方で多くの問題も抱えている[2,3]。例えば、深部を加温するには大型の機器が必要であること、加温するために長時間の治療時間が必要であることが挙げられる。また、細胞が持つ温熱抵抗機構のため治療効果が低減してしまうことも挙げられる。

細胞が持つ温熱抵抗機構には RNA 分解や翻訳抑制、ストレス顆粒の形成などが挙げられる[4]。ストレス顆粒には細胞質で形成されるストレス顆粒 (Stress granules; SGs) と核内ストレス顆粒 (nuclear stress bodies; nSBs) がある。我々はこれらストレス顆粒のうち、nSBs に着目している。nSBs は3種類の RNA と 20 種類以上の RNA 結合タンパク質から構成されている[5]。また、液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation; LLPS) が起こることで顆粒が形成することも報告されている[6]。

我々は nSBs 形成機構と機能について解析を進めている。これまでに nSBs 構成タンパク質である HSF1、SAFB をノックダウンすることで温熱による細胞増殖抑制（温熱感受性）が増強されることを明らかにしている。また、温度センサーである TRPV1 のアンタゴニストである SB366791 を用いることで SAFB 顆粒の形成が抑制され、温度感受性が増強さ

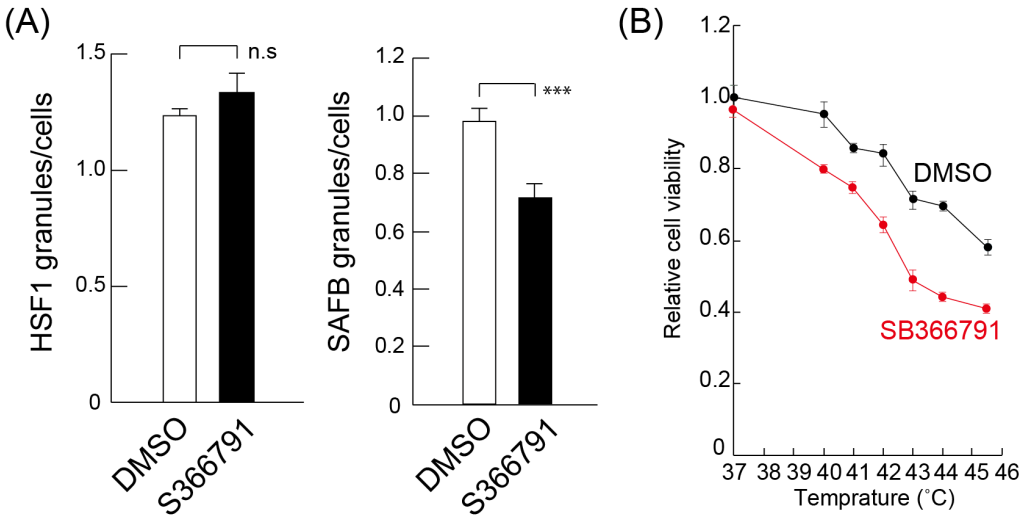


図 1　SB366791 による温熱感受性の増強 [6]
(A) SB366791 存在下での HSF1、SAFB 顆粒形成数。DMSO は溶媒。
(B) SB366791 存在下での温度依存的な細胞増殖。温熱処理時間は 1 時間。

れること（図 1）、脂肪族アルコールである 2,5-ヘキサンジオールを用いることで HSF1、SAFB 顆粒の形成を抑制することでも温度感受性が上昇することを明らかにしている [6]。つまり、HSF1、SAFB 顆粒の形成を抑制することで温熱感受性が増強されることが示唆された。このことから、HSF1、SAFB 顆粒の形成を抑制することで、ハイパーサーミアをより低温でかつ、より効果的に行うことができると考えられる。しかしながら、2,5-ヘキサンジオールは通常培養温度での細胞毒性が高く、クロマチンへの影響が報告されているため、医薬品として採用することは困難である。また、SB366791 による温熱感受性増強効果は低い。そこで本研究では、高い SAFB 顆粒形成抑制能を持つことで温熱抵抗機構を抑制し、温熱感受性を大きく増強させる新規温熱増感剤の開発を試みる。

【結果と考察】

1. 化合物ライブラリーを用いた新規温熱増感剤の同定（温熱時にのみ化合物が存在する）

本研究では SAFB 顆粒の形成を抑制することで温熱感受性を増強する新規化合物を探索するために大阪大学薬学サイエンス研究支援拠点が保有している化合物ライブラリー（2000 化合物のライブラリー）を用いることにした。しかしながら、SAFB 顆粒の観察には免疫染色を用いているため、結果を得るまでに非常に時間がかかる。そのため、2000 化合物に対する免疫染色を用いたスクリーニングは現実的ではない。これまでに TRPV1 アンタゴニスト SB366791 を用いて SAFB 顆粒の形成を抑制することで温熱による細胞増殖抑制が増強されることが明

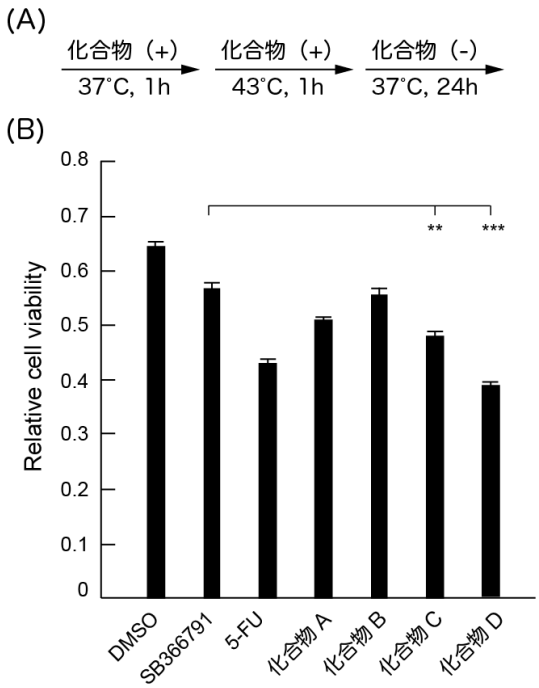


図 2 温熱時のみ化合物を処理することで温熱感受性を増強した化合物
(A) 実験条件　(B) 化合物存在下で温熱処理後、化合物なしで 24 時間細胞培養後の細胞増殖の割合

らかになっている（図 1）[6]。細胞増殖の分析結果は吸光度測定により得られること、96 well プレートで解析が可能なことからスクリーニング解析が容易である。そこで、SAFB 顆粒の形成を抑制することで温熱感受性を増強する新規化合物を同定するための一次スクリーニングとして、温熱による細胞増殖抑制を増強する化合物の同定を試みることにした。

SB366791 による温熱感受性に関する研究では温熱時にのみ SB366791 を存在させ、温熱処理後は SB366891 を取り除いていた。そこでまず、温熱処理時にのみ化合物を処理することで温熱による細胞増殖抑制を増強する化合物の同定を試みた（図 2A）。その結果、4 化合物が温熱感受性を増強することを明らかにした（図 2B）。また、5 化合物のうち、化合物 D、化合物 E は SB366791 よりも温熱感受性を増強することも明らかになった。しかしながら、ハイパーサーミアと化学療法を併用したがん治療において用いられている 5-FU よりも高い効果を示す化合物はなかった。

2. 化合物ライブラリーを用いた新規温熱増感剤の同定（温熱時およびその後の培養にも化合物が存在する）

実際に治療で化合物を用いる場合には温熱時にのみ化合物を存在させることはできない。そこで、温熱処理後も化合物を存在させることで温熱による細胞増殖抑制を増強する化合物があるのか検証した（図 3A）。まず、温熱時にのみ存在させていた場合

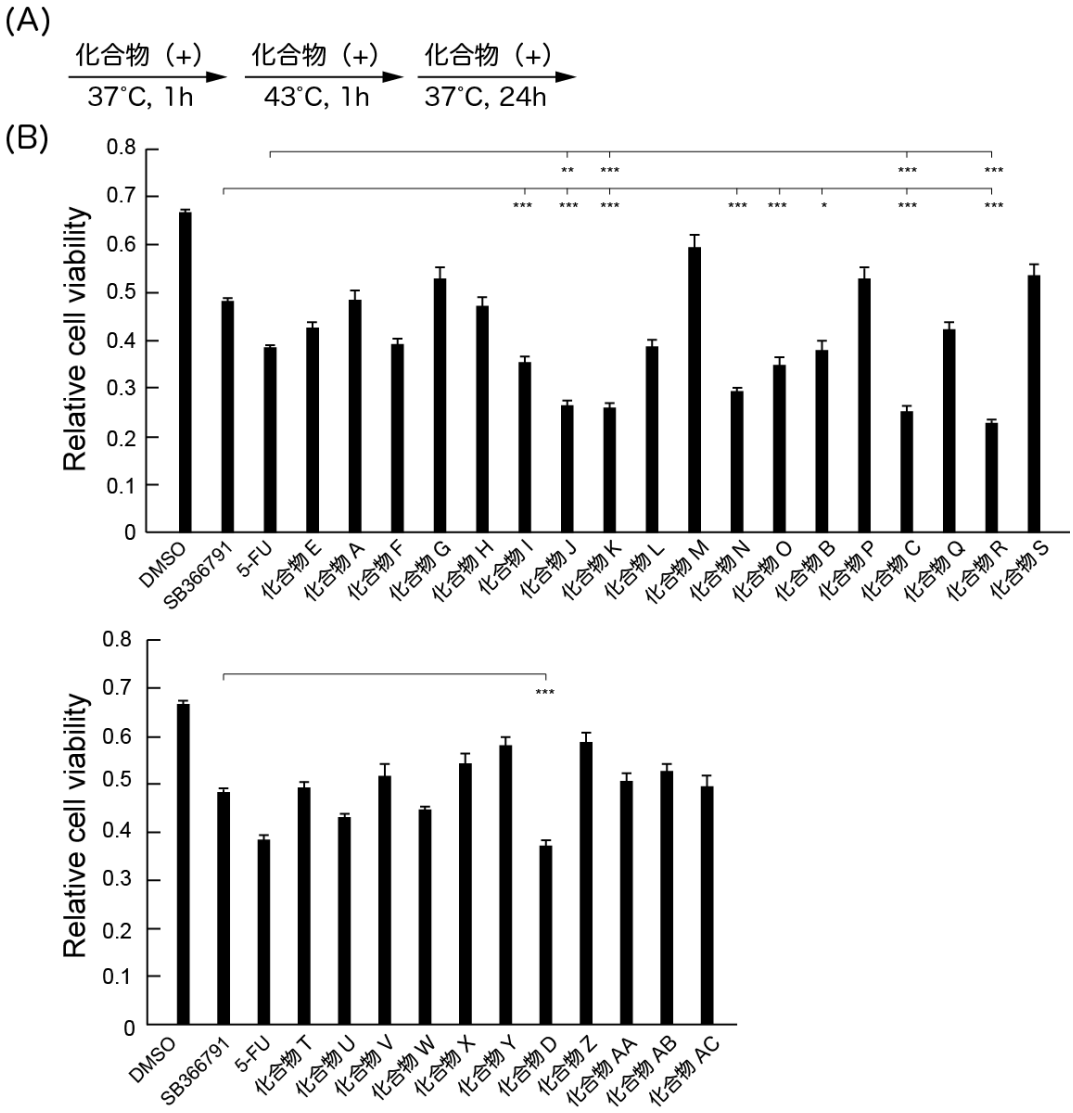


図 3 温熱処理後も化合物に曝すことで温熱感受性を増強した化合物

(A) 実験条件　(B) 化合物存在下で温熱処理し、24 時間細胞培養後の細胞増殖の割合

SB366791 および 5-FU はそれぞれ 0.57, 0.43 であったが（図 2B）、温熱処理後も化合物が存在していた時はそれぞれ 0.48、0.39 であった（図 3B）。このことから、SB366791 および 5-FU は温熱処理後も培地中に含めておくことで細胞増殖抑制を増強できることが示された。

次に化合物ライブラリーに対して解析を行った。その結果、29 化合物が温熱感受性を増強した（図 3B）。また、SB366791 よりも温熱感受性を増強した化合物として 9 化合物、5-FU よりも温熱感受性を増強した化合物として 4 化合物を同定した。

3. 温熱増感効果を示した化合物存在下での SAFB 顆粒形成抑制

1 より温熱感受性を増強した化合物として 4 化合物を同定した。そこでこれらの化合物が SAFB 顆粒の形成を抑制するのか検討した。SB366791 による SAFB 顆粒の形成抑制の知見は、SB366791 存在下で温熱 1 時間処理後のデータである。そこで同様に、化合物存在下（化合物 A,B,C,D）で温熱 1 時間処理することで SAFB 顆粒の形成が抑制されるのか検討した（図 2B）。その結果、化合物 A, B, C, D 全てにおいて SAFB 顆粒の形成数は SB366791 と同程度まで抑制されていた（図 4）。

次に 2 より温熱感受性を増強した化合物として

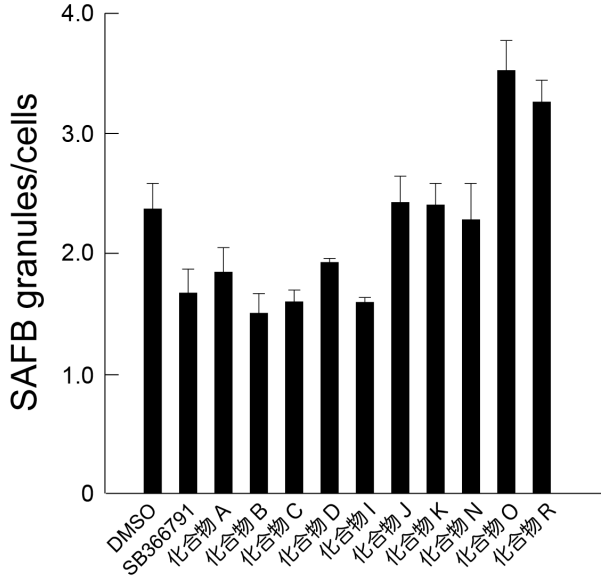


図 4 化合物存在下での温熱による一細胞あたりの SAFB 顆粒の形成数

29 化合物を同定した。しかし、29 化合物に対する SAFB 顆粒の形成抑制への影響を調べるのは時間がかかる。そこでまず SB366791 よりも温熱による細胞増殖抑制を増強した化合物 I, J, K, N, O, R が SAFB 顆粒形成に影響を与えるのか検証した（図 3B, 4）。その結果、化合物 I は SB366791 と同程度の SAFB 顆粒形成への抑制を観察することができた。しかしながら、化合物 J, K, N に関しては SAFB 顆粒形成に影響がなかった。さらに、化合物 O, R に関しては SAFB 顆粒の形成が増強されていた。

【まとめ】

化合物ライブラリーにある 2000 化合物から温熱感受性を増強させ、SAFB 顆粒の形成を抑制した化合物として、化合物 A, B, C, D, I を同定することができた。これら５つの化合物は SAFB 顆粒の形成を抑制することで温熱感受性を増強したと考えられる。つまり、これら５つの化合物は SAFB 顆粒の形成抑制を介した新規温熱増感剤であることが示唆された。一方で、化合物 J, K, N, O, R は SAFB 顆粒の形成抑制ではなく、異なった経路で温熱増感効果を示したと考えられる。

本研究では HeLa 細胞を用いて解析を行ってきた。今後は化合物 A, B, C, D, I が他のがん細胞でも同様の効果を示すのか検討する予定である。また、これら５つの化合物がどのタンパク質の阻害剤として働くことで SAFB 顆粒の形成を抑制しているのか検討していく必要がある。

化合物 J, K, N, O, R に関しては予想外の結果であった。そのため、これらの化合物がどのような機構で温熱による細胞増殖抑制を増強しているのか、検証していく必要がある。

【謝辞】

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

【参考・引用文献】

(1) Yagawa, Y., Tanigawa, K., Kobayashi, Y. & Yamamoto, M. (2017) Cancer immunity and therapy using

hyperthermia with immunotherapy, radiotherapy, chemotherapy, and surgery. J. Cancer Metastasis Treat. 3, 218–230.
(2) Mu, C., Wu, X., Zhou, X., Wolfram, J., Shen, J., Zhang, D., Mai, J., Xia, X., Holder, A.M., Ferrari, M., et al. (2018) Chemotherapy sensitizes therapy-resistant cells to mild hyperthermia by suppressing heat shock protein 27 expression in triple-negative breast cancer. Clin. Cancer Res. 24, 4900–4912.
(3) Kaur, P., Aliru, M.L., Chadha, A.S., Asea, A. & Krishnan, S. (2016) Hyperthermia using nanoparticles-Promises and pitfalls. Int. J. Hyperth. 32, 76–88.
(4) Watanabe, K., Miyagawa, R., Tomikawa, C., Mizuno, R., Takahashi, A., Hori, H. & Ijiri, K. (2013) Degradation of initiator tRNAMet by Xrn1/2 via its accumulation in the nucleus of heat-treated HeLa cells. Nucleic Acids Res. 41(8), 4671-4685.
(5) Miyagawa, R., Mizuno, R., Watanabe, K. & Ijiri, K. (2012) Formation of tRNA granules in the nucleus of heat-induced human cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 418(1), 149-155.
(6) Watanabe, K. & Ohtsuki, T. (2021) Inhibition of HSF1 and SAFB granule formation enhances apoptosis induced by heat stress. Int. J. Mol. Sci. 22, 4982.

免疫機能を内包する人工リンパ節の構築

岡山大学学術研究院ヘルスシステム統合科学学域

曲　正樹

リンパ球の一種であるB細胞は，二次リンパ組織において病原体を認識すると組織に常在するストローマ細胞の時空間的な制御のもと抗原特異的な抗体産生細胞や記憶細胞へと分化する．しかし，二次リンパ組織での B 細胞分化におけるストローマ細胞による詳細な制御機構は明らかになっていない．そこで本研究では，B 細胞の活性化および分化を支持できるマウスストローマ細胞株（FL-Y）を利用し，生体内に免疫能力を備えた人工リンパ節を構築できる手法を開発する．今回，効果的な免疫応答を誘発できるリンパ節構造を構築するため，活性化状態を維持できるFL-Y 細胞の樹立を試みた．まず，FL-Y 細胞の活性化方法を探索するため，FL-Y 細胞を抗 Lymphotoxin β receptor（LTβR）抗体で刺激した．その結果，FL-Y 細胞の増殖促進とともに *Slamf8* や *Enpp2* mRNA の発現上昇を含む遺伝子発現の変化が見られた．次に，遺伝子導入により FL-Y 細胞に LTβR を高発現させると，抗LTβR 抗体刺激と同様の遺伝子発現変化の傾向を示すとともに，高いB細胞活性化能を保持した．これらの結果は，LTβR 高発現 FL-Y 細胞が人工リンパ節構造の形成に有用である可能性を示す．

研究背景

リンパ節や脾臓は，体内に新入した病原体に対する免疫応答を活性化するために重要な二次リンパ組織である．リンパ節は，抗体産生細胞である B 細胞とそれらを活性化するT細胞を含むリンパ球や樹状細胞，マクロファージなどが，組織に常在するストローマ細胞（支持細胞）の時空間的な制御のもと規則性を保って集合することにより形成されている．通常，全身を循環しているリンパ球は，抗原が侵入すると感染部位近傍のリンパ節に留まりストローマ細胞の一種である濾胞樹状細胞（FDC）の制御のもとヘルパーT 細胞などからの刺激を受け活性化し，病原体への免疫応答を開始する[1]．またB細胞は抗体産生細胞へと分化する過程で，FDC の制御のもと自身の発現する抗原特異的抗体の抗原への結合親和性や免疫能力を向上させることにより，免疫能力をより効果的なものとする[2]．

ストローマ細胞は，リンパ節の組織化された構造の形成を担う細胞群であり，互いに結合することで密なネットワークを形成している．このストローマ細胞のネットワークが，定常状態および感染時のリンパ節の四次元的な動的変化に重要である．これまでにリンパ組織の形成や効率的な免疫応答の開始にはサイトカインの一種であるリンホトキシン（LT）が重要な役割を担うとされている．LT は組織常在性ストローマ細胞を刺激し，リンパ球遊走因子である CXCL13 やB細胞活性化因子である BAFF などの発現を増強させることで，リンパ球を誘引するとともにそれらを活性化する．実際，LT やその受容体である LTβR を欠損したマウスでは，ストローマ細胞や二次リンパ組織の消失とともに抗体産生を含む免疫応答が低下している[3,4]．しかし，LT により刺激されたストローマ細胞によるリンパ組織の構築や動的変化，さらにはリンパ球の活性化から抗体産生にいたる詳細な制御機構は不明である．

これまでに，リンパ節において B 細胞が活性化され抗体産生細胞へと分化する一連の機構を解明するため，LT 刺激に依存して活性化するなどの組織常在性ストローマ細胞の性質を持つ FDC 株（FL-Y）を樹立した[5]．FL-Y 細胞は，リンパ球の遊走活性や活性化能力を有している．また，FL-Y 細胞は容易に遺伝子改変できるため，細胞培養系を用いて生体内の免疫応答の再現可能とする有用なツールとなっている[6-9]．これまでに様々な細胞培養系を駆使して，ストローマ細胞によるB細胞の活性化機構を解明してきたが，今後は生理的条件下での時空間的な細胞間相互作用を解明する必要がある．そこで本研究では，これまでの細胞培養系から得られている成果を発展させるため，FL-Y 細胞を利用して生体内に免疫能力を備えた人工リンパ節を構築できる手法を開発する．

これまでに，B 細胞活性化因子(BAFF)と遊走因子(CXCL13)を高発現させた FL-Y 細胞をマウスの腎皮膜下に移植することにより，異所性のリンパ節様構造の形成を確認している．しかし，その形成効率が低い問題がある．そのため，より効率的に人工リンパ節を構築するため，FL-Y 細胞の機能向上が必要である．

材料と方法

1. 細胞

免疫したマウスリンパ節より樹立した FDC 株，FL-Y を使用した [5]．FL-Y 細胞は，10%牛胎児血清および 50 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640/DMEM 培地中で培養した．また，FL-Y 細胞の培養時には終濃度 5 ng/mL の TNF-αを添加した．FL-Y 細胞の刺激培養では，24 穴プレートに播種しておいた FL-Y 細胞に抗 LTβR 抗体(2.5 μg/mL)を添加し，4日間培養した．

3. FL-Y 細胞への遺伝子導入

24 穴プレートに播種しておいた FL-Y 細胞に，ネオマイシン耐性遺伝子を含む LTβR 発現ベクターをレトロウイルス遺伝子導入法を用いて導入した．遺伝子導入翌日にネオマイシンを含む選択培地に交換し，ネオマイシン耐性細胞を選別した．その後，限界希釈法を用いてクローン化し，各クローンの LTβR 発現量をフローサイトメーターを用いて解析した．

4. フローサイトメトリー解析

培養した FL-Y 細胞をトリプシン処理により回収し，rat IgG 抗体で 30 分間処理することによりブロッキングを行なった．洗浄操作を行なった後に PE 標識した抗 LTβR 抗体で 30 分間染色した．染色した細胞は FACSCalibur を用いて解析した．

5. リンパ球と FL-Y 細胞の共培養

4日前に足裏に TNP-KLH を免疫したマウスから膝下リンパ節を摘出し細胞懸濁液を調整した．前日に播種しておいた FL-Y 細胞（2×10^3 cells/mL）上で，調整したリンパ節細胞（4×10^5 cells/mL）を培養した．その際，TNP-KLH（10 μg/mL）の刺激を加えた．培養6日目にフローサイトメーターを用いて活性化 B 細胞数を評価した．

6. qRT-PCR

培養した FL-Y 細胞をトリプシン処理したのちに回収し，TRI reagent を用いて mRNA を抽出した．抽出した mRNA をテンプレートとし ReverTra Ace を用いて cDNA を合成した．Thunderbird SYBR qPCR Mix と *Slamf8*, *Enpp2* および *Actb* に特異的なプライマーを用いて qRT-PCR を行なった．

結果と考察

1. FL-Y 細胞の活性化に伴う遺伝子発現変化

FDC は細胞表面に発現する LTβR 刺激に伴い活性化することが知られている．先行研究において，FDC の活性化状態について評価するため，FL-Y 細胞を抗 LTβR 抗体で刺激し mRNA の発現変化をマイクロアレイにより解析した．その結果，*Slamf8* や *Enpp2* を含む mRNA の発現上昇が認められた(図1A)[5]．

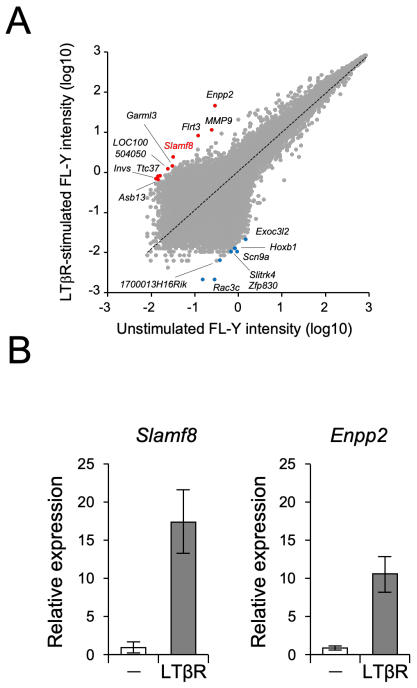


図1 FL-Y 細胞における LTβR 刺激に伴う遺伝子発現変化
(A) 抗 LTβR 抗体刺激した FL-Y 細胞より mRNA を抽出し，マイクアレイにより網羅的に遺伝子発現を解析した．横軸：未刺激時の発現量，縦軸：抗 LTβR 抗体刺激後の発現量，(B) 未刺激 (–) もしくは抗 LTβR 抗体刺激 (LTβR) した FL-Y 細胞での *Slamf8* と *Enpp2* mRNA 発現量を qRT-PCR により個別に解析した．内部標準として *Actb* 遺伝子を用いた．

これらの遺伝子発現変化を評価するため，抗LTβR抗体刺激したFL-Y細胞から抽出したmRNAを用いて，qRT-PCRにより発現上昇率を検討した．その結果，FL-Y細胞における*Slamf8* mRNA発現は，未刺激と比較し抗LTβR抗体刺激により約17倍上昇していた(図1B)．これらの結果は，SLAMF8がB細胞の活性化制御に関与する可能性を示すとともに，SLAMF8発現がFDCの活性化マーカーとなる可能性を示唆している．

2. LTβR高発現FL-Y細胞の樹立と評価

効率的に人工リンパ節を構築するためにはストローマ細胞の恒常的な活性化が必要であり，そのためにLTβRを恒常的に刺激することが有用であると考えた．そこで，FL-Y細胞にLTβRを高発現させる手法について検討した．FL-Y細胞にLTβR発現ベクターを導入したのち，フローサイトメーターを用いてLTβR発現量を評価することによりLTβR高発現FL-Y細胞を選別した．その結果，LTβRの発現が約2倍増加したFL-Y細胞(FL-YLT)を樹立した(図2)．

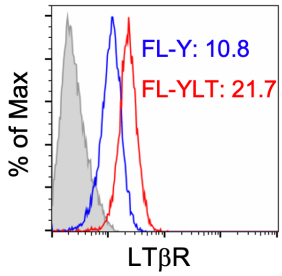


図2 LTβR 高発現 FL-Y 細胞の樹立
FL-Y細胞にLTβR発現ベクターを導入したのち，LTβR発現量をフローサイトメーターにより解析した．青:未導入細胞，赤:導入細胞，数値は平均蛍光強度を示す．

まず，FL-YLT細胞の活性化状態を評価するため，細胞増殖速度を比較した．その結果，LTβRの高発現により増殖速度が亢進していた(図3A)．次に，FDCにおいて活性化に伴い発現増加すると考えられる*Slamf8* mRNA発現量をqRT-PCRにより評価した．その結果，抗LTβR抗体で刺激したときと同様に*Slam8* mRNAの発現上昇が見られた(図3B)．これらの結果より，LTβRの高発現によりFL-Y細胞が活性化状態となると考えられる．

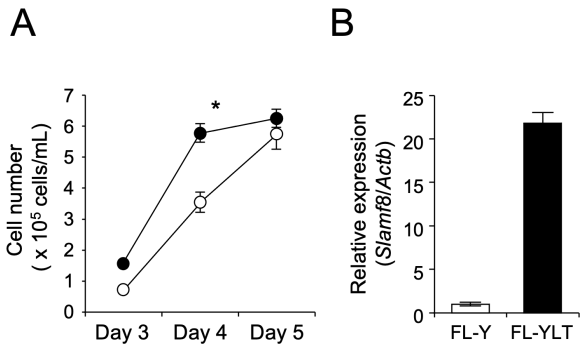


図3 LTβR 高発現 FL-Y 細胞の性質
(A) FL-Y細胞(○)およびLTβR高発現FL-Y細胞(●)の増殖曲線，(B) FL-Y細胞(FL-Y)およびLTβR高発現FL-Y細胞(FL-YLT)からmRNAを抽出し，*Slamf8* mRNA発現量をqRT-PCRにより解析した．なお，内部標準として*Actb*遺伝子を用いた．(*p<0.05)

FL-YLT細胞のB細胞活性化能力を評価するため，TNP-KLH免疫したマウスより調整したリンパ節細胞をFL-YLT細胞上で培養し，活性化B細胞数を評価した．その結果，FL-Y細胞にLTβRを高発現させることにより，活性化B細胞の有意な増加が見られた(図4)．これは，LTβRの高発現によりFL-Y細胞自身が活性化し，B細胞活性化および生存促進因子の産生が増強された結果であると考えられる．これらの結果より，FL-Y細胞におけるLTβRの高発現は，FL-Y細胞自身を活性するのみならず，B細胞の活性化を含む機能向上に有用であると考えられる．

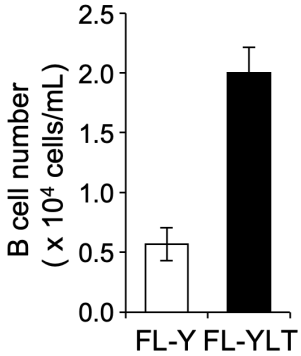


図4 LTβR 高発現 FL-Y 細胞の B 細胞活性化能力
FL-Y細胞(FL-Y)およびLTβR高発現FL-Y細胞(FL-YLT)上で，免疫したマウスより調整したリンパ節細胞をTNP-KLH存在下で培養し，活性化B細胞数を生細胞数の計数とフローサイトメーターを用いて算出した．

まとめ

本研究において，マウスリンパ節より樹立した濾胞樹状細胞株（FL-Y）の活性化状態を維持できる FL-YLT 細胞を樹立した．FL-YLT 細胞は，刺激非依存的に活性化していることから，FDC の機能解明のみならず，効率的な人工リンパ節構築のために有用であると考えられる．

これまでに，機能改変した胸腺由来のストローマ細胞を利用した人工リンパ節構築の報告がある [10]．この人工リンパ節は，抗体産生能力を含む免疫機能も有している．本研究で樹立した FL-YLT 細胞は B 細胞活性化能力が高いことから，FL-YLT 細胞により形成される人工リンパ節の抗体産生能力も高いと予想される．しかし，FL-YLT 細胞の人工リンパ節形成能力および生体内における抗体産生機構の制御については検討できていない．今後は，生体内での FL-YLT 細胞の役割についての評価が重要な検討課題である．

謝辞

本研究を遂行するにあたり，多大なご支援を賜りました公益財団法人ウエスコ学術財団に心より感謝申し上げます．

参考文献

1. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. ***Nature*** **381**, 751–758 (1996).
2. Allen C. D. C. and Cyster J. G. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: Phenotype and function. ***Semin. Immunol.*** **20**, 14–25 (2008).
3. Fütterer A., Mink K., Luz, A., Kosco-Vilbois M. H., and Pfeffer K. The lymphotoxin β receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. ***Immunity*** **9**, 59–70 (1998).
4. Koni P. A., Sacca R., Lawton P., Browning J. L., Ruddle N. H., and Flavell R. A. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins α and β revealed in lymphotoxin β-deficient mice. ***Immunity*** **6**, 491–500 (1997).
5. Nishikawa Y., Hikida M., Magari M., Kanayama N., Mori M., Kitamura H., Kurosaki T., and Ohmori H. Establishment of lymphotoxin β receptor signaling-dependent cell lines with follicular dendritic cell phenotypes from mouse lymph nodes. ***J. Immunol.*** **177**, 5204–5214 (2006).
6. Magari M., Nishikawa Y., Fujii Y., Nishio Y., Watanabe K., Fujiwara M., Kanayama N., and Ohmori H. IL-21–dependent B cell death driven by prostaglandin E_2 , a product secreted from follicular dendritic cells. ***J. Immunol.*** **187**, 4210–4218 (2011).
7. Zhang T. T., Gonzalez D. G., Cote C. M., Kerfoot S. M., Deng S., Cheng Y., Magari M., and Haberman A. M. Germinal center B cell development has distinctly regulated stages completed by disengagement from T cell help. ***eLife*** **6**, (2017).
8. Yamane F., Nishikawa Y., Matsui K., Asakura M., Iwasaki E., Watanabe K., Tanimoto H., Sano H., Fujiwara Y., Stanley E. R., Kanayama N., Mabbott N. A., Magari M., and Ohmori H. CSF-1 receptor-mediated differentiation of a new type of monocytic cell with B cell-stimulating activity: its selective dependence on IL-34. ***J. Leukoc. Biol.*** **95**, 19–31 (2014).
9. Ogawa S. Matsuoka Y., Takada M., Matsui K., Yamane F., Kubota E., Yasuhara S., Hieda K., Kanayama N., Hatano N., Tokumitsu H., and Magari M. Interleukin 34 (IL-34) cell-surface localization regulated by the molecular chaperone 78-kDa glucose-regulated protein facilitates the differentiation of monocytic cells. ***J. Biol. Chem.*** **294**, 2386–2396 (2019).
10. Suematsu S. and Watanabe T. Generation of a synthetic lymphoid tissue-like organoid in mice. ***Nat. Biotechnol.*** **22**, 1539-1545 (2004)

がん特異的糖代謝バランスを標的とした新規がん治療法の開発

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

（概要）

がん細胞は正常細胞とは異なる代謝系にリプログラムすることにより、高い増殖能を獲得している。ATP 産生効率の悪い解糖系に依存するワールブルグ効果も、がん細胞における代謝リプログラミングの一つである。好気的条件下において、正常細胞はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化により ATP を産生するのに対し、がん細胞はミトコンドリア活性を抑え、グルコースを活発に取り込むことで、解糖系を亢進し ATP を産生する。さらに、これまではがん細胞における解糖系の役割が注目されてきたが、解糖系の逆反応でピルビン酸からグルコースを生成する糖新生ががん細胞において抑制されていることも明らかになってきた。これらのがん細胞における代謝的特性に基づき、糖新生の促進により、がん細胞内でのグルコース代謝のバランスを崩壊させることで代謝ストレスを生み出すことができれば、効果的ながん治療の開発に繋がると考えている。

本研究では、先行研究によって糖新生との関係が示唆されている転写因子 NFYA（Nuclear Transcription Factor Y subunit Alpha）に着目して研究を行った。NFYA には、上皮性・間葉性細胞間で発現をスイッチさせている 2 種のスプライシングバリアント(長鎖型：NFYAv1, 短鎖型：NFYAv2)が存在し、それぞれ異なる機能を担うことが示唆されている。しかし、糖新生におけるスプライシングバリアント間の機能の違いは未だ明らかになっていない。以上のことから、本研究では、NFYA スプライシングバリアントの糖新生における機能を明らかにし、それによる腫瘍への影響を評価することで、効果的ながん治療開発の基盤構築を目指す。

［背景］

肝臓がんは、罹患者数・死亡者数共に高く、さらに 5 年生存率も低い極めて治療が困難である悪性腫瘍である。肝臓がんの 85～90%を占める肝細胞がん（HCC: Hepatocellular carcinoma）は、これまでC型肝炎などのウイルス性肝疾患が主な原因であった。しかし、近年、ウイルス感染を伴わない肝細胞がんが増加しており、その原因が、メタボリックシンドロームによる非アルコール性脂肪性肝障害であると考えられている。そのため、今後も肝臓がんの罹患者は増加していくことが予想できるが、明確な治療方法は確立されておらず、有効な治療方法の開発が急がれている。

がん細胞は生存・増殖・転移を行うために、正常細胞とは異なる代謝系にリプログラムしている。代表的なものとしてグルコース代謝が挙げられる。正常細胞は酸素が十分に存在している条件下では、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化により ATP を産生する。しかし、がん細胞は酸素が十分に存在する条件下においても、ミトコンドリア活性を抑え、グルコースを活発に取り込むことで､解糖系を亢進し、ATP を産生する。解糖系によるエネルギー産生は、酸化的リン酸化によるエネルギー産生と比べ、はるかに効率が低い。この特性は､『ワールブルグ効果』として知られている｡正常細胞よりも増殖能が高く、大量のエネルギーを必要とするがん細胞が、エネルギー産生効率の低い解糖系に依存する理由は、未だ明らかになっていない。さらに、これまではがん細胞における解糖系の役割が注目されてきたが、解糖系の逆反応でピルビン酸からグルコースを生成する糖新生ががん細胞において抑制されていることも明らかになっている。これらのがん細胞における代謝的特性に基づき、糖新生の促進により、がん細胞内でのグルコース代謝のバランスを崩壊させることで代謝ストレスを生み出すことができれば、効果的ながん治療の開発に繋がると考えている。

本研究では、先行研究によって糖新生との関与が示唆されている転写因子 NFYA に着目して研究を行っ

た。NFYA には２つのスプライシングバリアント（長鎖型 ： NFYAv1, 短鎖型 ： NFYAv2）が存在し、それぞれ異なる機能を担っていると考えられている。しかし、糖新生制御における NFYA スプライシングバリアントの機能は明らかになっていない。したがって、本研究では NFYA 各スプライシングバリアントの糖新生における機能および腫瘍への影響を評価することで、効果的ながん治療開発の基盤構築を目指す。

[結果]

糖新生誘導による NFYA の発現

これまでの研究から、NFYA が糖新生制御に関与していることが示唆されている。しかし、糖新生制御において、NFYA の 2 種のスプライシングバリアント間で機能の違いがあるかは明らかになっていない。そのため、我々はまず、マウスを飢餓状態にすることで糖新生を誘導し、その際の肝臓における NFYA 各バリアントの発現を評価した。飢餓状態にしたマウスの肝臓組織では糖新生制御因子である G6PC および PCK1 の遺伝子発現の上昇を確認した。このことは、飢餓状態により糖新生が誘導されていることを示している。その条件下で、NFYA 各バリアントの発現を調べた結果、NFYA の両バリアントとも同様に発現を上昇させることを明らかにした。これらの結果は、NFYA が糖新生制御因子 G6PC、PCK1 と同じ挙動を示すことから、NFYA が糖新生制御に関与していることを示している。しかし、NFYA の各バリアント間で、発現パターンに違いが確認できなかったため、この実験では機能の違いを明らかにできなかった。

肝臓がん細胞での糖新生誘導による細胞死

肝臓がんにおいて、糖新生制御因子 PCK1 および G6PC の発現は低下しており、これらの発現と肝臓がん患者の予後には強い相関があることが明らかになっている。さらに、肝臓がん細胞において、PCK1 の過剰発現が、糖新生を誘導するグルコース枯渇下で、細胞死を優位に上昇させることも明らかになっている。そのため、我々は、肝臓がん細胞において、NFYA 各バリアントの発現パターンを操作することで、糖新生制御因子の発現が変化し、グルコース枯渇下での細胞死に影響が現れるのではないかと仮説を立てた。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用い、NFYA 欠損細胞および NFYAv1 欠損細胞を作製し、細胞死に対する影響を調べた。その結果、グルコース枯渇下において、NFYAv1 欠損細胞（NFYAv2 高発現細胞）で細胞死が顕著に増加することを確認した。さらに、活性酸素種 ROS の阻害剤である NAC（N-Acetyl-L-Cysteine)、および TCA 回路の中間体である α ケトグルタル酸（α-KG)により、細胞死が抑制されることも確認した。これらの結果は、グルコース枯渇下において、NFYAv2 が活性酸素種 ROS の産生を介して細胞死を促進することを示している。

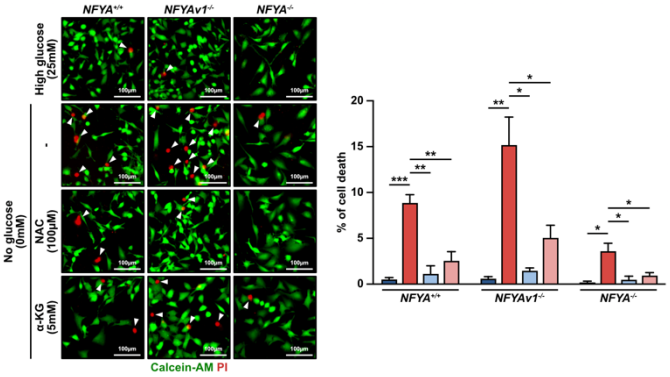


図 1：グルコース枯渇下における細胞死への影響
生存細胞を Calcein-AM（緑)、死細胞を PI（赤）で染色。全細胞数における死細胞数の割合をグラフで示す。

グルコース枯渇下における細胞死誘導メカニズム

グルコース枯渇下において、細胞は糖新生を誘導することにより、グルコースを産生しようとする。それにより、細胞はエネルギー枯渇に陥り、細胞死が誘導されると考えられる。そのため、細胞死を優位に促進させた NFYAv2 は、糖新生を誘導していると考えられ、糖新生誘導のメカニズムとして、以下の 2 つの仮説が考えられる。①NFYAv2 がグルタミン酸代謝を亢進させることで、糖新生の原料を供給する。②NFYAv2 が糖新生制御因子 PCK1 や G6PC の発現を亢進させる。

まず我々は、NFYAv2 によるグルタミン酸代謝への影響をグルタミン酸代謝制御因子の発現およびグルタ

ミン酸代謝中間産物の量を計測することで解析した。その結果、遺伝子発現およびグルタミン酸代謝中間産物量ともに優位な差は確認できなかった。

次に我々は、糖新生制御因子 PCK1 および G6PC の遺伝子発現を調べた。その結果、NFYAv1 欠損細胞（NFYAv2 高発現細胞）において、G6PC の発現は変化がなかったが、PCK1 の発現が優位に上昇していることを明らかにした。また、同時に NFYAv1 欠損細胞（NFYAv2 高発現細胞）では、細胞内 ATP 量が減少しており、エネルギー枯渇が生じていることを明らかにした。

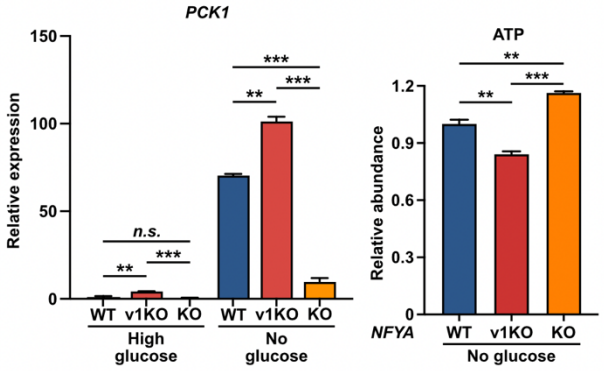


図 2：糖新生制御因子 PCK1 発現および ATP 量
NFYAv1 欠損細胞において糖新生制御因子 PCK1 の発現が上昇している。同時に、細胞内 ATP 量が減少している。

［考察］

本研究は、がん細胞における代謝的特徴に基づき、糖新生の促進により、がん細胞内でのグルコースバランスを崩壊させる、新規がん治療の開発基盤を築く研究である。本研究の結果、グルコース枯渇下において、NFYAv2 が細胞死を誘導することを明らかにした。これは、グルコースを枯渇させ、好気的解糖系依存から糖新生経路にシフトさせることで、細胞がエネルギー枯渇に陥り、ROS 産生が誘導されることによると考えられる。さらに、そのメカニズムとして、NFYAv2 が糖新生制御因子 PCK1 の発現亢進を介し、糖新生を促進させていることを明らかにした。今後、NFYA による包括的な代謝経路への影響およびマウスを用いた生体内での NFYA による抗腫瘍効果を明らかにすることで、効果的な肝臓がん治療の開発に繋げたいと考えている。

近赤外吸収を示す含カルバゾールポルフィリン多量体の開発

岡山大学学術研究院自然科学学域

前田 千尋

（概要）芳香環を縮環させた拡張ポルフィリンは通常のポルフィリンよりも広い共役系をもつことから近赤外での吸収が可能である。申請者はカルバゾールがポルフィリンの原料であるピロールの拡張化合物であることに着目し、カルバゾール骨格を組み込んだ新規拡張ポルフィリンを開発した。共役系の拡張により 34 π 芳香族性及び 1000 nm を超える近赤外吸収を示した。本研究では共役系を著しく拡張させることで従来と異なり近赤外領域で幅広く光吸収する有機色素として、鎖状及び環状の含カルバゾールポルフィリン多量体を開発することを目的としている。前年度は、直接結合二量体及び縮環二量体の合成を行い、それらの近赤外特性について明らかにした。本年度はブタジインやチオフェンを架橋スペーサーとして用いた環状多量体を構築し、それらの近赤外吸収特性を調査したところ、多量体内での強い電子的結合を確認した。

１．研究目的

芳香環を縮環させた拡張ポルフィリンは通常のポルフィリンよりも広い共役系をもつことから近赤外での吸収が可能である。特にアズレン、アントラセンを縮環させたものは 1000 nm を超える吸収を示すことが報告されている。近赤外領域は生体透過性が高く、また太陽光スペクトルの 4 割が近赤外領域にある。従って近赤外吸収色素は光線力学療法や太陽電池への応用が可能である。これまでに様々な拡張ポルフィリンが合成されてきたが、1000 nm を超える吸収を示すものは数例にとどまっている。

申請者はカルバゾールがポルフィリンの原料であるピロールの π 拡張体であることに着目し、カルバゾール骨格を組み込んだ新規拡張ポルフィリン **1** を開発した。この化合物は 1000 nm を超える近赤外吸収を示した（図１a）。[1–5]

本研究では含カルバゾールポルフィリン多量体を合成し、その光物性を調査する。これまでに周辺部置換基効果を探索して近赤外吸収特性のチューニングが可能であることを示してきたが、多量化により共役系を著しく拡張させることで従来と異なり近赤外領域で幅広く光吸収する有機色素を開発することを目的とした。前年度は直接結合二量体及び縮環二量体の合成を行い、それらの近赤外特性を評価したところ、縮環二量体は渡環架橋部位を介した共役系の拡張により 66 π 共役系由来の近赤外吸収を示した（図１b）。[6] 本年度は環状多量体の合成を試みたところ、ブタジイン及びチオフェンで架橋した環状三量体と四量体の合成に成功し、それらの近赤外吸収特性について明らかにした(図１c)。

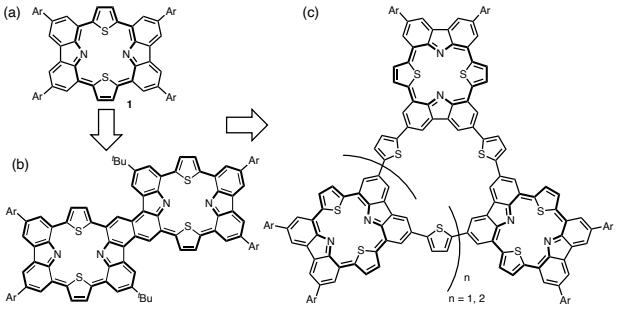


図１　含カルバゾールポルフィリンの構造

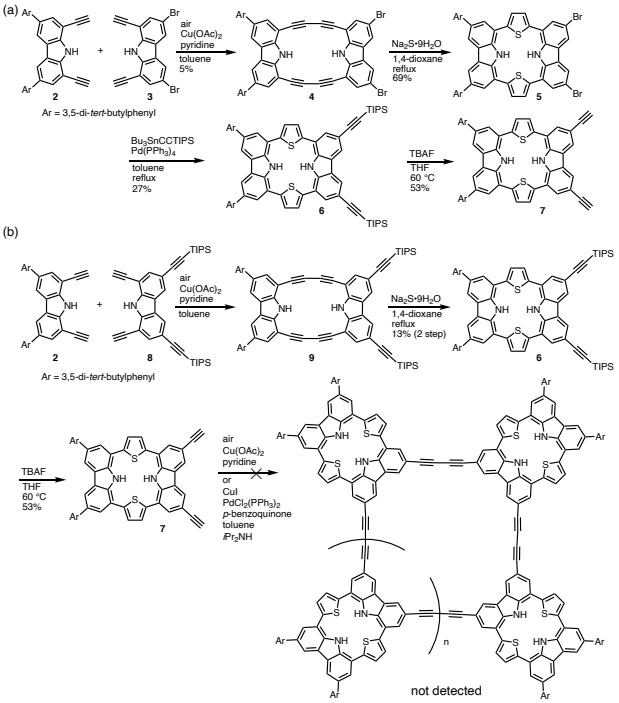
２．結果と考察

まず多量化反応に用いる単量体の合成検討を行った(スキーム 1)。3,6-bis(3,5-di-*tert*-butylphenyl)-1,8-diethynylcarbazole (**2**) と 3,6-dibromo-1,8-diethynylcarbazole (**3**)の Glaser カップリングによりカルバゾール二量体 **4** を得た。ブタジインをチオフェンに変換して２つのブロモ基を持つ単量体 **5** を得た。Stille カップリングによりブロモ基を TIPS エチニル基に変換し TBAF による **6** の TIPS の脱保護を行うことで単量体 **7** を得た(スキーム 1a)。しかし **7** の総収率は 4 ステップ 0.5%と十分な量を得るこ

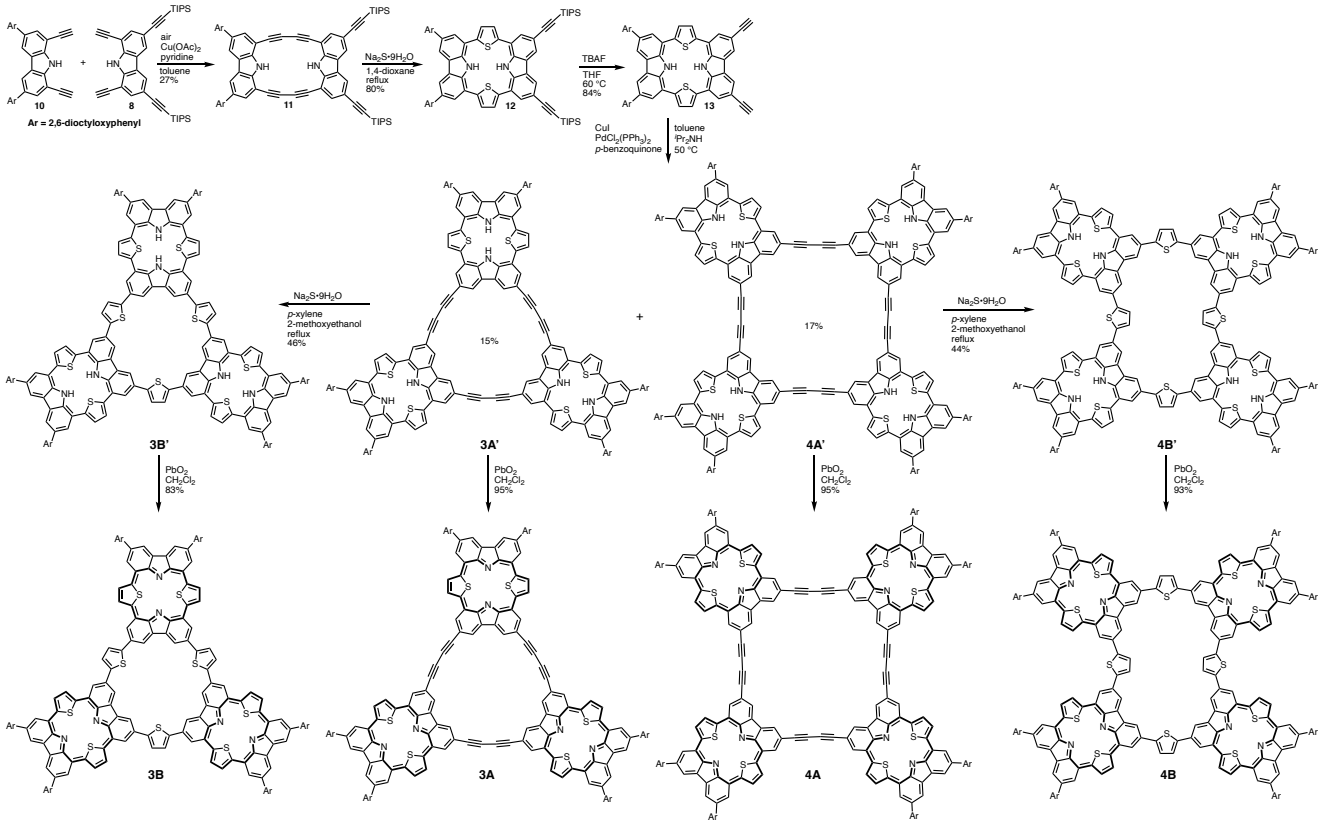
とができなかった。そこで **2** と 3,6-bis(triisopropylsilylethnyl)-1,8-diethynylcarbazole (**8**)の Glaser カップリングによりカルバゾール二量体 **9** を得た。ブタジインをチオフェンに変換して **6** とし TBAF による TIPS の脱保護を行うことで **7** を得た(スキーム 1b)。こちらのルートでは 3 ステップ 7%で **7** を得ることができ収率が大きく改善した。

次に **7** を用いて環状多量化を試みた。いくつか異なる条件で Glaser カップリングを試みたものの目的とする環状体は得られず、反応混合物の分析すら満足に行うことができなかった。この原因が多量体の難溶性によるものと考えられたため、分子の凝集を抑制するための置換基として 3,5-di-*tert*-butylphenyl の代わりに嵩高い 2,6-dioctyloxyphenyl 基を導入することとした。

スキーム 1b と同様の方法で嵩高い置換基を持つ **13** を合成したのち、**13** を Glaser カップリング条件に付して環状多量化を試みた(スキーム 2)。その結果 Pd 触媒を用いた条件において反応混合物を分析したところ環状体の生成を確認した。GPC による分取を行いブタジインで架橋した三量体 **3A'**と四量体 **4A'**を単離した。また **3A'**と **4A'**を硫化ナトリウムとの反応によりチオフェンで架橋した三量体 **3B'**と四量体 **4B'**に変換した。最後にこれらを二酸化鉛により酸化することで目的とする環状多量体 **3A**,**4A**,**3B**,**4B** を得た。



スキーム 1



スキーム 2 環状多量体の合成

環状多量体の紫外可視近赤外吸収スペクトルを図２に示す。単量体 **1** と比較すると多量化によりモル吸光係数が大きく向上し、近赤外吸収帯の長波長シフトとブロードニングが確認された。特に、チオフェンで架橋した **3B** と **4B** で顕著であり吸収末端は 1400 nm を超えた。この結果は多量体内での強い電子的相互作用を示唆している。特に環状多量化により隣接する単量体同士が共平面となることで鎖状の多量体と比較してより強い相互作用を示したと考えている。

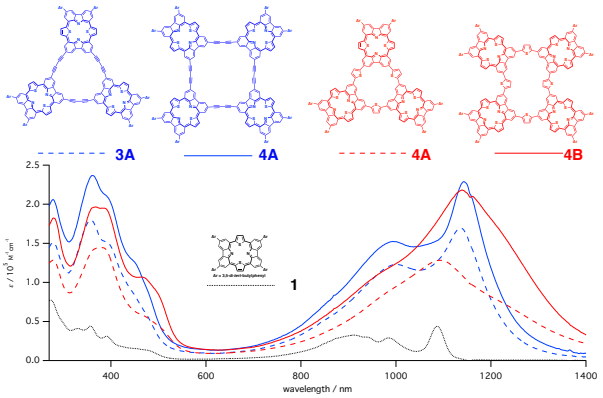


図２ 近赤外吸収スペクトル

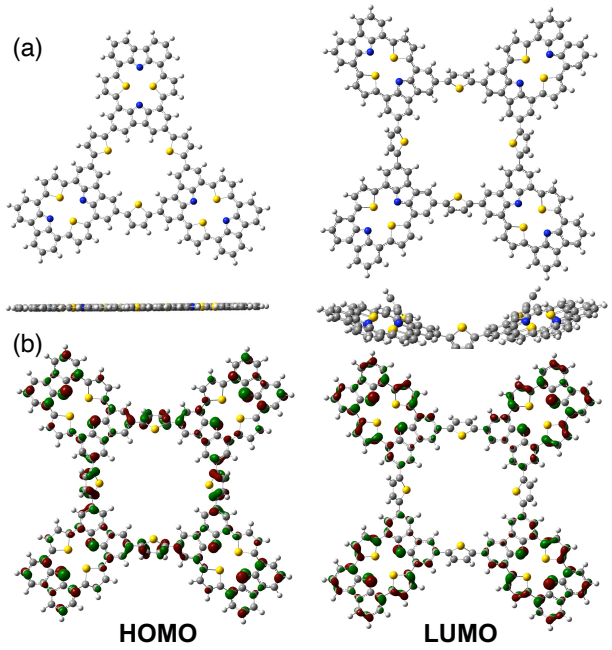


図３(a)**3B** と **4B** の最適化構造 (b)**4B** の分子軌道

DFT 計算によって得られた最適化構造では **3B** が平面構造であったのに対して **4B** はやや捻れた構造であった。しかし共役が有効につながる範囲内の捻れ角であり、**4B** の HOMO において電子的係数の非局在化が確認されたことからも多量体内での強い電子的相互作用が強く示唆された(図３)。

３．まとめ

本研究ではブタジインやチオフェンを架橋スペーサーとして用いた含カルバゾールポルフィリン環状多量体を合成し、それらの近赤外特性を調査した。いずれも単量体と比較し近赤外吸収帯が長波長シフト、ブロードニングし広い領域をカバーした。DFT 計算の結果 HOMO において電子的係数の非局在化が確認されたことからも多量体内での強い電子的相互作用が強く示唆された。環状化することで共平面構造に固定化されたことが強い相互作用に寄与したものと考えられる。

４．参考文献

(1) C. Maeda, T. Yoneda, N. Aratani, M.-C. Yoon, J. M. Lim, D. Kim, N. Yoshioka, A. Osuka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5691.

(2) C. Maeda, N. Yoshioka, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5182.

(3) C. Maeda, M. Masuda, N. Yoshioka, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3566.

(4) C. Maeda, M. Takata, A. Honsho T. Ema, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 6070.

(5) C. Maeda, T. Ema, J. *Porphyrins Phthalocycanines* **2020**, *24*, 247.

(6) C. Maeda, T. Shirakawa, T. Ema, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 10162.

各種ベントナイト材料の膨潤特性に及ぼす温度の影響に関する熱力学的研究

岡山大学学術研究院自然科学学域

佐藤　治夫

（概要）本研究では、ベントナイトの主成分であるモンモリロナイトの層間水の熱力学特性に着目し、ベントナイトの膨潤応力に及ぼす温度の影響を評価するための熱力学モデルを開発した。また、蒸気圧測定により、含水比に対する Na 型モンモリロナイト中の水の熱力学データを取得し、膨潤応力に及ぼす温度の影響についてモデル解析を実施した。その結果、膨潤応力に及ぼす温度の影響を評価するためのキーパラメータは、相対部分モルエンタルピー（$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$）であることが導出された。蒸気圧測定により$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$を測定した結果、$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$は、概ね 43%以下の含水比の領域で低下する傾向を示した。これは、概ね 1.25Mg/m^{3}以上のモンモリロナイト部分密度の領域で、温度上昇に伴い膨潤応力が低下することを示している。$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$データと開発したモデルにより、25℃と 60℃について解析した結果、温度上昇に伴う膨潤応力の低下の程度は、モンモリロナイト部分密度 1.26 ～2.02Mg/m^{3}の範囲で 10～20%と小さいことが分かった。処分場における緩衝材の設計密度を考えると、現実的には温度の影響を考えなくても良い範囲と言える。

1. はじめに

ベントナイトは天然の粘土材料であり、モンモリロナイトと言う粘土鉱物を主成分としている。水と接触すると親水性が高く、モンモリロナイトが吸水して何倍もの体積に膨張する（膨潤）特殊な性質を持つ。これらの性質から、ベントナイトは透水性が極めて低く、一般産業においては、土木・建設工事における防水材やダムの止水用グラウト（水の流れを止める材料）、産業廃棄物処分場の遮水材、化粧品（ファンデーションや保湿クリームなど）、医薬品（軟骨の基材や入れ歯安定剤など）、食品添加剤、ペット用トイレ砂、鉛筆の芯などとして非常に幅広く利用されている高機能材料である。最近では、薄膜状の粘土が蓄電池の素材としても研究されつつある。また、ベントナイトは、原子力発電所などの原子力施設、病院などの医療施設、大学や民間の研究所などの放射性物質や放射線を使用する施設から発生する放射性廃棄物の地中処分における人工バリア材や埋め戻し材として利用されるほか、2011 年 3 月に発生した福島第一原子力発電所事故による汚染土壌等の除染廃棄物の中間貯蔵施設や最終処分場における遮水材や放射性物質に対するバリア材（吸着材）などとしても研究されている。特に、高レベル放射性廃棄物は 300m 以深の地層中に坑道を掘削し、人工バリアを設置することで長期に亘る安全性を確保している。この処分方法は、地層処分と呼ばれ、米国を始め、カナダ、英国、フランス、フィンランド、スウェーデン、スイス、ドイツ、ベルギー、スペイン、イタリアなど、世界各国で実施のための研究が進められている。高レベル放射性廃棄物は、原子力発電所で発生した使用済燃料を再処理工場でウラン（U）やプルトニウム（Pu）を分離した後の残留廃液であり、多くの核分裂生成物を含有する。我が国では、この廃液は溶融炉においてガラス原料と共に混合溶融され、安定なガラス状の固化物（ガラス固化体）とされた後、地上施設において 30～50 年程度貯蔵され、その後、坑道を掘削して 300m 以深の地層中に人工バリアを設置して埋設処分される。

人工バリアは、内側から、廃棄物（ガラス固化体）、オーバーパック（金属容器）、緩衝材で構成され、その外側は岩盤（地層）である。ガラス固化体から緩衝材までが人工バリア、その外側の岩盤（地層）が天然バリアと呼ばれる。図 1 に高レベル放射性廃棄物の地層処分における多重バリアシステムの概念[1]を示す。ガラス固化体は、オーバーパックと呼ばれる厚い金属容器に封入され、その外側は、天然の粘土（ベントナイト）に 30wt%の割合で珪砂が混合され、圧縮成型された緩衝材が配置される。廃棄物を埋設後、周囲からは地下水が侵入し、緩衝材と接触すると膨潤することで隙間がシールされると共に、水の流れは抑制される。水は緩

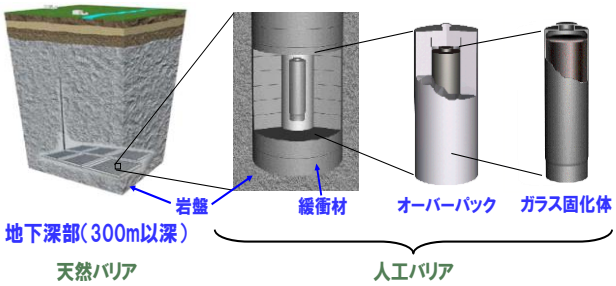


図１　高レベル放射性廃棄物の地層処分における多重バリアシステムの概念[1]

衝材中を拡散し、水分分布を形成しながらやがてはオーバーパックと接触する。一方、ガラス固化体は、埋設される時点で 100℃以下を想定しているが、含まれる核分裂生成物からの崩壊熱により、周囲よりも温度が高いことから、埋設後は外側に向かって熱の移動が発生し、長期に亘り緩衝材中で温度分布が発生する。このように、緩衝材外側からは、ガラス固化体の方向、即ち中心部に向かって水分分布が形成され、内側からは、外側に向かって温度分布が形成される。更に、ベントナイトの膨潤は水質の影響も受けることから、緩衝材の再冠水過程では、熱（Thermo）−水（Hydro）−応力（Mechanical）−化学（Chemical）が複合したプロセスが進行する。

ベントナイトの膨潤応力（圧力）については、これまで多くの研究が報告されているものの、温度の影響に関する研究は限られている。例えば、日本原子力研究開発機構が公表している緩衝材基本特性データベース[2]に基づけば、Na 型ベントナイト（クニゲル V1®，クニゲル OT-9607®）の膨潤応力は、温度の上昇に伴って低下する傾向であることを示している。また、Villar ら[3]は、FEBEX ベントナイトの膨潤応力も同様の傾向であることを報告している。図 2 に各種ベントナイトのモンモリロナイト部分密度に対する膨潤応力の温度依存に関する Arrhenius plot を示す。膨潤応力の対数値が絶対温度の逆数（1/T）に対して増加するか横ばい状態となっている。これは、活性化エネルギーがマイナスか、ゼロ付近であることを示しており、温度の上昇に伴って膨潤応力が低下する場合と変化しない場合があることを意味する。特に、低密度の条件（0.89Mg/m^3）で横ばい状態となっており、密度が低い場合、温度が上昇し

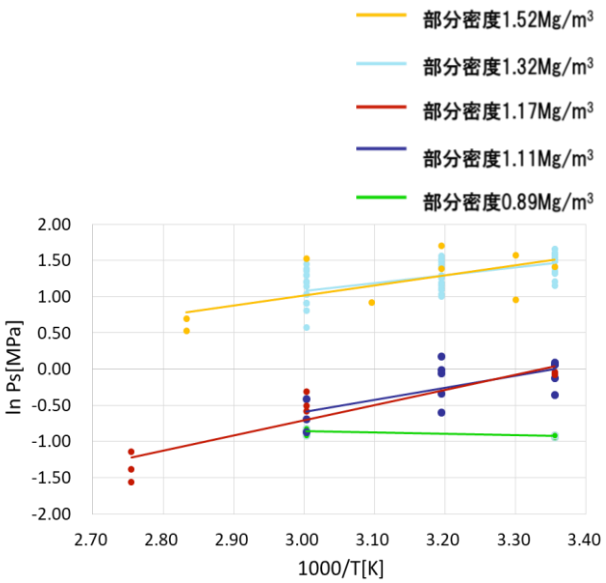


図２　各種ベントナイトのモンモリロナイト部分密度に対する膨潤応力（Ps）の温度依存に関する Arrhenius plot
モンモリロナイト部分密度 0.89, 1.11, 1.32 Mg/m^3：**クニゲル** V1[2]
モンモリロナイト部分密度 1.32Mg/m^3：**クニゲル** OT-9607[2]
モンモリロナイト部分密度 1.52Mg/m^3：FEBEX[3]

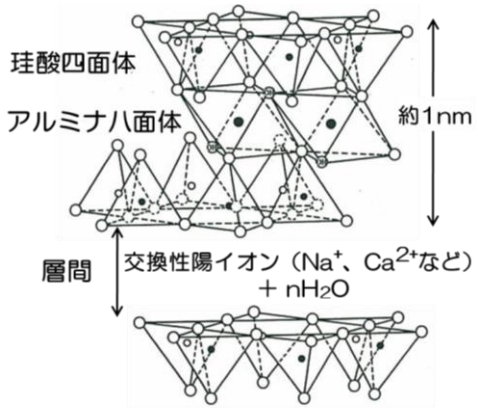
ても膨潤応力に変化が見られない可能性を示唆している。一方、Pusch ら[4]は、MX80（Na 型ベントナイト）の膨潤応力が温度上昇に対して増加した場合と低下した場合があることを報告しており、最近では、温度上昇に伴い膨潤応力が増加したことが報告される[5, 6]など、温度の影響については必ずしも議論が十分とは言えない。ここで、モンモリロナイト部分密度とは、モンモリロナイトのみに着目した時の密度のことであり、単位体積について考えた場合、そこに存在するモンモリロナイトの質量を、モンモリロナイトの固相体積と間隙体積の和で除した値で定義される[7]。このパラメータは、モンモリロナイト含有率が異なるベントナイトに対しても同一の指標で比較することができることから、様々な物性値に対しても活用されている。

本研究では、ベントナイトの膨潤特性の内、特に膨潤応力に及ぼす温度の影響について、ベントナイトの主成分であり、膨潤特性と密接に関係するモンモリロナイトの層間水の熱力学特性に着目し、熱力学理論に基づいてモデルを開発すると共に、熱力学データに基づいて温度の影響について検討した。

2. ベントナイトの膨潤応力に関する熱力学モデル

2.1 ベントナイトの性質

ベントナイトの主成分であるモンモリロナイトは、平面的な広がりを持ったシート状の結晶構造(図 3)をしており、それらが積層した状態(積層体あるいは重層体と言う)で存在する。モンモリロナイトの結晶シートの厚さは 0.988nm(=9.88Å=9.88×10^{-10}m)と水分子 3 個分程度と薄く、比表面積は約 800m^2/g と通常の岩石や土壌などと比較してもずば抜けて大きい。結晶シート表面と結晶シート表面の間は層間と呼ばれ、そこには層間外の陽イオンと交換可能な陽イオンが存在する。この陽イオンを交換性陽イオンと言う。単位質量当たりに交換できる陽イオン量を陽イオン交換容量(CEC：Cation Exchange Capacity)と言うが、モンモリロナイトの CEC は 100～150meq/100g(モンモリロナイト 100g 当たり 100～150 ミリ当量(1 価のイオンの場合、100～150mmol に相当))と極めて大きい。ベントナイトの膨潤は、このモンモリロナイト層間中の陽イオンの水和・溶媒和エンタルピーを駆動力として、層間に水分子が選択的に侵入し、モンモリロナイト表面や陽イオンが水和することで発生する。比表面積が莫大であることと親水性・保水性が高いことから、モンモリロナイトは単位質量当たりに保持できる水の量は莫大であり、遮水材や止水材として最適な性質を有していると考えることができる。一方、水和エンタルピーは陽イオンの種類により異なることから、モンモリロナイトの親水性や膨潤性は、層間中の陽イオンの種類の影響を強く受けることも明らかである。



○ 酸素 (OH) 水酸基 ● Al, Fe, Mg
○ ● Si (Al)

図 3 モンモリロナイトの結晶構造

2.2 標準状態における膨潤応力の熱力学モデル

図 4 に標準状態(25℃)において任意の濃度の溶液(α相)とベントナイト(β相)がフィルターを介して接触し、両相が平衡状態にある時の水の化学ポテンシャルバランスの概念を示す[8-10]。両相は、フィルターを介してのみ接続しており、上部の空間も独立しているものとする。両相上部の蒸気圧は、それぞれ溶液相中の水とベントナイト相中の水と平衡状態であるものとする。

α相からβ相へ溶液が侵入すると、ベントナイトは徐々に膨潤し、含水比の増加に伴ってβ相中の水の蒸気圧は上昇する。これは、含水比の増加に伴ってβ相中の Gibbs の自由エネルギーが増加することを意味する。α相とβ相が平衡状態である時、両相中の水の化学ポテンシャルは次式のように等しくなる。

$$\mu^0(W,\alpha) = \mu^0(W,\beta) \quad (1)$$

ここで、$\mu^0(W,\alpha)$と$\mu^0(W,\beta)$は、それぞれ標準温度(25℃)におけるα相とβ相中の水の化学ポテンシャル(J/mol)である。

この系において、平衡状態にある両相間中の水の Gibbs の自由エネルギーの差(dG)は膨潤エネルギーとして作用する。dG は次のように求めることができる。

$$dG = dG_S - dG_{H2O} \quad (2)$$

ここで、dG は、平衡状態にあるα相とβ相中の水の相対部分モル Gibbs の自由エネルギーの差(J/mol)、dG_S と dG_{H2O} は、それぞれα相とβ相中の水の相対部分モル

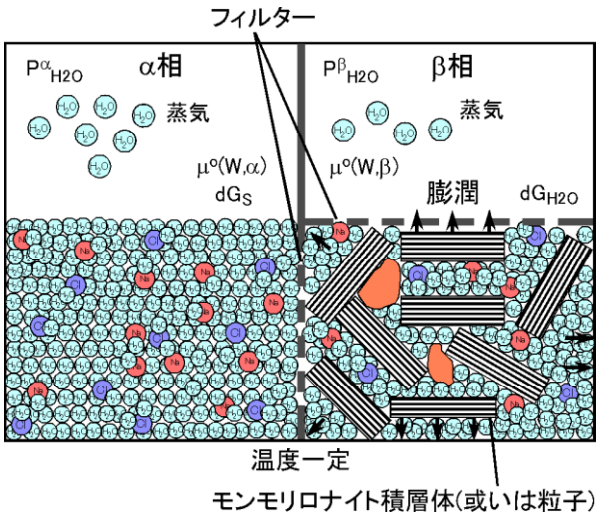


図 4 標準状態において任意の濃度の溶液(α相)とベントナイト(β相)がフィルターを介して接触し、両相が平衡状態にある時の水の化学ポテンシャルバランスの概念

Gibbs の自由エネルギー(J/mol)である。ここで、α相が純水である時、$dG_S = 0$ である。

両相が平衡状態である時のα相とβ相中の水の化学ポテンシャルは、それぞれ以下のように記述することができる。

$$\mu^0(W,\alpha) = dG_S = RT\ln\left(\frac{P^{\alpha}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) \quad (3)$$

$$\mu^0(W,\beta) = dG_{H2O} + \int_{P^0_{ext}}^{P_{ext}} V_w\, dP = RT\ln\left(\frac{P^{\beta}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) + \int_{P^0_{ext}}^{P_{ext}} V_w\, dP \quad (4)$$

両相中の水の化学ポテンシャルは等しいことから、ベントナイトの膨潤エネルギーは、式(1)～(4)に基づいて以下のように導出される。

$$RT\ln\left(\frac{P^{\alpha}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) = RT\ln\left(\frac{P^{\beta}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) + \int_{P^0_{ext}}^{P_{ext}} V_w\, dP \quad (5)$$

$$\therefore \int_{P^0_{ext}}^{P_{ext}} V_w\, dP = (P_{ext} - P^0_{ext})V_w = RT\ln\left(\frac{P^{\alpha}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) - RT\ln\left(\frac{P^{\beta}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) = dG_S - dG_{H2O} \quad (6)$$

よって、膨潤応力($dP_{ext} = P_{ext} - P^0_{ext}$)は、最終的には次の関係から計算することができる。

$$dP_{ext} = \frac{RT}{V_w}\ln\left(\frac{P^{\alpha}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) - \frac{RT}{V_w}\ln\left(\frac{P^{\beta}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) = \frac{dG_S - dG_{H2O}}{V_w} \quad (7)$$

ここで、P^{α}_{H2O}とP^{β}_{H2O}は、それぞれ 25℃におけるα相とβ相中の水の蒸気圧(Pa)、P^{0}_{H2O}は、25℃における純水の蒸気圧(3.168 kPa)、R は、ガス定数(8.314 J/mol/K)、T は、絶対温度(K)、dP_{ext}は、膨潤応力(Pa)、P^0_{ext}とP_{ext}は、それぞれベントナイトの初期(乾燥時)と含水飽和時の膨潤応力(Pa)、V_wは、25℃における水のモル体積(18.068 ml/mol)である。

更に、水の活量は、P^{0}_{H2O}, P^{α}_{H2O}, P^{β}_{H2O}から、次のように定義される。

$$a^{\alpha}_{w} = \frac{P^{\alpha}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}} \quad (8)$$

$$a^{\beta}_{w} = \frac{P^{\beta}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}} \quad (9)$$

ここで、a^{α}_{w}とa^{β}_{w}は、それぞれα相とβ相中の水の活量であり、α相が純水である時、$a^{\alpha}_{w} = 1$である。

2.3 任意の温度における膨潤応力の熱力学モデル

2.2 で説明したモデルは、標準状態でのベントナイトの膨潤応力に関するモデルである。温度が変化した場合に関する蒸気圧は、蒸気が理想気体と見なすことができるとすれば、Clausius-Clapeyron の式によって次のように与えられる。

$$\frac{dP}{dT} = \frac{P dH_v(s)}{RT^2} \quad (10)$$

任意の温度における両相中の水の蒸気圧は、式(10)に初期及び境界条件を与えて、それぞれ以下のように解くことができる。

$$\int_{P^{\alpha}_{H2O}}^{P^{\alpha}} \frac{dP}{P} = \int_{T_0}^{T} \frac{dH^0_v(H_2O)dT}{RT^2}$$

$$\therefore \ln\left(\frac{P^{\alpha}}{P^{\alpha}_{H2O}}\right) = \frac{dH^0_v(H_2O)}{R}\left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right) \quad (11)$$

$$\int_{P^{\beta}_{H2O}}^{P^{\beta}} \frac{dP}{P} = \int_{T_0}^{T} \frac{dH_v(s)dT}{RT^2}$$

$$\therefore \ln\left(\frac{P^{\beta}}{P^{\beta}_{H2O}}\right) = \frac{dH_v(s)}{R}\left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right) \quad (12)$$

ここで、Pは、任意の温度における蒸気圧(Pa)、P^{α}とP^{β}は、それぞれ任意の温度におけるα相とβ相中の水の蒸気圧(Pa)、$dH^0_v(H_2O)$は、純水の蒸発のエンタルピー(44.0 kJ/mol)、$dH_v(s)$は、β相中の水の蒸発のエンタルピー(J/mol)、T_0は、標準温度(25℃)である。

式(12)は、以下のように変形できる。

$$\ln\left(\frac{P^{\beta}}{P^{\beta}_{H2O}}\right) = \ln\left(\frac{P^{\beta}}{P^{0}_{H2O}}\right) - \ln\left(\frac{P^{\beta}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right)$$

$$\therefore \ln\left(\frac{P^{\beta}}{P^{0}_{H2O}}\right) = \ln\left(\frac{P^{\beta}}{P^{\beta}_{H2O}}\right) + \ln\left(\frac{P^{\beta}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) = \frac{dH_v(s)}{R}\left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right) + \ln\left(\frac{P^{\beta}_{H2O}}{P^{0}_{H2O}}\right) \quad (13)$$

任意の温度における両相中の水の Gibbs の自由エネルギーは次のように与えられる。

$$dG^{\alpha} = RT\ln\left(\frac{P^{\alpha}}{P^{\alpha}_{H2O}}\right) = dH^0_v(H_2O)\left(\frac{T}{T_0} - 1\right) \quad (14)$$

$$dG^{\beta} = RT\ln\left(\frac{P^{\beta}}{P^{0}_{H2O}}\right)$$

$$= \mathrm{d}H_{\mathrm{v}}(\mathrm{s})\left(\frac{T}{T_0}-1\right)+RT\ln\left(\frac{P^{\beta}_{\mathrm{H2O}}}{P^{0}_{\mathrm{H2O}}}\right) \quad (15)$$

ここで、$\mathrm{d}G^{\alpha}$と$\mathrm{d}G^{\beta}$は、それぞれ任意の温度におけるα相とβ相中の水の相対部分モルGibbsの自由エネルギー(J/mol)である。

両相が平衡状態である時の任意の温度における両相中の水の化学ポテンシャル($\mu(W,\alpha)$, $\mu(W,\beta)$)は等しいことから、式(14)と(15)から、次の関係が導出される。

$$\mu(W,\alpha)=\mathrm{d}G^{\alpha}=\mathrm{d}H^{0}_{\mathrm{v}}(\mathrm{H_2O})\left(\frac{T}{T_0}-1\right) \quad (16)$$

$$\mu(W,\beta)=\mathrm{d}G^{\beta}+\int_{P^{0}_{\mathrm{ext}}}^{P_{\mathrm{ext}}}V_{\mathrm{w}}\,\mathrm{d}P$$

$$=\mathrm{d}H_{\mathrm{v}}(\mathrm{s})\left(\frac{T}{T_0}-1\right)+RT\ln\left(\frac{P^{\beta}_{\mathrm{H2O}}}{P^{0}_{\mathrm{H2O}}}\right)+\int_{P^{0}_{\mathrm{ext}}}^{P_{\mathrm{ext}}}V_{\mathrm{w}}\,\mathrm{d}P \quad (17)$$

よって、温度の影響を考慮したベントナイトの膨潤応力は、式(16)と(17)から、次のように導出される。

$$\mathrm{d}P_{\mathrm{ext}}=\frac{\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}}{V_{\mathrm{w}}}\left(\frac{T}{T_0}-1\right)-\frac{\mathrm{d}G_{\mathrm{H2O}}}{V_{\mathrm{w}}} \quad (18)$$

ここで、$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$は、β相中の水の相対部分モルエンタルピー(J/mol)で、次の関係で定義される。

$$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}=\mathrm{d}H^{0}_{\mathrm{v}}(\mathrm{H_2O})-\mathrm{d}H_{\mathrm{v}}(\mathrm{s}) \quad (19)$$

上述のことから、ベントナイトの膨潤応力に及ぼす温度の影響を評価するためのキーパラメータは、相対部分モルエンタルピー($\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$)であることが分かる。

3. 蒸気圧測定によるデータ取得とモデル解析

3.1 相対部分モルエンタルピー($\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$)

相対部分モルエンタルピーは、Na型モンモリロナイト(モンモリロナイト含有率約 100wt%のクニピアP®(クニミネ工業製)を更に精製したもの)について、蒸気圧測定により、含水比(15-80%)と温度(15-40℃)をパラメータに取得した。Na型モンモリロナイトへの詳細な精製手順と蒸気圧測定の実験手順は、文献[11]に示す通りである。実験では、含水比と温度をパラメータとして、水の活量(a^{β}_{w})と相対部分モルGibbsの自由エネルギー($\mathrm{d}G_{\mathrm{H2O}}$)、含水比をパラメータとして、モンモリロナイト中の水の蒸発のエンタルピー($\mathrm{d}H_{\mathrm{v}}(\mathrm{s})$)を取得し、更に、式(19)に基づいて、相対部分モルエンタルピー($\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$)を決定した。

図5にこれまでに取得された相対部分モルエンタルピー($\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$)と含水比との関係を文献値[12, 13]と共に示す。文献データは、クニピアF®(Na型モンモリロナイト含有率 99wt%以上(クニミネ工業製))による測定値である。多少のバラツキが見られるものの、$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$は、概ね含水比 43%以下の領域で含水比の減少に伴い低下する傾向を示した。文献値[12, 13]についても同様な傾向であった。このことは、モンモリロナイト部分密度に換算して概ね 1.25Mg/m^3 以上の密度領域で、温度上昇に伴って膨潤応力が低下することを示している。

3.2 ベントナイトの膨潤応力に及ぼす温度の影響に関するモデル解析

表 1 にモンモリロナイト部分密度に対する 25℃と60℃における膨潤応力の解析結果を示す。60℃の温度条件は、我が国の地層処分についての「第2次取りまとめ」[14]におけるレファレンスケースに相当する。膨潤応力の低下の程度は、モンモリロナイト部分密度 1.26 Mg/m^3 で約 10%、1.61Mg/m^3 で約 15%、2.02Mg/m^3 で約 20%と、温度の影響は大きくない。これらの結果から、ベントナイトの膨潤応力に及ぼす温度の影響は、モン

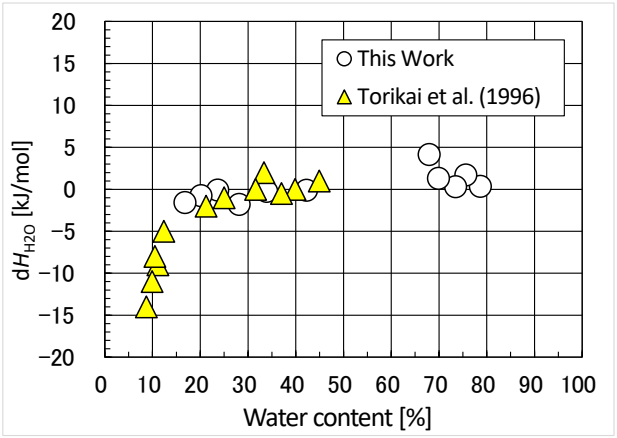


図5 相対部分モルエンタルピー($\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$)と含水比との関係(○:本研究(クニピアP®)、△:文献データ(クニピアF®)[12, 13])

表1 25℃と60℃における膨潤応力の解析結果

含水比 (%)	モンモリロナイト部分密度 (Mg/m^3)	$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$ (kJ/mol)	膨潤応力 (MPa)		備考
			25°C	60°C	
42.23	1.26	-0.102	5.96	5.31	本研究
33.86	1.41	-0.22	11.0	9.57	本研究
25.00	1.61	-1.0	46.8	40.3	文献値[12, 13]
16.78	1.85	-1.56	122.0	111.9	本研究
12.36	2.02	-5.0	147.6	115.1	文献値[12, 13]

モリロナイト部分密度が 1.25Mg/m^3 以上の比較的高い密度領域で温度上昇に伴い低下し、密度の低い領域では殆ど変化しないことが分かった。処分場における緩衝材の設計密度(レファレンスケースの乾燥密度 1.6 Mg/m^3, 珪砂混合率 30wt%)[14]を考えると、現実的には温度の影響を考えなくても良い範囲と言える。

現状では、データ数が限られていることから、更にデータ取得を継続すると共に、陽イオンの異なるタイプのモンモリロナイトについても検討する予定である。

4. まとめ

本研究では、ベントナイトの主成分であるモンモリロナイトの層間水の熱力学特性に着目し、ベントナイトの膨潤応力に及ぼす温度の影響を評価するための熱力学モデルを開発した。また、蒸気圧測定により、含水比に対する Na 型モンモリロナイト中の水の熱力学データを取得し、膨潤応力に及ぼす温度の影響についてモデル解析を実施した。

その結果、膨潤応力に及ぼす温度の影響を評価するためのキーパラメータは、相対部分モルエンタルピー($\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$)であることが導出された。蒸気圧測定により$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$を測定した結果、$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$は、概ね 43%以下の含水比の領域(モンモリロナイト部分密度 1.25Mg/m^3 以上の領域に相当)で低下する傾向を示し、この領域で、温度上昇に伴い膨潤応力が低下すると考えられた。

$\mathrm{d}H_{\mathrm{H2O}}$データと開発したモデルに基づいて、25℃と60℃について解析した結果、温度上昇に伴う膨潤応力の低下の程度は、10～20%と小さいことが分かった。処分場における緩衝材の設計密度を考えると、現実的には温度の影響を考えなくても良い範囲と言える。

参考文献

[1] 佐藤治夫：地層処分における人工バリアとしての緩衝材の膨潤と熱力学, バックエンド研究, Vol.27, No.2, pp.105-114 (2020).

[2] 日本原子力研究開発機構：緩衝材基本特性データベース, https://www.bufferdb/jaea.go.jp/bmsb/, 最終アクセス日：12/14 (2014).

[3] M. V. Villar and A Lloret：Influence of Temperature on the Hydro-Mechanical Behaviour of a Compacted Bentonite, Appl. Clay Sci., 26, pp.337-350 (2004).

[4] R. Pusch, O. Karnland and H. Hokmark：GMM –A General Microstructural Model for Qualitative and Quantitative Studies of Smectite Clays, SKB Tech. Rep., 90-43 (1990).

[5] 武藤尚樹, 金澤伸一, 市川希:温度変化を考慮したベントナイトの膨潤圧の計測について, 原子力学会 2018 年秋の大会, 2F06 (2018).

[6] B. Akinwunmi, L. Sun, J. T. Hirvi, S. Kasa and T. A. Pakkanen：Influence of Temperature on the Swelling Pressure of Bentonite Clay, Chem. Phys., Vol.516, pp.177-181 (2019).

[7] H. Sato and S. Miyamoto：Diffusion Behaviour of Selenite and Hydroselenide in Compacted Bentonite, Appl. Clay Sci., 26, pp.47-55 (2004).

[8] H. Sato：A Thermodynamic Approach on the Effect of Salt Concentration on Swelling Pressure of Water-Saturated Bentonite, MRS Symp. Proc., Vol.1124, 1124-Q07-11, 6 pages (in pdf format) (2009).

[9] H. Sato：Thermodynamic Approach on Effect of Salinity on Swelling Pressure of Bentonite, Proceedings of the 4th Japan-Korea Joint Workshop on Radioactive Waste Disposal 2008：Perspective of Science and Eng., May 27-28, 2008, Hakone, Japan, pp.1-17 (2008).

[10] H. Sato and M. Fukazawa：A Thermodynamic Analysis on the Swelling Stress of Na-Bentonite under Various Solution Conditions, MRS Advances, Vol.1, Issue 61, pp.4019-4025 (2016).

[11] H. Sato：Thermodynamic Model on Swelling of Bentonite Buffer and Backfill Materials, Phys. Chem. Earth, 33, pp.S538-S543 (2008).

[12] Y. Torikai, S. Sato and H. Ohashi：Thermodynamic Properties of Water in Compacted Sodium Montmorillonite, Nucl. Technol., 15, pp.73-80 (1996).

[13] H. Ohashi：Migration Behavior of a Nuclide in Surface Soil (III), PNC Tech. Rep., PNC TJ1600 96-004 (1996).

[14] Japan Nuclear Cycle Development Institute (JNC)：Second Progress Report on Research and Development for the Geological Disposal of HLW in Japan, JNC Tech. Rep., JNC TN1410 2000-001 (2000).

（表　題）計算機解析と実測との比較による貯水池の地形変化の解析手法実用化研究

（所　属）岡山大学客員研究員

（氏　名）神保秀司

（概要）

水底地形面は，三角形メッシュが設定された領域上に定義された区分一次関数で表される曲面で近似される。三角形メッシュの各要素を定義域とする一次関数は，測位データと測深データから得られる水底地形データを導入した最小二乗近似によって導かれる。三角形メッシュの各要素に対する最小二乗近似から各節点における高度が導かれる。一連の成果は，論文等[1]～[5]と会議発表[1]～[6]に発表された。

（本文）

測位データの収録には，VRS （Virtual Reference Station, 仮想基準点）方式の RTK-GPS （Real Time Kinematic GPS）を用いた。また，測深データの収録には音響測深機を用いた。小型船舶の船体に固定されたポールの上端には GPS アンテナが取り付けられ，また水中のポール下端には音響測深機のセンサーが取り付けられた。小型船舶が対象水域を航行し，測位データと測深データが収録された。測位データの緯度－経度成分は Gauss-Krügel 投影法により xy 座標に変換された。変換後の測位データの xy 成分は測深データを含む鉛直成分と結合され，その結果三次元水底地形データが得られた。

水底地形面は三角形メッシュが設定された領域に定義された区分一次関数で近似的に表される。三角形メッシュのある要素を定義域とする一次関数の各頂点での地形面の高度は，水底地形データを導入した最小二乗近似によって更新される。この操作がある要素に対して完了したときに，次の要素に対する操作が実施され，一連の操作は最後の要素に達するまで実行される。各節点での地形面の高度に関し，節点での地形面の高度を成分とするベクトルの残差がある一定値以下になるまで各要素に対する一連の操作が繰り返される。

前述の水底地形を表す区分一次関数を求めるための方法は，ある固定された三角形メッシュが設定された領域を定義域とする区分線形関数を求めるための基本的方法である。一方，初期に設定された三角形メッシュから要素分割により三角形メッシュ列を生成し，各三角形メッシュを定義域とする区分線形関数列を求める方法が提案された。三角形メッシュの各要素を四分割することにより新しい三角形メッシュを構成する方法を用いて三角形メッシュ列が初期の三角形メッシュから構成された。初期の三角形メッシュの各節点における初期高度はすべてゼロとし，後続の各三角形メッシュの各節点での高度の初期値は先行する三角形メッシュの高度の最終値からの補間により求められた（論文等[1]，[2]，[3]）。三角形メッシュの各要素を四分割する方法に対して，各要素におけるデータ密度，すなわち単位面積当たりの水底地形データの xy 成分数に応じて四分割，三分割，二分割あるいは分割することなく新しい三角形メッシュを生成する方法が提案され，この手法にもとづく三角形メッシュ列の生成法が示された（論文等[4]）。

水底地形面を表す三角形メッシュが設定された領域を定義域とする区分一次関数を，水底地形データから導くための新しい手法も提案された（論文等[5]）。各三角形要素の各頂点における高度を，xy 成分が要素に含まれる水底地形データから更新する一変数の写像が示された。各節点における地形面の高度を更新する写像は，当該節点を頂点の一つとするすべての要素に対する一変数の写像の合成写像として表される。各節点における地形面の高度はこの合

成写像から導かれる。

論文等

[1] Satoshi Iwakami, Masahiko Tamega, Masahide Sanada, Michiaki Mohri, Yoshitaka Iwakami, Naoki Okamoto, Shuji Jimbo, Masaji Watanabe, Study on Change of Topography in Water Area with Field Measurement, Journal of Geoscience and Environmental Protection, Vol. 9 No. 4, April 2021.
https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=109431

[2] Satoshi Iwakami, Masahiko Tamega, Masahide Sanada, Michiaki Mohri, Yoshitaka Iwakami, Naoki Okamoto, Ryousuke Asou, Shuji Jimbo, Masaji Watanabe, Mathematical modeling and computational analysis of underwater topography with global positioning and echo sounder data, Journal of Applied Mathematics and Physics, Vol. 9 No. 5, May 2021.
https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=109663

[3] Satoshi Iwakami, Masahiko Tamega, Masahide Sanada, Michiaki Mohri, Yoshitaka Iwakami, Naoki Okamoto, Ryousuke Asou, Shuji Jimbo, Masaji Watanabe, 刊行予定

[4] Satoshi Iwakami, Masahiko Tamega, Masahide Sanada, Michiaki Mohri, Yoshitaka Iwakami, Naoki Okamoto, Eishi Mitsui, Shuji Jimbo, Masaji Watanabe, Study in numerical techniques for underwater topography based on measurement, Submitted.

[5]岩上 聡，爲賀 雅彦，真田 将英，毛利 道明，岩上 義隆，岡本 尚己，光井 英視，神保 秀司，渡辺 雅二，水面下の地形の形状推定に伴う問題点と計測結果の解析手法の提案，応用数理，依頼執筆

会議発表

[1] Satoshi Iwakami, Masahiko Tamega, Masahide Sanada, Michiaki Mohri, Yoshitaka Iwakami, Naoki Okamoto, Shuji Jimbo, Masaji Watanabe, Study on change of topography in water area with field measurement, CHWM 2021, International Conference on Hydrology and Water Management
（口頭発表，発表年月日：2021 年 4 月 24 日，video 発表，基調講演，発表者：渡辺雅二）

[2] Satoshi Iwakami, Masahiko Tamega, Masahide Sanada, Michiaki Mohri, Yoshitaka Iwakami, Naoki Okamoto, Ryousuke Asou, Shuji Jimbo, Masaji Watanabe, Mathematical modeling and computational analysis of underwater topography with global positioning and echo sounder data, The 4th int'l Conference on Statistics, Mathematical Modeling and Analysis (SMMA 2021)
（口頭発表，発表年月日：2021 年 5 月 30 日，video 発表，基調講演，発表者：渡辺雅二）

[3] Satoshi Iwakami, Masahiko Tamega, Masahide Sanada, Michiaki Mohri, Yoshitaka Iwakami, Naoki Okamoto, Ryousuke Asou, Shuji Jimbo, Masaji Watanabe, Numerical study of underwater topography with measurement data, 2nd International Conference on Advanced Information Scientific Development (ICAISD) 2021
（Online 発表，発表年月日：2021 年 8 月 5 日，発表者：渡辺雅二）

[4]岩上 聡，爲賀 雅彦，真田 将英，毛利 道明，岩上 義隆，岡本尚己，麻生 良祐，神保 秀司，渡辺 雅二，水底地形の作成に関する計測とデータ解析手法および解析結果についての考察，日本応用数理学会 2021 年度年会（Online 発表，発表年月日：2021 年 9 月 7 日，発表者：渡辺雅二）

[5] Satoshi Iwakami, Masahiko Tamega, Masahide Sanada, Michiaki Mohri, Yoshitaka Iwakami, Naoki Okamoto, Ryousuke Asou, Shuji Jimbo, Masaji Watanabe, Study on numerical techniques for construction of underwater topography based on positional data and depth data, 12th National Seminar of Mathematics And Applied (12th SiManTap)
（口頭発表, 発表年月日:2021 年 11 月 28 日，Online 発表，基調講演，発表者：渡辺雅二）

[6] Satoshi Iwakami, Masahiko Tamega, Masahide Sanada, Michiaki Mohri, Yoshitaka Iwakami, Naoki Okamoto, Ryousuke Asou, Shuji Jimbo, Masaji Watanabe, Study on numerical techniques for underwater topography

based on measurement, Engineering Mathematics and Application Conference (EMAC 2021)
（口頭発表, 発表年月日：2021 年 12 月 2 日, Online 発表, 発表者：渡辺雅二）

都市マネジメントを想定した建築景観デザインのあり方に関する研究

岡山大学学術研究院環境生命科学学域

堀　裕典

全国アンケート調査からまちづくり団体の法人形態と活動および団体の活動と地域活性化への貢献意識との関連性を分析した。その結果、法人格のある団体は施設の管理・運営、交通対策などの活動、また、法人格のない任意組織は清掃・防犯活動のようなまちの環境を維持・保全していく活動を行っていた。イベント、交流の場の提供を行う団体は「地域住民の結びつき強化」に対し、まちのビジョン・ガイドラインの作成や交流の場の提供、清掃防犯活動、防災環境保全活動を行う団体は「安全安心な環境づくり」に対して貢献意識をもって活動していた。市民提案による景観計画の変更・改定・見直しに関する事例調査では、札幌市等の大規模な都市の駅前商業地エリアでは、景観を規制するとともに、地区計画の導入により容積率の緩和を設けることで、その地域に賑わいが生まれている。また、協議会がエリアマネジメントとして機能し、景観に関する管理も行うことが街にとってより良い方向に進むと考えられる。日本全国のエリアマネジメント団体に対する示唆として、協議会を組織し、今後、より公共性の高い「景観の向上」というテーマに取り組んでいくことが重要となる。

1.　研究の背景および構成

1-1. 研究の背景

我が国は、人口減少時代へと突入し、これまで急激に進められてきた都市開発や都市再開発のあり方が見直され、都市のマネジメントを含めた地域管理であるエリアマネジメントの推進が求められている（小林 2018）[1)]。一方で、地域資源の大きな要素である建築景観について、高木ら (2020) [2)]によれば、従来の規制誘導手法のみならず、多様な主体の参加により景観マネジメントを行うことが重要とされている。以上より、本研究では、次項の２つのサブテーマを設定し、研究をすすめることで、都市マネジメントを想定した都市景観デザインのあり方を探るものとする。

1-2. 研究の構成と各研究の目的

(1)　まちづくり団体の活動や組織及び地域活性化への貢献意識との関連性

これまで、エリアマネジメント団体については研究が進められてきたが、広くまちづくりを行う団体がエリアマネジメントをどのような意識で行ってきたかは明らかにされていない。本研究は、アンケートデータ分析によりまちづくり団体の意識とエリアマネジメント活動の関連性について明らかにする。

(2)　市民提案による景観計画の変更・改定・見直しに関する事例調査

これまで、景観計画の見直しに関する全国的な調査は行われてない。本研究では、平成 25 年度以前に景観計画を変更した全国の自治体 (59 自治体) に対して、ヒアリング調査を行い、提案による変更を行った事例 (11 自治体) からそのプロセスと課題を明らかにする。

2.　まちづくり団体の活動や組織及び地域活性化への貢献意識との関連性

2-1. 背景と目的

これまでの都市計画は行政があらゆる公共サービスを担い、市民はサービスの受け手という形で展開してきた。しかし人々のニーズや価値観の多様化、複雑化が進む中、行政だけでは地域の課題に対応することが困難になってきた。一方で人々の社会貢献活動への参加意欲は全国的に高まり [3)]、地域の課題を自らの取り組みで解決していこうという機運が広がっている。こうした中で、市民や NPO、事業者など多様な人々が主体となってまちづくりに関する取り組みを行うケースも増えている。本研究では東京都都市整備区 [4)]の概念を参照し、地域の特性を生かし魅力を高めるまちづくり活動を主体的に行う団体を

まちづくり団体と定義する。
まちづくり団体は様々な運営や活動を行っており、それらと各地域での地域活性化がどのように関連しているのか分析することが社会的に求められる。
まちづくりに関する研究では、まちづくり団体の役割やマネジメントに関する研究は多く行われている[5]が、まちづくり団体による活動が地域にどのような影響を与えているか考察を行った研究は少ない。さらに、一部の地域に限定し、ヒアリング調査を基本とした定性的な研究は多く行われている[6]が、全国のまちづくり団体を対象にして定量的な分析を行った研究は少ない。そこで本研究では、まちづくり活動を行う全国の団体の地域への貢献意識を地域活性化の指標に設定し、組織形態や活動、地域活性化に対する貢献意識がどのように関連しているか明らかにすることを目的とする。

2-2. 研究の方法

全国のまちづくり活動を行う団体を対象に組織や活動の実態を把握するアンケート調査を実施した。調査の概要は**表 1** の通りである。団体の法人形態と活動を明らかにし、次に団体の活動と地域活性化への貢献意識との関連性を分析する。

2-3. まちづくり団体の法人形態と活動の分析

表 2 は、まちづくり団体が行っている活動をカテゴリー化したものである。また、まちづくり団体の法人形態は大きく「社団・財団法人」、「NPO 法人」、「株式会社」、「任意組織」と分類した。法人形態と活動との関連性に関して独立性の検定を行った結果を**表 3** に示す。施設の管理運営、清掃防犯活動に関しては、有意水準 1%で統計的な差が認められた。空き家・空き店舗対策、交通対策に関しては有意水準 5%で統計的な差が認められた。残差分析の結果により、施設の管理運営、交通対策に関しては、株式会社は行っている団体が多く、任意組織は行っている団体が少ないことが明らかになった。空き家・空き店舗対策に関しては、株式会社は行っている団体が多く、社団・財団法人は行っている団体が少ないことが明らかになった。清掃防犯活動に関しては、任意組織は行っている団体が多く、株式会社は行っている団体が少ないことが明らかになった。
また、社団・財団法人、NPO 法人、株式会社を法人格のある団体、任意組織を法人格のない団体と定義し、同様に独立性の検定を行った結果を**表 4** に示す。

表 1. アンケート調査の概要

調査期間	2020/12/25~2021/01/23	総数	130団体(回収率49.4%)
調査対象地域	全国	形式	webアンケート，e-mailでの回答
対象団体	都市再生推進法人，中心市街地活性化協議会，全国まちなか広場研究会，全国エリアマネジメントネットワーク，エリアマネジメント人材育成研究会に所属・登録されている団体		
調査項目	組織特性	法人形態，所属団体，職員の人数，資本金，昨年度の収益	
	運営	事務所の所在，事務局員の雇い方，他まちづくり団体との連携 課題，課題の対策，財源の得方，組織の役割	
	活動	行っている活動，活動の頻度，エリアマネジメント活動の有無	
	地域活性化への貢献	安全安心な環境づくり，地域の賑わいづくり， 地域住民の結びつき強化，総合的な地域活性化	

表 2. 活動のカテゴリー化

カテゴリー	活動の種類	カテゴリー	活動の種類
A. 施設の管理・運営	商業施設の管理・運営	J. 交通対策	交通機関の運行
	ビルの管理・運営		マップ製作
	公共施設の管理・運営		駐車場事業
B. 空き家・空き店舗対策	空き家対策		駐輪場事業
	空き店舗対策		交通対策の講習会
C. まちのビジョン・ガイドラインの作成	エリアビジョンの作成	K. 防災・環境保全	震災訓練
	まちづくりガイドラインの作成		防災マップの配布
D. イベント	イベント		環境保全活動
E. マルシェ・マーケット	マルシェ・マーケット		環境学習
F. 通りの活性化	オープンカフェの設置・運営	L. 情報発信	SNSによる情報発信
	歩行者天国の実施		地域情報誌の発刊
G. 交流の場の提供	交流の場の提供	M. 市民支援	健康づくり
H. 清掃・防犯活動	清掃活動		食育活動
	花壇・植栽の管理		子育て支援活動
	防犯活動		人材発掘
I. 財源の確保	広告事業（壁面広告など）		知的交流の促進

表 3. 法人形態と活動の違いとの関連性

		法人形態				P値	
		社団・財団法人	NPO法人	株式会社	任意組織		
活動カテゴリー	施設の管理・運営						
	行っている (n=69)	16 (48.5%)	5 (41.7%)	**44 (77.2%)**	**4 (16.0%)**	0.0000	**
	行っていない (n=58)	17 (51.5%)	7 (58.3%)	**13 (22.8%)**	**21 (84.0%)**		
	空き家・空き店舗対策						
	行っている (n=37)	5 (15.2%)	4 (33.3%)	**24 (42.1%)**	4 (16.0%)	0.0189	*
	行っていない (n=90)	28 (84.8%)	8 (66.7%)	**33 (57.9%)**	21 (84.0%)		
	清掃・防犯活動						
	行っている (n=67)	16 (48.5%)	8 (66.7%)	23 (40.4%)	**20 (80.0%)**	0.0069	**
	行っていない (n=60)	17 (51.5%)	4 (33.3%)	34 (59.6%)	**5 (20.0%)**		
	交通対策						
	行っている (n=73)	16 (48.5%)	8 (66.7%)	**40 (70.2%)**	9 (36.0%)	0.0187	*
	行っていない (n=54)	17 (51.5%)	4 (33.3%)	**17 (29.8%)**	16 (64.0%)		

独立性の検定　**：1%有意　*：5%有意
クロス集計の残差分析　**太字**：1%有意　：5%有意
青字 期待度数よりも実測度数が高い　赤字 期待度数よりも実測度数が高い

表 4. 法人格の有無と活動の違いとの関連性

		法人格		P値	
		あり	なし		
活動カテゴリー	施設の管理・運営				
	行っている (n=69)	**65 (63.7%)**	**4 (16.0%)**	0.0000	**
	行っていない (n=58)	**37 (36.3%)**	**21 (84.0%)**		
	清掃・防犯活動				
	行っている (n=67)	**47 (46.1%)**	**20 (80.0%)**	0.0048	**
	行っていない (n=60)	**55 (53.9%)**	**5 (20.0%)**		
	交通対策				
	行っている (n=73)	64 (62.7%)	9 (36.0%)	0.0279	*
	行っていない (n=54)	38 (37.3%)	16 (64.0%)		

独立性の検定　**：1%有意　*：5%有意
クロス集計の残差分析　**太字**：1%有意　：5%有意
青字 期待度数よりも実測度数が高い　赤字 期待度数よりも実測度数が高い

施設の管理運営、清掃防犯活動に関しては、有意水準 5%で統計的な差が認められた。交通対策に関しては有意水準 1%で統計的な差が認められた。残差分析の結果により、施設の管理運営、交通対策に関しては､法人格のある団体は行っている団体が多く、法人格のない団体は行っている団体が少ないことが明らかになった。清掃防犯活動に関しては、法人格のない団体は行っている団体が多く、法人格のある団体は行っている団体が少ない事が明らかになった。

2-4. まちづくり団体による活動と地域活性化への貢献意識との関連性

地域活性化への貢献意識については「安全安心な環境づくり」と「地域住民の結びつき強化」の 2 項目について分析を行った。

「地域住民の結びつき強化」に対する地域活性化への貢献意識との関連性に関して独立性の検定を行った結果を**表 5** に示す。有意水準 5%で統計的な差が認められ、残差分析の結果により、イベント、交流の場の提供を行っている団体は「地域住民の結びつき強化」に高い貢献意識を持っていることが明らかになった。同様に「安全安心な環境づくり」に対する地域活性化への貢献意識との関連性に関して独立性の検定を行った結果を**表 6** に示す。有意水準 1%もしくは 5%で統計的な差が認められ、残差分析の結果により､まちのビジョン･ガイドラインの作成、交流の場の提供、清掃防犯活動、防災環境保全活動を行っている団体は「安全安心な環境づくり」に高い貢献意識を持っていることが明らかになった。

2-5. 小結

法人格のある団体は施設の管理・運営、交通対策などの活動を行っている傾向が明らかになり、株式会社はこの傾向が顕著に見られた。法人化することによって､節税や社会的信頼の獲得等の効果が得られ、活動の規模が大きく、費用や人員も必要とされる活動にも取り組むことができると考えられる。また、法人格のない任意組織は清掃・防犯活動のようなまちの環境を維持・保全していく活動を行っている傾向が見られた。イベント、交流の場の提供を行う団体は「地域住民の結びつき強化」に対し、まちのビジョン・ガイドラインの作成や交流の場の提供、清掃防犯活動、防災環境保全活動を行う団体は「安全安心な環境づくり」に対して貢献意識をもって活動していることが明らかになった。地域に携わる人々や団体が行うソフト面のまちづくりは、地域住民のコミュニティや安全な社会構築において効果があると考えられる。

表 5. 活動と地域住民の結びつき強化への貢献意識との関連性

		地域住民の結びつき強化		P値	
		貢献している	貢献していない		
活動カテゴリー	イベント				
	行っている(n=97)	89(78.1%)	8(50.0%)	0.0495	*
	行っていない(n=33)	25(21.9%)	8(50.0%)		
	交流の場の提供				
	行っている(n=57)	47(50.0%)	10(27.8%)	0.0368	*
	行っていない(n=73)	47(50.0%)	26(72.2%)		

独立性の検定　**：1%有意　*：5%有意

クロス集計の残差分析　**太字**：1%有意　：5%有意

青字 期待度数よりも実測度数が高い　赤字 期待度数よりも実測度数が高い

表 6. 活動と安全安心な環境づくりへの貢献意識との関連性

		安全安心な環境づくり		P値	
		貢献している	貢献していない		
活動カテゴリー	まちのビジョン・ガイドラインの作成				
	行っている(n=38)	**31(36.9%)**	**7(15.2%)**	0.0165	*
	行っていない(n=92)	**53(63.1%)**	**39(84.8%)**		
	交流の場の提供				
	行っている(n=57)	43(51.2%)	14(30.4%)	0.0361	*
	行っていない(n=73)	41(48.8%)	32(69.6%)		
	清掃・防犯活動				
	行っている(n=69)	**55(65.5%)**	**14(30.4%)**	0.0003	**
	行っていない(n=61)	**29(34.5%)**	**27(69.6%)**		
	防災・環境保全活動				
	行っている(n=29)	**25(29.8%)**	**4(8.7%)**	0.0111	*
	行っていない(n=101)	**59(70.2%)**	**42(91.3%)**		

独立性の検定　**：1%有意　*：5%有意

クロス集計の残差分析　**太字**：1%有意　：5%有意

青字 期待度数よりも実測度数が高い　赤字 期待度数よりも実測度数が高い

3. 市民提案による景観計画の変更・改定・見直しに関する事例調査

3-1. 研究の背景と目的及び方法

景観の意義や整備保全の必要性を明確に定め法的な強制力を持たせるとの目的で景観法が 2005 年に施行されてから、各自治体が景観計画に基づき景観計画を策定している。景観計画は都市計画マスタープランとは異なり変更の契機について明確に定められておらず、景観計画を運用するにあたり何か問題点が生じ変更に至ったと考えられる。以前行った調査で景観計画変更の内容として景観計画区域の変更と景観形成基準に関する変更が多くみられ、変更の理由として地元住民や地域団体、協議会、また、自治体関係者から自治体への提案が契機となり変更に至った事例が最も多くみられた。

景観計画に関する既往研究を見ると、佐藤ら(2008)の研究[7]では自治体は色彩を特に重視している傾向があり、景観法の策定により法的な拘束力が高まり、事業者が行政の景観政策に適合しない計画を実行することに対する抑止力としての効果を上げていることを明らかにした。江崎ら(2017)の研究[8]では計画変更の内容は積極的な場合が多いが、規制の緩和といった消極的な内容もあったとしている。また、計画変更に関する既往研究では、長嶺ら(2008)の研究[9]では見直しの契機に関しては上位計画である総合計画の改訂に伴って見直されるケースが多いことを明らかにしている。景観計画に関する研究のうち、策定初期の景観計画や中国地方の景観行政団体を対象にしたものはあるが、提案により景観計画の変更に至った事例を取り上げた研究は見当たらない。

以上より本研究では、景観計画の変更内容を把握し変更内容のうち協議会等から提案により変更に至ったケースについて着目した。ヒアリング調査を行う事で、提案により景観計画変更に至ったケースの実態を明らかにすることを目的とする。

3-2. 研究の対象

平成 25 年度以前に景観計画を変更した全国の自治体(59 自治体)に対して、ヒアリング調査を行った。その上で、**表 1** に示す、「提案による変更」を行った事例 (11 自治体) からそのプロセスと課題を明らかにする。市民や協議会から自治体への提案により景観計画の変更に至ったケースに着目し、景観計画担当者と協議会の関係者にヒアリング調査を行い、実態を確認した。今回の調査では、自治体、協議会関係者の両方から回答の得られた札幌市と神戸市についてまとめる。

表 1 提案により変更に至った自治体一覧

都市名	変更内容	変更理由
札幌市	重点区域や基準の変更	協議会からの提案
横須賀市	色彩基準追加・変更	景観審議会委員の意見
神戸市	岡本駅南都市景観形成地域の屋外広告物基準の追加	地域団体からの提案
呉市	音戸の瀬戸景観づくり区域の色彩基準の変更	工事施行者である広島県からの提案
横須賀市	横須賀見晴らしの丘景観推進地区区域の新規指定	開発業者から提案
高岡市	池の端通り景観形成重点地区 旧北陸街道福岡景観形成重点地区新規指定	地元からの声
高山市	景観形成重点地区（2か所）	市が主導で地域との協議
長浜市	やわた夢小路重点区域，北国街道木之本宿重点区域の追加	住民等による提案
高槻市	JR高槻駅北東地区新設	まちづくり協議会からの提案
西宮市	甲陽園目神山東地区，苦楽園五番町くすのき台地区新規指定	地域住民からの提案
四万十町	重点地区（吉見町）の削除	事務局（町）からの提案

3-3. 事例調査

(1) 札幌市

札幌市では平成 23 年に景観計画が変更された。変更の内容としては、景観計画重点区域である札幌駅南口地区の一部を札幌駅前通北街区地区へ編入すること、重点地区である札幌駅前通北街区地区における行為の制限の変更、良好な景観の形成に関する方針の新設である。

① 自治体からの回答

景観計画変更の背景として、沿道地権者を中心的な構成員とする札幌駅前通協議会が 2005 年 10 月に発足したことが挙げられる。そこでまちづくりの目標が検討され、その実現に向け地区計画が提案された。地区計画の提案を踏まえ、地区計画との整合性を図りながら相乗的にまちづくりの目標を実現するよう協議会とともに景観計画の見直しを行った。地区計画のうち、景観計画に反映されている容積率

の部分の目的や、指定された経緯に関しては容積率の緩和（容積ボーナス）を受ける場合の景観に与える影響の大きさに着目して届出対象としている。地区計画が提案されたことを踏まえて、札幌駅南口地区の一部を札幌駅前通り北街区地区に編入した理由については、平成 20 年に「札幌駅前通北街区地区計画」を決定したことに伴い、当該地区計画との整合を図るためである。協議会からの提案を踏まえて審議会内や協議会との間で、景観計画内の景観の方針を踏まえて、具体的な基準の文言等が議論されていた。

② 協議会からの回答

協議会から自治体へ地区計画を提案した理由については、協議会では、当初駅前通の地上部再整備計画について協議がされていたが、その後、協議会内に「まちづくりルール検討部会」が設置され、2006 年 12 月に、「札幌駅前通まちづくりルール」を整理した。このルールに示された内容のうち、建築物の整備により実現する項目を主な内容とした地区計画が関係地権者より 2008 年 7 月に都市計画提案され、2008 年 12 月に都市計画決定がなされた。また、地区計画を自治体に提案する際の過程については、協議会内で策を策定後、関係地権者に内容を個別に説明し同意を得ていた。加えて、周囲の町内会や振興会などに説明の機会を設けていた。地区歩行空間整備により札幌駅周辺と大通り周辺の連携が変化したかまたは商業核の連携の効果の有無については、札幌駅前通地下歩行空間が整備されたことにより、四季を通じて安全で快適に歩くことができるようになり、札幌駅周辺地区と大通やすすきの地区が地下で繋がることで回遊性も向上した。地区計画の導入により、賑わい用途を低層部に設けることで容積緩和を受けられることとなり、低層部に賑わい用途が導入されてきた。さらに地下歩行空間に面して賑わい用途が導入されていることにより地下空間で実施されるイベント等も相まってこれまで通過地点であった札幌駅前通地区が商業ゾーンとしても立ち寄れる場所へ変化している。

(2) 神戸市

神戸市では平成 27 年に、岡本駅南地都市景観形成地区の屋外広告物基準の追加を行っている。

① 自治体からの回答

景観計画変更前は協議会が地域独自の基準として「岡本版・屋外広告物ルール＆ガイドライン」を策定し、これに基づき当地区の掲出予定の屋外広告物に対して自主的に事前協議をしていたが、「岡本版・屋外広告物ルール＆ガイドライン」の基準を景観計画に位置づけられないかという提案がなされ景観計画変更に至った。ルール＆ガイドラインのうち、景観計画に掲載されている部分については、地域団体として必ず守ってもらいたいルール部分を景観計画として定めている。

② 協議会からの回答

神戸市では、大規模建築物等の届出制度の運用開始とあわせて景観アドバイザー制度を設けており、コンサルティング会社とともに景観誘導を行っている。屋外広告物のルール＆ガイドラインの提案理由に関しては、景観計画に屋外広告物基準が掲載される以前から事前協議を行っていたが感覚的な判断基準だったため具体的なルールを策定したとしている。提案に関して厳しすぎるのではという意見があったが、屋外広告物の基準に関して細かい数値が定められて一見厳しそうに見えるが実際に基準に基づき規制を行うと厳しくはないということで理解を頂いた。景観計画に提案する際の過程については、検討経過を地区内や土地の権利者に対して広報し、アンケートを行った。その後、協議会の総会で承認を取り、提案を行った。提案後は提案文書から市の景観計画の文言にするために調整を行った。時間のかかったこととして、調整の際には、元の意図が変わらないように書きかえる作業や、ルール案を作成する際の調査で実際に看板を数多く調査し数値化したことを挙げている。ルールの案を作成する際には 2 年かかったとしている。

3-4. 小結

札幌市等の大規模な都市の駅前商業地エリアでは、景観を規制するとともに、地区計画の導入により容積率の緩和を設けることで、その地域に賑わいが生まれることが明らかになった。また、協議会がエリアマネジメントとして機能し、景観に関する管理も行うことが街にとってより良い方向に進むと考えられる。加えて、自治体が景観に関するアドバイザー制度等の活用により協議会がコンサルティング会社とともに景観規制や誘導を行っている場合、協議会はより良い景観に向けてうまく活動できると考えられる。

4. まとめ

まちづくり団体の活動や組織及び地域活性化への貢献意識との関連性に関する研究では、全国のまちづくり活動を行う団体を対象に組織や活動の実態を把握するアンケート調査を実施し、団体の法人形態と活動および団体の活動と地域活性化への貢献意識との関連性を分析した。その結果、法人格のある団体は施設の管理・運営、交通対策などの活動を行っている傾向が明らかになり、株式会社はこの傾向が顕著に見られた。法人化することによって、節税や社会的信頼の獲得等の効果が得られ、活動の規模が大きく、費用や人員も必要とされる活動にも取り組むことができると考えられる。また、法人格のない任意組織は清掃・防犯活動のようなまちの環境を維持･保全していく活動を行っている傾向が見られた。イベント、交流の場の提供を行う団体は「地域住民の結びつき強化」に対し、まちのビジョン・ガイドラインの作成や交流の場の提供、清掃防犯活動、防災環境保全活動を行う団体は「安全安心な環境づくり」に対して貢献意識をもって活動していることが明らかになった。地域に携わる人々や団体が行うソフト面のまちづくりは、地域住民のコミュニティや安全な社会構築において効果があると考えられる。

市民提案による景観計画の変更・改定・見直しに関する事例調査では、平成 25 年度以前に景観計画を変更した全国の自治体（59 自治体）に対して、ヒアリング調査を行い、提案による変更を行った事例（11 自治体）のうち自治体、協議会関係者の両方から回答の得られた札幌市と神戸市についてそのプロセスと課題を整理した。その結果、札幌市等の大規模な都市の駅前商業地エリアでは、景観を規制するとともに、地区計画の導入により容積率の緩和を設けることで、その地域に賑わいが生まれることが明らかになった。また、協議会がエリアマネジメントとして機能し、景観に関する管理も行うことが街にとってより良い方向に進むと考えられる。加えて、自治体が景観に関するアドバイザー制度等の活用により協議会がコンサルティング会社とともに景観規制や誘導を行っている場合、協議会はより良い景観に向けてうまく活動できると考えられる。

以上より、日本全国のエリアマネジメント団体に対する示唆として、協議会を組織し、今後、より公共性の高い「景観の向上」というテーマに取り組んでいくことが重要となる。

【参考文献】

1) 小林重敬+森記念財団編著（2018）、まちの価値を高めるエリアマネジメント、学芸出版社
2) 高木悠里、嘉名光市、蕭閎偉（2020）、エリアマネジメント団体による景観マネジメントの現状とその団体類型ごとの特徴に関する研究－エリアマネジメント団体への全国アンケート調査・分析に基づいて、日本都市計画学会、都市計画論文集、55(3)、pp. 1423-1430.
3) 内閣府：世論調査、社会意識に関する世論調査、図 4-2、2020 年
4) 松浦 健治郎、 藪崎 奏菜、 浦山 益郎（2008）：まちづくり事業体としてのコミュニティ組織の実行性に関する研究－三重県名張市の地域づくり委員会を事例として－、都市計画論文集、43.3 巻 p. 511-516
5) 田邉 信男、 阿部 宏史、 氏原 岳人（2016）：継続的なまちづくり活動に向けた組織運営の課題とマネジメントの方策に関する考察 活動者の観点に基づく分析、都市計画論文集、 51 巻 3 号 p. 553-559
6) 北野 幸樹、 野田 りさ（2018）：活動内容の特性と活動組織の意識からみた千葉県の NPO 法人におけるまちづくり活動の動向と持続性について－地域主体のまちづくり活動における連関性と持続性に関する研究－、日本建築学会計画系論文集、83 巻 745 号 p. 465-473
7) 佐藤貴彦、堀裕典、小泉秀樹、大方潤一郎（2008）：景観法下の建築物規制の運用実態と課題-景観計画に基づく届出制度に着目して-. 日本都市計画学会、都市計画論文集、43.3 巻、pp. 217-222.
8) 江崎卓、鵜心治、小林 剛士（2017）：景観計画の届出運用の課題と計画変更に関する研究. 日本建築学会中国支部研究報告集、40 巻、pp. 709-802.
9) 長嶺創正、 池田孝之、 小野尋子、 飯田直彦、 大隅雄治(2008)：全国市町村都市計画マスタープラン見直しの実態と課題に関する研究その(1)―見直しと広域調整－. 日本建築学会大会学術講演梗概集（中国）.

斜面安定性向上のための疎水性鉄鋼水砕スラグの適用性評価

岡山大学学術研究院 環境生命科学学域

金　秉洙

本研究では高炉水砕スラグに注目し，疎水材の斜面への適用性の把握を目指して基本物理化学特性の確認や疎水性の評価，そして室内盛土模型実験を行った。本研究での高炉水砕スラグについての疎水性の評価は，水浸入水頭(WIH)試験により，乾燥密度，層厚，飽和度の各観点で疎水材層に与える影響について検討した。この試験結果により，疎水材の乾燥密度が大きいほど遮水機能は増加することが分かった。また，乾燥状態において層厚が 4.0mm と，疎水材の飽和度が 20%の条件で十分な遮水性能の発揮が確認された。一方，室内盛土模型実験では，水浸入水頭(WIH)試験と同様の条件で行い，盛土傾斜角 10° において，遮水機能を示すことが明らかとなった。また，飽和度 20%の疎水材高炉水砕スラグを用いた場合も遮水機能を確認できた。

1. はじめに

近年，集中豪雨により，雨水が斜面内部に浸透することで土の抵抗力が弱まり発生する土砂災害が急激に増加している。そのため，対策として土構造物の斜面に遮水性の高い材料を用いて斜面内部への水の浸透を抑えることが挙げられる。金ら(2019 & 2020)は，疎水性豊浦砂を用いて遮水機能と強度試験を行い，盛土斜面への適用性を確認した。優れた遮水機能を示したが，不十分な強度を示したため，新たな疎水性地盤材料として高炉水砕スラグに注目した（参照：図-1）。本研究では水滴浸入時間(WDPT)試験，接触角試験，水浸入水頭(WIH)試験から高炉水砕スラグの遮水機能を検討し，その結果を踏まえて室内盛土模型実験を行い，乾燥・湿潤両状態の疎水性高炉水砕スラグの盛土斜面への適用性を検討した。

2. 疎水性地盤材料の評価

2.1 水滴浸入時間(WDPT)試験

水滴浸入時間(water drop penetration time, WDPT)試験は，地盤材料の疎水性の程度を評価するために行う。水滴浸入時間(WDPT)は，水滴が地盤材料に完全に浸透するまで必要な時間を表す。水滴浸入時間により撥水性の程度を 5 段階に分類している(Ritsema & Dekker, 2000)。水滴浸入時間（Water drop penetration time, WDPT）試験では，疎水性高炉水砕スラグを乾燥密度 ρ_d=1.75g/cm^3 の条件で試料を詰め，水を滴下して実験した。その結果，WDPT＞3600 を計測し，極端な疎水性を示すことが明らかになった。

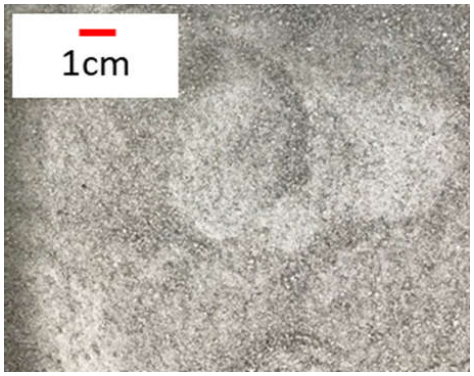


図-1　用いた高炉水砕スラグ

2.2 接触角試験

地盤材料の疎水性の程度を評価する方法として，接触角試験が利用される。水滴が平らな地盤材料に置かれると，3 つの相（液相，固相，気相）の表面エネルギーが異なるため，異なる形状を示す。この時三相の接触で示す角度を接触角という。接触角試験では，疎水性高炉水砕スラグを乾燥密度 ρ_d=1.75g/cm^3 の条件で試料を詰め，水を滴下して，写真を撮影し，角度を計測した。その結果，接触角の平均が 136.1° となり，疎水性に分類されることが明らかになった。

2.3 水浸入水頭(WIH)試験

水浸入水頭 (Water infiltration head, WIH) 試験では，

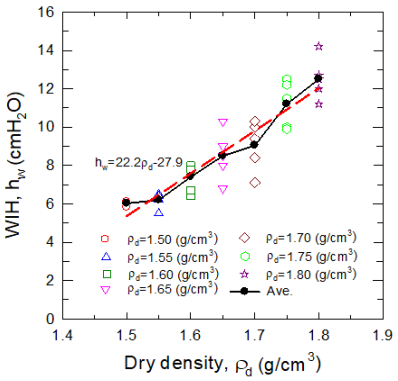


図-2　乾燥密度と水浸入水頭の関係

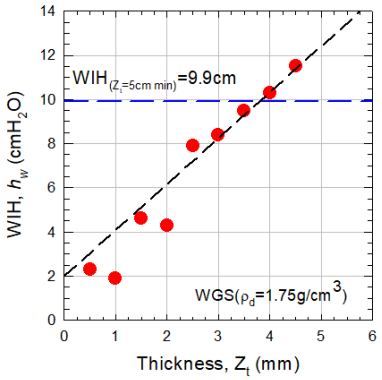


図-3　層厚と水浸入水頭の関係

疎水性高炉水砕スラグの遮水機能を評価した。水浸入水頭は，水が供試体の表層に浸透した瞬間の水頭(h_w)を指すものとして定義される。水浸入水頭試験では，アクリル円筒内に所定の乾燥密度で作製された供試体の表面に水を滴下し，浸透が始まるまで水頭(h_w)を上げ，浸透時の水頭を測定する。Case A では，乾燥密度の変化による水浸入水頭への影響を調べるため，乾燥密度を ρ_d=1.50g/cm^3~1.80g/cm^3 の 7 通りに変化させ，高さ 5.0cm で供試体を作製し水浸入水頭を測定した。乾燥密度と水浸入水頭との関係を図-2 に示す。その結果，乾燥密度が増加すると水浸入水頭は増加することが分かり，乾燥密度 ρ_d=1.50g/cm^3 で十分な遮水機能を示す(WIH=11.2cm)。次に，Case B では，十分な水浸入水頭を得るのに必要な厚さの最小値について検討した。乾燥密度を ρ_d=1.75g/cm^3 とし，0.5mm 毎で層厚を増加させ，Case A で求めた層厚 5.0cm の水浸入水頭の最小値を超えたものを必要層厚（Require thickness：Z_{rt}）と定義し，その遮水性能について評価を行った。層厚と水浸入水頭の関係を図-3 に示す。すると，層厚が 4.0mm で層厚 5.0cm の水浸入水頭の最小値を超えたので，必要層厚が Z_{rt}=4.0mm となる。よって，層厚を小さくすることで，施工時のコスト削減が可能となると考えられる。Case C では，湿潤状態の疎水性高炉水砕スラグの遮水機能を評価するために，飽和度 S_r=10，20，30，40%の条件について水浸入水頭を検討した。飽和度と水浸入水頭の関係を図-4 に示す。その結果，飽和度 20%までは乾燥状態の疎水性高炉水砕スラグの水浸入水頭と変化はなかったが，飽和度 30%で急激に水浸入水頭が減少する。よって，飽和度 20%までは遮水機能を示すことができることがいえ，一度疎水性高炉水砕スラグに水が浸透しても，飽和度が 20%まで減少すれば遮水機能が回復できると期待される。

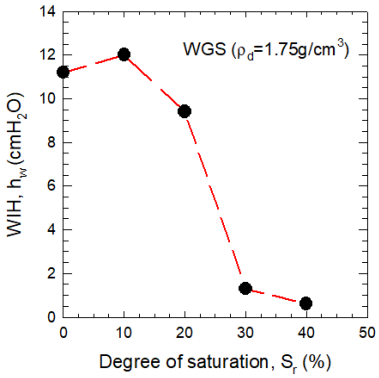


図-4　飽和度と水浸入水頭の関係

3. 室内盛土模型実験

3.1　概要

水浸入水頭（water infiltration head, WIH）試験では，珪砂 2～5 号，豊浦砂を用いて，疎水性地盤材料の遮水特性を評価した。水浸入水頭は，水が供試体の表層に浸透した瞬間の水頭(h_w)を指すものとして定義される。水浸入水頭試験では，アクリル円筒内に所定の乾燥密度で作製された供試体の表面に水を滴下し，浸透が始まるまで水頭(h_w)を上げ，浸透時の水頭を測定する。本研究では，複合的に評価を行うため，Case 1: 乾燥密度，Case 2: 層厚，Case 3: 混合率として計 3 つのケースに分け，それぞれ試験条件に合わせて水浸入水頭試験を実施した。

3.2　試料の物理特性

疎水性高炉水砕スラグ，珪砂 1 号，真砂土を用いた。珪砂 1 号は排水経路，真砂土は被覆層，疎水材層の下層として使用した。**表-1** に試料の物理特性を示す。疎

表-1　用いた試料の物理特性

項目	疎水性高炉水砕スラグ	珪砂1号	真砂土
土粒子密度(ρ_s)(g/cm^3)	2.86	2.65	2.58
最大乾燥密度(ρ_{dmax})(g/cm^3)	1.80	1.67	1.88
最小乾燥密度(ρ_{dmin})(g/cm^3)	1.44	1.45	-
最大間隙比(e_{max})	0.87	0.83	-
最小間隙比(e_{min})	0.49	0.58	0.37
平均粒径(D_{50})(mm)	0.45	4.50	0.38
均等係数(U_c)	4.64	2.24	13.7
透水係数(k_s)(cm/s)	1.2×10^{-2}	2.44×10^{-1}	1.40×10^{-4}

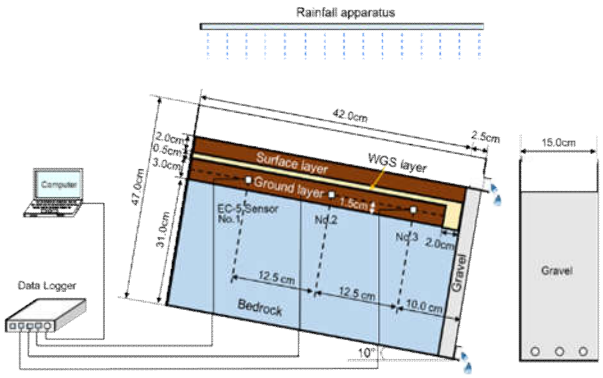


図-5　Case 1 における実験装置の模式図

水性高炉水砕スラグの水浸入水頭(WIH)値は 11.2cm である。

3.3 Case 1：疎水性高炉水砕スラグの遮水機能の検討

金ら(2020)の研究では，疎水性豊浦砂が層厚 5.0mm，降雨強度 100mm/h，傾斜角 10°，計測時間 5h という条件で優れた遮水機能を示した。そこで，Case 1 ではそれらの条件を一致させ試験を行い，疎水性高炉水砕スラグの遮水機能を確認する。図-5 のように実験装置は被覆層（真砂土）2.0cm，疎水材層（疎水性高炉水砕スラグ）0.5cm，EC-5 センサー設置のための土層（真砂土）3.0cm として模型盛土を作製した。降雨浸透の有無を測定するため，疎水材層の下に真砂土の層を設けて，その層内に 3 ヶ所 EC-5 センサーを設置した。また，排水経路からの水の浸入を防ぐため，土層の側面に厚さ 2.0cm で疎水材（疎水性高炉水砕スラグ）を設置した。

一方，水浸入水頭試験の結果から，乾燥密度 ρ_d=1.75g/cm^3 で十分な遮水機能(WIH=11.2cm)を示した。そこで，室内盛土模型実験の Case 1 では，疎水性高炉水砕スラグを用いて，乾燥密度 ρ_d=1.75g/cm^3 で締固めを行い，模型盛土を作製した。表-2 に実験条件をまとめている。

表-2　盛土実験条件

項　目		Case 1	Case 2	Case 3
被覆層の厚さ(cm)		2.0	2.0	2.0
疎水材層の厚さ(cm)		0.5	5.0	0.5
真砂土層の厚さ(cm)		3.0	-	3.0
初期乾燥密度, ρ_{di}(g/cm^3)	被覆層	1.50	1.50	1.50
	疎水材層	1.75	1.75	1.75
	土層	1.50	-	1.50
	排水経路(礫)	1.64	1.64	1.64
降雨強度, I (mm/h)		100	100	100
斜面傾斜角度, Φ (°)		10	10	10
測定時間, t (h)		5	5	5

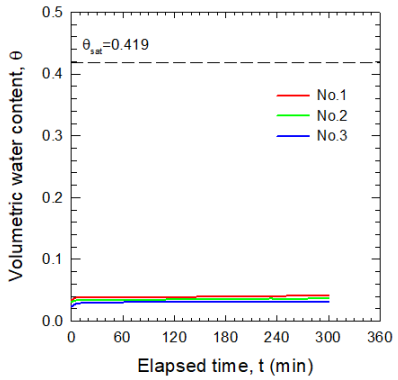


図-6　Case 1 における EC-5 センサーの測定結果

EC-5 センサーにより測定された結果を図-6 に示す。降雨強度 100mm/h で 5 時間測定したが，いずれの降雨強度でも，終了時点でセンサー（No.1，No.2，No.3）の反応は見られなかった。また，実験開始後すぐに被覆層に水が浸入し，実験終了後，被覆層は完全に湿潤状態であった。一方，下の疎水材層，EC-5 センサーを入れた真砂土層は乾燥状態であった。以上の結果から，疎水材層 0.5cm（乾燥密度 ρ_d=1.75g/cm^3）の条件において，疎水材層内への降雨浸透は起こらないことが確認され，疎水性高炉水砕スラグの優れた遮水機能が明らかになった。

3.4 Case 2：湿潤状態での疎水材の遮水機能の検討

水浸入水頭試験では，疎水性高炉水砕スラグの飽和度が 20%で優れた遮水機能を示したため，Case 2 では，飽和度を 20%にした疎水性高炉水砕スラグを用いて実験を行う。実験装置の模式図は図-7 のように被覆層 2cm，疎水材層を 5cm として模型盛土を作製した。こ

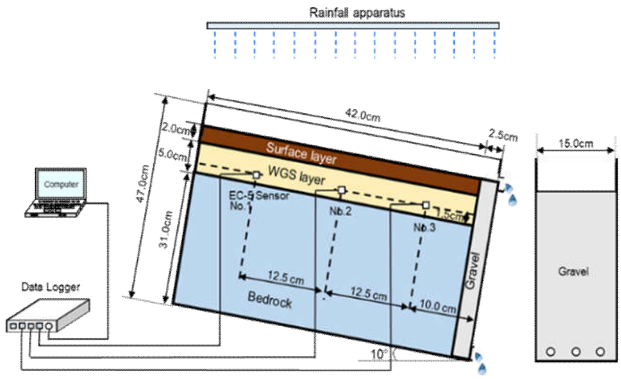


図-7　Case 2 における実験装置の模式図

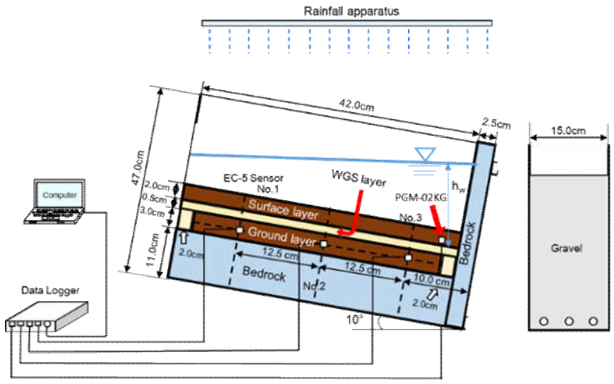


図-9　Case 2 における実験装置の模式図

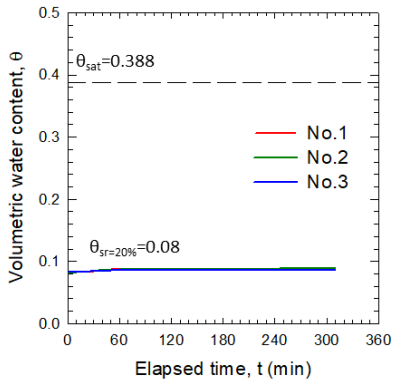


図-8　Case 1 における EC-5 センサーの測定結果

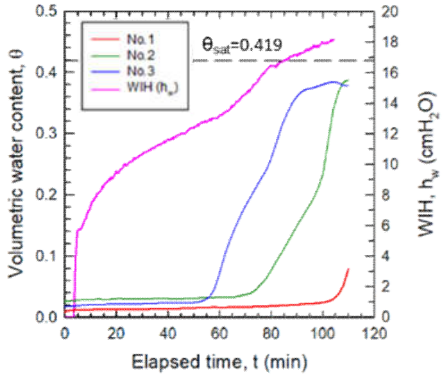


図-10　Case 3 における EC-5 センサーの測定結果

こで，飽和度 20%の疎水性高炉水砕スラグは層厚 5cm で十分な遮水機能を示したが，層厚 5mm では十分な遮水機能を示さなかったため，疎水材層を 5cm としている。また，降雨浸透の有無を測定するため，疎水材層に 3 ヶ所 EC-5 センサーを設置した。水浸入水頭試験と同様に初期乾燥密度 ρ_d=1.75g/cm^3 の状態から飽和度を 20%にして，模型盛土を作製した。表-2 に実験条件をまとめている。

EC-5 センサーにより測定された結果を図-8 に示す。降雨強度 100mm/h で 5 時間測定した結果，初期のセンサー（No.1，No.2，No.3）は飽和度 20%を示す体積含水率 $\theta_{Sr=20\%}$=0.08 を示している。そこから終了時点でセンサー(No.1，No.2，No.3)の反応は変化していないことが分かる。つまり，降雨による浸透は発生していないといえる。実験開始後すぐに被覆層に水が浸入し，終了後，被覆層は湿潤状態であった。疎水材層は側面に水が浸透しているように見えたが，内部を確認すると乾燥状態であった。これは，用意した模型装置の壁面(アクリル)を通じて水みちができ浸透したと考えられる。よって，飽和度を 20%にした疎水性高炉水砕スラグでも，疎水材層への降雨浸透は発生しない，すなわち優れた遮水機能を維持することが明らかになった。

3.5　Case 3：遮水層の浸透破壊状況の検討

前述した Case 1 と Case 2 では，排水経路を設けて現場斜面と同様の経路としていた。しかし，水浸入水頭(WIH)試験の結果が盛土斜面に適用できるかどうかを検討するため，Case 3 では遮水層を土槽内で設ける位置を低くし，水頭が高くなるよう非排水条件として設定した。前章での水浸入水頭(WIH)試験により，疎水性高炉水砕スラグ（乾燥密度 ρ_d=1.75g/cm^3）では，WIH(h_w)=11.2cm という結果を得たので，計測水頭が 12cm 以上になるように設計した。実験装置の模式図は図-9 のように被覆層 2.0cm，疎水材層 0.5cm，EC-5 センサー設置のための土層 3.0cm として模型盛土を作製した。降雨浸透の有無を測定するため，疎水材層の下に真砂土の層を設けて，その層内に 3 ヶ所 EC-5 センサーを設置した。また，排水経路からの水の浸入を防ぐため，土層の側面に厚さ 2.0cm で疎水材（疎水性高炉水砕スラグ）を設置した。模型内部の水頭(h_w)を計測す

るために，疎水材層の上部(No.3 の EC-5 センサーの上部)に間隙水圧計を設置する。この読み値を水頭に変換し水浸入水頭を読み取る。また，試料や模型の条件は Case 1 と同様に設定した。さらに，試験終了は水頭が十分高くなり疎水材層およびその下層が十分浸透した様子が見られた時とする。表-2 に実験条件をまとめている。

EC-5 センサーおよび間隙水圧計により測定された結果を図-10 に示す。降雨強度 100mm/h で測定したが，まず，測定開始 55 分後にセンサーNo.3 が反応した。またその時の間隙水圧計の読み値を水頭に直すとおよそ 13cm であった。また，70 分後にセンサーNo.2 が，100 分後にセンサーNo.1 が反応し，試験が終了した。

以上の結果から，室内盛土模型実験における水浸入水頭が 13cm であり，これは，水浸入水頭(WIH)試験の結果 WIH=11.2cm と比較すると類似しているといえる。すなわち，水浸入水頭(WIH)試験により求められた WIH 値(h_w)が疎水性地盤材料の遮水性能を表すことが証明できたと考えられる。

4. 結論

本研究では，疎水性高炉水砕スラグに注目し，疎水性の評価を行い，室内盛土模型実験により疎水性地盤材料の浸透特性及び実際の施工現場での疎水性地盤材料の適用性について評価を行った。疎水性評価では水滴浸入時間(WDPT)試験，接触角試験を行い，疎水性高炉水砕スラグの優れた疎水性を示した。また，室内盛土模型実験では，水浸入水頭試験で得られた結果を踏まえて乾燥状態，湿潤状態の疎水性高炉水砕スラグに対する遮水性能の評価により，疎水性地盤材料の盛土斜面への適用性を評価した。以下に，本研究で得られた結果及び考察についてまとめる。

(1) 水性高炉水砕スラグを用いた水滴浸入時間(WDPT)試験では WDPT＞3600 を計測し，極端な疎水性を示すことが明らかになった。また，接触角試験では，平均 136.1° を計測し，高い疎水性を持つということが分かった。

(2) 水浸入水頭(WIH)試験では，疎水性高炉水砕スラグの乾燥密度が大きいほど，遮水機能が増加することが明らかとなり，乾燥密度 ρ_d=1.75g/cm^3 で十分な遮水機能(WIH=11.2cm)を示した。また，層厚を変化させた結果，層厚 4.0mm 以上であれば，十分な遮水機能を発揮することになり層厚を小さくすることによる施工のコスト削減に繋げることが可能である。一方，飽和度の影響に関する試験結果では，飽和度 20%までは十分な遮水機能を示すことが明らかとなった。つまり，一度降雨により疎水材層に水が浸透したとしても，地盤が乾燥し始め，飽和度が 20%を下回る状態になると，もう一度遮水機能を示すということがいえる。

(3) 乾燥状態の疎水性高炉水砕スラグを用いて室内盛土模型実験を行ったところ，測定時間 5h で降雨浸透が生じないことが明らかとなった。つまり，乾燥状態の疎水性高炉水砕スラグの疎水材層への設置は降雨浸透による斜面崩壊の対策として有用であると考えられる。

(4) 疎水性高炉水砕スラグ（飽和度 20%）を用いて室内盛土模型実験を行ったところ，測定時間 5h で降雨浸透が生じないことが明らかとなった。つまり，一度降雨により疎水材層に水が浸透したとしても，地盤が乾燥し始め，飽和度が 20%を下回る状態になると遮水機能が回復できることで，断続的な降雨にも有用であると考えられる。

(5) 室内盛土模型を非排水の状態について実施し，模型内での浸透状態，すなわち水浸入水頭(WIH)を検討した。模型実験では，土中水分計が反応したタイミングで WIH=13cm という結果を得ることができた。WIH 試験では，WIH=11.2cm という結果を得たので，室内盛土模型を用いた WIH 計測は WIH 試験の結果が再現できたと考えられる。

参考文献

1) 金 秉洙, 任 道駒, 岡本 良太, 竹下 祐二, 加藤正司. 2020. 疎水性地盤材料の遮水性能の評価に関する研究, 第 55 回地盤工学研究発表会，地盤工学会，京都(2020 年 7 月), 22-12-2-05.

2) 金 秉洙, 任 道駒, 岡本 良太, 竹下 祐二, 加藤正司. 2020. 疎水性地盤材料の斜面への適用性の評価に関する研究, 第 55 回地盤工学研究発表会，地

盤工学会，京都(2020 年 7 月), 22-12-2-04.

3) 金 秉洙, 小林 弘昌, 橋口 侑生, 竹下 祐二, 加藤正司. 2019. 親水性・疎水性地盤材料の混合比が力学特性に与える影響に関する研究, 全国大会 第74 回年次学術講演会, 土木学会, 香川大学(2019 年 9 月), III.

4) Ritsema, C.J., and Dekker, L.W. 2000. Preferential flow in water repellent sandy soils: principles and modeling implications, Journal of Hydrology, Vol. 231-232, pp. 308-319.

ALB 計測による 3 次元河道条件の推定と旭川分流堰周辺の洪水流解析への応用

岡山大学学術研究院　環境生命科学学域

吉田　圭介

平成 30 年 7 月豪雨では岡山市を縦断する旭川では分流堰「一の荒手」の治水機能が発揮され，市街地は外水氾濫の被害から免れた．一の荒手は固定堰であり，堰前面の中州周辺には樹木や竹林の群落が存在するため，流況は複雑であり，一般的な平面 2 次元解析の適用が妥当かは判断できない．一方，学術的には従来，植生場の 3 次元流解析は模型（主に柱状の金属片）を用いた基礎研究が主であり，実際の植生の検討は限られている．また，現地を対象とした解析では河川流量および河床高と地被定数の面分布の把握が重要になるが，後者では河道広範囲の計測手法は確立しておらず，課題であった．そこで，本研究では航空レーザ測深(ALB)の点群データから河道の地形や地被・植生の平面分布を推定し，植生に関しては新たに抵抗要素の鉛直分布を考慮した 3 次元モデルを検討した．また，得られた現地条件を 3 次元モデルに組み込んで，平成 30 年洪水を対象に分流部周辺での洪水流況の再現計算を試み，水位や流速場の現地観測結果と比較して解析精度を検討することとした．

1. はじめに

近年，豪雨災害が頻発し，全国各地で甚大な水害が発生している．平成 30 年 7 月豪雨では岡山県倉敷市真備町において小田川やその支川の堤防が決壊し，大規模な浸水被害が生じた．一方，岡山県内の他の国直轄河川ではハード対策が功を奏し，例えば岡山市を縦断する旭川では，放水路である百間川の河口水門，および分流部の改修事業（**図-1**）が洪水前に概ね完成したため，岡山市街地は外水氾濫の被害から免れた [1)]．

分流部の主な改修事業は，歴史的な「一の荒手」の構造強化と背割堤の嵩上げである．一の荒手は練積み石組みの固定堰であり，分派流は堰周辺の樹木分布や地形起伏に依存する可能性がある．そのため，洪水時の河床変動や植生流出が実際の分流量，さらには洪水後の河道変化にどう影響するのかを十分に検討しておくことは重要である．

著者らはこれまで旭川河道や分流部周辺の洪水流況を平面 2 次元数値解析モデルで検討してきた [1),2)]．その結果，縦断水位や分流量に関して定性的には概ね再現性が確認されたが，堰周辺の定量的な流動や河床変動の評価は困難であり，今後は 3 次元モデルを用いた詳細な検討が必要と考えられた．一方，これまでの水工学分野では，植生を含む水理現象の 3 次元流動解析は実験室レベルでの模擬植生の乱流場を対象とした基礎研究が主流であり [3)]，現地での検討は限られる [4)]．これにはスケールを踏まえた植生乱流のモデル化 [5)]に加えて，河川広域での植生分布の再現性や，検証データとしての洪水流観測の難しさなど，複数の理由が考えられる．

一方，近年では航空レーザー測深(ALB)，モービルマッピングシステム(MMS)，無人航空機(UAV)などによる河道の測量技術 [6)]は著しく向上しており，3 次元地形情報が以前と比較して容易に得られるようになっている．また，開発途上ではあるが，地被や植生種は概略，数 m のオーダで推定可能となっている [7)]．そのため，新たな計測・フィルタリング技術の導入が河川流解析の精度向上に限らず，河川管理の高度化（例えば，河川環境のモニタリング [8)]や Construction Information Modeling (CIM)への活用など）へ広く応用できるものと期待される．

本研究ではこうした背景の下，河道の ALB 点群データから地形や地被・植生分布を得て 3 次元河道モデルを構築し，平成 30 年 7 月豪雨時の旭川の洪水流を対象に，分流部周辺での 3 次元洪水流の数値計算を行う．また，現地計測結果や既往の 2 次元計算結果と比較し，計算精度を検討する．

2. 平成 30 年 7 月豪雨時の旭川下流部の洪水

2.1 旭川洪水の概況と洪水の影響

図-2 は本研究で対象とする分流堰周辺の河道区間を示す．図中の範囲が 3 次元解析の領域である．**図-3** は旭川下流の基準地点である下牧と，旭川本川



図-1 平成 30 年洪水後の分流部の様子
（旭川左岸：12.2KP付近）

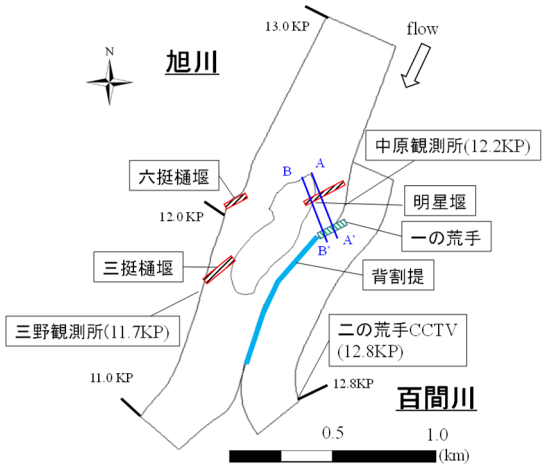


図-2 検討対象領域と分流部周辺の諸構造物位置図

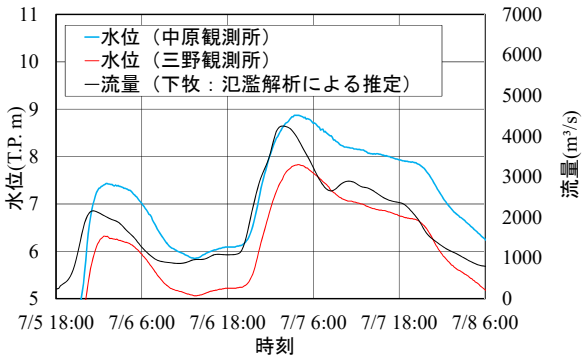


図-3 平成 30 年西日本豪雨時における旭川の水位・流量ハイドログラフ

の三野観測所および百間川分流部付近の中原観測所における豪雨時の水位・流量ハイドログラフを示す．降雨特性により，7/6 と 7/7 の深夜帯に洪水のピークが観測された．

図-4 は CCTV カメラにより 7/7 の午前 6 時半頃に撮影された一の荒手周辺の越流状況を示す．この時刻はピーク流量時を過ぎているが，洪水の濁流が巻石部の高さで旭川から百間川へ流れ込む様子が観察される．

2.2 洪水による植生と河床の変化

図-5 は洪水前後に分流部周辺で撮影した UAV 写真である．洪水の影響で，分流部より上流では主に草本類の植生が流出し，分流部前面では土砂の堆積や洗掘が観察される．なお，この洪水により分流部前面の明星堰の一部が破損した．

本洪水の前後では ALB によって河道測量が行われた．**表-1** には計測機器の仕様と，計測の諸元を示した．計測機器は Leica Chiroptera II を用いた．2017 年は固定翼，2019 年は回転翼による飛行のため，地上点密度が異なる．

図-6 は ALB 計測結果より得られた解析範囲の地被・植生分類と，洪水による植生変化を示した．旭

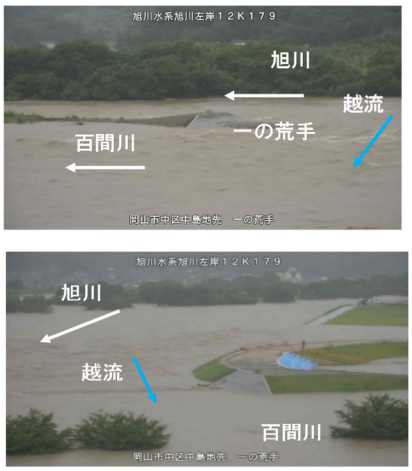


図-4 一の荒手の越流状況 7/7 6:30（上写真:下流側，下写真:上流側）

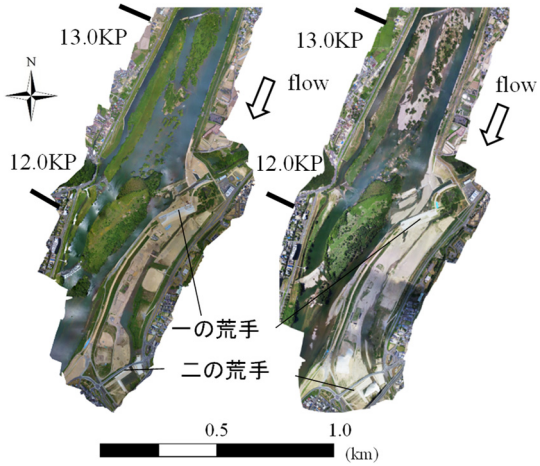


図-5 三次元計算領域の UAV 写真（左図：洪水前 2018.05.22，右図：洪水後 2018.07.20）

川本川，百間川ともに砂州上の水際には樹木が生い茂り，本川の中州には竹林が密生している．本洪水では河床変動に伴って砂州上の草本類の多くが流出し，また樹木の一部は流出・倒伏したが，竹林には変化は生じなかった．ここで，樹木の倒伏は ALB の差分結果と UAV 写真より判断した．なお，洪水前後の衛星写真などを詳細に調べると，図中の赤点線部は洪水による変化ではなく，洪水前の人為的な工事（分流部事業）に伴う伐採による変化であることが分かった．

図-7 は洪水前後での ALB 測量結果の差分を示す．プラスが堆積，マイナスが洗掘を示す．図中では洪水に関係無く，人為的な工事によって河床高変化が生じた箇所は黒破線で囲んだ．洪水の影響で，旭川本川では 13 KP 周辺で樹林部下流での河床変動や，明星堰や三挺樋堰の堆積が顕著に見られる．**図-6** の百間川 13 KP 付近にある赤点線部において**図-7** では浸食が確認できるが，複数の時期の航空写真から，このことは伐採の影響ではなく洪水による地形変化と確認した．また，洪水の影響で一の荒手の前面の明星堰の一部が破損した．

表-1 ALB 計測で用いた機器仕様と計測諸元

	項目		計測年月	
			2017.11	2019.01
機器仕様	レーザ波長帯 (nm)	近赤外	1,064	
		緑	515	
計測仕様	レーザ照射数 (万発/秒)	近赤外	20	14.8
		緑	3.5	
	対地高度(m)		500	
	飛行速度(km/h)		220	110
	計測点密度 ($1/m^2$)	近赤外	8.0	64.0
		緑	2.0	4.5

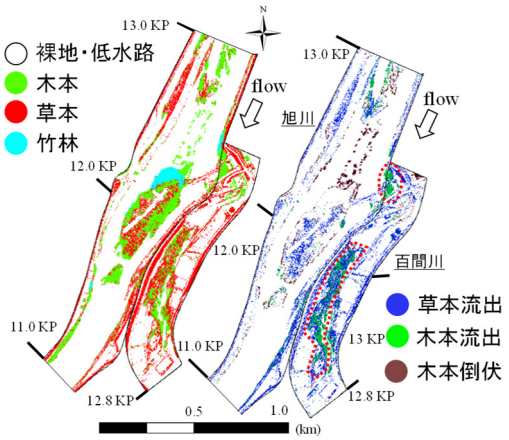


図-6 地被分類(左)と洪水による植生変化(右)

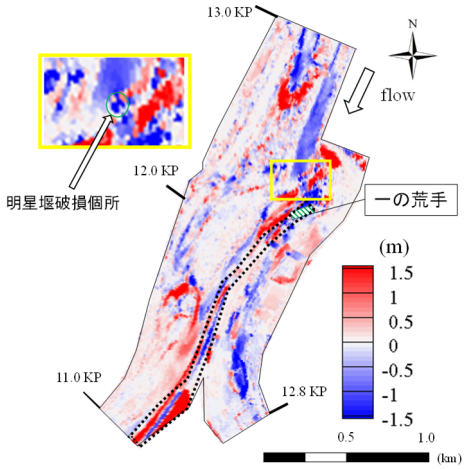
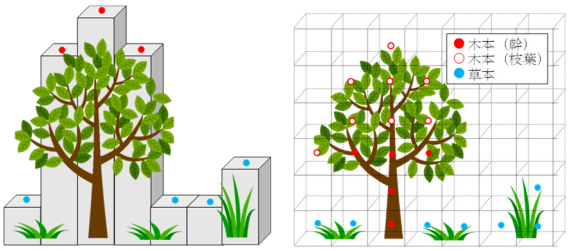


図-7 洪水による河床変動量 (ALB 計測差分)



(a) 2 次元モデル　　(b) 3 次元モデル

図-8 モデルの違いによる植生分布の概念図

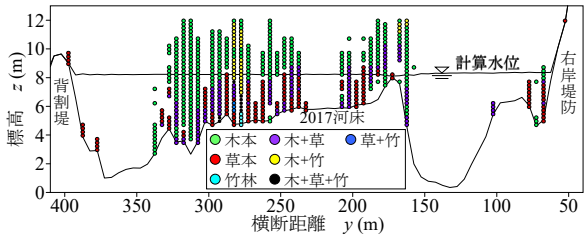


図-9 旭川12.0 KP断面における
3次元植生分布データ

3. 植生を考慮した３次元洪水流解析モデル

3.1 植生分布データの作成および植生抵抗の考え方

まず，**図-8** は(a)2 次元モデルおよび(b)3 次元モデルにおける植生分布の考え方を示している．2 次元モデルでは，平面上の 1 点において 1 つの植生情報しか考慮できないのに対し，3 次元モデルでは鉛直方向に複数の植生情報を考慮することができ，さらに空間的な分布も考慮することができる．本研究では，1 辺 0.5 m の立方体に 1 点の植生情報を有する前処理付き ALB データを使用し，3 次元計算格子 (5 m × 5 m × 0.25 m) に落とし込むことで植生分布データを作成した．**図-9** は作成した旭川 12.0 KP 断面における 3 次元の植生分布データを示している．ここで，ALB データでは，木本の葉部分を草本として判定している場合があったため，本研究では河床から 3 m 以上の位置にある草本は木本として処理した．次に，植生抵抗の考え方であるが，**図-8**(b)に示される木本の幹部分，草本，および竹林については従来同様 [1),2)]，抗力係数を用いた流速の 2 乗に比例する形で抵抗をモデル化した．一方，木本の枝葉部分については，空隙の極めて大きい多孔質体として捉え，ポーラスモデルにより抵抗をモデル化した．ただし，ALB データから木本の枝葉部分を判定することは現段階では困難であったため，樹高の半分以上の高さにある木本を枝葉部分と判定した．

3.2 基礎方程式と数値計算法

本研究では，ポーラスモデルに基づく以下の 3 次元流れの基礎方程式を使用した．ただし，枝葉部分の空隙率は極めて大きいとし，本研究では慣性力係数を 0 とした．また，乱流モデルには標準型 k-ε モデルを採用し，植生抵抗による影響を考慮した [3)]．

[連続式]

$$\frac{\partial}{\partial x_i}\left\{\gamma_{(i)}u_i\right\}=0 \tag{1}$$

[運動方程式]

$$\frac{\partial u_i}{\partial t}+\frac{1}{\gamma_v}\left\{\frac{\partial \gamma_{(j)}u_j u_i}{\partial x_j}\right\}=-g\delta_{3i}-\frac{1}{\rho}\frac{\partial P}{\partial x_i}$$
$$+\frac{1}{\gamma_v}\frac{\partial}{\partial x_j}\left\{\gamma_{(j)}(\nu+\nu_t)\left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j}+\frac{\partial u_j}{\partial x_i}\right)\right\}-\frac{F_i}{\gamma_v} \tag{2}$$

$$F_i=\frac{1}{2}C_D\lambda u_i\sqrt{u_j u_j} \tag{3}$$

表-2 平成30年7月豪雨を対象とした解析条件

離散間隔	時間方向		$\Delta t = 0.05$ s
	空間方向		$\Delta x = \Delta y = 5.0$ m, $\Delta z = 0.25$ m
植生	木本（枝葉）空隙率 γ_v		70 %（一定値）
	密生度 λ (1/m)	木本（幹）	樹高5 m以下: 0.023, 5 m以上: 0.013
		草本	0.031
		竹林	0.286
	抗力係数 C_D		1.0
マニングの粗度係数 (m$^{-1/3}$/s)			低水路：0.028, 高水敷：0.026
下流水位	ピーク流量時 $Q = 4{,}251$ m^3/s		旭川 11.0 KP：7.180 m 百間川 12.8 KP：8.190 m
	STIV計測時 $Q = 4{,}146$ m^3/s		旭川 11.0 KP：7.141 m 百間川 12.8 KP：8.158 m

[k-方程式]

$$\frac{\partial k}{\partial t}+\frac{1}{\gamma_v}\left\{\frac{\partial \gamma_{(j)}u_j k}{\partial x_j}\right\}=\frac{1}{\gamma_v}\frac{\partial}{\partial x_j}\left\{\gamma_{(j)}\nu_k\frac{\partial k}{\partial x_j}\right\}$$
$$+\nu_t\frac{\partial u_i}{\partial x_j}\left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j}+\frac{\partial u_j}{\partial x_i}\right)+C_{fk}\frac{F_j}{\gamma_v}u_j-\varepsilon \quad (4)$$

[ε-方程式]

$$\frac{\partial \varepsilon}{\partial t}+\frac{1}{\gamma_v}\left\{\frac{\partial \gamma_{(j)}u_j \varepsilon}{\partial x_j}\right\}=\frac{1}{\gamma_v}\frac{\partial}{\partial x_j}\left\{\gamma_{(j)}\nu_k\frac{\partial \varepsilon}{\partial x_j}\right\}$$
$$+\frac{\varepsilon}{k}\left[C_{\varepsilon 1}\left\{\nu_t\frac{\partial u_i}{\partial x_j}\left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j}+\frac{\partial u_j}{\partial x_i}\right)+C_{f\varepsilon}\frac{F_j}{\gamma_v}u_j\right\}-C_{\varepsilon 2}\varepsilon\right] \quad (5)$$

$$\nu_t = C_\mu\left(k^2/\varepsilon\right)$$
$$\nu_k = \nu+\nu_t/\sigma_k;\quad \nu_\varepsilon = \nu+\nu_t/\sigma_\varepsilon \quad (6)$$

ここに，t：時間，添え字 i, j：総和規約に従い，(1, 2, 3)はそれぞれ(x, y, z)方向を表す，u_i：i 方向の流速成分，γ_v：空隙率，$\gamma_{(i)}$：i 方向面積透過率，g：重力加速度，δ_{3i}：クロネッカーのデルタ，ρ：流体の密度，$P = p + 2/3\rho k$，p：圧力，k：乱流エネルギー，ν：動粘性係数，ν_t：渦動粘性係数，ε：乱流エネルギー散逸率，F_i：植生抵抗の i 方向成分，C_D：抗力係数，λ：植生密生度である．k-ε モデルの定数には，$C_\mu = 0.09$, $\sigma_k = 1.0$, $\sigma_\varepsilon = 1.3$, $C_{\varepsilon 1} = 1.44$, $C_{\varepsilon 2} = 1.92$ を用い，植生抵抗に係る係数は，$C_{fk} = 1.0$, $C_{f\varepsilon} = C_{fk}C_{\varepsilon 2}/C_{\varepsilon 1}$ とした[3]．また，$\gamma_{(i)}$は河床及び木本類枝葉に相当する格子でのみ 1 以下の値となる変数であり，λ との関係性は無い．

数値計算法として，計算格子にはコロケート格子を採用し，HSMAC 法により格子境界流速および圧力を，Fractional-step 法により格子中央流速を逐次更新した．運動方程式移流項には WENO 法を適用し，k-および ε-方程式は hybrid 法により差分化した．

4. ３次元洪水流解析モデルの妥当性の検証と２次元モデルとの比較

4.1 平成３０年７月豪雨を対象とした検討

計算領域は 3 次元（3D）および 2 次元（2D）モデル[1),2)]ともに**図-2** の範囲である．ただし，両モデルでは座標系が異なるため，旭川の下流端は両者とも 11.0 KP でほぼ一致しているものの，百間川の下流端は，3D では矩形の計算領域に合わせるため，12.8 KP より若干下流に位置させた．**表-2** に解析条件を示す．木本（枝葉）の空隙率 γ_v は予備解析により決定した．植生抵抗に係る各係数やマニングの粗度係数は，従来の研究[1),2)]を参考に決定した．また，粗度による河床と堰との区別はしていない．地形および植生条件には，両条件が揃っている 2017 年 ALB データを使用した．ここで，**図-6** より，この洪水による植生の流失は草本類が主であり，その草本類は分流量に大きな影響を与えないものと考え，本解析モデルでは，洪水時の植生の倒伏・流失は考慮していない．

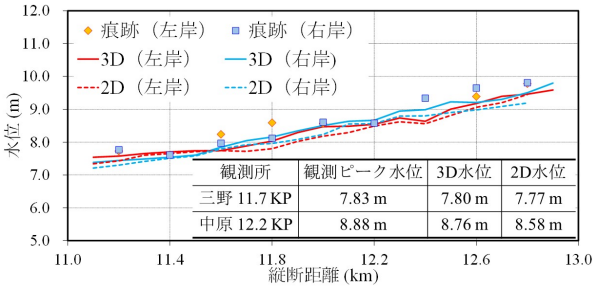


図-10 旭川痕跡水位・観測水位と解析水位との比較

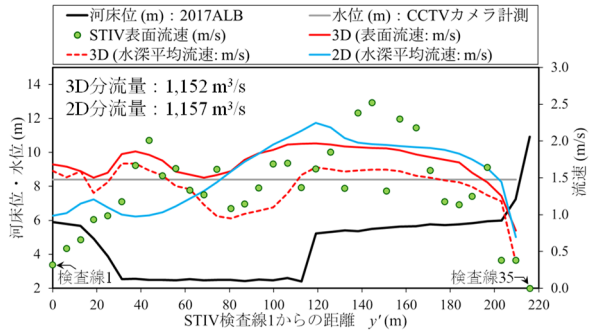
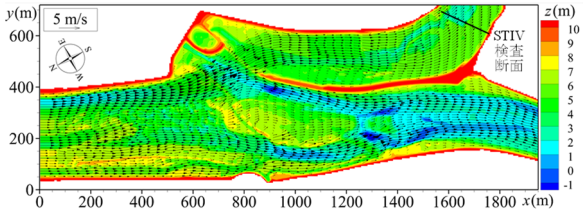


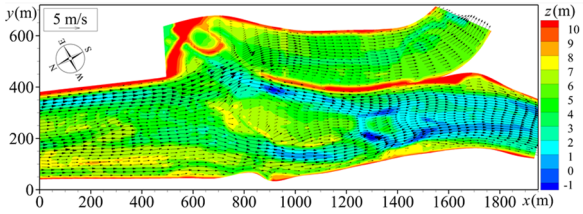
図-11 百間川12.8 KPでのSTIV表面流速との比較

図-10 は旭川痕跡水位と解析水位を比較したものである．分流部の 12.4 KP より上流側で，両解析水位は痕跡より約 0.3 m 低い．しかしながら，12.2 KP より下流側では両モデルとも痕跡水位を再現できている．また，両解析結果はほぼ一致しているものの，観測ピーク水位と比較すると，中原（**図-2** 参照）では 3D の方が観測水位に近く，再現性が良い．

図-11 は百間川 12.8 KP における STIV による表面流速と解析結果を比較したものである．ただし，2D は水深平均流速のみ示している．ここで，高水敷上の STIV 解析結果では流速を精度良く推定できていない．これは，CCTV カメラが低解像度なためである．また，堰周辺の急激な水深変化により表面流が乱れており必ずしも正しい流速とは言えない．よって参考値として理解されたい．3D 表面流速と STIV を比較すると，$y' = 40$ m より左岸側では過大評価であるものの，右岸側では概ね一致している．また，12.8 KP は二の荒手直下であるため，$y' = 60$～120 m で 3D の表面と水深平均では，流速の分布傾向が異なる．一方の 2D では，$y' = 70$m より左岸側で流速の

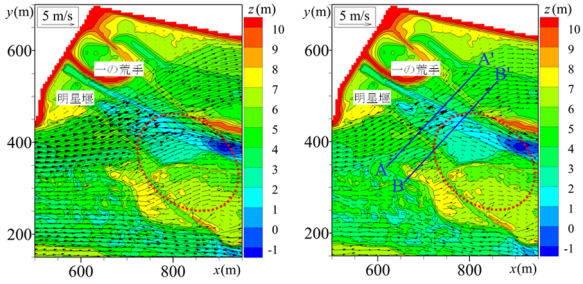


(a)　3 次元モデル（3D）



(b)　2 次元モデル（2D）

図-12 水深平均流速ベクトルの比較

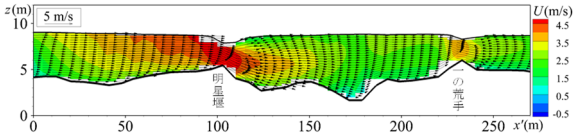


(a) 水面　　(b) 底面

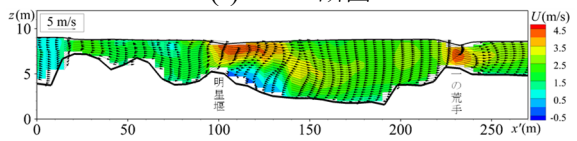
図-13 3次元モデル（3D）による平面流速ベクトル

低下が著しく，右岸側に流れが集中している．その結果，3D の水深平均流速分布とも大きく異なる．百間川の解析境界が両モデルで若干異なる影響（**図-12** 参照）も考えられるが，いずれにしても 2D では荒手堰の影響による流況の変化を捉えきれていない．

図-12 は両モデルによる水深平均流速ベクトルを示している．ここで，**図-12** はベクトルを間引いて表示しており，座標系が異なることからも，同一の表示とはなっていない点に注意されたい．全体的には両者ともほぼ同様の結果ではあるが，百間川の背割堤側を見ると，3D では明瞭な剥離渦が形成されている．これは，3D と 2D での座標系や渦動粘性係数の評価，移流項の差分法等の違いによる影響と考えられる．一方，**図-13** は 3D による分流堰周辺の(a)水面および(b)底面（河床から $\Delta z/2$ 上）での平面流速ベクトルを示している．赤破線で囲まれた領域では，水面と底面で流向が大きく異なっている．更に，**図-14** は**図-14**(b)および**図-2** に示される(a)A–A'断面および(b)B–B'断面での縦断流速ベクトルを示している．明星堰直下では主流の潜り込みや剥離が混在しており，3 次元的な流況が発達している．このような流況は 2 次元モデルでは再現できず，河床変動解析を鑑みると 3 次元モデルが必要であること



(a) A–A′ 断面



(b) B–B′ 断面

図-14 3 次元モデル（3D）による縦断流速ベクトル

表-3　百間川分流量に関する解析条件と結果

分流前流量 Q (m³/s)	旭川 11.0 KP 水位 (m)	百間川 12.8 KP 水位 (m)	3D分流量 (m³/s)		2D分流量 (m³/s)	
			2017 地形	2019 地形	2017 地形	2019 地形
1,000	4.822	5.355	8	16	30	36
2,000	5.552	6.402	341	340	353	352
3,000	6.282	7.314	668	750	704	760
4,251	7.180	8.190	1,214	1,262	1,203	1,308
5,000	7.676	8.682	1,552	1,601	1,505	1,641
5,800	8.205	9.117	1,865	2,007	1,869	2,001

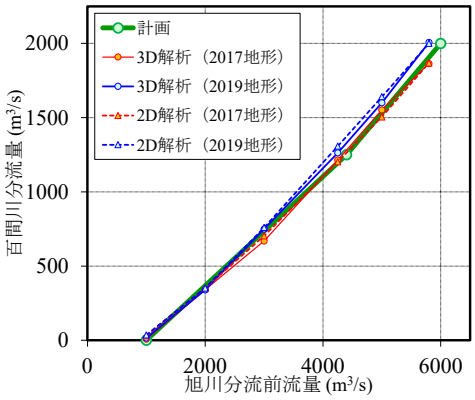


図-15 分流量比較

が分かる．

以上より，本研究で構築した植生分布を考慮した 3 次元洪水流解析モデルの妥当性が確認できた．

4.2 流量条件を種々変更した分流量に関する検討

ここでは，流量条件を種々変更した 3D および 2D による数値解析により，百間川への分流量について検討を行った．計算条件は**表-2** と同様であり，流量条件は**表-3** に示す通りである．ここで，地形条件については明星堰の破損が分流に与える影響を検討するため，2017 年および 2019 年地形で検討を行った．

解析結果を**表-3**および**図-15**にそれぞれ示す．また，**図-15**には計画分流量も示している．明星堰破損後は数%ほど分流量が多くなるものの，破損前と大きな差は無い．また，3Dおよび2Dの全ての解析結果はほぼ一致しており，さらに，両解析結果は計

画分流量とも一致している．すなわち，現状の植生状況であれば，概ね計画通りの分流となる可能性がある．

5. まとめ

本研究では, 河道の ALB 点群データから地形や植生データを抽出して 3 次元河道モデルを構築し，平成 30 年 7 月豪雨時の旭川の洪水流を対象に，分流部周辺での 3 次元洪水流解析を行った．そして，現地計測結果や既往の 2 次元モデルと比較し，計算精度を検討した．以下に本研究で得られた成果をまとめる．

[1] 平成30年7月豪雨前後におけるALB計測から，河道の地形，地被，植生の状態を再現した．その結果，洪水による対象領域の地形変化や植生の流出・倒伏状況を確認することができた．また，ALBデータを活用して，植生の3次元モデルを作成することができた．

[2] 植生分布を考慮したポーラスモデルに基づく3次元洪水流解析モデルを構築した．平成30年7月豪雨時の洪水流への適用から, 本解析モデルは当時の流況を既往2次元モデルよりも良好に再現できており，モデルの妥当性を示すことができた．

[3] 流量条件を種々変更した分流量に関する検討を行った. 本3次元モデルは既往2次元モデルの結果と良好に一致し, さらに計画分流量とも一致することが示された．現状の植生状況であれば，計画相当の分流ができる可能性が示された．

以上の結論が得られたが，本研究には以下の課題があり，今後も継続的に取り組む予定である．

[1] 本研究で構築した解析手法では枝葉のモデル化において仮定が存在し，空隙率は試行錯誤から決定した．そのため，その妥当性を現地計測や流況観測等から検証する必要がある．

[2] 本研究では単一の大規模洪水のみを扱っており，今後は他の中小規模の出水における数値解析を併せて行い，スケール毎の相違や普遍性を明らかにしたい．

[3] 本研究で構築した3次元モデルでは洪水時の植生の倒伏や流失を考慮していない．より規模の大きな洪水では解析の精度面で問題になる可能性がある. そのため, 今後は洪水時の植生の消失（流水抵抗の減少など）を考慮する必要がある．

[4] 本研究では河床変動を扱っていない．より規模の大きな洪水では分派量に影響を与える可能性がある．今後は河床変動解析（掃流砂や浮遊砂）を併せて検討し, 中州周辺の深掘れ現象との関係や, 旭川から百間川へ輸送される流砂量を検討していきたい．

参考文献

1) 吉田圭介，前野詩朗，工藤亮治，近森秀高，赤穂良輔，小川修平，永田貴美久：2018 年 7 月西日本豪雨時の岡山県での降雨特性と旭川水系での洪水被害の調査解析, 土木学会論文集B1(水工学), Vol. 75, No. 1, pp.172-183, 2019.
2) 吉田圭介，前野詩朗：2011 年 9 月旭川洪水における河道内植生の流水抵抗特性の検討，水工学論文集，第 57 巻, pp.I_715- I_720, 2013.
3) López, F. and Garía, M.: Open-channel flow through simulated vegetation: Suspended sediment transport, *Water Resources Research*, Vol. 34, No. 9, pp.2341-2352, 1998.
4) Stoesser, T., Wilson, C.A.M.E., Bates, P.D., Dittrich, A.: Application of a 3D numerical model to a river with vegetated floodplain, *Journal of Hydroinfomatics*, Vol.5, No.2, pp.99-112, 2003.
5) Nepf, H.M.: Hydrodynamics of vegetated channels, *Journal of Hydrraulic Research*, Vol. 50, No. 3, pp.262-279, 2012.
6) 冨井隆春：防災・減災のための ICRT 技術による 3 次元レーザ点群の活用法とその取得法に関する研究，岡山大学学位論文，2019.
7) 吉田圭介，前野詩朗, 間野耕司, 岩城智大, 小川修平, 赤穂良輔：航空レーザ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 (応用力学論文集 Vol. 20), pp.I_607-I_618, 2017.
8) 中村圭吾：グリーンレーザを用いた航空レーザ測深（ALB）による河川調査の現状と可能性, 水環境学会誌, Vol. 42(A), No. 5, pp.174-178, 2019.

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謝いたします. 国土交通省岡山河川事務所ならびに株式会社パスコからは貴重なデータを提供頂きました. また, 本学大学院の永田貴美久君（現, 株式会社 大林組）および安達 森君には調査や解析の整理で多くの協力を頂きました. ここに記して謝意を示します.

飼料用生菌剤への応用に向けた高免疫賦活化能を有するバクテリオシン産生乳酸菌の選抜と評価

岡山大学学術研究院環境生命科学学域（農）

畑生俊光

（概要）バクテリオシン産生乳酸菌を用いた新奇家畜用生菌剤の開発を最終目的として、①鶏腸管よりバクテリオシン産生能を有する乳酸菌の分離と免疫賦活可能の検討、②すでに単離保存されていたバクテリオシン産生乳酸菌 5 菌株について、それらのマクロファージ（MΦ）活性化能の検証、③鶏に対する乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* L-55 株（L-55）投与による免疫増強作用の評価、を行った。①鶏腸管から乳酸菌計 271 株を分離した。分離乳酸菌 271 菌株のバクテリオシン産生試験の結果、バクテリオシン産生菌株は今回分離した菌株からは得られなかった。②既存のバクテリオシン産生乳酸菌 5 株(A,B,C,D,E 株)による MΦ活性化試験の結果は、A 株のみ P388D1 株による IL-1βおよび COX-2 遺伝子発現を誘導した。③*in vivo* における評価系を構築する目的で、L-55 摂取鶏にニューカッスルウイルス（NDV）生ワクチンを投与し、脾臓のサイトカイン遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて測定した。その結果、NDV 二回目接種後脾臓における IL-1β および IFN-γ遺伝子発現量が L-55 投与群で有意に増加したことから、今後の *in vivo* 評価系が構築できたと考えた。

【緒言】感染症は、畜産業において家畜の発育不良を引き起こし、時に致死的であるため、甚大な経済損失を与えることがある。そのため、畜産業では、抗生物質を成長促進剤として使用することが一般的になっている。成長促進剤の効果は、不衛生な環境であるほど高いため、周辺環境からの微生物侵襲による免疫ストレス軽減に由来するものと考えられる。しかし、成長促進剤の多用は、薬剤耐性菌の家畜での出現率上昇や人への拡散リスクをもたらすため、代替技術への転換や新奇成長促進剤の開発が望まれている。そのような背景の中で、整腸作用や免疫賦活作用等のプロバイオティック能を有した乳酸菌が生菌剤として多々検討されており、様々な研究成果を基に実際に抗生物質に代わる成長促進剤として近年では利用されるようになってきている。

乳酸菌の中には、抗菌物質であるバクテリオシンを産生する菌株が存在する。バクテリオシンは、細菌が産生する抗菌ペプチドの総称であり、主にグラム陽性菌に対して広く、もしくは選択的に効果を発揮する。加えて、他の抗生物質と異なり、ペプチド性ゆえに環境中に残存する可能性が低く、耐性菌出現の可能性も低いことが知られる。そのような有用な性質を利用して、これまでバクテリオシンおよびその産生菌は食品保蔵や医薬品へ応用展開されてきた。しかし、バクテリオシンおよびその産生菌の生菌剤としての畜産利用はほとんどなされていない。そこで、免疫賦活作用と抗菌作用の相乗効果による高度な微生物制御を実現する新奇家畜用生菌剤（成長促進剤）の開発を最終目的として、①鶏腸管よりバクテリオシン産生能を有する乳酸菌の分離と免疫賦活可能の検討、②すでに単離保存されていたバクテリオシン産生乳酸菌 5 菌株について、それらの免疫細胞活性化能の検証、③鶏に対する乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* L-55 株投与による免疫増強作用の評価、を行った。

【方法】(1) 鶏腸管からの乳酸菌の分離とバクテリオシン産生能の検証：腸管の回収は、ソムノペンチルの過剰投与によりと殺した白色レグホーン種幼ヒナから回収した。乳酸菌は、回収した腸管（小腸、盲腸､大腸)を長軸方向に眼科はさみで切開した後、腸内容物を回収し、さらに綿棒で腸管表面を擦過することで行った。腸管より回収した腸内容物および腸管表面擦過物は、MRS 液体培地、TYLG 液体培地で培養後寒天培地にて培養し、コロニーを得た。バクテリオシン産生能の判定は、中和後オートクレーブ処理して得られた乳酸菌培養液を指標菌（*Listeria monocytogenes* VTU206 および *L. bulgaris* JCM 1002）

を播種した寒天培地に塗布して 30℃および 37℃で培養して行った。

（2）バクテリオシン産生乳酸菌による MΦ株活性化の検証：MΦ株はネズミ MΦ株である P388D1 株を用いた。これらの細胞株は、10%FBS 添加 RPMI 1640（継代培地）にて維持したものを試験に用いた。乳酸菌添加による MΦ株活性化の検証は、以下の手順で行った。MΦ株は、2×10^5個/ml を 6 穴培養皿に播種した。24 時間培養後、バクテリオシン産生乳酸菌 5 株（A:ナイシン A 産生菌、B:ナイシン Z 産生菌、C:ガセリシン A 産生菌、D:ガセリシン T 産生菌、E:メセンテリシン産生菌）は、細胞株の培養液に 20 μg/ml となるように添加後、24 時間培養した。その後、細胞株の培養上清を除去し、リン酸緩衝液で洗浄後 MΦ株を回収した。RNA は、RNAzol®（フナコシ)を用いてプロトコールに従って回収した。cDNA 合成は、トータル RNA（0.5 μg）を ReverTra Ace® RT Master Mix （TOYOBO）を用いてオリゴ dT18 プライマーで逆転写してえた。qPCR Master Mix kit のプロトコールに従い、すべての cDNA 産物は RNase-free water で 50 倍に希釈し、使用するまで-20℃で保存した。比較対象として、LPS（シグマ H011）、ザイモザン（シグマ）、*L. acidophilus* L-55 株（オハヨー乳業提供株：L-55）凍結乾燥粉末を用いた。
定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）は、を使用して実施した。MΦ株活性化の指標としてのサイトカイン（IL-1βおよび IFN-γ）遺伝子発現は、OneTaq ポリメラーゼ（NEB）を用いた RT-PCR により各遺伝子発現を確認後、Mini Opticon リアルタイム PCR システム（BioRad）で、BrilliantIII Ultra-Fast SYBR®GreenQPCR Master Mix Kit （アジレント・テクノロジー株式会社)を用いて発現遺伝子量を定量した。リアルタイム PCR は、95° C で 5 分間加熱後、95° C 15 秒、60℃ 1 分の反応を 40 サイクル繰り返す反応条件で行った。相対的な mRNA 発現量は $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を使用して計算した。

（3）鶏に対する乳酸菌 L-55 株投与による免疫増強作用の評価：実験に供したニワトリは、白色レグホーン種 1 週齢の幼ヒナを用いた。幼ヒナは有精卵から孵化した後、1 週間を 37℃の育すう器内で馴化飼育した。L-55 は、オハヨー乳業より供試された凍結乾燥粉末を用いた。L-55 は、体重 100g あたり 0.15mg となるように生理食塩水で調整し、孵化 1 週間後より 1 羽当たりmℓをラット用経口ゾンデを用いて毎日同時刻に強制経口投与を行った。孵化 4 週後（1 回目接種）および孵化 6 週後（ブースター接種）に、ニワトリに対してニューカッスル病ウイルス生ワクチン（NDV；clone ND30）を点眼および点鼻にて接種した。NDV 接種ニワトリは、脾臓を回収するために NDV 接種 1 週間後にソムノペンチルの腹腔内過剰投与により安楽死させた。脾臓の RNA は、RNAzol®（フナコシ)を用いてプロトコールに従って回収した。cDNA 合成は、トータル RNA（0.5 μg）を ReverTra Ace® RT Master Mix （TOYOBO）を用いてオリゴ dT18 プライマーで逆転写してえた。すべての cDNA 産物は qPCR Master Mix kit のプロトコールに従い、RNase-free water で 50 倍に希釈し、使用するまで-20℃で保存した。定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）は、を使用して実施した。MΦ株活性化の指標としてのサイトカイン（IL-1βおよび IFN-γ）遺伝子発現は、KOD FX-plus（TOYOBO）を用いた RT-PCR により各遺伝子発現を確認後、Mini Opticon リアルタイム PCR システム （BioRad） で、BrilliantIII Ultra-Fast SYBR®GreenQPCR Master Mix Kit （アジレント・テクノロジー株式会社)を用いて発現遺伝子量を定量した。リアルタイム PCR は、95° C で 5 分間加熱後、95° C 15 秒、60℃ 1 分の反応を 40 サイクル繰り返す反応条件で行った。相対的な mRNA 発現量は $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を使用して計算した。

・統計解析：全ての統計分析は、Microsoft® Excel ver16.43 を用いて行った。実験データは、平均値±標準誤差で示した。2 標本間の有意差の有無を確認するために、2 標本による F 検定を行い、等分散・不等分散を判定した後、*t* 検定を行った。$p<0.05$ を有意差ありとした。

【結果と考察】(1) 鶏腸管からの乳酸菌の分離とバクテリオシン産生能の検証：鶏腸管（小腸、盲腸、大腸）内容物および腸表面のスワブから乳酸菌計271 株を分離した。指標菌を用いた分離乳酸菌 271 菌株のバクテリオシン産生試験の結果、今回分離した菌株からはバクテリオシン産生菌株は得られなかった。バクテリオシン産生乳酸菌は、動物の飼育環境に影響されることが推測され、我々の現在の鶏飼育環境（室内のケージ飼育）下では環境中にバクテリオシン産生乳酸菌が存在していないか乳酸菌回収時の鶏が幼ヒナであったためバクテリオシン産生乳酸菌が腸内に十分定着していないと考えられた。今後は、再度同様の実験を行い、我々の飼育鶏腸管からのバクテリオシン産生乳酸期の分離を試みると同時に、平飼いや外界と途絶されていない環境下で飼育されている鶏から腸内容物等のサンプルを得てバクテリオシン産生乳酸菌の分離を継続していく。

(2)既存のバクテリオシン産生乳酸菌によるマクロファージ細胞株の活性化試験：研究分担者ストックの 5 株（A,B,C,D,E 株）を用いて、これらバクテリオシン産生乳酸菌のネズミ MΦP338D1 株に対する免疫活性化能についてサイトカイン遺伝子および COX-2 遺伝子発現を指標として検討した。その結果、IL-12 および IFN-γの遺伝子発現は観察できなかった。定量的 RT-PCR の結果、A 株は、対照群と比較して約 1.6 倍の IL-1β遺伝子発現が認められた（図 1 左)。また A 株は、対照群と比較して約 2.9 倍、B 株で 1.43 倍の COX-2 遺伝子発現が、認められた（図 1 右)。このことから、今回試験に供したバクテリオシン産生菌株において、ナイシン産生乳酸菌株のみがネズミ MΦ株に対する炎症性サイトカイン誘導活性を有すると考えられた。一方、C および D 株は、共培養した MΦ株に対する細胞毒性が認められた。今回認められたガセリシン産生菌の細胞毒性については、他の MΦ（ネズミ MΦJ774G8 株やヒト MΦ株、ニワトリ末梢血単球や腹腔滲出 MΦ）を用いて、P388D1 株に対してのみ認められる現象であるのかの検証を今後行っていく予定である。また、P388D1 株で発現が認められなかったサイトカイン（IL-12 および IFN-γ)遺伝子発現についても同様に今後検討する。

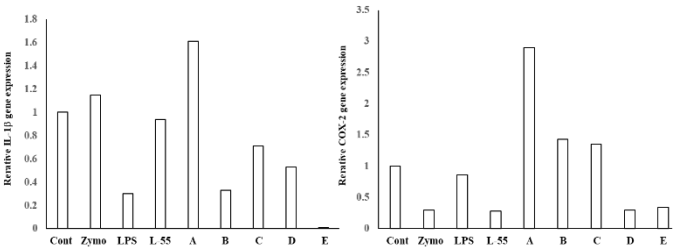


図1：バクテリオシン産生乳酸菌5株（A～E株）共培養によるネズミMΦ株（P388D1）のIL-1β（左）およびCOX-2（右）遺伝子発現。Cont: 陰性対照、Zymo: Zymosan、LPS: Lipopolysaccharide

③鶏に対する乳酸菌 L-55 株投与による免疫増強作用の評価：鶏に対する乳酸菌投与による免疫増強作用の評価系を確立する目的で、L-55 を摂取させたニワトリに NDV を 2 回接種し、各接種 1 週間後の脾臓におけるサイトカイン遺伝子発現を定量した。試験の結果、L-55 摂取ニワトリにおいて、1 回目の NDV 接種後の脾臓において IFN-γおよび IL-1β遺伝子発現の上昇が確認されたが、有意差は認められなかった（図 2 上段)。一方 2 回目 NDV 接種後、対照群と比較して L-55 摂取群では IFN-γおよび IL-1β遺伝子の有意な発現上昇が認められた（図 2 下段)。このことから、今後バクテリオシン産生乳酸菌を用いた免疫増強効果を検討する際の評価系として本実験方法が有用であることが示された。

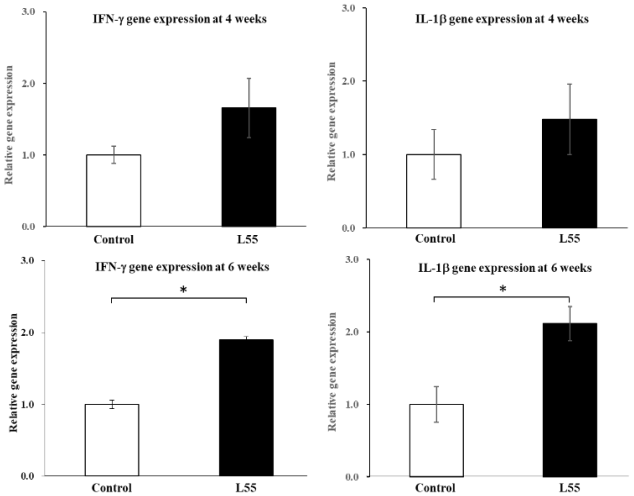


図2：ニワトリにおけるL-55摂取ニワトリに対するNDV接種が脾臓におけるサイトカイン産生を増強する。左：IFN-γ、右：IL-1β。上段）L-55摂取ニワトリへのNDV接種（接種時週齢4週齢）後のサイトカイン遺伝子発現量。下段）L-55摂取ニワトリへのNDV接種（接種時週齢6週齢）後のサイトカイン遺伝子発現量。＊$p<0.05$

フラボノイド代謝変換物の同定と生理活性評価

岡山大学学術研究院環境生命科学学域

中村俊之

（概要）

フラボノイドは野菜や果物に遍在する化合物群であり、抗酸化や抗炎症効果が期待される機能性成分である。摂取したフラボノイド類は、小腸上皮細胞での抱合化や腸内細菌叢による分解を受け、吸収またはそのまま排泄される。このように、多くのフラボノイド類は生体内で「代謝物」として存在していると考えられるが、代謝物の生体内での有効性は不明である。そこで本研究では、フラボノイド類の代謝変換物の同定とそれらの生理活性の評価を行なった。代表的なフラボノイドであるケルセチンを ICR マウスに投与し、経時的に採取した血液を測定したところ、ケルセチンは投与後速やかに吸収され時間とともに減少することが確認できた。次に、投与 0.5 時間後の血液中に存在する代謝物の分析を行なったところ、グルクロン酸抱合体ならびに硫酸抱合体が検出できた。これら代謝物の抗酸化作用を検討したところ、いくつかのケルセチン代謝物に抗酸化作用が認められた。以上の結果から、代謝変換を受けたケルセチンにおいても、生体内で抗酸化作用を発揮することが示唆された。

１．背景

フラボノイドは野菜や果物に遍在する化合物群であり、生体に有益な効果が期待される機能性成分である。1980 年代に文部省（現・文部科学省）により疾病を予防・改善する食品機能（食品の三次機能）が提唱されてから、数多くの臨床試験や動物実験によりフラボノイド類の生活習慣病予防・改善効果が示されている。

このようなフラボノイドの機能性には消化管から生体内への吸収・代謝プロセスが大きく関与すると考えられる。例えば、代表的なフラボノイドであるケルセチンは食品中では配糖体として存在しており、摂取したケルセチン配糖体は小腸において小腸上皮細胞に局在する SGLT-1（ナトリウム依存性グルコーストランスポーター）を介して CßG（サイトソリック ß-グルコシダーゼ）により、あるいは LPH（ラクターゼ・フロリジンヒドロラーゼ）により加水分解され非抱合体（アグリコン）に変換される。アグリコンは高い生理活性を示すことが知られているが、小腸に発現する解毒酵素群（UGT や SULT）により速やかに抱合され吸収されるため、生体内でアグリコンは検出されない（1)。一方、小腸で吸収されなかったケルセチン配糖体は大腸に到達し、腸内細菌叢により分解され吸収またはそのまま排泄される（2)。このように、多くのフラボノイド類は生体内で「代謝物」として存在していると考えられる。しかしながら、代謝物の生体内での有効性は不明である。そこで本研究では、フラボノイド類の代謝変換物の同定とそれらの生理活性の評価を行なった。

２．方法

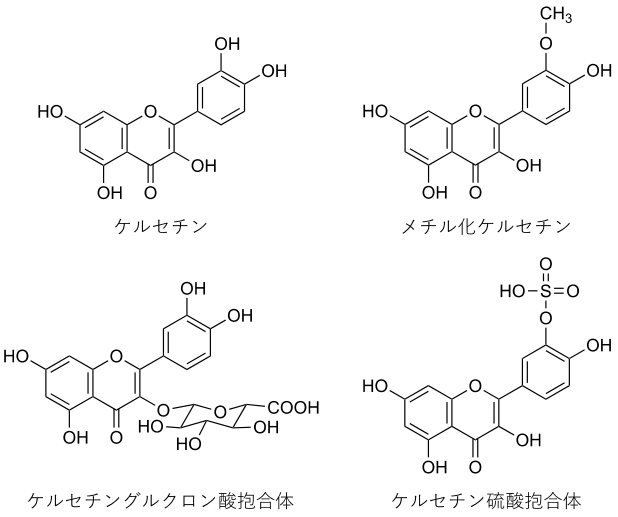
<u>マウス血漿中のケルセチン代謝変換物の分析</u>

プロピレングリコールに溶解したケルセチンを ICR マウスに経口投与し、投与 0.5 時間後から 6 時間後まで、尾静脈より経時的に採血を行なった。ケルセチンとその代謝物の抽出および分析は、Nakamura et al.の方法に従って行なった（3)。得られた血漿を脱抱合酵素処理後、酢酸エチルで抽出を行い、吸収された総ケルセチン量を評価した。また、投与 0.5 時間後のマウス血漿は、メタノール・アセトニトリルで抽出を行い、代謝変換物を LC-MS/MS を用いて分析した。測定条件は以下のとおりである。

Waters Xevo-TQD

Mode: negative

Solvent A: 0.1% formic acid in water
Solvent B: methanol
Column: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×50 mm) for aglycone、Develosil C30-UG (2.0×150 mm) for metabolites
ケルセチン m/z 301/151
メチル化ケルセチン m/z 315/300
ケルセチングルクロン酸抱合体 m/z 477/301
ケルセチン硫酸抱合体　m/z 381/301



図：ケルセチンとその抱合体の一例

ケルセチン代謝物の抗酸化評価

DPPH ラジカル消去活性法ならびに Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 法は、Wu et al.の報告をわずかに改変し行なった (4)。具体的には、各濃度のケルセチン、ケルセチンメチル化体、ケルセチングルクロン酸抱合体、およびケルセチン硫酸抱合体に同量の 200 μM DPPH を添加し、暗所で 30 分静置した。その後、520 nm の吸光度を測定した。

ORAC 法は、各濃度のケルセチンおよびケルセチン代謝物とフルオレセイン水溶液を混ぜ、さらに AAPH （ 2,2′ -Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride）を添加後、蛍光検出器を用いて蛍光強度を 2 分毎に 2 時間測定した。DPPH ラジカル消去活性法、ORAC 法ともに標準物質としてトロロックスを用いた。

ケルセチン代謝物の抗酸化遺伝子発現誘導評価

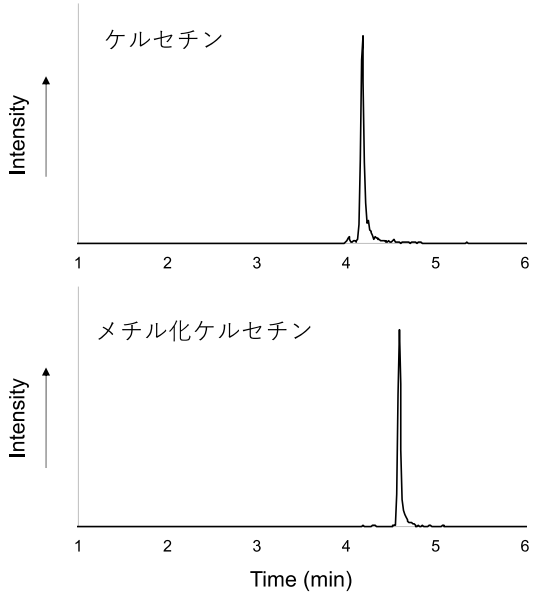
遺伝子発現誘導評価は、Nakamura et al.の報告に従い行なった (5)。マウス肝がん細胞株にケルセチン代謝物を処理し、6 時間後に回収した。RT-PCR 法を用いて抗酸化酵素である Heme oxygenase-1 （HO-1）遺伝子の発現量を評価した。

3．結果と考察

マウス血漿中のケルセチン代謝変換物の分析

ケルセチン投与後に採取した血漿に脱抱合酵素処理を行ない測定したところ、ケルセチンアグリコン（未抱合体）およびそのメチル化体が検出された。ケルセチンアグリコンは、投与 0.5 時間後に最も多く検出され、その後速やかに減少した。メチル化ケルセチンは投与 6 時間後まで増加傾向が認められた。脱抱合酵素処理をしない場合は、いずれの化合物も血漿中から検出されなかった。これらの結果から、吸収されたケルセチンは代謝物として体内循環により臓器分布または排泄されるだけでなく、Catechol-*O*-methyltransferase (COMT) によりメチル化体へと変換されていることが示唆された。

次に、ケルセチン代謝変換物の検出を LC-MS/MS を用いて行なった結果、ケルセチンのグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体、およびそれらのメチル化体が検出された。これらのことから、小腸で UGT または



図：マウス血漿中のケルセチンおよびそのメチル化体の分析チャート

SULT による抱合を受け吸収され、さらに COMT による抱合がなされたと考えられた。

ケルセチン代謝物の抗酸化評価

ケルセチンならびにその代謝変換物を用いて、DPPH ラジカル消去活性を評価したところ、ケルセチン＞＞ケルセチングルクロン酸抱合体＞硫酸抱合体の順に DPPH ラジカル消去活性を示した。さらに、ORAC 法による評価を行なったところ、DPPH ラジカル消去活性法の結果と同様、ケルセチン＞＞ケルセチングルクロン酸抱合体＞硫酸抱合体の順に抗酸化作用を示した。これらのことから、摂取後速やかに代謝物として吸収されたケルセチンは、生体内でラジカル消去に寄与する可能性が示唆された。

ケルセチン代謝物の抗酸化遺伝子発現誘導評価

代謝物の抗酸化作用をさらに調べるために、ケルセチン代謝物による抗酸化酵素 HO-1 の遺伝子発現を評価した。その結果、ケルセチン代謝物処理により HO-1 の遺伝子発現の有為な上昇が認められた。以上の結果から、生体内に存在するケルセチン代謝物は生体内で直接的だけでなく間接的にも抗酸化作用に寄与している可能性が示唆された。

４．まとめ

植物性食品成分であるケルセチンは、摂取後速やかに代謝物として吸収される。その代謝物は、ケルセチンアグリコンよりも活性は低いものの、直接的・間接的に生体の抗酸化に寄与することが示唆された。

謝辞

本研究を遂行する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. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. Free Radic Res. 2001 Dec;35(6):941-952.

2. Mullen W, Rouanet JM, Auger C, Teissèdre PL, Caldwell ST, Hartley RC, Lean ME, Edwards CA, Crozier A. Bioavailability of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside in rats. J Agric Food Chem. 2008 Dec 24;56(24):12127-12137.

3. Nakamura T, Kinjo C, Nakamura Y, Kato Y, Nishikawa M, Hamada M, Nakajima N, Ikushiro S, Murota K. Lymphatic metabolites of quercetin after intestinal administration of quercetin-3-glucoside and its aglycone in rats. Arch Biochem Biophys. 2018 May 1;645:126-136.

4. Wu H, Nakamura T, Guo Y, Hirooka M, Zhang G, Munemasa S, Murata Y, Fujita A, Nakamura Y. White rice ethanol extract is qualitatively, but not quantitatively, equivalent to that of brown rice as an antioxidant source. Biosci Biotechnol Biochem. 2021 Sep 22;85(10):2161-2168.

5. Nakamura T, Murata Y, Nakamura Y. Characterization of benzyl isothiocyanate extracted from mashed green papaya by distillation. Food Chem. 2019 Nov 30;299:125118.

日本における大統領制化のダイナミクスー安倍政権下の自民党政策会議の分析

岡山大学社会文化科学学域

朴志善

（概要）

2000 年代以降、比較政治学においては、先進工業民主主義諸国における政治の「大統領制化」、すなわち、「党内及び政治的執政府内の双方で指導層の権力資源と自立性が増大していること」が指摘されている。日本においては、小泉政権や 2012 年以降の安倍政権における官邸主導を事例に、1994 年の選挙制度改革や 2001 年の中央省庁改革などの制度改革が、重要要因として指摘されてきた。しかし、行政府首班としての権限強化（行政改革）が与党の政策活動に及ぼす影響については、まだ十分な研究が行われていない。そこで、本研究は、第二次から第四次安倍内閣における自民党の政策会議のデータを用い、同影響を探った。分析結果、内閣人事局や国家安全保障会議などの行政改革が行われる前の第二次政権と比較すると、改革の後の第三・四次内閣において、総裁直属機関による会議がより活発であったことが分かった。特に、法案審査においては、従来通り、95%以上の法案審査に部会が関与する中で、総裁直属機関の単独及び部会との連携が増えている。以上から、第三・四次安倍内閣の下、自民党の政策決定において、首相によるトップダウン型の政策決定が増加している点が明らかになった。

（本文）

1. 背景と研究目的

2000 年代以降、比較政治学においては、先進工業民主主義諸国における政治の「大統領制化（presidentialization）」に関する議論が活発にされてきた。大統領制化とは、議院内閣制を含む、代議制民主主義において、権力が執政長官へ集中すること、すなわち、「党内及び政治的執政府内の双方で指導層の権力資源と自立性が増大していること」や「選挙過程がますます指導層中心になっていること」を意味する（Poguntke and Webb 2007）。

一方、日本における大統領制化論は、小泉政権の官邸主導を中心に、比較政治学と同じ時期に議論され始めた（竹中 2006、奥・黒澤 2022）。2001 年の 4 月、中央省庁改革が実行されることによって、首相のリーダーシップを強化する様々な行政改革が行われたことがその背景にある。小泉政権の後は、約 1 年で首相が交代する時期があったものの、2012 年から 2020 年までの第二次から第四次安倍政権においては、「安倍1強」と呼ばれるほど、官邸主導が進んだ。

この安倍 1 強については、1994 年の選挙制度改革と 2001 年の中央省庁改革による、首相の権限強化を含め（待鳥 2012 など）、首相のパーソナリティ（田崎 2014 など）を中心に論じられてきたが、自民党においていかなる影響を及ぼしたかについてはまだ十分な研究が行われたとは言えない。日本では「与党事前審査制」が存在し、全ての政府提出法案は、自民党の政策機関の承認を得る必要がある。すなわち、日本の政策決定おいて、自民党は拒否権者（veto power）として働く（奥・河野編 2015）。多くの先行研究は、自民党に対する安倍首相の政策的優位を指摘するが（George Mulgan 2017）、その中では党内のボトム・アップ的な政策決定は変わっていないと指摘する研究もある（中北 2017 など）。

そこで本研究は、与党事前審査制度という特定の条件の下、安倍政権の中で行われた行政改革が自民党の政策決定に及ぼす効果を明らかにすることを目標とする。具体的に、以下の二つの質問に答える。第一に、第二次から第四次安倍政権における自民党の政策活動を明らかにし、従来のボトム・アップ的な政策決定過程の変化を調べる。第二に、安倍政権の中で行われた二つの行政改革（国家安全保障会議と内閣人事局の設置）が自民党の政策行動に及ぼす効果を明らかにする。

2. 理論的背景・方法

(1) 自民党の政策活動

党内政策決定は、二つの経路を通じて行われると思われる。従来のパターンとして、政策調査会の部会を通じて行われる「党主導型」と、新しいパータンとして、総裁直属機関を活用した「首相主導型」である。本研究は、党主導型として政調会の部会の活動と、首相主導型として総裁直属機関の活動を、各会議の月別開催数を通じて把握する。この作業を通じて、安倍政権における政策決定の全体像を明らかにし、その特徴を明示する。

(2) 行政改革が政策活動に及ぼす効果

国家安全保障会議と内閣人事局の設置が自民党の政策行動に及ぼす影響を調べるために、自民党の政策活動が時期(第二次、第三次、第四次)によっていかに変化したかを調べる。

国家安全保障会議は、2013 年 12 月、国の安全保障に関する重要事項を審議するために、内閣に設置された。4 大臣会合(総理大臣、内閣官房長官、外務大臣、防衛大臣)を中核として、9 大臣会合や、緊急事態大臣会合、内閣官房に国家安全保障局が置かれ、官邸が外交・防衛政策のコントロールタワーとして機能することを目的とするものである(Liff 2018)。一方、内閣人事局は、2014 年 5 月、内閣官房に設置された。審議官・部長級以上の約 600 人を対象とした「適格性審査」により、昇進に関する選考を、官邸のもとで一元的に行う仕組みである(出雲 2017)。

以上の行政改革は、政策決定における首相の権力資源を増大させ、首相のリーダーシップが向上すると思われる(Heffernan 2003; 2005)。すなわち、行政改革の後、自民党の政策活動における首相主導型の政策決定が党主導型の政策決定と比較して増えると予想される。この仮説を検証するために、行政改革が行われる第二次安倍政権とその後の第三次・四次政権における自民党の部会と総裁直属機関の活動を調べ、その変化を明らかにする。

3. 結果と考察

まず、この時期における部会(党主導型)と総裁直属機関(首相主導型)の会議の開催数を調べると(図1)、部会(PD、3, 387 回)が総裁直属機関(SOP、1, 481 回)に比べて多く行われたことがわかる。

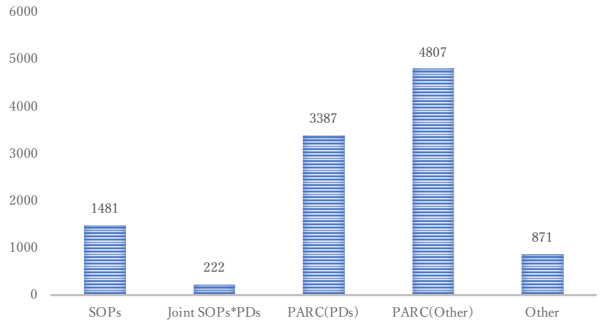


図1. 各会議の開催数

また、提言作成や、政策を最終的に決定する法案審査など、政策決定機能を果たす会議を調べた結果(図2)、法案審査の 85%を部会単独で担当し、約 10%を総裁直直属機関が単独、または、部会と共同で担当することが分かった。また、提言作成においては、約 25%を部会が、約 20%を総裁直属機関が担当することが分かった。

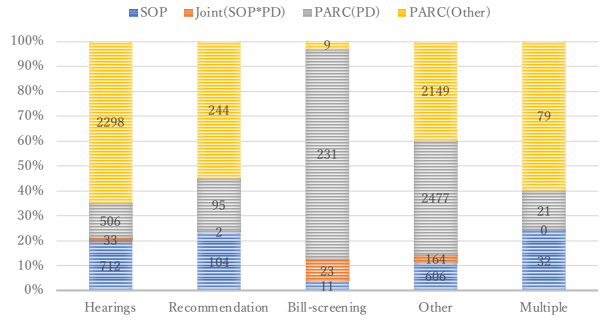


図2. 各会議のアジェンダにおける各会議の割合

次は、時期による会議の活動の変化を調べる(図3)と、行政改革の前の 2 次政権に比べて、3 次・4 次政権において、部会の活動の割合は減り、総裁直属機関の活動の割合が増えたことが確認できる。

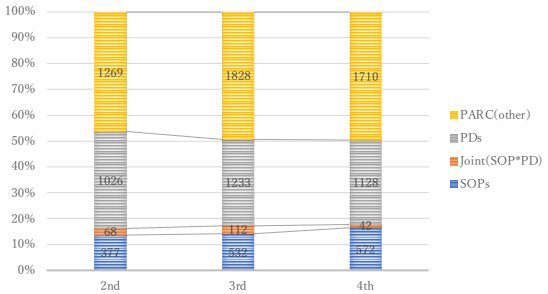


図3. 時期による各会議の割合

また、これを政策分野で見ると（図４）、経済、外交・安保、その他の分野に渡って、総裁直属機関の活動が増えたことが確認される。特記事項としては、外交・安保政策において、部会と総裁直属機関との連携が大きい点である。

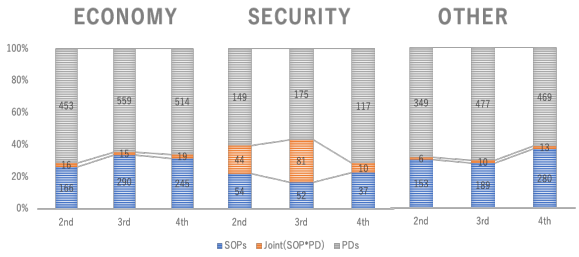


図４．政策分野における各会議の割合

最後に、時期とアジェンダによる会議の割合を調べた結果（図５）、法案審査や提言の作成において総裁直属機関の割合が増えていることが分かる。行政改革の前の二次政権に比べて、その後の第三・四次政権の下で、総裁直属機関がより法案審査や提言の作成に関与したのである。ただし、すでに指摘したように、部会は、全体の法案審査の中で約 95%以上に関与している。

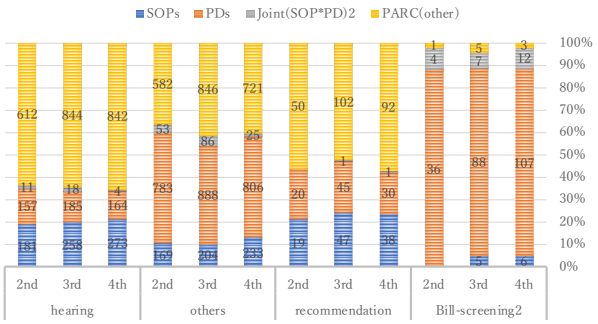


図５．時期及びアジェンダによる各会議の割合

以上の分析の結果から、第二次から第四次安倍政権における自民党の政策活動について、以下のような点が指摘できる。第一に、従来の「党主導型」の政策決定と新しい「首相主導型」の政策決定においては、「安倍一強」を分析した多くの既存研究が指摘しているように、総裁直属機関を中心とする「首相主導型」のトップダウンの政策決定は強い存在感を示している。この時期、部会による会議の開催数の約 43%にのぼる会議が総裁直属機関によって開かれた。総裁直属機関は、政策決定のためのヒアリングや提言の作成にも多く関与している。

しかし、従来のボトムアップの「党主導型」の政策決定も維持されている。特に、政策決定の最終段階である法案審査の約 95%以上を部会が担当している。また、部会を除く他の政調会の会議（調査会や委員会など）は、全体のヒヤリングや提言作成の50%以上を担当している。

第二に、第二次安倍政権で行われた行政改革が自民党の政策活動に及ぼす効果に関して、改革の後、首相主導型の政策決定が増えた点が確認された。第二次政権と比較して、その後の時期において、総裁直属機関の会議の開催数の割合が増え、提言の作成や法案審査においても総裁直属機関の会議が示す割合が増えたのである。

ただし、行政改革が自民党の政策活動に及ぼす効果、特に、国家安全保障会議の設置による効果についてはより厳密な研究が必要になると思われる。国家安全保障会議の設置によって、第二次から第三次・四次の増加が大きく予想された、外交・安保政策における総裁直属機関の活動が大きくなかったのである。特に、第二次と第三次の間では、部会との連帯は大きく増えたものの、総裁直属機関単独ではその活動が減り、第四次では、総裁直属機関の単独活動は増えたものの、部会との連携は減った。

今後の課題として、より厳密な検証のために、首相と与党をめぐる様々な要因をコントロールし、行政改革が自民党の政策活動に及ぼす効果を回帰分析することもが考えられる。自民党の政策活動に影響すると思われる要因としては、内閣人事局や国家安全保障会議などの政策会議（野中・青木 2016）の設置など、制度的要因（独立変数）を除き、選挙や議会のサイクルなどの時期的要因、各省庁を跨る総合的政策や首相個人の特論などの政策分野の要因が想定される。

以上の限界があったものの、本研究の結果からは、日本において、行政府の首班としての資源が強化されることによって、党内で首相主導の政策決定、すなわち、首相への権力集中が行われている点が確認された。

4. 参考文献

Heffernan, R. (2005). ‘Exploring (and Explaining) the

British Prime Minister.' *British Journal of Politics and International Relations* 7:4: 605–20. https://doi.org/10.1111/j.1467-856X.2005.00203.x

Heffernan, R. (2003). 'Prime Ministerial Predominance? Core Executive Politics in the UK.' *The British Journal of Politics and International Relations* 5:3: 347–72. https://doi.org/10.1111/1467-856x.00110

George Mulgan, A. (2017). *The Abe administration and the rise of the prime ministerial executive.* Routledge.

Liff, A. P. (2018). 'Japan's National Security Council: Policy Coordination and Political Power.' *Japanese Studies*, 38(2), 253–279. https://doi.org/10.1080/10371397.2018.1503926

Poguntke, T., & Webb, P. eds.. (2007). *The presidentialization of politics: A comparative study of modern democracies*. Oxford University Press.

飯尾潤 2007『日本の統治構造 ： 官僚内閣制から議院内閣制へ』中央公論新社.

出雲明子 2017「内閣人事局設置後の官僚人事： キャリアパスからみる人事の変容と専門性」『東海大学紀要』 49:1-23.

奥 健太郎・黒澤良 2022『官邸主導と自民党政治――小泉政権の史的検証』吉田書店.

奥健太郎・河野康子編 2015『自民党政治の源流――事前審査制の史的検証』 吉田書店.

竹中治堅 2006『首相支配 ： 日本政治の変貌』中央公論新社.

田﨑史郎 2014『安倍官邸の正体』講談社.

中北浩爾 2017『自民党―「一強」の実像』中公新書.

野中尚人・青木遥 2016『政策会議と討論なき国会』朝日新聞出版.

待鳥聡史 2012『首相政治の制度分析－現代日本政治 の権力基盤形成』千倉書房.

炎症誘導性脂質メディエーター合成系を標的としたジオスゲニンの抗炎症効果

岡山県立大学　保健福祉学部　栄養学科

津嘉山　泉

ω6系不飽和脂肪酸アラキドン酸の代謝産物であるプロスタグランジン(PG)E_2の過剰産生によって、急性や慢性の炎症が引き起こされる。私たちは、 病態時のPGE_2過剰産生に関わる誘導型シクロオキシゲナーゼ(COX)-2 とミクロソーム型 PGE 合成酵素(mPGES)-1 を標的として、炎症の予防や改善を目的とした食品機能性の探索に取り組んでおり、その中で、植物ステロールのジオスゲニンにその効果を見出した。

本研究では、癌のモデル細胞や急性あるいは慢性炎症性疾患モデルマウスを用いて、ジオスゲニンの効果を検討した。ジオスゲニンは、グルココルチコイド受容体(GR)を介して COX-2 と mPGES-1 の発現を抑制することを明らかにした。また、LPS 誘発急性肝障害において、マクロファージ特異的に両酵素の発現を抑制することで、肝臓の炎症を抑えることを見出した。一方で、ジオスゲニンは、恒常性維持に必要な血管内皮細胞でのPGE_2合成系には影響せず、心血管系への副作用を回避し、抗炎症効果を有することが期待される。

1. 研究の背景と目的

ω6 系不飽和脂肪酸のアラキドン酸より生合成されるプロスタグランジン (PG) E_2は、恒常性維持に働く一方で、誘導型のシクロオキシゲナーゼ(COX)-2 とミクロソーム型 PGE 合成酵素(mPGES)-1 による過剰な PGE_2 産生の継続は、様々な炎症性疾患を導く。解熱鎮痛の目的で、COX 阻害剤の非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)が広く臨床応用されているが、その長期服用は、恒常性維持に必要なプロスタノイドの産生も抑えてしまい、胃粘膜障害などの重篤な副作用が生じる。COX-2 選択的阻害剤においても、血管内皮細胞で恒常的に発現する COX-2 にも作用し、血小板凝集抑制作用のある PGI_2 を減少させ、心血管障害の副作用を示すことが報告されている。よって、これら COX 阻害薬を、予防目的で長期服用することは難しい。そこで私たちは、炎症性疾患の予防や改善のために、PGE_2 合成系を標的とした副作用の少ない食品機能性の探索を行ってきた。その中で、ヤマノイモ科の自然薯に、COX-2 と mPGES-1 の発現抑制効果と、炎症や腫瘍形成に対する予防や改善効果を明らかにした [1)、2)]。また、その機能性を有する候補成分として、ジオスゲニンを見出した。

植物ステロールであるジオスゲニンは、フェヌグリーク（*Trigonella foenum-graecum*）の種子や、野生のヤマノイモの根に多く含まれることが知られている。ジオスゲニンは、癌や心臓血管系の疾患や炎症など、様々な薬理活性作用が報告されているものの [3)]、炎症抑制の作用機序については、十分に解明されていない。

本研究では、ジオスゲニンの COX-2 と mPGES-1 の発現抑制についての作用機序を明らかにし、炎症性疾患の予防や改善効果を検証する。

2. 研究の方法

1) 細胞および動物

癌と炎症のモデル細胞として、ヒト非小細胞肺癌 A549 細胞を用いた。疾病モデル動物に、グラム陰性菌リポ多糖(LPS)誘発急性肝障害モデルマウスと、メチオニン・コリン欠乏(MCD)食摂餌による非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)様モデルマウスを使用した。

2) タンパク質発現解析

A549 細胞ホモジネート（10,000xg 上清）を用いて、COX-2 と mPGES-1 のタンパク質発現

動態を、ウェスタンブロットにより解析した。

3) 定量 RT-PCR による遺伝子発現解析

細胞あるいはマウス肝臓より total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作成した。この cDNA を鋳型として各遺伝子に対する特異的プライマーを用いて、SYBR green real-time PCR の⊿⊿Ct 法により遺伝子の発現量を比較定量した。内在性コントロールには、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)を用いた。

4) 免疫細胞化学解析

A549 細胞を 4%パラホルムアルデヒドと 0.5%エタノールで固定した後、NF-κB の特異的抗体を用いて免疫染色を行った。

5) 病理・組織化学解析

マウス肝臓を 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、凍結切片を作製した。一部は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。また、COX-2 あるいは mPGES-1 とマクロファージマーカーの F4/80 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

3. 研究成果[4)]

1) ジオスゲニンによる COX-2 と mPGES-1 の発現抑制と GR アンタゴニストによる COX-2 発現の回復

A549 細胞にジオスゲニンを添加したところ、濃度依存的に COX-2 と mPGES-1 の発現を抑制することが示された（図 1A)。グルココルチコイド受容体(GR)拮抗薬の RU486 を用いて検討したところ、GR 作動薬のデキサメタゾン(Dex； 100 nM)による *PTGS2*（COX-2）発現の抑制を、RU486 添加により回復することを確認した（図 1B)。次に、ジオスゲニンによる *PTGS2* 発現抑制も、RU486 濃度依存的に回復することが示され、ジオスゲニンが GR を介して *PTGS2* の発現を抑制することが示された（図 1B)。さらに、COX-2 の強力な転写因子である nuclear factor-kappa B (NF-κB)の免疫染色の結果（図 1C)、COX-2 が恒常的に高発現する A549 細胞では、通常核内に存在する NF-κB が、ジオスゲニン添加により細胞質へ移行し、RU486 添加で再び核に移行していることを確認した。以上の結果より、ジオスゲニンの COX-2 発現抑制の作用機序が明らかとなった。

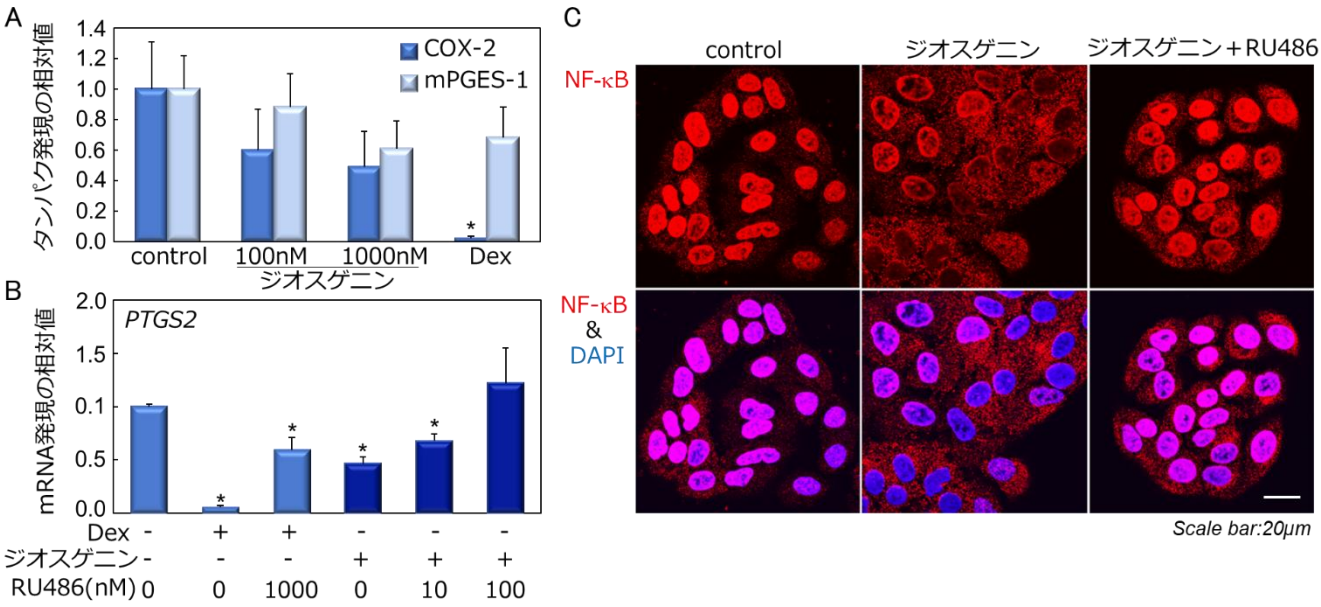


図 1. A549 細胞におけるグルココルチコイド受容体を介したジオスゲニンの効果
*$p < 0.01$ vs ジオスゲニン(-) / Dex(-) / RU486(-)

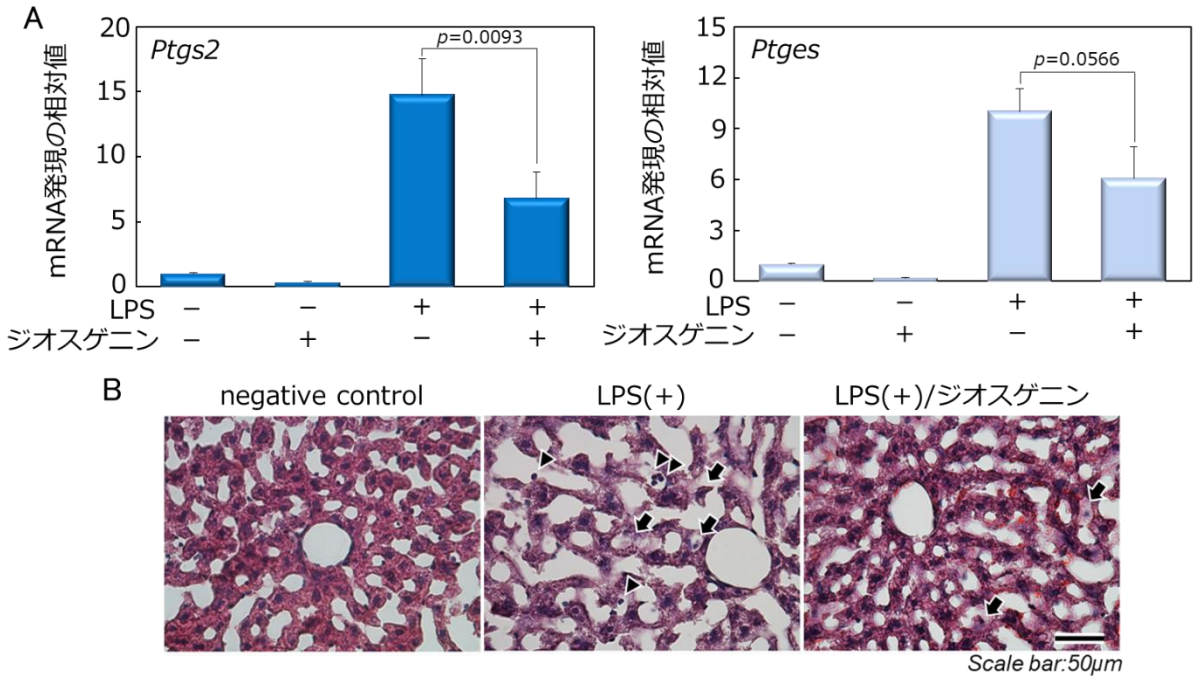


図 2.　LPS 誘発肝障害モデルマウスにおける *Ptgs2* と *Ptges* の発現動態と病理組織解析
矢印：マクロファージ（MΦ）、矢尻：好中球

2)　疾病モデルマウスにおけるジオスゲニンの効果

ジオスゲニンの効果を、LPS 誘発急性肝障害モデルマウスを用いて検証した。LPS 投与 6 時間後の肝臓において有意に上昇した *Ptgs2*(COX-2)と *Ptges*(mPGES-1)の発現上昇が、ジオスゲニン投与により、有意に抑制されることが示された（図 2A)。

また、HE 染色の結果、LPS(+)マウス肝臓では、正常な肝臓と比較して、肝小葉構造の乱れと肝類洞の間隙の拡張がみられ、炎症性細胞の浸潤上昇が観察された（図 2B)。さらに、ジオスゲニン投与により、組織構造の修復と炎症性細胞の浸潤低下が認められた。次に、COX-2 と mPGES-1 の特異的抗体を用いて免疫組織化学解析を行った。COX-2 とマクロファージマーカーF4/80 との蛍光免疫二重染色の結果から、LPS(+)処理により COX-2 陽性細胞数が増加し、F4/80 陽性マクロファージと肝類洞内皮細胞に発現していた（図 3A 上段)。また、ジオスゲニン投与により、特にマクロファージでの COX-2 の発現が低下していた。その陽性細胞数を計測した結果、F4/80 陽性細胞数は、ジオスゲニン投与によって変化しないが、COX-2 陽性細胞数は、negative control と同程度に減少し、特に F4/80 陽性細胞での COX-2 発現が約 30%減少していることが分かった（図 3B)。また、mPGES-1 も同様に、LPS 処理で陽性細胞数が増加し、F4/80 陽性マクロファージと肝類洞内皮細胞での発現が認められた(図 3A 下段)。さらに、ジオスゲニン投与で、特にマクロファージでの発現が著しく低下した(図 3B)。

慢性炎症性疾患である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)様モデルマウスを用いた検討でも、ジオスゲニン投与による病態の改善と、細胞選択的な COX-2 発現抑制効果を確認した。

4.　考察

COX-2 の転写因子である NF-κB は、通常 I kappa B(IκB)と結合して、細胞質に存在している。しかしながら、細胞外から炎症刺激が加わると、細胞内シグナル伝達によって、IκB が分解されて NF-κB が核内移行し、COX-2 の転写因子として働き、その発現を上昇させる。GC は、

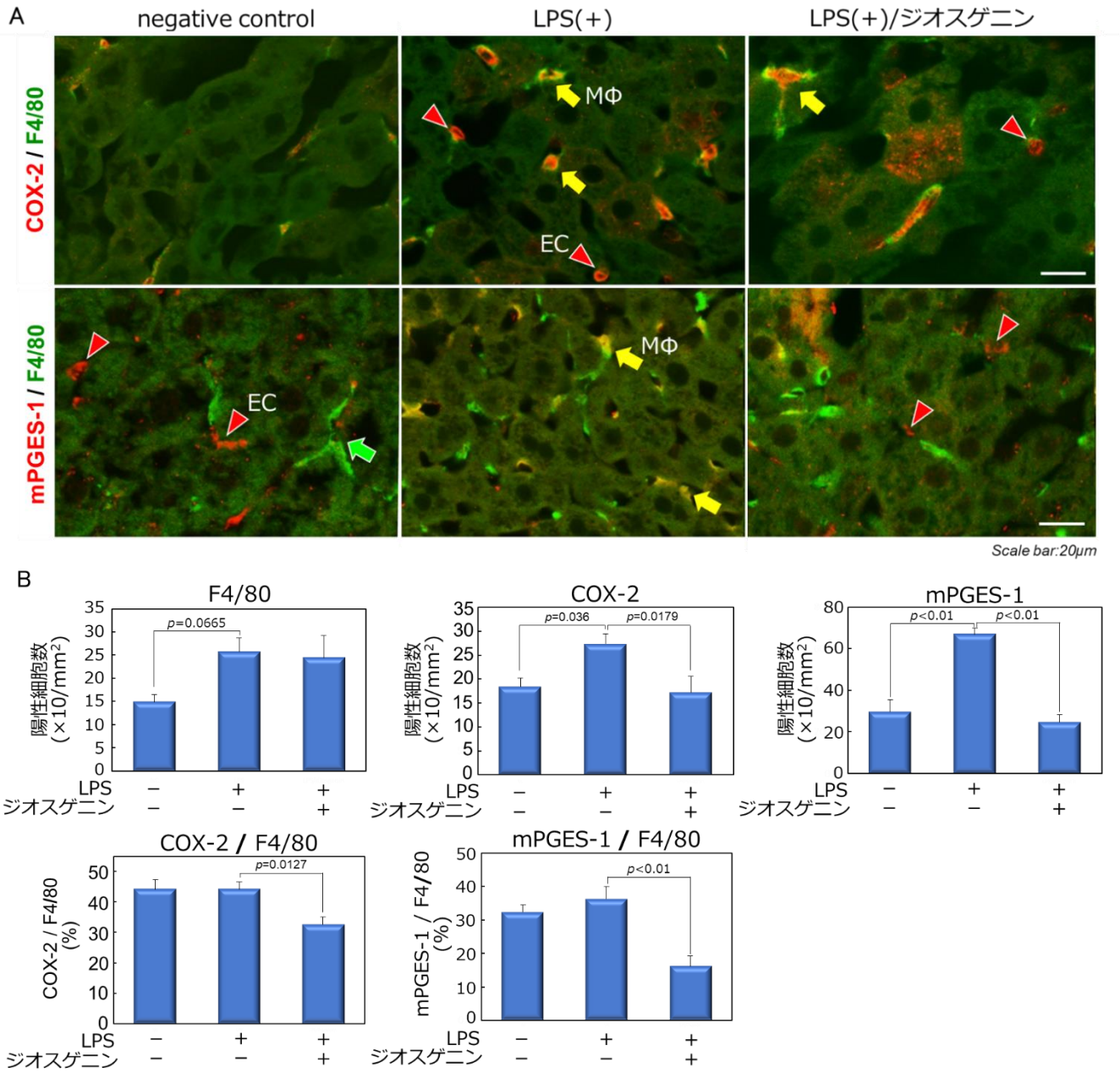


図 3.　LPS 誘発肝障害モデルマウス肝臓の免疫組織化学解析
矢印：マクロファージ（MΦ）、矢尻：肝類洞内皮細胞

GR と複合体を形成した後、IκB の転写因子として働き、その発現を上昇させることで、NF-κB の核内移行を阻害して、COX-2 の発現を抑える。本研究では、食品由来成分のジオスゲニンが GC と同様の作用を有し、NF-κB の作用を制御することで、COX-2 の発現を抑制することが示された。

また、LPS 誘発肝障害モデルと NASH 様モデルマウスにおいて、ジオスゲニンは *Ptgs2* と *Ptges* の発現を抑制し、肝臓の組織障害を修復した。加えて、ジオスゲニンは、肝臓マクロファージ選択的に COX-2 と mPGES-1 の発現を抑制し、病態を改善することが示された。既存薬の NSAIDs は、全ての細胞に発現する COX 活性を阻害するため、血管内皮細胞で産生される PGI_2 の産生を減少させ、血栓のリスクを上昇させるが、ジオスゲニンは、マクロファージ選択的に作用し、血管内皮細胞の PGI_2 を維持

する。よって、ジオスゲニンは、NSAIDs で生じる副作用を軽減すると考えられる。

本研究において、ジオスゲニンによる細胞選択的 COX-2 発現抑制効果が明らかとなり、炎症性疾患モデルマウスを用いた解析より、急性あるいは慢性の肝炎を改善することが示された。今後は、その他の慢性炎症性疾患の予防や改善に対するジオスゲニンの有効性についても検証を進めたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援賜りました公益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) T. Suzuki-Yamamoto, S. Tanaka, I. Tsukayama, M. Takafuji, T. Hanada, T. Arakawa, Y. Kawakami, M. Kimoto, Y. Takahashi, *Dioscorea japonica* extract down-regulates prostaglandin E_2 synthetic pathway and induces apoptosis in lung cancer cells, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 55 (2014) 162–167.

2) I. Tsukayama, K. Toda, Y. Takeda, T. Mega, M. Tanaka, Y. Kawakami, Y. Takahashi, M. Kimoto, K. Yamamoto, Y. Miki, M. Murakami, T. Suzuki-Yamamoto, Preventive effect of *Dioscorea japonica* on squamous cell carcinoma of mouse skin involving down-regulation of prostaglandin E_2 synthetic pathway, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 62 (2018) 139–147.

3) D. Parama, M. Boruah, K. Yachna, V. Rana, K. Banik, C. Harsha, K.K. Thakur, U.Dutta, A. Arya, X. Mao, K.S. Ahn, A.B. Kunnumakkara, Diosgenin, a steroidal saponin, and its analogs: effective therapies against different chronic diseases, *Life Sci.* 260 (2020) 118182.

4) I. Tsukayama, T. Mega, N. Hojo, K. Toda, Y. Kawakami, Y. Takahashi, T. Suzuki-Yamamoto, Diosgenin suppresses COX-2 and mPGES-1 via GR and improves LPS-induced liver injury in mouse, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 156 (2021) 106580.

人とロボットの瞬時接触動作が生み出す身体的インタラクション特性の解析

岡山県立大学　情報工学部　人間情報工学科

太田　俊介

（概要）

将来，ロボットと人間が共同生活する場では，ロボットが人間に接触しなければならない場面が存在しており，ロボットが起こす動作によって人間がどのように感じ，どのような動作特性を好むかについて明らかにする必要がある．先行研究では接触動作と非接触動作で人間が好む動作特性が異なることが示されており．その移り変わりにおける動作特性の変化については明らかにされていない．そこで，本研究では，動作の移り変わりとしてハイタッチの動作特性を明らかにするため，ロボットに動作を生成させる際の基準となるハイタッチ動作モデルの提案を行う．まず人間同士がハイタッチする際の振りかぶり動作時間における肘関節の動作に着目した解析を行った．得られた肘関節角速度パターンから，躍度最小モデルに必要な開始角度，終端角度，動作時間，ピーク位置について，向かい合う距離や強さの条件を変えハイタッチを行う際のパラメータの変化から動作に影響を与える条件について検討を行った．その結果，普遍的な動作が見られるものの，条件によって変化するパラメータがあり，特に肘関節の動作は距離による影響が大きいことが示された．

1. はじめに

近年，人間とロボットが共同で生活するが期待されており，将来的には医療介護や生活支援など人間をサポートするロボットの活用が望まれている[1][2]．このようなロボットと人間が共存する場では，ロボットが人間と接触しなければならない場面が少なからず存在する．人間がロボットとの心地よい共同生活を行うためには，人間に不信感を与えないためにも，ロボットが起こす動作によって人間がどのように感じ，どのような動作特性を好むのか明らかにする必要がある．特に挨拶等の動作は，コミュニケーションの始まりを円滑にするものであり，その動作特性を明らかにするには重要である．そのため本研究室では，ロボットが行う挨拶動作の中でも，挙手といった非接触動作や，握手といった接触動作では人間がどのような動作特性を好むのか，どのように感じるかについて研究が行われている[3][4][5]．これらの先行研究では，非接触動作では音声挨拶を先に行い，手部動作が後に行うことが好まれたのに対し，接触動作では手部動作を先に行い，音声挨拶を後に行うことが好まれたことが示されている．しかし，非接触動作と接触動作の人間に好まれる動作特性の移り変わりはどこなのか，その移り変わりの最中の動作ではどのような動作特性が好まれるかについては明らかになっていない．非接触動作と接触動作の移り変わり時の境界付近における動作特性を解明することで，接触，非接触の動作特性についてより詳細に解明することが期待される．

一方，接触動作と非接触動作の中間的動作である瞬間的接触動作としてハイタッチが挙げられる．ハイタッチに関する研究は，動作に制限を設けた際のハイタッチにおける心理的変化についての研究[6]等は行われているが，ハイタッチ動作やその動作が人に与える影響について取り扱っているものは非常に少ない．そのため本研究では，非接触動作と接触動作の移り変わりとして，ハイタッチについて取り扱い，ロボットにハイタッチ動作を生成させ，人間に好まれる動作特性を明らかにすることを目的とする．ロボットにハイタッチ動作を生成させる方法の一つに，複数の人間が実際に行った動作をもとに一般化したハイタッチ動作モデルの使用が挙げられる．人間は挨拶のタイミングや接触時の強さといった条件を細かく変更することは困難である．しかし，この動作モデルを用いることで他の条件を固定したまま，細かい動作の変更が可能になり，人間が好む動作特性についてより詳細に解明することが期待され

る．そこで本研究では，ロボットにハイタッチ動作を生成させるために，ロボットの動作の基準となるハイタッチ動作モデルの提案を行う．まず人間同士がハイタッチをする際の振り上げ動作時間における肘関節角度に着目した解析を行い．向かい合う距離や強さなどの条件を変化させた際に動作の差から，動作に影響を与えている条件について検討している．

2. ハイタッチ動作計測実験

ロボットに動作を生成させるための基準となるハイタッチ動作モデルを開発するため，まず人間同士のハイタッチ動作の計測実験を行った．

2.1 計測実験

本実験では，挨拶の有無，接触の強さ，向かい合う距離の 3 要素を変動させる計測実験を行った．挨拶については，挨拶ありの場合は要求側の被験者が自由なタイミングで”よろしく”と挨拶する．一方挨拶なしの場合，要求側，応答側ともに発声をしないと定めた．接触については，何も意識せずにハイタッチを行った場合を「普通」，「普通」よりも強く行った場合を「強い」，「普通」よりも弱く行った場合を「弱い」として被験者の思う強さでハイタッチをするよう，条件を定めた．向かい合う距離については，山梨医大のパーソナル・スペースの形態に関する考察[7]を基準に，向かい合う距離をお互いのくるぶしを基準に 80cm，100cm，120cm に設定をした．これらの条件に加えて，ハイタッチの要求側，応答側を入れ替えて計測を行った．被験者は 20～22 才の健常な学生の男性 26 名，女性 4 名，計 30 名，15 ペアである．

2.2 計測システム

本計測では 9 軸慣性センサ（IMU-Z2，ZMP 社製）を用いてサンプリング周波数 50Hz で計測を行った．センサの取り付け位置を図 1 に示す．一方の被験者には，頭・胸・腰・左右の肩・右上腕・右前腕・右手甲に取り付ける．もう一方の被験者には先述の 8 箇所に加え，計測システム内のモデルを区別するために左上腕にセンサを取り付ける．前者のシステム内モデルをモデル 1，後者をモデル 2 として区別する．計測システムでは被験者に取り付けた各部位のセンサから得られる加速度，角速度，地磁気から，物体の回転を表すクォータニオンを算出する．さらに，各部位のクォータニオンから，モデル 1 の腰を原点とした座標と関節の回転を表すクォータニオンを算出し，システム内のモデルに動作を反映する．計測開始と同時にセンサのデータ取得と撮影を開始する．計測風景を図 2 に，動作が反映されたモデルの様子およびシステムで定義した直交座標系(X-Y-Z）を図 3 に示す．

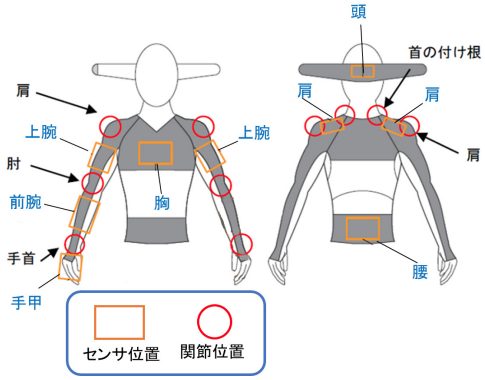


図 1　センサ取り付け位置



図 2　計測風景

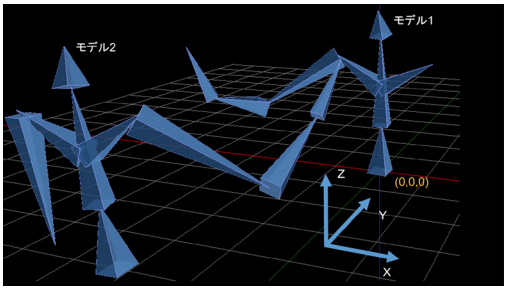


図 3　システム内のモデルの様子

2.3 計測手順

まず，2 名の被験者の決められた位置にセンサを取り付ける．8 つのセンサを取り付けた被験者が要求動作，9 つのセンサを取り付けた被験者が応答動作を行う．屋内で両被験者のくるぶしを基準に距離を空け向かい合う．向かい合う際に右手を前に伸ば

し，ハイタッチができる位置に移動する．両被験者が直立で静止した状態から計測を開始し，計測者の合図で要求側の被験者がハイタッチ動作を開始する．被験者が動作終了後に直立に戻ったところで計測を終了する．各条件につき 10 回ずつ計測し，その後，要求側と応答側を入れ替え，同様に計測した．

3.ハイタッチ動作の解析

3.1 肘関節角度，角速度の算出

各モデルの肩の座標から肘の座標までと肘の座標から手首の座標までを 3 次元ベクトルとして扱い，ベクトルのなす角から肘の関節角度を算出した．算出に利用したモデル上の座標と概要を図 4 示す．また算出した関節角度を微分することで肘関節の角速度を算出した．肘の関節角度のグラフの一例を図 5 に，肘関節角速度の一例を図 6 示す．

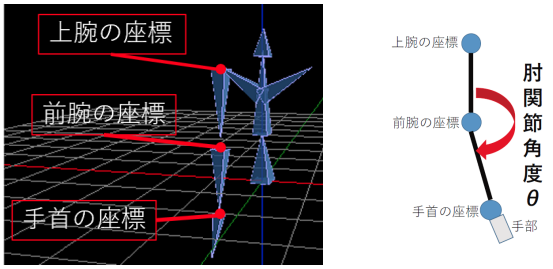


図 4　モデル上の座標と算出概要

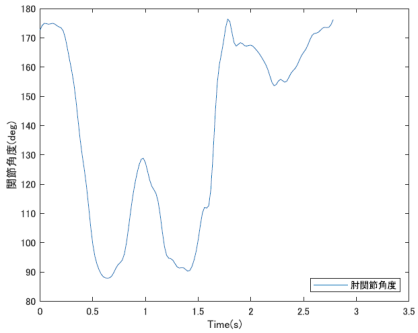


図 5　肘の関節角度の一例

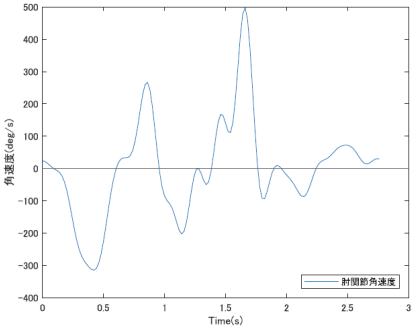


図 6　肘の関節角速度の一例

3.2 肘関節角速度波形に関する解析

要求動作における肘関節角速度波形の一例を図 7 に示す．動作開始から最大屈曲点の角速度波形は釣り鐘型をしており，多くのデータは先行研究で有効性の示されている躍度最小モデル［3][4］を用いて生成した波形と類似している．

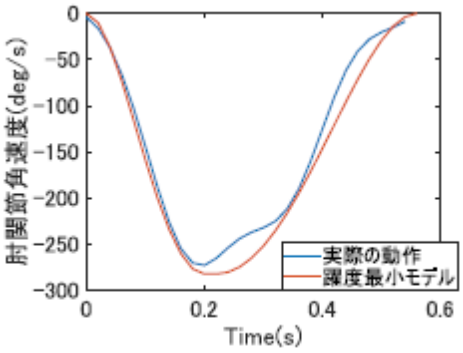


図 7　躍度最小モデルと計測波形の比較

躍度最小モデルは，開始角度r_0，終端角度r_f，動作時間T_fから釣り鐘型の速度パターンを生成する．躍度最小モデルにおける時刻tでの角速度は以下の式(1)，(2)で求められる．

$$V_{max} = \frac{15}{8T_f}(r_f - r_0) \qquad (1)$$

$$\mathrm{V}(t) = V_{max}\frac{16}{{T_f}^4}\left(t^4 - 2T_f t^3 + {T_f}^2 t^2\right) \qquad (2)$$

しかし，躍度最小モデルで生成される速度パターンは左右対称の釣り鐘型となることから，速度がピークに達するまでの時間（速度ピーク時間）を調整することができない．そこで，2 つの動作時間の異なる躍度最小モデルを結合することで任意の位置に速度のピークを有する釣り鐘型速度パターンの生成が可能である[3]．目標とする釣り鐘型速度パターンの動作時間と速度ピーク位置をそれぞれT_{max}，P とし，ピーク位置P を動作時間を 1 として正規化した値とするとき，動作時間T_fをそれぞれ$2\cdot T_{max}\cdot P$と$2\cdot T_{max}\cdot(1-P)$とした躍度最小モデルを求め，2 つの躍度最小モデルを結合することにより，速度ピークがPとなる釣り鐘型速度パターンが生成できる．

そこで，各計測データにおける躍度最小モデルの生成に必要な変数である開始角度，最大屈曲時角度，振りかぶり動作時間，速度ピーク位置，最大角速度

の解析を行った．

3.3 肘関節角速度波形に関する解析結果

開始角度，終端角度，動作時間，ピーク位置，最大角速度について，全条件において解析を行った．それぞれの結果の分布を図 8～図 12 に示す．また，表 1 に図中凡例の詳細を示す，

表 1　凡例の詳細

要求動作の順番	距離	強さ	条件名
先	80	強い	80A
		普通	80B
		弱い	80C
	100	強い	100A
		普通	100B
		弱い	100C
	120	強い	120A
		普通	120B
		弱い	120C
後	80	強い	80D
		普通	80E
		弱い	80F
	100	強い	100D
		普通	100E
		弱い	100F
	120	強い	120D
		普通	120E
		弱い	120F

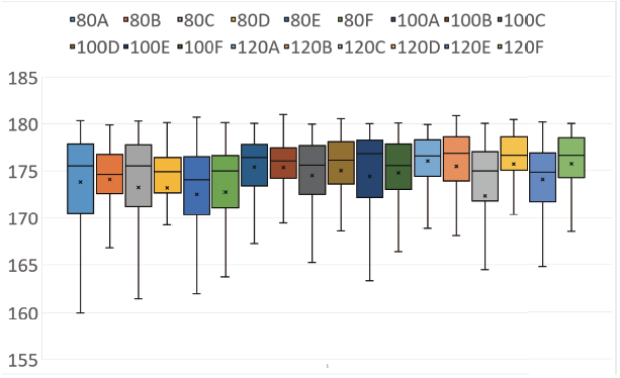


図 8　開始角度

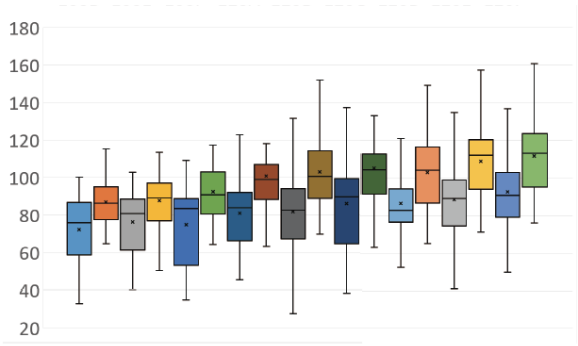


図 9　最大屈曲角度

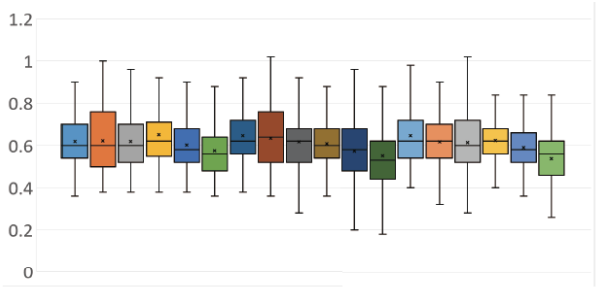


図 10　振りかぶり動作時間

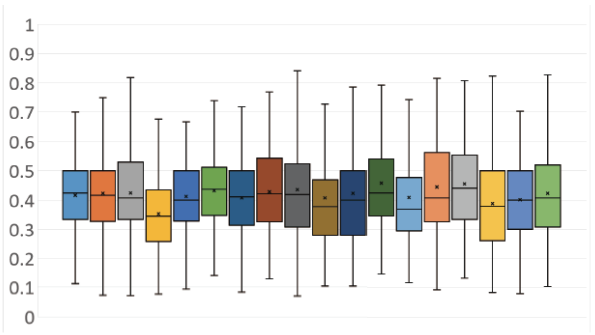


図 11　ピーク位置

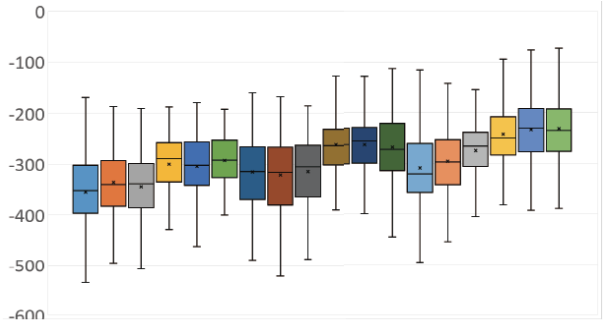


図 12　最大角速度

3.4 影響を与える条件についての検討

解析の結果，開始角度，動作時間，ピーク位置の 3 項目は強さ，距離のどちらからも大きな影響は見られず，四分位範囲は表 2 に示すようになった．また，最大角速度，最大屈曲角度については，要求動作を先に行った被験者と後に行った被験者に分けた場合において，傾向に違いが見られた．それぞれのグループに分けた結果を図 13 に示す．この結果から，どちらのグループにおいても最大角速度は距離が大きいほど小さい値をとり，最大屈曲角度は距離が大きいほど，肘の曲げが小さいことが示された．さらに最大屈曲角度は，強さによって値の範囲に違いが見られることが示された．

表 2　変化が小さい項目の範囲

	第一 四分位数	第三 四分位数
開始角度［deg］	170.4	178.6
動作時間［s］	0.44	0.76
ピーク位置	0.26	0.54

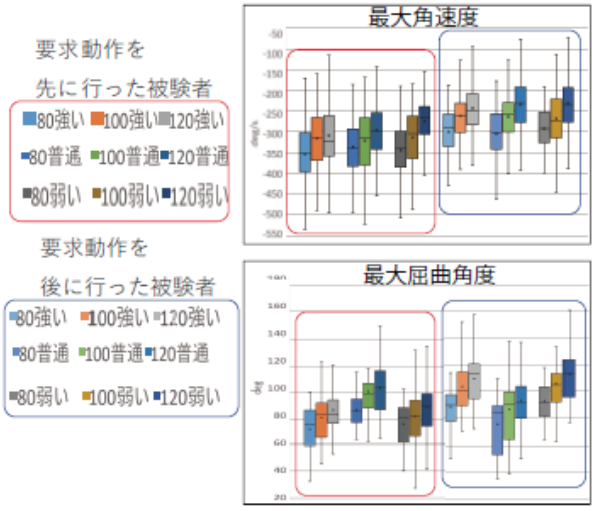


図 13　最大角速度と最大屈曲角度における
実験順序による違い

3. 結論

本研究ではロボットにハイタッチ動作を生成させるモデルを開発するための基礎検討として，人間同士のハイタッチ動作を計測し，ハイタッチ要求動作の肘関節に着目した関節角度，角速度についての解析を行った．解析の結果，先行研究で示されていた躍度最小モデルのハイタッチ動作への利用可能性について検討し，ハイタッチ要求動作における肘関節の最大角度，最大角速度，最大屈曲までの時間，速度ピーク位置，動作開始時の関節角度の分布を解析した．また，振りかぶり動作時間における肘関節速度パターンは躍度最小モデルを使い，生成することができることを示した．また，最大角速度と最大屈曲角度は，ハイタッチを行う距離に影響を受けることが示された．今後の課題として，振りかぶり動作時間における肘関節以外の動作について解析を行い，ハイタッチ動作モデルの開発，および動作を生成するハイタッチロボットを開発し、モデルを適用して動作を生成させることで有効性を確認していく予定である．

参考文献

[1] 久場景太郎, 山野辺夏樹, 原辰徳, 新井民夫, ユーザの満足度を考慮した「手渡し」サービスを実現する生活支援ロボットのための作業指示システムの構築, 精密工学会学術講演会講演論文集, 2010, 2010S 巻.

[2] 楊光, 王碩玉, 瀋博, 榎勇人, 石田健司, 和食一男, 溝渕宣誠, 猪野真吾, 生活支援ロボット～基本構造、運動制御、対象物認識, バイオメディカル・ファジィ・システム学会大会講演論文集, 2018, 31 巻, 31.

[3] Shunsuke Ota, Mitsuru Jindai, Toshiyuki Yasuda and Yoshihiro Sejima, Development of a Hand-up Request Motion Model Based on Analysis of Hand-up Motion between Humans, Proc. of the Second IEEE International Conference on Robotic Computing (IRC2018).

[4] 太田俊介，神代充，山内仁，渡辺富夫，接近を伴う握手要求動作を生成する握手ロボットシステム，日本機械学会論文集，Vol.81, No.825，2015.

[5] 神田崇行，今井　倫太，小野　哲雄，石黒　浩，人-ロボット相互作用における身体動作の解析，情報処理学会論文誌，2003,Vol.44,No.11.

[6] 今井聖也, 斎藤瑶平, 羽田久一, 制限の有無によるハイタッチにおける心理変化の考察, 画像電子学会研究会講演予稿, 2018, 17.04 巻.

[7] 渋谷昌三，パーソナル・スペースの形態に関する一考察，山梨医大紀要，1985.2 巻 Vol.81，No.825，pp.1-13，2015.

プロジェクトを跨いだソースコード片の不具合潜在性予測手法の有用性に関する調査

岡山県立大学情報工学部情報システム工学科
天嵜　聡介

近年、ソフトウェア開発において細粒度のソースコード片単位での更新履歴を記録できる仕組みが開発者に幅広く受け入れられている。そのため、モジュール単位ではなく、不具合を含む可能性が高いソースコード片の更新履歴を予測する研究(Just-in-Time Defect Prediction）が盛んである。開発中にソースコード片が記録された時点で即座に不具合潜在性を予測できるのがこのアプローチの利点の一つである。一方で、従来の研究で行われてきたプロジェクトを跨いだ予測モデル(Cross-Project Defect Prediction, CPDP)の構築方法との関連性については未だ不明な点が多くあるのが現状である。本調査では、従来型の Defect Prediction 向けに開発された CPDP 手法を JIT defect prediction に適用した際の性能を評価した。複数のオープンソースソフトウェアプロジェクトで構成されたデータセットスイート 2 種類を予測対象とした性能評価の結果、多くの CPDP 手法が予測精度に影響を及ぼすことが明らかとなった。多くの CPDP 手法が予測精度を低下させた一方で、少数ながら予測精度の向上に寄与する可能性がある CPDP 手法を特定できた。

1.　はじめに

ソフトウェア開発においてソフトウェアの品質は最も重要な関心事である。しかしながら、ソフトウェア開発に割り当てられる資源（人員、工期など）は有限であり、品質保証活動では効率的にソフトウェアの品質をチェックする必要がある。ソフトウェアの部品（コンポーネント）が不具合を含む可能性を予測することができれば、疑わしいコンポーネントから順番にソースコードをレビュー・テストすることが可能になる。

近年、ソフトウェア開発において細粒度のソースコード片単位での更新履歴を記録できる仕組みが開発者に幅広く受け入れられている。そのため、モジュール単位ではなく、不具合を含む可能性が高いソースコード片の更新履歴を予測する研究(Just-in-Time Defect Prediction）が盛んである。開発中にソースコード片が記録された時点で即座に不具合潜在性を予測できるのがこのアプローチの利点の一つである。一方で、従来の研究で行われてきたプロジェクトを跨いだ予測モデル(Cross-Project Defect Prediction, CPDP)の構築方法との関連性については未だ不明な点が多くあるのが現状である。

本報告書では JIT CPDP におけるコンポーネントレベルの CPDP 手法の性能についての調査結果について述べる。具体的には、以下の項目について報告する。

- **調査項目 1（RQ1）:** コンポーネントレベルの CPDP 手法は JIT defect prediction でも性能に影響を及ぼすか？
- **調査項目 2（RQ2）:** どの CPDP 手法が JIT defect prediction の性能を向上させるか？
- **調査項目 3（RQ3）:** コンポーネントレベルの CPDP 研究の成果と一貫した結果が得られるか？

これらの項目を調査するため、複数のオープンソースソフトウェアプロジェクトで構成されたデータセットスイート 2 種類を対象として 21 種類の CPDP 手法の性能を評価した。その結果、多くの CPDP 手法が予測精度に影響を及ぼすことが明らかとなった。多くの CPDP 手法が予測精度を低下させた一方で、少数ながら予測精度の向上に寄与する可能性がある CPDP 手法を特定できた。また、本調査で得られた結果はコンポーネントレベルの CPDP 手法に関する研究成果と必ずしも一貫性のある結果ではなかった。

表 1 ソースコード片の変更履歴に関するメトリクス[1]

Dimension	Name	Definition
Diffusion	NS	Number of modified subsystems
	ND	Number of modified directories
	NF	Number of modified files
	Entropy	Distribution of modified code across each file
Size	LA	Lines of code added
	LD	Lines of code deleted
	LT	Lines of code in a file before the change
Purpose	FIX	Whether or not the change is defect fix
History	NDEV	The number of developers that changed the modified files
	AGE	The average time interval between the last and the current change
	NUC	The number of unique changes to the modified files
Experience	EXP	Developer experience
	REXP	Recent developer experience
	SEXP	Developer experience on a subsystem

2. 方法

2.1. データセット

本調査では 2 つのデータセットスイート（以降、データセットスイート A および B と呼ぶ) を用いて性能評価実験を実施した。いずれのデータセットも JIT defect prediction でよく用いられる 5 分野 14 種類のメトリクスおよび不具合の有無を示すラベルで構成されている。表 1 にメトリクスの一覧および概要を示す。

データセットスイート A は先行研究[1]において 6 つのオープンソースソフトウェアプロジェクトから収集されたデータセットで構成されている。表 2 にプロジェクト名、収集期間、および変更履歴の数を示す。変更回数は少ないもので 4000 回程度、多いものでは 10 万回近くであり、幅広い条件で評価実験を実施できた。

データセットスイート B は別の先行研究[2]において JIT defect prediction におけるラベルの偏りの影響を調査するために 10 個のオープンソースプロジェクトから収集された。収集されたメトリクスはデータセットスイート A と同様である。ただし、提供されているデータセットの中には収集ミスと思われる事例が含まれていたため、本調査ではそれらを取り除いて評価実験に用いた。

表 2 データセットスイート A の概要

Project Name	Period	# changes
BugZilla	08/1998-12/2006	4,620
Columba	11/2002-07/2006	4,455
Eclipse JDT	05/2001-12/2007	35,386
Eclipse Platform	05/2001-12/2007	64,250
Mozilla	01/2000-12/2006	98,275
Postgres SQL	07/1996-05/2010	20,431

表 3 データセット B の概要

Project Name	Period	# changes
Fabric8	12/2011-12/2017	13,004
JGroups	09/2003-12/2017	18,317
Camel	03/2007-12/2017	30,517
Tomcat	03/2006-12/2017	18,877
Brackets	12/2011-12/2017	17,311
Neutron	12/2010-12/2017	17,311
Spring-Integration	11/2007-01/2018	8,692
Broadleaf	11/2008-12/2017	14,911
Nova	08/2010-01/2018	48,938
NPM	09/2009-11/2017	7,893

2.2. 実験手順

CPDP は対象となるプロジェクトに十分な変更履歴および不具合の有無についてのラベルが付与されていないため他のプロジェクトで収集されたデータセットを用いる状況を想定している。本調査で用いたデータセットスイートは複数のプロジェクトで構成されているため、個々のプロジェクトを順番に予測対象プロジェクトとして、他のプロジェクトを CPDP 手法による予測のために用いることにした。

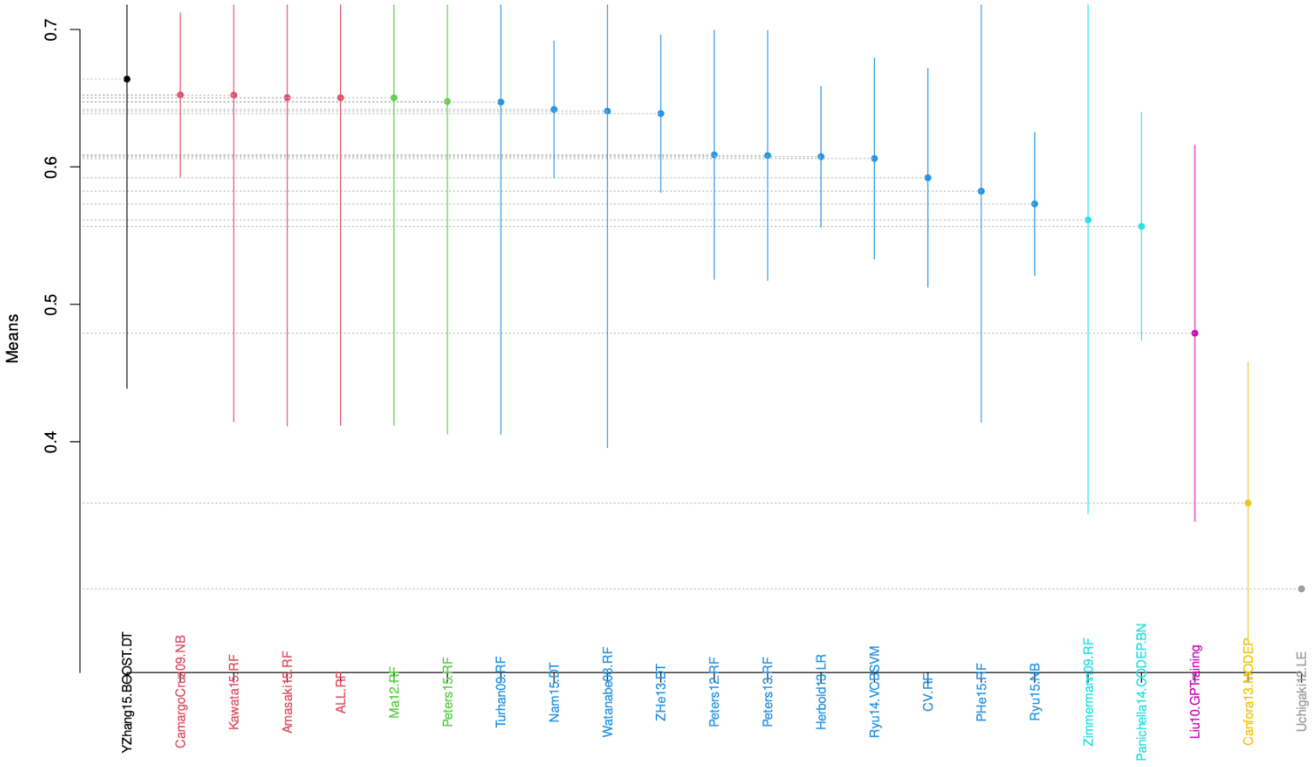


図 1　Scott-Knott ESD による CPDP 手法のランキング（データセットスイート A）

評価実験には CPDP 手法のベンチマーク用に開発された CrossPare を用いた。また、2 つのテストスイートは合併させず別々に利用することにした。この理由としては、データセットに含まれる変更履歴の回数が多く CPDP 手法の適用に要する時間の長さが挙げられる。評価実験には AMD 3950X と 128GB のメモリを搭載した計算機を利用したが、データセットスイートを別々に利用した場合であっても複数の CPDP 手法において一週間では評価実験が終了しなかった。その他の理由としては、異なる研究で収集されたデータセットスイートにおける性能評価の結果を比較することで、プロジェクト選択の影響を観察できると考えたためである。

複数の CPDP 手法は主にデータ変換に関わるものであり不具合の有無の予測には任意の機械学習手法を組み合わせることが可能である。これらの CPDP 手法については CrossPare で利用できる複数の機械学習手法と組み合わせて性能を評価した。ただし、SVM は計算時間が多大になることから除外した。

CPDP 手法による性能の変化を観察するために 2 つの基準となる予測手法を設けた。1 つは他のプロジェクトデータを合併して前述の機械学習手法を用いる手法である。もう 1 つは予測対象プロジェクトのデータによる交差検証法である。後者と同程度の性能である場合、その CPDP 手法は実用上の観点からも有用であると判断できる。

2.3.　性能評価指標

本調査では AUC(Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve)を性能評価指標とした。AUC は不具合予測のような正例と負例に大きな偏りがある場合に用いられることが多い。AUC が 1.0 のとき全て正確に予測できていることを示す。また、AUC が 0.5 の時にランダムな予測の結果と一致する。

CPDP 手法および基準となる予測手法との比較には Scot-Knott Effect Size Difference (ESD) を用いた。Scott-Knott ESD は複数の CPDP 手法を性能評価指標の値の統計的に有意な差異に基づいて複数のクラスタに分割する評価方法である。各クラスタ内の CPDP 手法は互いに統計的に有意な差がない。一方、クラスタ間では一定以上の有意な差が存在する。

最上位のクラスタに含まれる CPDP 手法が最も性能が高いと言える。

3. 結果

3.1. テストスイート A

図 1 に Scott-Knott ESD によるランキングの結果を示す。多くの CPDP 手法は組み合わされた機械学習手法名と一緒に表記されている。機械学習手法として決定木 (DT)、ナイーブベイズ (NB)、ランダムフォレスト (RF)、およびロジスティック回帰 (LR) を用いた。

ただし、CPDP 手法と機械学習手法の組み合わせの数は多いので、最も性能が高い機械学習法との組み合わせのみ図に示している。例えば、最高位にある ZHe13 はランダムフォレストとの組み合わせのみ図に示されているが、それ以外のナイーブベイズとの組み合わせなどは省略されている。表 4 に AUC の平均値とランクを示す。

表 4 CPDP 手法の性能とランキング (データセットスイート A)

Rank	Configuration	AUC mean
1	ZHe13-RF	0.63
2	Nam15-LR	0.62
3	Ryu15-NB	0.58
4	Herbold13-LR	0.58
	Watanabe08-NB	0.56
5	Turhan09-NB	0.55
	Peters15-NB	0.54
6	Amasaki15-NB	0.53
	CamargoCruz09-NB	0.53
	CV-RF	0.52
	Zimmermann09-NB	0.50
	YZhang15-MAXVOTE	0.49
7	Peters12-RF	0.47
	Peters13-DT	0.46
8	PHe15-NB	0.43
	ALL-DT	0.42
	Ma12-DT	0.42
	Kawata15-DT	0.42
	Panichella14-CODEP-BN	0.41
9	Canfora13-MODEP	0.40
10	Ryu14-VCBSVM	0.40
	Liu10-GPTraining	0.33
11	Uchigaki12-LE	0.29

順位 6 位の CV-RF は交差検証法による基準を示す。同順位のクラスタに含まれる 4 つの CPDP 手法は CV-RF と同程度の性能であると言える。しかしながら AUC の平均値は 0.5 付近であり実用上有用であるとは言い難い。

順位 8 位の ALL-DT はもう一つの基準を示す。コンポーネントレベルではより高い性能を示すことが示されていたが、変更履歴を対象とした本調査では十分な性能を示さなかった。

同様に順位 8 位の 4 つの CPDP 手法および順位 9 位以降の CPDP 手法は実用的な性能を有するとはいえなかった。

本調査の対象とした 21 個の CPDP 手法のうち、7 つの CPDP 手法は順位 6 位より高い順位にあった。つまり、交差検証法より良い性能を示した。7 つの CPDP 手法のうち、Watanabe08 以外は全て事例をフィルタリングするアプローチである。コンポーネントレベルの研究[3]ではフィルタリングアプローチの有効性は確認されておらず、変更履歴においては異なる傾向が観察された。

3.2. テストスイート B

図 2 に Scott-Knott ESD によるランキングの結果を示す。また、AUC の平均値およびランキングを表に示す。

CV-RF はテストスイート B においても交差検証法の最も良い組み合わせであった。順位 4 位に CV-RF は含まれており、また、10 個の CPDP 手法も同順位にクラスタリングされていた。また、いずれの CPDP 手法の AUC の平均値も 0.5 以上あり、一定の予測性能を示していると考えることができる。一方、順位 5 位以下の 7 つの CPDP 手法の性能は順位 2 位にある ALL-RF より有意に低いことから、有用性は低いと言える。

順位 2 位の ALL-RF は他のプロジェクトを合併して機械学習手法を適用するものであった。順位 2 位には 3 つの CPDP 手法が含まれている。これらは CPDP 手法を用いない場合と同程度の性能であり、有用であるとは言い難い。

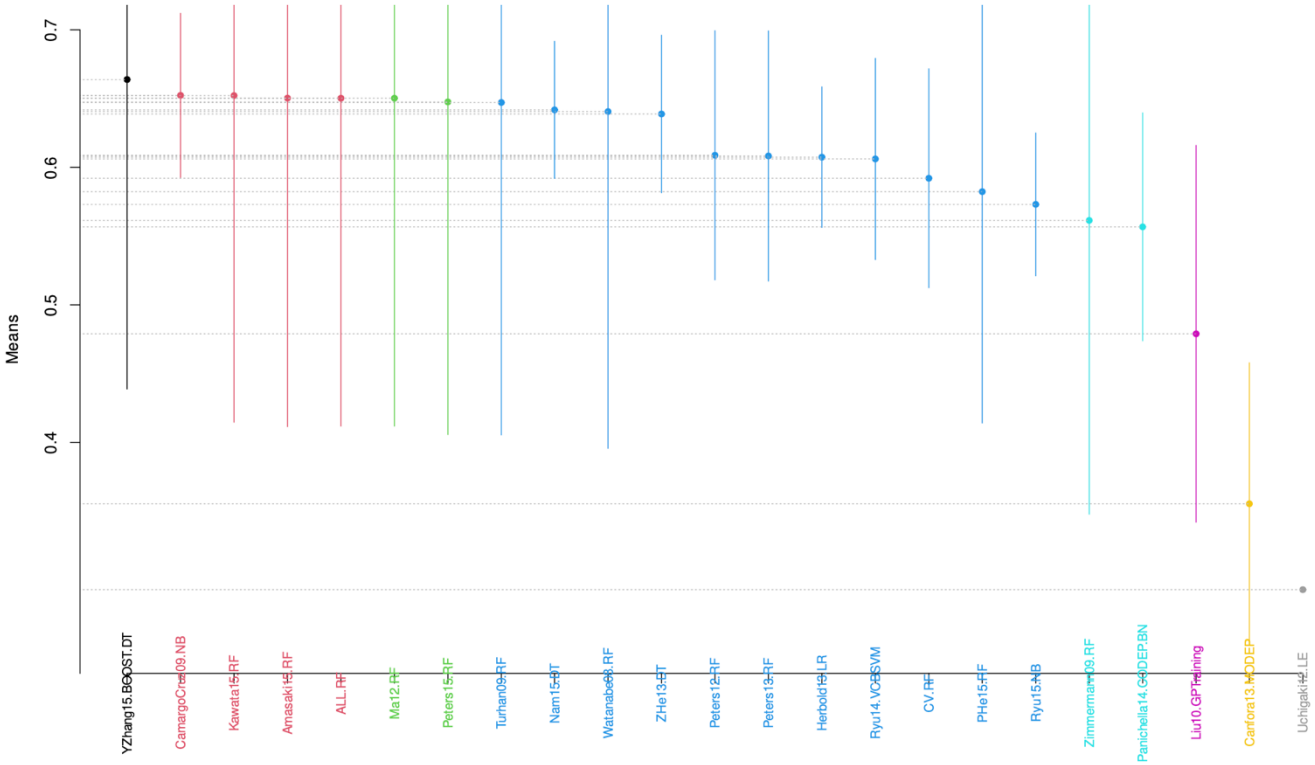


図 2 Scott-Knott ESD による CPDP 手法のランキング（データセットスイート B）

表 5 CPDP 手法の性能とランキング（データセットスイート B）

Rank	Configuration	AUC mean
1	YZhang15-BOOST-DT	0.66
2	CamargoCruz09-NB	0.65
	Kawata15-RF	0.65
	Amasaki15-RF	0.65
	ALL-RF	0.65
3	Ma12-RF	0.65
	Peters15-RF	0.65
4	Turhan09-RF	0.65
	Nam15-DT	0.64
	Watanabe08-RF	0.64
	ZHe13-DT	0.64
	Peters12-RF	0.61
	Peters13-RF	0.61
	Herbold13-LR	0.61
	Ryu14-VCBSVM	0.61
	CV-RF	0.59
	PHe15-RF	0.58
	Ryu15-NB	0.57
5	Zimmermann09-RF	0.56
	Panichella14-CODEP-BN	0.56
6	Liu10-GPTraining	0.48
7	Canfora13-MODEP	0.36
8	Uchigaki12-LE	0.29

順位 1 位には YZhang15-BOOST-DT のみ含まれていた。ALL-RF と異なるクラスタに含まれていることから有用な CPDP 手法であるということができる。YZhang15-BOOST-DT はアンサンブル学習の一種であるブースティングを決定木（DT）と組み合わせた方法である。コンポーネントレベルの先行研究[3]でもアンサンブル学習の有効性は示されていた。

4. 考察

4.1. RQ1

本研究で対象とした CPDP 手法の多くが基準とした予測手法と有意に異なる性能を示した。他のデータセットを合併して機械学習法を適用する方法との比較では、データセットスイート A では 4 個の CPDP 手法のみが同じクラスタに分類された。データセットスイート B でも 4 個の CPDP 手法のみが同じクラスタに分類された。これらのことから、コンポーネントレベルの CPDP 手法は JIT defect prediction においても予測精度を有意に変化させると言える。

4.2. RQ2

他のデータセットを合併して機械学習法を適用す

る方法と比較して、データセットスイート A では 13 個の CPDP 手法の性能が有意に高かった。一方、データセットスイート B では 1 個の CPDP 手法のみ有意な性能向上を示した。

交差検証法との比較では、データセットスイート A において 7 個の CPDP 手法が有意に高い性能を示した。データセットスイート B では 6 個の CPDP 手法が有意に高い性能を示した。

２つのデータセットスイートの結果を比較すると多くの場合、異なる手法が上位に位置している。双方の結果から、少なくとも基準となる予測手法と同等の性能を示す CPDP 手法は YZhang15-MAXVOTE と Amasaki15 であると言える。

4.3. RQ3

コンポーネントレベルでの先行研究[3]では、他のデータセットを合併して機械学習法を適用する方法もしくはアンサンブル学習が良い結果を示すと示唆されている。また、フィルタリングに基づいた手法は有用でないとも示されている。本調査の結果はこれらの知見とは必ずしも一致しなかった。このことから、より詳細な分析を進める必要があると言える。

5. まとめ

本調査ではコンポーネントレベルの CPDP 手法が JIT defect prediction でも有用であるか実証的に検証した。その結果、多くの CPDP 手法が予測精度に影響を及ぼすことが明らかとなった。多くの CPDP 手法が予測精度を低下させた一方で、少数ながら予測精度の向上に寄与する可能性がある CPDP 手法を特定できた。また、本調査で得られた結果はコンポーネントレベルの CPDP 手法に関する研究成果と必ずしも一貫性のある結果ではなかった。

今後の研究では、より広範囲の CPDP 手法およびデータセットスイートによる検証を進めていく必要がある。

参考文献

[1] Y. Kamei, E. Shihab, B. Adams, A. E. Hassan, A. Mockus, A. Sinha, and N. Ubayashi, “A large-scale empirical study of just-in-time quality assurance,” IEEE Transactions on Software Engineering, vol. 39, no. 6, pp. 757–773, 2013.

[2] G. G. Cabral, L. L. Minku, E. Shihab, and S. Mujahid, “Class imbalance evolution and verification latency in just-in-time software defect prediction,” in 2019 IEEE/ACM 41st International Conference on Software Engineering (ICSE), 2019, pp. 666–676.

[3] Y. Kamei, T. Fukushima, S. McIntosh, K. Yamashita, N. Ubayashi, and A. E. Hassan, “Studying just-in-time defect prediction using cross- project models,” Empirical Software Engineering, vol. 21, no. 6, pp. 2072–2106, 2016.

不整地における農業用トラクタの挙動解析

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，不整地を走行するトラクタに対し，路面が車体の挙動に与える影響を理論的に解析した．このような影響を調べることは，トラクタが不整地を安定して走行するために重要であり，トラクタの自動化の実現につながると期待される．本研究では，車体の揺れの大きさをH_2ノルムによって定量化し，不整地を走行するトラクタに対応するシステムのH_2ノルムを解析した．H_2ノルムの性質を考慮してシステムを修正し，得られたシステムのH_2ノルムを路面とトラクタのパラメータの関数として導出した．そして，この結果から，路面が粗くなるほど車体の揺れが大きくなることを示し，路面の粗さが車体の揺れに与える影響の度合いを定量化する方法を与えた．これらの結果は計算機シミュレーションにより検証した．

1 はじめに

現在，農業用トラクタの自動化に向けて研究開発が進められている．その背景には，世界人口の増加に伴う食糧需要の増加や農業生産者の減少がある．また，トラクタの手動での操作は事故の原因になり得る．たとえば，農林水産省の調査[a]によると，2019年の農作業事故死亡者数は281人であり，その中で乗用型トラクタの事故による死亡者数は最も多い80人である．

トラクタの自動化においては，不整地を安定して走行することが課題となる．トラクタが走る道は主に農道であり，その路面は平坦ではない．このような道を平坦な道の場合と同様に走行すると，車体の挙動が不安定になる恐れがある．これは作業効率を悪化させ，生産性の低下につながる．加えて，安全性の問題が生じる．不整地を走行するトラクタについては，たとえば文献[b]で検討されているが，そこでは路面が車体の挙動に与える影響を理論的に解析する問題は考えられていない．

そこで本研究では，不整地を走行するトラクタを対象に，路面が車体の挙動に与える影響を理論的に解析した．具体的には，車体の揺れの大きさの指標としてH_2ノルムを考え，不整地を走行するトラクタに対応するシステムのH_2ノルムを解析した．そして，H_2ノルムを路面とトラクタのパラメータの関数として与えた．これにより，路面の粗さと車体の揺れの大きさの関係が明らかになるとともに，路面とトラクタの情報から車体の揺れの大きさを見積もることが可能となる．以上の成果は，国際誌に論文[1)]として投稿中である（文献番号は5のものに対応）．

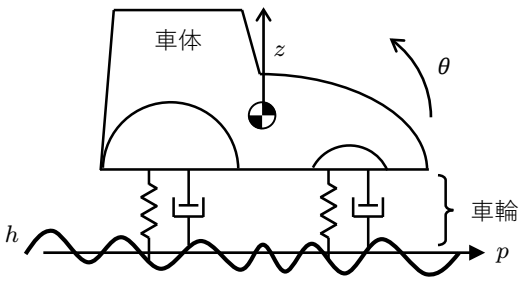


図1　不整地を走行するトラクタのモデル

2 問題設定

図1に示される，不整地を走行するトラクタを考える．トラクタは車体と前輪，後輪で構成され，各車輪はばねとダンパによって表現される．図中のp,zはそれぞれ車体の水平方向の位置，鉛直方向の変位を表し，θは車体の傾きを表す．また，hはある基準面からの路面の高さを表す．

図1のモデルを用いた計算機シミュレーションにより，図2の2種類の路面を走行した場合のz,θの

[a] https://www.maff.go.jp/j/press/seisan/sizai/attach/pdf/210216-1.pdf

[b] 青柳ら：事故現場の地形に基づくトラクタの挙動に関する研究，農業食料工学会誌，Vol. 78, No. 6, pp. 529-535 (2016)

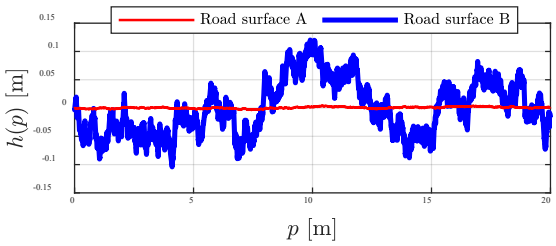


図２　２種類の路面

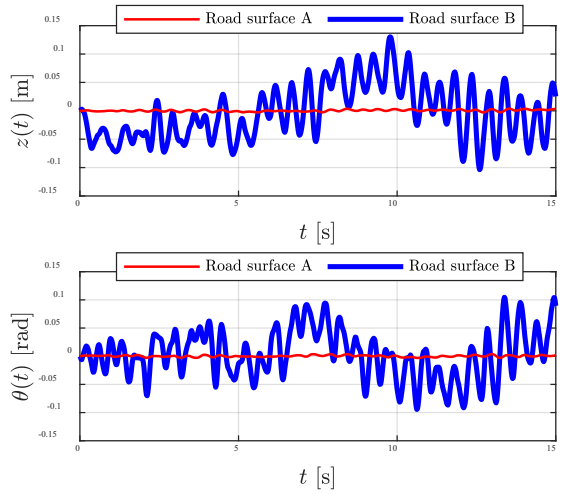


図３　図２の路面に対するシミュレーション結果

時間変化を求めた．その結果の一例を図３に示す．路面が粗くなると，車体の揺れが大きくなることが観察できる．

以上のことを踏まえて，本研究では図１のモデルに対し，車体の揺れの大きさを理論的に解析する問題を考える．

3 研究成果

3.1 解析のアイデア

本研究では，車体の揺れの大きさを定量化するために，H_2ノルムを導入する．H_2ノルムは，システムに白色雑音が入力されるとき，その定常状態における出力の二乗の期待値の平方根と解釈される．したがって，H_2ノルムの値が小さいほど，（期待値の意味で）定常状態での出力は小さいといえる．H_2ノルムは，制御工学の分野において，システムへの入力が出力に与える影響の度合いを表すものとしてよく用いられる．

H_2ノルムのアイデアを図１のモデルに導入する単純な方法は，図 4(a)のように，路面の情報を入力，

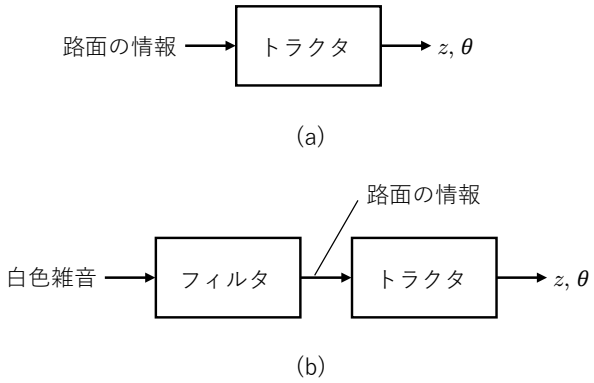


図４　図１のモデルの振舞いを記述するシステム

z, θを出力とするシステムを考えることである．この場合，H_2ノルムは，路面の情報が白色雑音として記述されるときの車体の揺れの大きさを表す．しかし，路面の情報を白色雑音として表すことは現実的ではない．

そこで，図 4(b)のシステムを考える．これはフィルタとトラクタからなり，フィルタは白色雑音から路面の情報を生成する役割を担う．このシステムの入力は白色雑音であるため，上で述べた問題は起こらない．本研究では，図 4(b)のシステムを解析して以下の成果を得た．

3.2 成果１：安定性解析

まず，図 4(b)のシステムの安定性を調査した．具体的には，フィルタとトラクタそれぞれの安定性を示すことで，システム全体の安定性を示した．ここで，トラクタの安定性解析においては，トラクタの力学的エネルギーに着目し，それが時間とともに減少することと非線形制御理論を利用して安定性を示した．H_2ノルムは対象とするシステムが安定であることを仮定しており，この結果は，その仮定が満たされることを意味している．

3.3 成果２：H_2ノルムの解析

つぎに，図 4(b)のシステムのH_2ノルムを，フィルタとトラクタのパラメータの関数として導出した．この結果を用いることで，路面とトラクタの情報から，H_2ノルムの意味での車体の揺れの大きさを見積もることが可能となる．さらに，この結果を利用して，路面が粗くなるほど車体の揺れが大きくなるこ

とを示し，路面の粗さが車体の揺れに与える影響の度合いを定量化する方法を与えた．

以上の結果を計算機シミュレーションにより検証した．まず，解析によって得られたH_2ノルムの値と1000 種類の路面に対するシミュレーションの結果を比較し，解析結果がシミュレーション結果に近いことを確認した．その後，図4(b)のシステムの代わりに図 4(a)のものを用いる解析方法と比較し，図4(b)のシステムを考えることで，トラクタの揺れの大きさをより正確に推定できることを示した．

4 おわりに

本研究では，不整地を走行するトラクタに対し，その車体の揺れの大きさを理論的に解析した．揺れの大きさの指標としてH_2ノルムを採用し，H_2ノルムの性質を考慮して，フィルタとトラクタを組み合わせたシステムを考えた．そして，システム全体の安定性を示すとともに，そのH_2ノルムを路面とトラクタのパラメータの関数として導出した．得られた結果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，不整地を走行する際のトラクタの挙動を予測するのに役立ち，不整地での安定走行の実現につながると期待される．

5 成果物

1) S. Izumi, R. Hayashida, and X. Xin: H_2 Performance Analysis of Tractors Traveling on Rough Terrain, ASME Letters in Dynamic Systems and Control, submitted

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．昨年度は金型とホットプレスの電装化による成形・融着時の温度と圧力の履歴を記録し，機械学習に投入する教師データのパラメータ数を効率的に取得する環境を構築した．一方で，溶着部評価で用いる目違い切り欠き圧縮試験の試験治具は，試験片固定に使用するボルトの締結トルク管理が手動であり，個人の技能のばらつきが結果に影響を及ぼす可能性があるほか，作業に時間を要する．今年度は試験結果のデータセットを作成する際の効率化と人為的要因を排除するため，試験治具の作製を行ったほか，締結荷重が溶着強度評価に及ぼす影響を調査した．

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 であが，評価部の長さを変えずにそのほかの部分を切り詰めることによって試験片全長を短くした試験方法の検討を実施した．この結果，試験片全長を半分にできることが実験的に確認できた．一方，試験条件ごとのばらつきが一定ではなかった．この要因として，治具への試験片固定の際用いられるトルクレンチでの締結力の管理がが試験を行う個々人の技能によって影響を受け，試験片保持力が一定ではなかったことが示唆された．

そこで本年度は，人為的な影響を排して常に一定の力をかけることができる，エアシリンダを用いた試験治具を作製し，試験片保持力の強弱が目違い切り欠き圧縮試験における CFRTP の溶着面の層間せん断強度におよぼす影響を評価した．

2. 材料

2.1 材料および積層板の成形

一方向セミプレグシートを積層することで積層構成$[0]_{48}$となる積層板を作製した．ここで，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. 1 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．また，金型から積層板を離形するために，離型剤ではなくフッ素樹脂コーティングクロスを使用した．次節で説明するように，本節で作製した積層板同士を融着する．したがって，樹脂そのものが離型性を持つ本コーティングクロスをもちいることで融着面すなわち積層板表面に離型剤が残らないよう配慮した．積層構成は$[0]_{48}$とした．

次に作製した積層板を 2 枚用意し，それらを 1 枚

に熱融着することにより，板厚中央に融着面を持つ積層構成$[0]_{96}$の積層板を作製した．成形条件は$[0]_{48}$と同じである．

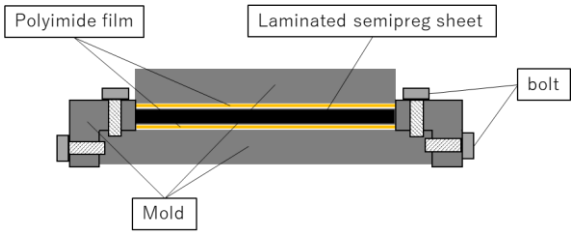


Fig. 1 Schematic diagram of shear-edge mold prepared to mold CFRTP laminates without washing out the fibers

2.2　目違い切り欠き圧縮試験片の作製

2.2 節で述べた方法で$[0]_{96}$積層板の 4 辺を 10 mm 切り落とした後，長さ 80 mm，幅 13 mm を基準として試験片を切り出した．次に切欠きの間隔 6.5 mm，切欠き幅 0.9 mm を目標に切り欠きを導入した．これらの作業には，ダイヤモンドカッター（MC-120，（株）マルトー）を用いた．

2.3　目違い切り欠き圧縮試験

目違い切欠き圧縮試験は，CFRP の一方向強化材料及び織物強化材料における層間せん断強度を目違い切欠き試験片の圧縮によって求める方法である．治具ここで用いる治具には，試験片の面外変形を防ぐ役割がある．規格では，4 本の M5 ボルトを締結することで治具の固定を行っており，締め付けトルクの範囲が 0.10 Nm から 0.15 Nm と定められている．しかし，1 章で述べた通り締め付けトルクの均一化が難しいため，エアシリンダ（スーパーマウントシリンダ，CKD（株））を用いることで，均一に力をかけて試験片の保持を行う治具を作製した．（Fig. 2）．これによって，試験片保持力を簡便に変えることができるほか，試験片の着脱が容易になり，作業を効率よく実施することができるようになった．この治具ではボルトを使用しないので，式(4)を用いて JIS 規格の締め付けトルクから試験片保持力を算出し，基準となる試験片保持力を算出した．

$$P = \frac{4T}{kd} \qquad (1)$$

ここで，T は締め付けトルク，k はトルク係数，d はネジの呼び径を表し，トルク係数は 0.2 とした．これより，JIS 規格で定められた締め付け力は 400 N から 600 N である．本研究では試験片保持力と層間せん断強度の関係を明らかにするため，試験片保持力は 250 N，350 N，450 N，550 N，650 N の 5 条件とした．

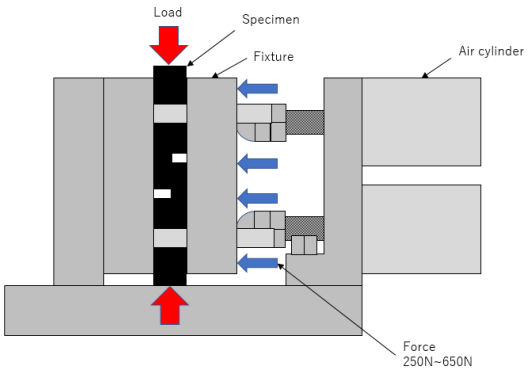
本研究では試験機に油圧サーボ式強度試験機（EHF-EB50KN-10L，（株）島津製作所）を用いた．試験速度は 1.2 mm/min とした．試験機から得られた荷重 F_{max} に対して次に示す式 (2) を適用することで層間せん断強度 τ_D を得た．

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

ここで，F_{max} は最大荷重，b は試験片の幅，l は切り欠き間隔である．



(a) Appearance of fixture



(b) Schematic image of setup of interlaminar shear test

Fig. 2 Fixture of test for interlaminar shear strength by double-notch specimen

また，標準偏差 s および変動係数 CV は，式(3)及び(4)を用いて求めた.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})}{n - 1}} \qquad (3)$$

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \qquad (4)$$

ここで，x は個々の測定値，x̄は測定値の平均値，n は測定値の数である．本報では 1 条件当たり試験片 6 本を準備したため，n=6 である．試験片保持力ごとの試験片寸法の平均値，標準偏差を Table 1 に示す.

Table 1 Average value of specimen dimensions and standard deviation

	JIS 7092	Experimental value				
Holding force [N]	400~600	250	350	450	550	650
Length L [mm]	78~91	80.0 (0.03)	80.0 (0.01)	80.0 (0.01)	80.0 (0.03)	80.0 (0.01)
Width b [mm]	12.5~13.3	13.0 (0.08)	12.9 (0.06)	13.0 (0.03)	13.0 (0.04)	13.0 (0.07)
Thickness h [mm]	3.5~6.5	4.13 (0.01)	4.22 (0.04)	4.22 (0.05)	4.21 (0.01)	4.19 (0.03)
Gauge length l [mm]	6.4±0.2	6.54 (0.02)	6.49 (0.05)	6.47 (0.01)	6.48 (0.04)	6.52 (0.04)
Notch width w [mm]	1.0±0.2	0.92 (0.01)	0.93 (0.01)	0.92 (0.01)	0.92 (0.01)	0.92 (0.02)
Notch depth [mm]	h/2~h/2+0.02	2.19 (0.01)	2.2 (0.01)	2.16 (0.02)	2.16 (0.03)	2.15 (0.02)

The value in parentheses is the standard deviation.

3. 実験結果および考察

各試験片の寸法と目違い切り欠き圧縮試験により得られた最大応力から，式(1)を用いて求めた各試験片における層間せん断強度の平均値と，標準偏差の関係を Fig. 3 および Table 2 に示す．図中における点が平均値，エラーバーが標準偏差である．また，2 本の破線内の範囲が式(4)を用いて得られた JIS 規格で定められた試験片保持力の範囲である．これらの結果，層間せん断強度の平均値は互いの標準偏差の範囲内に収まっていることから，今回実施したエアシリンダによる保持方法において試験片保持力は強度に有意な影響を及ぼさないといえる.

本試験において，層間せん断強度は試験片保持力によらず 3 から 9 MPa 程度のばらつきが発生した．先行研究において，層間せん断強度のばらつきに評価部寸法のばらつきの影響はないとされている [3]が，改めて確認を行った．Table. 3 に各試験片保持力における試験片の評価部寸法と層間せん断強度それぞれの平均値，標準偏差，変動係数の値を示す．Table.3 から，すべての評価部寸法における変動係数は 1% 未満と小さい値であるが，層間せん断強度の変動係

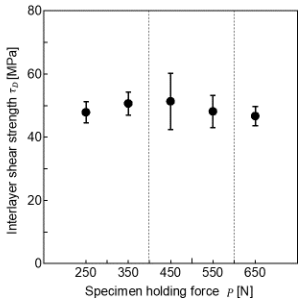


Fig. 3 Interlayer shear strength in test condition

Table 2 Interlaminar shear strength and the standard deviation

Holding force [N]	Average of interlayer shear strength [MPa]	S.D.[MPa]
250	47.8	3.4
350	50.6	3.7
450	51.3	9
550	48.1	5.1
650	46.6	3

S.D.: Standard deviation

数は 6.4%以上と比較的大きい値になっている．各評価部寸法の変動係数と層間せん断強度の変動係数の同期も確認できないため，層間せん断強度のばらつきに評価部寸法のばらつきは影響していないことが確認できた．ばらつきが発生した原因としては，き裂が進展する溶着面にブリッジングしている繊維の存在があげられる（Fig. 4）．

以上の検討結果から，本報で作製したエアシリンダによる試験片保持方法と，JIS 規格並びにその前後の保持力においては，試験片保持力は試験片の溶着強度の評価に有意な影響を及ぼさないと考えられる．

Table 3 Relationship between dimensions and interlaminar shear strength

Holding force [N]		Width [mm]	Gauge length [mm]	Interlayer shear strength [MPa]
250	Average	13	6.54	47.8
	S.D.	0.076	0.024	3.4
	C.V.[%]	0.59	0.37	7.1
350	Average	12.9	6.49	50.6
	S.D.	0.059	0.055	3.7
	C.V. [%]	0.45	0.85	7.3
450	Average	13	6.47	51.3
	S.D.	0.032	0.011	9
	C.V. [%]	0.25	0.17	18
550	Average	13	6.48	48.1
	S.D.	0.044	0.038	5.1
	C.V. [%]	0.34	0.59	11
650	Average	13	6.52	46.6
	S.D.	0.07	0.036	3
	C.V. [%]	0.54	0.55	6.4

S.D.: Standard deviation, C.V.: Coefficient of Variation

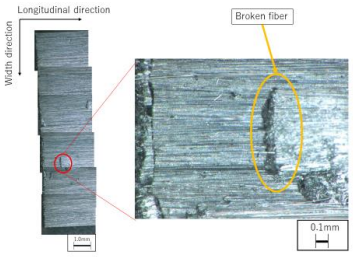


Fig. 4 Broken fiber on fracture surface of specimen

4. 結言

本報では，治具による試験片保持力と CF/PA6 の融着面における層間せん断強度の関係を評価するため，試験片保持力を等間隔で変えて目違い切欠き圧縮試験を行った．各試験片保持力における試験片の層間せん断強度の平均値は大差がなかった．また，その平均値は互いの標準偏差の範囲内だったため，標準偏差を考慮しても有意な差は見られなかった．層間せん断強度のばらつきは，試験片寸法のばらつきによるものではなく，き裂の進展する溶着面に存在するブリッジングした繊維による影響と考えられる．

以上の結果から，本試験で実施した範囲内では試験片保持力の層間せん断強度に対して有意な影響を及ぼさない．

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) 金崎真人，田中基嗣，斉藤博嗣，鵜澤潔，北條正樹，金原勲，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，材料システム，34，pp.29-33，2016.
3) 川邊浩平，CFRTP 積層板における目違い切り欠き圧縮試験の強度と評価部以外の長さの関係に関する実験的評価，岡山県立大学 卒業研究論文，2019.

マスク着用下における様々な条件での歩行が歩容および注意に及ぼす影響

岡山県立大学　情報工学部　人間情報工学科

大下　和茂

本研究は，歩行時のマスク着用および認知課題が心拍数，歩調，息苦しさ，認知課題の成績に及ぼす影響を調べた．健常成人男性 12 名を対象に，トレッドミル上での時速 4.0km および 6.0km の歩行を，不織布マスクを着用する条件とマスクを着用しない条件とで実施した．また，歩行時にスマートフォンを使用した計算を課し，画面上に表示される 2 桁の足し算を，できるだけ早く正確に回答するよう指示した．歩行時の心拍数や歩調，計算課題の成績にマスク着用による有意な効果は認められなかったが，マスク着用により主観的運動強度や息苦しさが増加した．また，歩行速度に関わらず，計算課題時に歩調が有意に増加し，計算課題に伴い歩調が大きく増加する者は計算課題の正答率が低く，これはマスク着用下のみで認められた．これらの結果は，歩行時のマスク着用は運動機能や認知課題の成績に影響しないが，マスク着用下における歩行時の認知的要求により，歩行パターンが大きく増加（実際の歩行では，歩幅の短縮や歩行速度の低下）する者は，認知的要求を正確に遂行しにくくなることを示した．

1 はじめに

マスク着用は，衛生面，感染症予防，粉塵や花粉などの対策として重要である．しかし，マスク着用により，息苦しさ[1)]，マスク内の温度変化[2,3)]，頭痛[4,5)]，ニキビやかゆみ等の皮膚反応[6)]など，様々な弊害が指摘されている．このうち息苦しさは，マスクによる呼吸抵抗の増大が影響すると考えられている[1,7)]．特に運動中は換気要求が高まるため，運動中のマスク着用が生理応答や運動パフォーマンスに与える影響は広く検討されている．これらの報告を review した最近の研究では[8-10)]，歩行などの低強度運動時における一般的なマスクの着用は，呼吸パターンを除いて，健常成人の生理的反応や運動能力に有意な影響を及ぼさないものの，主観的な息苦しさを増加させると報告している．これらの結果から，歩行などの日常生活における通常のマスク着用は，生理的に与える影響が小さいとしても，息苦しさを増加させることを示している．

日常生活における歩行は，単なる身体運動ではなく，様々な認知機能を必要とする．すなわち，路面状況を判断して転倒を防ぐ，他の人や物の動きや位置を把握して衝突を避ける，目的地までのルートを計画する，時には他人との会話などを伴う．また推奨されないが，モバイル機器を操作するケースも多い．このような認知的要求を伴う身体活動を二重課題またはマルチタスクと呼び，認知機能または運動能力の低下と関連する[11-14)]．長時間のマスク着用は認知機能や作業効率などへの影響が懸念されており[4,15,16)]，歩行などの低強度の運動で，運動パフォーマンス自体に影響が認められなかったとしても，息苦しさの増加から，マルチタスク下では，認知機能や運動能力に影響を及ぼす可能性がある．これは，日常歩行時では衝突や転倒などの事故に繋がる危険性が高まることを示している．

そこで本研究では，マスク着用下での歩行時に計算課題を実施することが，心拍数，歩行パターン，息切れ，計算成績に及ぼす影響について検討した．

2 方法

2.1 対象者

対象者は，健常成人男性 12 名（年齢：22±1 歳，身長：173.1±6.3 cm，体重：68.8±16.7 kg）であった．対象者には事前に実験内容を文書と口頭で説明し，書面による実験参加の同意を得た．なお，本研究は，岡山県立大学　倫理委員会の承認を経て実施された．

2.2 歩行課題および計算課題

対象者には後述するスマートフォン(AQUOS sense, シャープ㈱; 144.0×72.0×8.6mm および iPhone X, Apple Inc.; 143.6×70.9×7.7mm) を用いた計算課題とトレッドミル(Tempo T82, Johnson Health Tech)での歩行の練習時間を，事前に設けた.

実験日，対象者は，10 分間の座位安静の後，トレッドミル上に立ち，計算課題を 2 回実施した．その後，トレッドミル上で 3 分間の通常歩行（4.0km/h）を 2 回，その後，3 分間の速歩（6.0km/h）を 2 回実施した．各歩行速度での 2 回の歩行について，1 回目は歩行のみとし（歩行課題)，2 回目は計算課題を実施しながら歩行した（歩行+計算課題)．計 4 回の歩行間には，それぞれ 1 分間の休憩を設けた．実験は 2 日以上 7 日以内の間隔をあけて 2 日実施した．1 日はマスクを着用せずに歩行し，もう 1 日は座位安静時から不織布製の使い捨てマスク(Fitty 7DAYS マスク EX，玉川衛材㈱）を着用した．マスク有無の順序は参加者間でランダムとした.

計算課題はスマートフォンを用いて 2 桁の足し算を 1 分間実施した．参加者は左右任意の手でスマートフォンを保持し課題を実施した．画面に表示される 2 桁の足し算に，タッチ入力でできるだけ早く，正確に答えるよう指示した．計算課題は専用のアプリケーションを用い，1 問ずつ表示し，回答を入力した後に次の問題を表示した．歩行中の計算タスクは，歩行開始後 30 秒後に 2 回連続で実施した.

2.3 計測項目

2.3.1 心拍数(HR)

実験中の HR は HR モニター(FT7, Polar Japan)を用いて計測した.安静時前に電極ベルトを装着し，座位安静最後の 1 分間と各歩行課題終了直前の 10 秒間の平均値を測定した．歩行時の HR は，%予備 HR（%HRR）を算出し，運動強度として評価した.

2.3.2 主観的運動強度（RPE）および息苦しさ

RPE は Borg スケールを用い，息苦しさは VAS（visual analogue scale）で測定した．息苦しさの VAS は，米国胸部学会の声明において紹介されている「全く息苦しくない」（0cm）から「非常に息苦しい」(10cm）までの範囲とした[17,18]．これらの指標は各歩行終了後の休息時間に各歩行課題の感覚として評価した.

2.3.3 歩数・歩調

歩容はデジタルビデオカメラ（GZ-E109, JVC ケンウッド）により撮影した．歩数は動作解析ソフト kinovea を用いて，歩行課題の中間 30 秒分，歩行+計算課題の 1 分間計算課題時の中間 30 秒分を測定した．測定した歩数から歩調（歩/秒）を算出した.

2.3.4 計算課題の評価

回答数と誤答数から正答率を算出した．立位時，普通歩行時，速歩時，各 2 回ずつ実施した課題のうち,正答率の高かった課題のものを分析対象とした.

2.4 統計解析

%HRR, 歩調, RPE, 息苦しさ, それぞれの比較には，2 つのマスク条件（マスクの有無）×2 つの歩行速度（普通歩行と速歩）×計算課題の有無の 3 要因の分散分析を用いた.計算課題の正答率の比較には.2 つのマスク条件（マスクの有無）×3 つの歩行条件（立位, 通常歩行, 速歩）の 2 要因の分散分析を用いた.計算課題に伴う歩調の変化と計算課題の回答数および正答率との関係について,各速度の歩行において，計算課題の付加による歩調の変化（計算課題有りの歩調÷計算課題なしの歩調）を算出し，上位 6 名（増加大群）と下位 6 名（増加小群）とで回答数と正答率の平均値および標準誤差を算出した．また，各群における回答数および正答率の平均値の差は，2 つの群（増加大群と増加小群）×2 つのマスク条件（マスクの有無）×2 つの歩行速度（普通歩行と速歩）の 3 要因の分散分析により比較した．分散分析の結果，有意な主効果もしくは交互作用が認められた場合，Holm の方法による多重比較を実施した.

これらの統計解析には統計ソフト js-STAR XR（Ver.1.1.8j） を用いた．統計的有意水準は 10%未満を有意傾向，5%未満を有意とした.

表1　各条件における各測定指標の平均値と標準偏差および分散分析結果

	マスク	安静座位	普通歩行		速歩		分散分析結果			
			歩行課題	歩行+計算課題	歩行課題	歩行+計算課題	①歩行速度	②マスク	③計算課題	交互作用
%HRR (%)	無		19.7 ± 8.2	24.2 ± 7.5 †	29.9 ± 9.6 *	36.4 ± 8.9 *†	$P < .01$	N.S.	$P < .01$	①×③ ($P < .05$)
	有		18.9 ± 5.9	23.7 ± 8.4 †	29.0 ± 7.8 *	38.6 ± 12.7 *†				
RPE	無		8.7 ± 2.1	9.3 ± 2.6 †	11.0 ± 2.3	11.9 ± 2.4 †	$P < .01$	$P < .05$	$P < .01$	②×③ ($P < .05$)
	有		9.4 ± 1.7 ‡	10.5 ± 1.9 †‡	11.9 ± 1.8 ‡	13.1 ± 2.4 †‡				
息苦しさ (VAS; cm)	無		1.1 ± 0.8	1.6 ± 1.1 †	2.7 ± 1.4	3.4 ± 1.3 †	$P < .01$	$P < .01$	$P < .01$	②×③ ($P < .05$)
	有		1.7 ± 1.1 ‡	2.6 ± 1.7 †‡	3.8 ± 1.6 ‡	4.8 ± 1.9 †‡				
歩調 (歩/秒)	無		1.71 ± 0.14	1.78 ± 0.12 †	2.06 ± 0.10 *	2.15 ± 0.12 *†	$P < .01$	N.S.	$P < .01$	①×③ ($P < .10$)
	有		1.71 ± 0.13	1.76 ± 0.12 †	2.08 ± 0.11 *	2.15 ± 0.13 *†				
正答率 (%)	無	92.9 ± 4.5		91.3 ± 3.2		89.8 ± 5.0 #	$P < .01$	N.S.		N.S.
	有	92.3 ± 4.5		90.0 ± 5.9		88.1 ± 7.3 #				

*は普通歩行と比べて，†は歩行課題と比べて，‡はマスク無しと比べて，#は安静座位と比べて，それぞれ有意差あり（$P < .05$，Holmの方法による多重比較）

3. 結果および考察

各条件における各測定指標の対象者全体の平均値と標準偏差を表 1 に示す．

%HRR について，歩行速度や計算課題付加に有意な主効果が認められたが（$P < 0.01$），マスク着用の有意な効果は認められなかった．また，歩行速度と計算課題付加との有意な交互作用が認められた（$P < 0.05$）．多重比較の結果，各歩行速度において，計算課題の付加，もしくは歩行速度の増加により%HRR は有意に高くなった．RPE および息苦しさは，マスク着用，歩行速度，計算課題付加に有意な主効果が認められ（$P < 0.05$），マスク着用と計算課題付加との有意な交互作用も認められた（$P < 0.05$）．多重比較の結果，計算課題付加，もしくはマスク着用により RPE および息苦しさは有意に高くなった（$P < 0.05$）．

運動時のマスク着用に関する review では，低強度運動時のマスク着用は心血管系反応や血液ガスなどの生理的指標に大きな影響を与えないが，息苦しさは増加すると報告されている [8]．これは，比較的短時間歩行を実施した本研究結果と同様である．息苦しさの増加はマスク着用による呼吸抵抗の増加によるものと考えられ，これが本研究ではマスク着用による RPE の増加に繋がったと考えられる．一方，低強度運動であっても長時間の場合はマスク着用により HR の有意な増加が認められており [19]，運動時間が長くなると，主観的指標だけでなく，生理的指標にも影響する可能性がある．一方，息切れや RPE は計算課題付加でも有意に増加した．この結果は，単にマスクを着けて歩いた場合より，これに認知的な要求が加わる場合で主観的な疲労感が増することを示唆している．日常生活での歩行は，経路計画や事故防止に注意を払うなど認知機能も要求されるため，実験室レベルでマスク着用した歩行よりも，より疲れると認識されるかもしれない．そのため，十分なソーシャルディスタンスが確保できるのであれば，極度の疲労感を避けるために，マスク着用しないと言う選択肢も有用となる可能性がある．

歩調は，歩行速度や計算課題付加に有意な主効果が認められたが（$P < 0.01$），マスク着用の有意な効果は認められなかった．また，歩行速度と計算課題付加との交互作用は有意傾向を示した（$P < 0.10$）．多重比較の結果，マスクの有無に関わらず，計算課題の付加，もしくは歩行速度の増加で歩調は有意に高くなった（$P < 0.05$）．計算課題の正答率は，歩行速度に有意な主効果が認められたが（$P < 0.01$），マスク着用による有意な効果は認められず，これらの有意な交互作用も認められなかった．多重比較の結果，安静時よりも速歩時で正答率が有意に低くなった（$P < 0.05$）．

計算課題に伴う歩調の変化は，マスク無しの普通歩行時に増加大群で 1.06±0.02 倍，増加小群で 1.02±0.02 倍，速歩時に増加大群で 1.07±0.03 倍，増加小群で 1.02±0.02 倍であった．また，マスク着用の普通歩行時に，増加大群で 1.05±0.02 倍，増加小群で 1.01±0.01 倍，速歩時に増加大群で 1.06±0.02 倍，増加小群で 1.01±0.01 倍であった．各群の計算

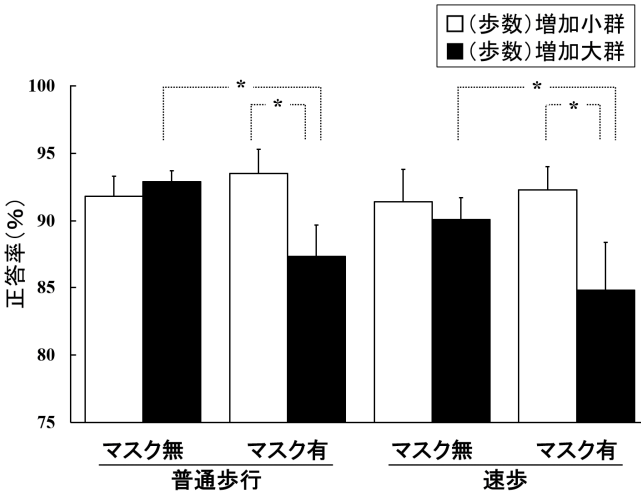


図1 歩行時の計算課題に伴う歩数の変化と
計算課題の正答率（*; $P < 0.05$）

課題の正答率を図1に示す．分散分析の結果，マスク着用および歩行速度に有意な効果は認められなかったが，群間の差は有意傾向であり（$P < 0.10$），群間とマスクの着用との有意な交互作用が認められた（$P < 0.05$）．多重比較の結果，増加大群においてマスク着用により，またマスク着用時に増加小群に比べ増加大群で，それぞれ有意に低い正答率を示した（$P < 0.05$）．これらの結果は，歩行時における計算課題付加で歩調や計算成績にマスク着用の有意な影響は認められないが，マスク着用下でのみ，計算課題付加に伴い歩調が大きく増加する者は計算課題の成績が低いことを示している．

本研究では，スマートフォンを用いた認知課題を実施したが，マスク着用歩行時のスマートフォン操作で歩行パターンが大きく変化する者は認知課題の成績も大きく悪化する，もしくは，認知課題の大きく悪化する者は歩行パターンも大きく変化するという個人特性を示した．これらの結果は，マスク着用が歩行パターンや認知能力の変化に何らかの影響を及ぼす可能性を示しているが，その詳細は本研究では明らかでない．マスクの長時間着用は作業能率や作業効率を低下させることが報告されており[4,15,16]，呼吸パターンの変化や息苦しさが部分的に影響している可能性がある．今後，脳活動などの測定により，そのメカニズムを詳細に検討する必要があろう．いずれにせよ，本研究結果は，マスク着用下におけるマルチタスク歩行で歩行速度が大きく低下したり，認知課題の成績が悪化したりする者は，歩行パターンの変化によるつまずきや認知能力の低下による注意力・判断力の低下が考えられるため，注意が必要となる可能性を示している．特に，本研究でのマルチタスクはスマートフォンを用いた作業であった．いわゆる「歩きスマホ」の危険性はよく知られているが，本研究の結果は，マスク着用下での「歩きスマホ」によって歩行パターンが大きく変化する人（歩行速度が遅くなるなど）は，認知パフォーマンスも大きく低下する可能性を示している（判断力や注意力が低下するなど）．逆に，マスク着用下で「歩きスマホ」で認知パフォーマンスが大きくに悪化する（周囲の人や物に気づかずぶつかる，信号機を見落とすなど）人は，歩行パターンも大きく変化する（つまずきによる転倒リスクの増加など）ことに繋がる可能性を示している．このことから，通常でも危険な「歩きスマホ」は，人によってはマスクを着用することでより危険度が増す可能性を示している．

4. 今後の検討

本研究において，歩行中の認知課題付加は，課題の成績や歩行パターンに影響することを示したが，健康成人を対象としたトレッドミルでのマルチタスク歩行で，歩行パターンや認知機能に有意な影響が認められないとする報告もがある[20]．これは認知課題の種類や難易度に関連している可能性がある．本研究では計算課題のみを用いたため，他の認知課題との比較が必要である．また，本研究では不織布製のマスクを使用したが，現在，様々なタイプのマスクが使用されており，これらのマスクの違いによる影響も検討することが重要であろう．さらに，本研究では歩調のみを評価したが，今後はモーションキャプチャなどを用いた各関節角度，歩幅，脚の上がり方などの変化も評価することが望ましいと考える．

5. まとめ

本研究は，歩行時のマスク着用と計算課題付加がHR，歩調，息苦しさ，計算課題に及ぼす影響について検討した．その結果，マスク着用により，HR，歩行時の心拍数に有意な影響は認められなかったが，

主観的な運動強度や息苦しさは有意に増加した．また，歩行速度に関わらず，計算課題の付加により歩調は有意に増加し，計算課題の成績は速歩時で有意に低下した．そして，マスク着用での歩行時のみ，計算課題の付加により歩調が大きく増加した者は，計算課題の正答率も低かった．これらの結果から，マスク着用の歩行は息苦しさの増加に繋がり，歩行パターンの変化が大きい人ほど認知機能も低下することが示唆された．そのため，マスクを着用下での日常歩行で歩行パターンの変化が大きい人は，周囲の状況を正確に判断する能力，経路などを考える能力などの認知能力も低下する可能性を示している．

謝辞

本研究の実施にあたり支援を賜った，公益財団法人 ウエスコ学術振興財団に深く謝意を表します．

参考文献

1. Warren, D. D. W., Mayo, D. R., Zajac, D. D. J. & Rochet, D. A. H. Dyspnea following Experimentally Induced Increased Nasal Airway Resistance: *Cleft Palate Craniofac. J.* 33, 231-235 (2017).
2. Daanen, H. et al. COVID-19 and thermoregulation-related problems: Practical recommendations. *Temp. Multidiscip. Biomed. J.* 8, 1 (2021).
3. Laird, I. S., Goldsmith, R., Pack, R. J. & Vitalis, A. The effect on heart rate and facial skin temperature of wearing respiratory protection at work. *Ann. Occup. Hyg.* 46, 143-148 (2002).
4. Ong, J. J. et al. Headaches Associated With Personal Protective Equipment -A Cross-Sectional Study Among Frontline Healthcare Workers During COVID-19. *Headache* 60, 864-877 (2020).
5. Lim, E. C. H. et al. Headaches and the N95 face-mask amongst healthcare providers. *Acta Neurol. Scand.* 113, 199-202 (2006).
6. Foo, C. C. I., Goon, A. T. J., Leow, Y. H. & Goh, C. L. Adverse skin reactions to personal protective equipment against severe acute respiratory syndrome--a descriptive study in Singapore. *Contact Dermatitis* 55, 291-294 (2006).
7. Szeinuk, J., Beckett, W. S., Clark, N. & Hailoo, W. L. Medical Evaluation for Respirator Use. *Am. J. Ind. Med.* 37, 142-157 (2000).
8. Hopkins, S. R. et al. Face Masks and the Cardiorespiratory Response to Physical Activity in Health and Disease. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 18, 399-407 (2021).
9. Shaw, K. A. et al. The impact of face masks on performance and physiological outcomes during exercise: a systematic review and meta-analysis. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 46, 693-703 (2021).
10. Engeroff, T., Groneberg, D. A. & Niederer, D. The Impact of Ubiquitous Face Masks and Filtering Face Piece Application During Rest, Work and Exercise on Gas Exchange, Pulmonary Function and Physical Performance: A Systematic Review with Meta-analysis. *Sport. Med. - Open* 7, 1-20 (2021).
11. Crowley, P., Madeleine, P. & Vuillerme, N. The effects of mobile phone use on walking: a dual task study. *BMC Res. Notes* 12, 352 (2019).
12. Jeon, S., Kim, C., Song, S, & Lee, G. Changes in gait pattern during multitask using smartphones. *Work* 53, 241-247 (2016).
13. Tian, Y., Huang, Y., He, J. & Wei, K. What affects gait performance during walking while texting? A comparison of motor, visual and cognitive factors. *Ergonomics* 61, 1507-1518 (2018).
14. Bovonsunthonchai, S. et al. The impact of different mobile phone tasks on gait

behaviour in healthy young adults. *J. Transp. Heal.* 19, 100920 (2020).
15. Bustamante-Sánchez, A. et al. Effects of Hypoxia on Selected Psychophysiological Stress Responses of Military Aircrew. *Biomed. Res. Int.* 2021, 6633851 (2021).
16. Elisheva, R. Adverse Effects of Prolonged Mask Use among Healthcare Professionals during COVID-19. *J. Infect. Dis. Epidemiol.* 6, (2020).
17. Janson-Bjerklie, S., Carrieri, V. K. & Hudes, M. The sensations of pulmonary dyspnea. *Nurs. Res.* 35, 154-159 (1986).
18. Meek, P. M. et al. Dyspnea. Mechanisms, assessment, and management: a consensus statement. American Thoracic Society. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 321-340 (1999).
19. Roberge, R. J., Kim, J. H. & Benson, S. M. Absence of consequential changes in physiological, thermal and subjective responses from wearing a surgical mask. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 181, 29-35 (2012).
20. Wrightson, J. G. & Smeeton, N. J. Walking modality, but not task difficulty, influences the control of dual-task walking. *Gait Posture* 58, 136-138 (2017).

エリアリノベーション時代の地域建設業の役割と業態に関する研究

岡山県立大学デザイン学部

穂苅　耕介

市街地環境の維持保全に働きかける地域建設業の衰退と消滅という現代日本の社会課題に対し、本研究では、昨今注目されている「エリアリノベーション」に着目し、その展開が見られる長野市善光寺門前（東町）を対象に、エリアリノベーションの状況や特性を踏まえ、リノベーションと地域建設業の関わりを、資料分析と関係者へのヒアリングを通じて把握することを通じて、市街地環境の維持保全さらには進化と創造に寄与できる地域建設業の役割と業態の解明を試みた。

これにより、1)エリアリノベーションによる市街地環境の変化は、それまでとさほど変化の見られない市街地の様相の上に小さく漸進的に手が加えられていくものであること、2)リノベーション工事に関わる地域建設業は、リノベーションの発生前後に会社設立あるいは開業した個人または小規模事業者からなり、事業者はそれぞれ既存の業種区分の境界をまたぐ事業を展開していること、3)リノベーション工事には分離発注方式が採用されており、これに関わる専門工事業はエリアリノベーションの進展にともない「変化＝多能工化」し、業種区分にとらわれない幅広い事業展開がみられること、の3点を明らかにした。

1. はじめに

1-1. 研究の背景と目的

旧市街地の保全においては、歴史的な家屋や都市施設等の日常的点検や修繕、または更新を手がける建設業の存在が重要であるが、近年はこうした役割を担ってきた地域建設業は、衰退し消滅しつつあると言われている（橋本他：2002[1)]）。建設業者という存在は一般的に、業界をとりまく体質や特異性から調査研究の対象としては近づきにくいものとされてきた。そのため、衰退・消滅の危機にあるとされながらも市街地環境の保全に果たしうる地域建設業の役割や可能性については、これまで十分に議論されてこなかった。

これに対し、近年「リノベーション」という言葉が一般によく知られるようになり、地域社会から放擲されていた空き家を、リノベーションによって再生する試みが各地で行われている[注1]。また、一部では、ある狭いエリアでリノベーションが同時多発的に展開する「エリアリノベーション」と呼ばれる現象も起こっている。

このような市街地環境の維持更新に働きかけるリノベーションに、地域建設業は一体どのような関わり方をしているのだろうか。

本研究では、エリアリノベーションの展開が見られる地方都市として長野市善光寺門前を対象に、リノベーションの状況や特性を把握の上、リノベーション工事に関係する建築関係者にヒアリング調査を行い、リノベーションと地域建設業との関わりを把握することを通じて、地域建設業の果たす役割と業態の解明を試みる。

1-2. 研究の方法

以上の研究目的に沿い、本研究では以下の【1】～【3】の方法から研究課題の解明を試みる。

まず、【1】研究対象地の現地踏査とGoogle Street View（以下、GSV）を用いて、エリアリノベーションの展開がみられる市街地を対象とした市街地環境の変化の様相を経時的に把握しその特質を明らかにする（第2章）。次に、【2】当該市街地のエリアリノベーションの展開に関係する建築関係者にヒアリングを行い、各建物のリノベーション工事に関係する建設業者を特定の上、国・地方自治体の管理する企業情報検索システムや民間の信用調査会社、その他公表されているインターネット情報などから地域建設業の業態の特質を明らかにし（第3章）、最後に、【3】エリアリノベーション時代の地域建設業の役割と業態との関係について考察する（第4章）。

1-3. 研究対象地：長野市東町

本研究の対象地である長野市善光寺門前の中央通りから東側にひとつ小脇にそれた東町（図 1）は、昭和 40 年代頃までは商工業がひしめく問屋街をなし経済活動の中心であった。その後、商工業に関係する事業者らの卸売団地への移転などを機に、問屋街としての様相から人通りもまばらな住宅地としての様相に変化したとされている。

その後 2009 年の倉庫を利用した空き家再生活動を発端とした東町界隈を中心とするリノベーションの連鎖[5]により、エリアリノベーションの先進地として紹介されるようになった（馬場：2016[6]）。



図1 対象地の位置

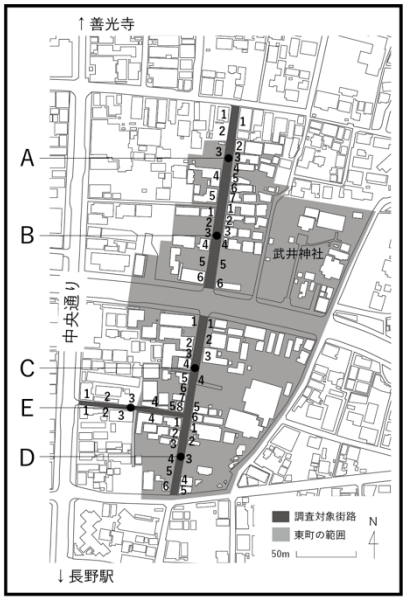


図2 GSV による分析対象街路

表1 GSV 記録の有無

	A	B	C	D	E
2020 年 11 月					
2019 年 10 月					
2019 年 6 月					
2018 年 9 月					
2018 年 4 月					
2017 年 7 月					
2015 年 9 月					
2014 年 9 月					
2012 年 5 月					

凡例：GSV の記録あり

2. リノベーションによる市街地環境の変化の様相

2-1. 分析手法

まずエリアリノベーション時代によってもたらされる市街地環境の変化の様相を、a)現地踏査と b) GSV の Time Machine を用いて明らかにする。

GSV の Time Machine は、2014 年 4 月に追加された機能で、Google が GSV サービスを開始した 2007 年 8 月以降の市街地環境の経時的変化の閲覧を可能にした。これにより、「図」となる市街地環境だけでなく、その背後におかれた「地」の市街地環境の様相の変化も経時的に把握することが可能になった。

a）現地踏査による分析対象街路の抽出

2021 年 3 月 8 日に実施した現地踏査では、対象地

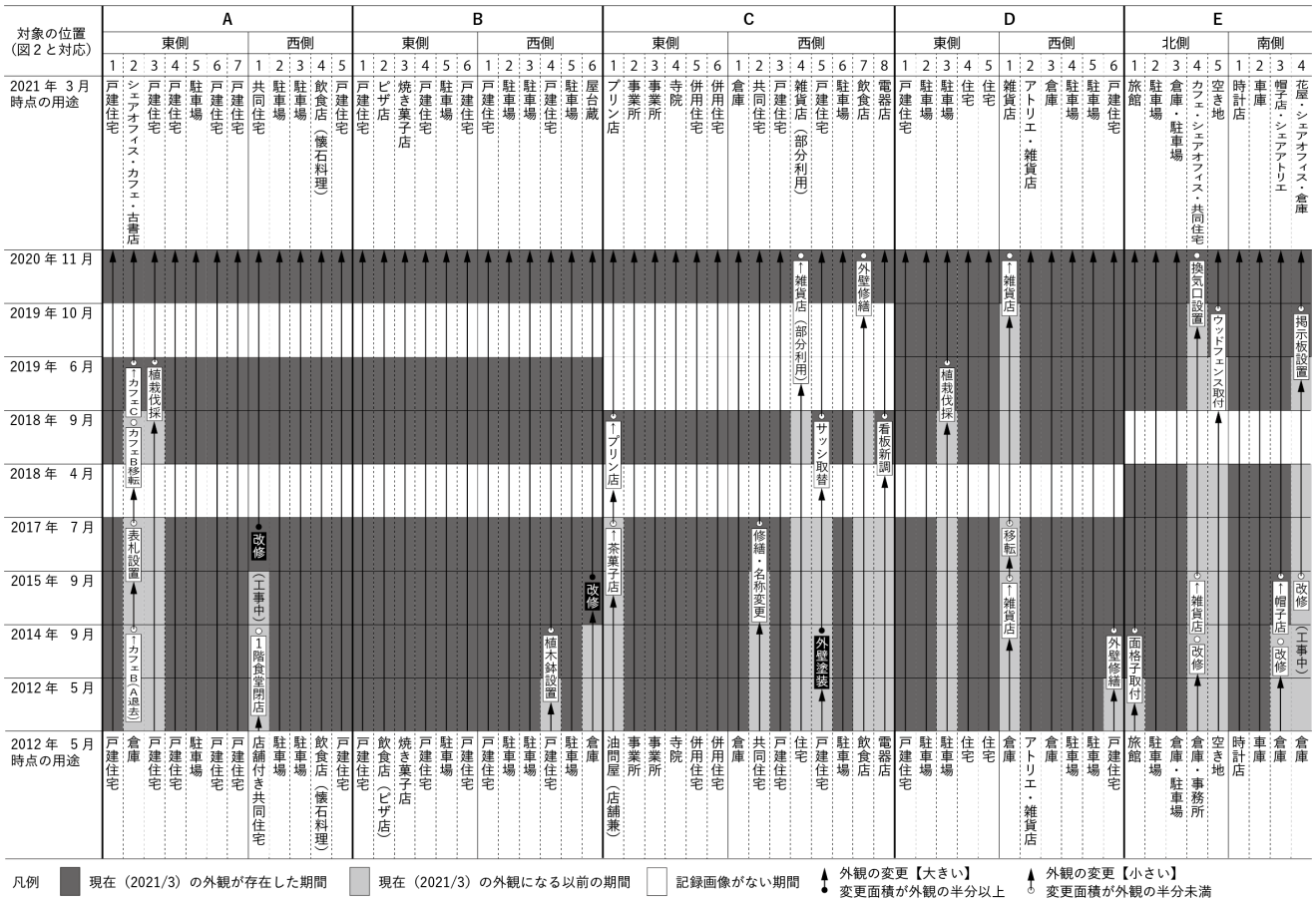


図3 GSV-Time Machine 記録画像からみた外観の変更履歴

の範囲とエリアリノベーションの現況を確認の上、GSV の Time Machine による分析対象とするリノベーション建物を含んだ街路（A～E）を抽出し、沿道の敷地・建物の位置関係の確認とナンバリングを行った（図 2）。

b）記録画像の蓄積状況の確認

次に、現地踏査で抽出した街路（A～E）を対象として GSV-Time Machine 記録画像の蓄積状況を確認し、長野市東町には、2012 年 5 月から 2020 年 11 月までの期間に 9 回分の記録画像があり、A～E それぞれの街路別では、6～8 回の記録画像の蓄積があることを確認した（表 1）。

2-2. 現地踏査と記録画像を用いた分析

分析にあたり、前節 b）で確認した GSV-Time Machine 記録画像を、図 2 に示す現地踏査で確認・ナンバリングした敷地・建物ごとに切り取り、それを最新の記録である 2020 年 11 月から 2012 年 5 月まで遡ってみていくことで、市街地環境の変更履歴を整理した（図 3）。

また、整理したその結果の中にリノベーション事例（A-東側-2／B-西側-6／C-東側-1／C-西側-4／C-西側-7／D-西側-1／E-北側-4／E-南側-3／E-南側-4 の 9 例）を確認の上、変更履歴の中に経時的な変化が確認された事例を、外観の変更の大きい・小さいと敷地・建物の用途変更の有・無から抽出し、その傾向を見た（図 4）。

そこから、長野市東町におけるリノベーションを含む市街地環境の様相について、以下のことが確認された。

・エリアリノベーションの展開がみられる長野市東町において、GSV の記録画像が存在する 2012 年 5 月から 2020 年 11 月の期間中の建物の新築、取り壊し、建て替えの例は認められない（敷地・建物の更新頻度は高くない）。
・同期間における分析対象の敷地・建物 58 例中 39 例は、外観自体に変化が認められない。
・外観に変化が認められた 19 例中 16 例には、事前に確認されたリノベーション事例（9 例）がすべて含まれており、それらは外観を大きく変えない【小さな】変更である。

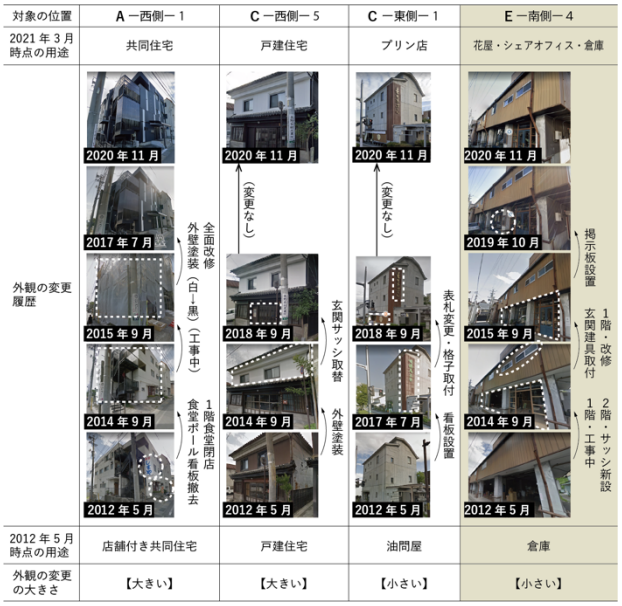


図 4 積層するように変化する外観の具体例

・とりわけ倉庫などの空き家をリノベーションした事例（A-東側-2、E-北側-4、E-南側-4）では、変更は 1 回だけでなく複数回にわたって繰り返し行われる傾向が見られる（ちなみに、外観に大きな変更が加えられた 3 例中 2 例は、塗装によるものであった）。

3. リノベーションに参加する地域建設業

3-1. 地域建設業の特定手法

a）関係者へのヒアリング

長野市東町のエリアリノベーションの展開過程をよく知る人物として、当該地区のリノベーション建物（図 2、図 3 の A-東側-2、E-南側-4）を運営する入居者の 1 人であると同時に、そのリノベーション工事の設計を担当した建築設計事務所代表に、リノベーション工事における地域建設業の関わりについてヒアリング調査を実施した[注2]。

具体的には、２章で確認したリノベーション建物 9 例のうち工事の内情のわかる 5 例について、事例ごとに関係した事業者の特定を行った。これを整理したのが図 5 である。

ここから、リノベーションに関わる建物の仲介・設計・施工すべてを手掛ける事業者が存在していること、設計・施工には入居者自らが参加していること、また、施工においてはその一部を担う特定の「個人名の専門工事業」の関わりが頻出して見られることを把握した。

b）官公庁等の登録データによる業態の把握

次に、図5において特定した事業者がどのような生業をしているか、その業態を把握するため、事業者の経営体制（資本金額、設立（開業）年、主業従業の別と業種、所員数）と来歴の調査を行った。

経営体制に関する情報については、国土交通省の建設業者・宅建業者等企業情報検索システムと帝国データバンクのTDB会社情報から取得した。また、来歴に関する情報については、主に個人ホームページやブログ、長野市がシティプロモーション一環で設置するWebサイト[7]（長野市内で活躍する特定の個人を対象とするインタビュー記事)から取得した。

表2は、これらから得られた情報を整理して一覧にしたものである。経営体制からは、リノベーション工事は、小規模な法人、または個人または、それらが集合した組合や事業体の参加によって成り立っていること、これらの事業者の会社設立や開業は、この長野市東町でリノベーションによる空き家再生活動した2009年前後に集中していること。また、来歴からは、M社以下Hi社、C事業体に、「不動産仲介」「設計」「施工」の業種区分の境界をまたぐ事業志向が見られること、専門工事業のOさん、Sさん、Kさんについては、いずれも建設業許可を持たない[注3]「個人事業主」であり、先の「不動産仲介」「設計」「施工」という区分とは別に、専門工事業としての区分[注4]において各区分の境界をまたぐ事業展開が見られることを確認した。

3-2. 地域建設業の業態の特質

以上の結果を踏まえた上で、最後に従来の工務店方式の工事と本研究対象の長野市東町におけるリノベーションの工事とで、地域建設業の関わりにどのような違いがあらわれるのかを確認しておきたい。

図6は、本報告3-1.a）における建築設計事務所代表へのヒアリング調査[注5]の内容を精査・抽出し、リノベーションと地域建設業との関係を整理したものである。ここからリノベーションと地域建設業との関わりについて、以下のことが確認された。

・従来の工務店方式との違い

リノベーション工事は、今では一般的になった工務店や住宅メーカーに設計と施工を一括で発注する

対象の位置	A－東側－2	B－東側－2	C－西側－4	C－西側－7	E－南側－4
2021年3月時点の用途	 シェアオフィス・カフェ・古書店	 飲食店	 雑貨店	 飲食店	 シェアオフィス・花屋・倉庫
従前の用途	倉庫	習い事教室	住宅（店舗付）	飲食店	倉庫
空き家仲介	He社	M社	M社	M社	M社
設計	B組合	Hi社	M社	Kさん	C事業体
施工	B組合	Hi社、入居者	M社、入居者	Kさん、入居者	C事業体
専門工事（主な）	Oさん他	Oさん他	Sさん他	不　明	Sさん他
備考	入居者=B組合				入居者=C事業体

図5 リノベーション建物別の地域建設業の実績

表2 リノベーションに参加する地域建設業の業態

	区分	資本金*1（千万円）	設立（開業）	主業*1（従業）	所員数（参加者数）	来歴・業態*2
He社	法人	1.5	1976	不動産代理業・仲介業（不動産管理業）	2	地元不動産会社
M社	法人	1.55	2010	木造建築工事業（不動産代理業・仲介業）	2	大学卒業後、関東での不動産会社勤務を経Uターン。実家の工務店に戻り働くも東京R不動産の影響を受け2010年に独立。リノベーションに関係する不動産仲介・設計・施工までを幅広く手掛ける。
B組合	組合（LLP）	—	2009	—	（7）	A-東側-2の運営にあたりこれに入居する建築士やデザイナー、編集者らが設立した組合（LLP）。
Hi社	法人	0.3	2013（2007）	木造建築工事業	2	2007年に起業し一人親方として大工工事を主にリノベーションに施工で携わる。2015年に一級建築士を取得して以降は、設計施工を一貫して手掛ける。
C事業体	事業体	—	2013	—	（5）	M社の事業として、E-南側-4に入居するM社を含む不動産仲介、建築設計、デザイン、施工を手掛ける事業者らが参加するプラットフォーム。
Oさん	個人（電機設備）	—	2009	—	—	東京での飲料製造会社、電機会社エンジニア勤務を経て2007年に独立。2009年に長野市に移住。電気設備工事を主として大工仕事や新エネルギー事業も手掛ける。
Sさん	個人（一人親方）	—	2012	—	—	洋服屋、板金屋、家具屋など様々な職を経2004年に長野市に移住。2012年に一人親方として独立。家具や什器制作の他、内装・電気工事や現場施工管理も手掛ける。
Kさん	個人（美術家）	—	2009	—	—	美術工房でのアシスタントや美術関連の鉄工所での金属制作の仕事を経2009年に東京からUターン。美術家として活動する傍ら店舗・住宅・庭等の設計施工も手掛ける。

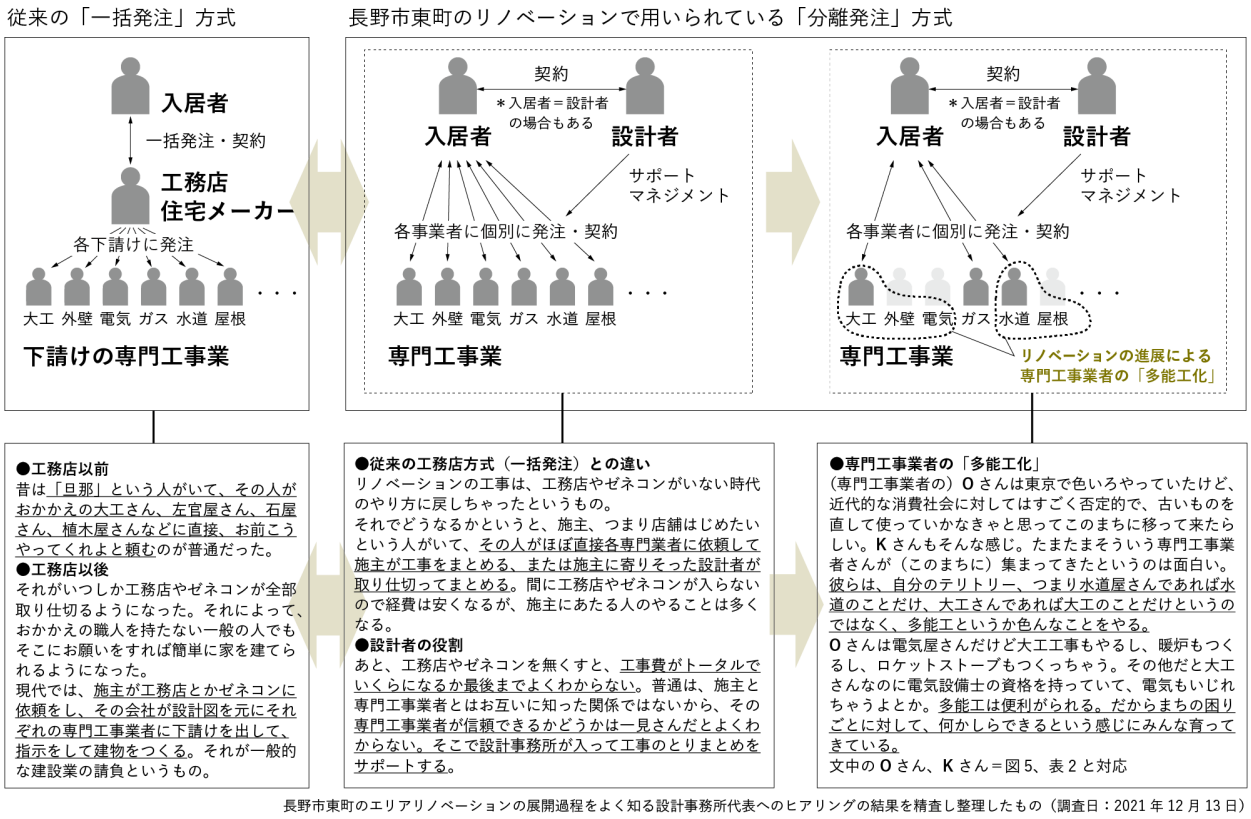
*1国土交通省：建設業者・宅建業者等企業情報検索システムと帝国データバンク（TDB）の企業情報に基づく
*2各事業者の個人ホームページやブログ、市のシティプロモーションのWebサイトに基づく

方式ではなく、むしろ工務店が登場する以前の「旦那と出入り職人」の関係の中で用いられた発注者が各々の職人に直接依頼する「分離発注」方式が採用されている。

・設計者の役割

分離発注の有効性を確保するには、発注者と受注者との間に一定の信頼関係または発注者側の情報や知識を補うしくみが必要とされている[8]。

長野市東町の場合は、入居者と契約を交わした設計者（Hi社やM社など）が入居者と各専門工事業者との間に入りサポートやマネジメントを行っている。なお、B組合、O事業体のように、入居者＝設計者（入居者に設計者の役割を担える事業者が含まれる）場合もある。



長野市東町のエリアリノベーションの展開過程をよく知る設計事務所代表へのヒアリングの結果を精査し整理したもの（調査日：2021 年 12 月 13 日）

図 6 リノベーションで用いられる工事方式とその進展による専門工事業の関わりの変化

・専門工事業の変化

専門工事業に関わる個人は、「*彼らは、自分のテリトリー（中略）というのではなく、多能工というか色んなことをやる*」との証言にみられるように、エリアリノベーションの進展過程で工事への関わりが「変化＝多能工化」している。また、「*多能工は便利がられる。だからまちの困りごとに対して何かしらできるという感じにみんな育ってきている*」として、リノベーションに関わることで、生活者の多様な要望に応える幅広い事業展開の実現を可能なものにしている。

4．まとめ

まずは、各章から得られた知見を整理する。

第 2 章では、GSV-Time Machine 機能を用いた市街地環境の変化の経時的分析により、長野市東町におけるエリアリノベーションによる市街地環境の変化は、それまでとは見違える市街地の様相に突如として生まれ変わるものではなく、それまでとさほど変化の見られない市街地の様相の上に小さく漸進的に手が加えられていくものであることを明らかにした。

第 3 章では、長野市東町のエリアリノベーションの展開過程をよく知る建築関係者へのヒアリングとインターネット公開された官公庁等の資料分析から、リノベーション工事に関わる地域建設業の業態として、東町でリノベーションが発生した 2009 年前後に会社設立あるいは開業した個人または小規模事業者からなり、事業者はそれぞれ既存の業種区分の境界をまたぐ事業を展開している点を明らかにした。

また、前出の建築関係者へのヒアリングから、長野市東町のリノベーション工事では、入居者が適宜設計者によるサポートや施工マネジメントのもとで工務店や住宅メーカーを介さずして各々の専門工事業に直接依頼する分離発注の方式が採用されていること、また、エリアリノベーションの進展にともない専門工事業の関わりが「変化＝多能工化」し、業種区分にとらわれない幅広い事業展開がみられることを明らかにした。

＊＊＊

リノベーションにおける専門工事業の担い手は、個人事業主であるがゆえにか細く不安定に見えるかも知れない。しかし「下請業者」という枷にはまることなく業種の枠をこえ自由に働くふるまいの先にある「多能工」への進化の内実は、身近で生活する

人々に寄り沿い、困りごとがあればそれに応えようとする所謂「まち医者」そのものでありはしないか。ここに一縷の可能性を見出したい。

なお、この長野市東町のリノベーション工事で認められた分離発注の方式は、東町と同様にエリアリノベーションが展開する和歌山市大新地区でも用いられていることを当該地区の建築関係者へのヒアリングから確認した[注6]。その一方、長野市東町で認められたエリアリノベーションの進展過程での専門工事業に関わる個人の「多能工化」は、和歌山市では認めることができなかった。

今後は、リノベーションと地域建設業との関わりについてより多くの情報を集めるとともに、本研究で明らかにした専門工事業者の「多能工化」が発生する条件やプロセスの解明を試みたい。

謝　辞

本研究にあたり、公益財団法人ウエスコ学術振興財団にご支援をいただきました。また、調査にあたり、長野市東町と和歌山市大新地区の建築関係者の皆さまと和歌山大学・佐久間康富さま[注7]、資料整理では岡山県立大学穂苅研究室・平野優斗くんに多大の協力をいただきました。記して感謝します。

脚　注

注 1)日本における現在のリノベーションブームの発生は、1998 年頃とされている[2)]。発生当初は、古い建物をリセットする、すなわち古びた壁を白く塗り直なおすなどして新築時になるべく近い状態に戻すことを意味する見方もあった。しかし近年は、リノベーションを「固定した形態と機能の関係を解き放ち本来の機能とは違う用途を発見する行為」（五十嵐:2001[3)]）として、別の見方や価値観の発見することを意味する見方が主流になっており、この点で、「物理的な改修による機能の再生」を志向するリフォームと異なるとの指摘もある[4)]。

注 2)ヒアリング調査は、2021 年 12 月 13 日に長野市東町にある相手先が代表をつとめる建築設計事務所にて実施した。

注 3)1 件あたりの工事金額が 500 万円未満であれば、軽微の工事として扱われ、建設業許可を取得せずに建設業を営むことができる。

注 4)建設業法が定める建設業の「許可の区分」において、専門工事は 27 の業種に区分されている。

注 5)実施日と場所は、注 2）と同じ。

注 6)ヒアリング調査は、2022 年 3 月 17 日に和歌山市大新地区にある相手先が運営するゲストハウスにて実施した。

注 7)本報告の第 2 章の GSV を用いた調査は、佐久間氏との共同研究として実施した（文献 11)。

参考文献

1)橋本清勇・東樋口護・宗田好史：京都市都心部における伝統的木造建物の維持管理システムの衰退、日本建築学会計画系論文集 67(554)、pp.259-265、2002 年.

2)RENOVATION 1998-2018 and then リノベーションの 20 年とこれからの都市とか建築とか（企画展ブックレット)、アートアンドクラフト、pp.46-47、2018.

3) SSC 監修フリックスタジオ編：東京リノベーション、廣済堂出版、pp.53-54、2001.

4)山崎泰寛・本橋仁編著／勝原基貴・熊谷亮平・吉江俊著：クリティカル・ワード・現代建築-社会を映し出す建築の 100 年史、フィルムアート社、p.280、2022.

5)古き良き未来地図・転、風の公園出版、2021.

6)馬場正尊＋Open A：エリアリノベーション-変化の構造とローカライズ、学芸出版社、pp.188-219、2016.

7)ナガノシティプロモーション・ナガラボ：長野市人物図鑑（https://nagano-citypromotion.com/nagalab/people/)、最終閲覧日 2022/4/20.

8)松村秀一：建築の明日へ－生活者の希望と耕す、平凡社文庫、pp.68-72、2022.

9)松村秀一:「住宅ができる世界」のしくみ、彰国社、pp.16-19、1998.

10)矢吹剣一・西村幸夫・窪田亜矢：歴史的市街地における空き家再生活動に関する研究-長野市善光寺門前町地区を対象として、都市計画論文集 vol.49-1、pp.47-52、2014.

11)穂苅耕介･佐久間康富:Google Street View の Time Machine 機能を用いた生活景の経時的変化の解読、2021 年度日本建築学会大会（東海）学術講演会、2021.9.

12)穂苅耕介:建物とその先の時間も引き受ける 善光寺門前-地域社会と関わる空き家活用モデルの作法（日本都市計画学会都市空間のつくり方研究会編『小さな空間から都市をプランニングする』)、学芸出版社、pp.153-164、2019.

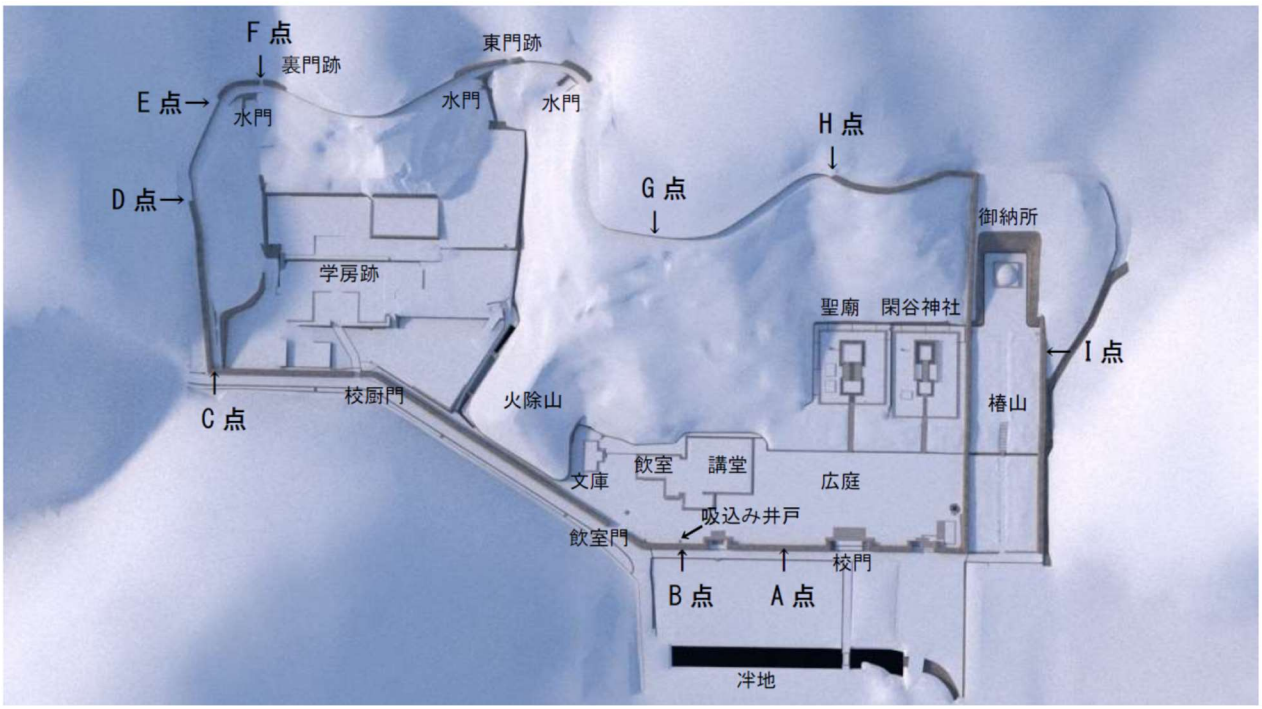
閑谷学校の水利技術と学びの場について-閑谷学校の環境技術に関する研究

岡山県立大学デザイン学部建築学科

向山徹

前年度研究[1]において、地中レーダー探査の結果も踏まえ、閑谷学校構内の雨水の流れが生み出す場所について考察し、自然地形に対して寄り添うように建築が置かれ、それぞれに特徴的な場所が開かれ、それらの場所は、地形の凹凸や石組みの凹凸、表土と岩盤との間を流動する雨水の流れに呼応して現れていることを示した。

今年度は、学びの場としての構内と周囲の自然を凸としての存在で境界付けている石塀・石垣について工法と素材に着目し考察した。南側の蒲鉾型の石塀はそのままの断面形状をほぼ維持しながら東西の斜面を登り、途中から工法・素材・仕上げを変化させながら北側の尾根筋と谷筋を東西に横断し、周辺との間に閉じた境界を形成している。また、東の端には、椿山と東の沢筋との間を境界付ける蒲鉾型の石塀が南側の石塀とは少し趣を変えた表情で南北に築かれている。今回は、石塀のそれぞれの場所における工法・素材の変化に着目し、境界としての様態の変化を探ることを目的とする。今回は、変化しながら連続する石塀・石垣のなかから 9 か所に焦点を当て、写真測量による実測調査およびモデリングによる可視化を行った。(図 1)



(図1) 今年度調査箇所

1－2既往研究と本研究の位置づけ

閑谷学校の石塀に関する資料は、昭和 34 年から 37 年にかけて行われた岡山県教育委員会による保存修理に伴う調査[2]、平成 12 年の同じく岡山県教育委員会による環境整備に伴う確認調査[3]および（公財）特別史跡旧閑谷学校顕彰保存会発刊『閑谷学校研究』に掲載の諸論考[4]による。

本研究では特別史跡の現状維持の原則から、上記調査資料に加え、現地測量・写真測量による 3 次元モデリングによって可視化することとした。さらに石塀周囲の自然環境の目視調査を加え、石塀の境界としての様態の変化を可視化することとした。

2　石塀調査と可視化による考察

今回の調査では、石塀・石垣の高さ・幅・傾斜角度について、ほぼ全域に渡り実測した。その際、石塀内外の植生と地形との関係も目視調査し、石塀の

境界としての様態の変化の要因として考察に加えた。

次に、石塀の形状および地形との関係を写真測量によるテクスチャーデータ・メッシュデータで可視化した。

2-1　A点：広庭に面した蒲鉾型石塀部分

図２がA点の広庭側から見たテクスチャーデータ、図３がそのメッシュデータである。



図２　広庭側テクスチャーデータ

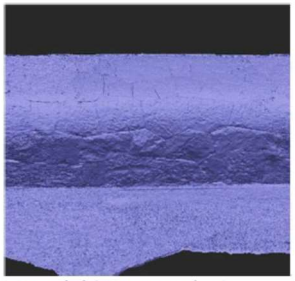


図３　広庭側メッシュデータ

A点は典型的な蒲鉾型石塀で、ほぼ平均して外側の高さ 2000㎜、内側の高さ 1500㎜、幅 1800㎜、傾斜角 0 度でああった。切り石の合端を密着させた切り込みハギといわれる積み方で隙間なくお互いがかみ合うように積まれている。

平成 12 年の発掘調査[3]では深度 1700㎜ 以上の基礎石が確認され、2019 年の弾性波探査による地盤調査からも 1000㎜～2000㎜ の盛り土が広庭側に確認されている。

図２では、基礎石の上に積まれた切り石が塀の地盤下から続き、塀の下層部で土留めとして存在していることが確認できる。

図３では、比較的平滑に切りこまれた幅 700㎜～800㎜ の切り石が中層部に積まれ、その上に、多くのノミの跡が示す曲面に加工された切り石が積まれている。

雑草の存在は皆無であるが地衣類が石の表面に生息する。

2-2 B点：講堂前　吸込井戸が接する蒲鉾型石塀部分

図４はB点の写真測量によるテクスチャーデータ、図５がメッシュデータである。



図４石塀広庭側テクスチャーデータ

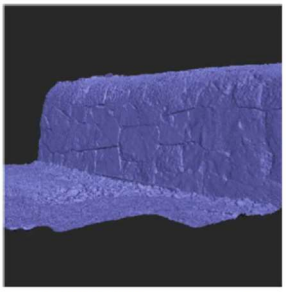


図５石塀広庭側メッシュデータ

前項で示した、下端の石積み、中間の石積み、上端の曲面の石積みによる 3 層構成、特に中間の石の平滑面と上部の曲面部のノミ跡による凹凸面がメッシュデータに鮮明に現れている。平成 12 年の発掘調査[3]の土層断面図に石塀沿いの礫層の存在が示されているが、礫層が広がる形で吸込井戸となり、石塀下の基礎部分に講堂から暗渠を経て雨水が吸い込まれる様態が視覚化されている。

2-3　C点:西端から北へ向きを変える蒲鉾型石塀部分

図６、７はC点の写真測量によるテクスチャーデータ、図８が図 6 のメッシュデータである。



図６見下ろしのテクスチャーデータ

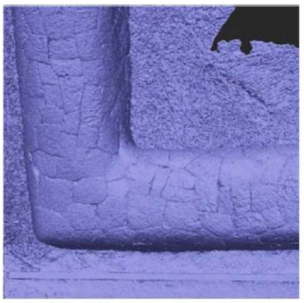


図８見下ろしのメッシュデータ



図７直角に北に向きを変えて傾斜面を上る石塀　テクスチャーデータ

C点は南側石塀が、学房跡を囲うように北に向きを変えて斜面に沿って登る結節点である。学房跡南側の石塀は、A点・B点より経年による石のずれが大きい。高さはA点より 500㎜ ほど低く、天端の傾斜角度は３度～５度と地形に沿って大きくなる。北に向かう石塀は高さが 1000 ㎜～1300㎜、幅はA点とほぼ同じ 1750㎜、傾斜角は 17 度となる。D点まで蒲鉾形状を維持するが、D点までの４分の３ほどのところから切り石ハギの積み方から打ち込みハギの積み方へと徐々に変化する。また、傾斜が急なため、石のずれがA点、B点に比べて少し大きい。この石塀を学房跡側から石垣が２段積まれ、石塀の地盤を支持しているように見える。C点では上部の石が端部において外側にずれている様子が窺える（図７）また、校厨門からC点、D点までは石塀上部に上部

に張り出した周辺樹木の枝に覆われ、コケ類が石塀に繁茂している。

２－４　D点：蒲鉾型石塀が石垣に変化する部分

図９，図１０がD点の見下ろしのテクスチャーデータ、図１１が石垣見上げのメッシュデータである。



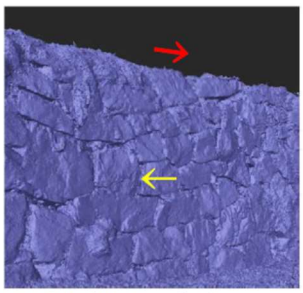


図９見下ろしテクスチャーデータ　図１１見上げメッシュデータ



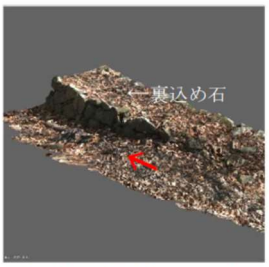
図１０　変化部の斜め見下ろし　テクスチャーデータ

C点から保持されてきた蒲鉾形状は、D点において石垣に切り替わる。石塀が少しずつ地形の傾斜に擦り合わせるように地中に埋もれて（赤→部分）石垣となる（図９，図１０）。また（図１１）をみると、石塀部分から石垣へと切り替わると同時に、石のサイズがひとまわり小さくなっている。このサイズの変化は石塀が終わる手前で始まっており(黄←部分)、石塀の終端と石垣の始端が互いが噛み合うように（赤←と黄→）上下に重なり合っている。D点から東を見ると、学房跡の平地部分の北端とほぼ一致する。

D点では、切り込みハギから蒲鉾形状を変えずに打ち込みハギへと積み方が変化し、傾斜した地盤面に埋もれるように終端を形成しながら次の石垣積へと姿を変え、学房跡の領域と呼応するような様態がみられる。

２－５　E点：石垣が石塀に変化する部分

図１２、図１３はE点の内・外両側からのテクスチャーデータ、図１４が正面からのメッシュデータである。



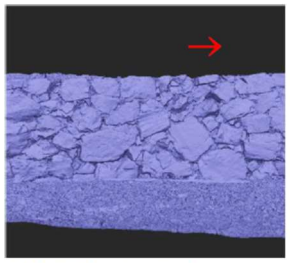


図１２外側テクスチャーデータ　図１４内側メッシュデータ

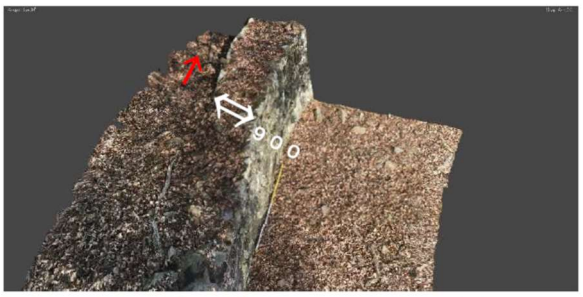


図１３　変化部の内側からの斜め見下ろし　テクスチャーデータ

D点から打ち込みハギによる石垣に切り変わり、さらに地形が谷筋にかかり下り斜面になるに従い、石積の工法は変化せずに、内・外両側が打ち込みハギによる石塀へと切り替わる（赤→部分）。そのまま上端の幅を 900㎜～1800㎜ へと広げながらＦ点の裏門跡へとカーブを描きながら谷を下る。上端は枯葉で覆われているが、内側に積まれた裏込め　石が露出する。

２－６　Ｆ点：石塀に開口が開けらた裏門跡部分

図１５は裏門跡北側から、図１６は上からのテクスチャデータ、図１７は裏門跡南側メッシュデータである。



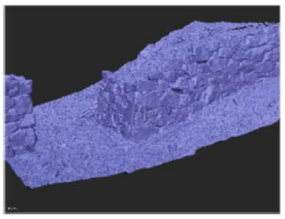


図１５　北側テクスチャーデータ　図１７南側メッシュデータ

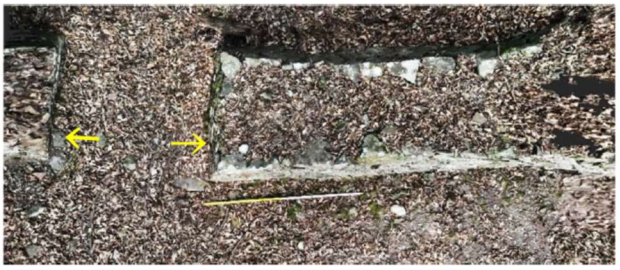


図１６　上から見下ろし　テクスチャーデータ

Ｆ点において、裏門跡の２m強の幅で一度石塀が途切れ、そのまま北側（山側）の石積みは斜面の中に消えてゆき、南側（学房跡側）の石積みはそのまま尾根筋に沿って斜面を登る。今回の調査では写真測量を行っていない部分であるが、Ｅ点からＦ点への同様の様態変化が、東門跡付近にも見られ、二つの谷筋における排水機能を併せ持つ石塀としての様態を確認することができた。前年度研究[1]でも示したが、二つの門跡付近には、雨水排水の水門遺構も併設され、学房跡を水害から防いでいた。

２－７　G点：講堂裏手の石垣部分

図１８は、講堂裏手の尾根筋の石垣見下ろしテクスチャーデータ、図１９が南側正面のメッシュデータである。



図１８見下ろしテクスチャーデータ

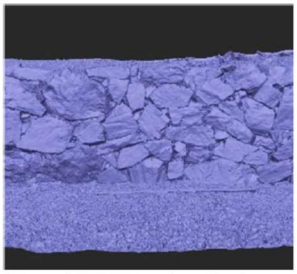


図１９南側正面メッシュデータ

火除山と講堂の裏手は大きな尾根筋であり、等高線沿いに石垣が積まれ、山側には火成岩の岩盤が顔を覗かせている。北側の雑木林と、講堂の後背地として手入れされた山芝による傾斜面。大小の石による打ち込みハギの石垣には、ふたつの対照的な領域を緩やかに繋ぐ境界としての様態がみられる。

２－８H点：石垣が蒲鉾型石塀に変化する部分

図２０、２１は聖廟と山側のテクスチャーデータ、図２２は石垣の西側からのメッシュデータである。

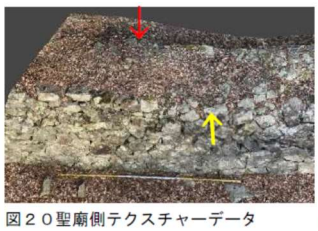


図２０聖廟側テクスチャーデータ

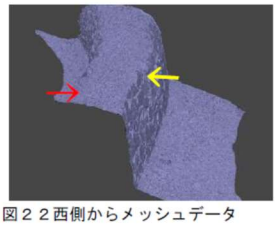


図２２西側からメッシュデータ

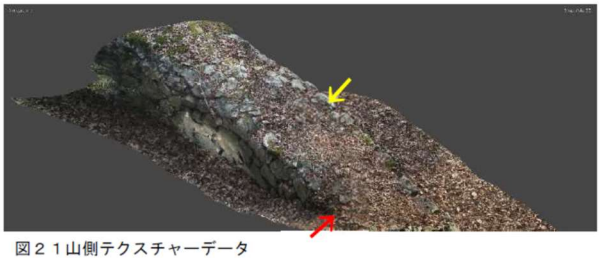


図２１山側テクスチャーデータ

Ｇ点において、講堂裏手から続く石垣が、聖廟裏手で蒲鉾型石塀に切り替わる。図中（赤→）は蒲鉾型石塀が山側で地中に消える箇所、図中（黄→）は聖廟側の石垣が蒲鉾型石塀に切り替わる箇所を示している。

蒲鉾型石塀は閑谷神社裏手あたりから打ち込みハギの積み方から、少しづつ切り込みハギに変化し、御納所との境界まで５分の４ほど進んだ箇所で、完全に切り込みハギの積み方に切り替わる。聖廟と閑谷神社の領域のみならず、御納所の領域とも呼応する様態が見られる。

２－９　Ｉ点：椿山東端の蒲鉾型石塀部分

図２３は、椿山側からのテクスチャーデータ、図２４は椿山側からのメッシュデータである。



図２３　椿山側テクスチャーデータ

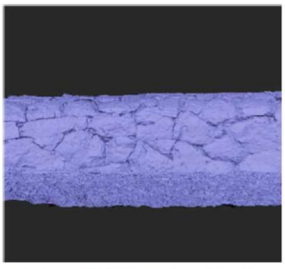


図２４　椿山側メッシュデータ

御納所に向かう椿山東側の蒲鉾型石塀は、隣に流れる河川との境界でもある。椿山側の高さが 1100 ㎜、天端の幅 1600 ㎜、河川側は川床まで連続した石垣となっている。共に打ち込みハギにより、椿山側は椿の林の中に静かに横たわる自然石の境界の様態、河川側は北西から流れる川の水を受け流す末広がりの断面を形成し、高さが深いところで 2700 ㎜にもなるダイナミックな石積みとしての様態がみられる。

３　まとめ

本稿では、閑谷学校の石塀・石垣が、構内の諸領域と周辺の自然環境とに寄り添う様態を、それぞれの場所ごとにつくりだしていることを示した。

石の積み方・加工の方法・寸法が、場所の移り変わりを鋭敏に感じとりながら、次へと引き渡すしなやかな所作として紡がれている。自然から発せられる言葉を素直に受け入れ、ひとつひとつ丁寧に教えを心と体の中に積み上げてゆく「学びの場」のかたちを、閑谷の石の技術の中に垣間見ることができたように思う。

注

1. 向山徹、河田智成「閑谷学校における雨水の流れによる場所の現れについて一閑谷学校の環境技術について２」2021 年度日本建築学会大会研究発表梗概集、NO9044。
2. 『特別史跡並びに重要文化財「閑谷學聖廟、閑谷神社々殿及び石塀保存修理（第二期）工事報告書』岡山県教育委員会、1962 年、12～13 頁（(三)閑谷學石塀）、14～15 頁（第五節修理前の破損状況）、写真 1 （石塀）。
3. 『特別史跡旧閑谷学校保存管理計画書』岡山県教育委員会、2010 年、164～174 頁。
4. 『閑谷学校研究』(財特別史跡旧閑谷学校顕彰保存会、第 7 号、71～74 頁(廣井弘「石塀に想う」)。同 16 号、45～52 頁（北脇義友「閑谷学校の石工技術について」)。同 25 号、77～87 頁（野瀬重人「閑谷学校の石塀を語る」。）

図版出典

1-24.　2022 年 1 月研究協力者作成。

本研究は（公財）ウエスコ学術振興財団の助成を受けて実施いたしました。ここに記して感謝申し上げます。

家庭で発生する食品廃棄物の不可食部による布帛への染色

岡山県立大学　デザイン学部

岡本　汐加

テキスタイル・繊維産業は、石油産業に次ぐ環境汚染産業といわれている。近年、環境問題に対する関心の高まりから、デザイン分野においても廃棄部分を再利用した製品が多く提案されており、染色においては、天然染料・植物染料による染色が再認識されている。しかしながら、特定の色合いや機能性を求めることで、特定の原料の購入・消費に結びついてしまい、本来の意識から矛盾したケースが見受けられる。本研究では、家庭で発生する食品廃棄物の不可食部による布帛への染色実験を行い、本来ならばゴミとして処分される物から、どのような色が抽出されて繊維へ染め付けることが出来るのかを明らかにすることを目的として実験を行った。特定の材料を染料として調達することなく、幅広い色彩を得られることを実践により明らかにし、染色作品を制作、展覧会への出展を通して実験成果を公にした。

1　背景

テキスタイル・繊維産業は、かねてより環境への影響が問題視されている業界であり、石油産業に次いで世界で 2 番目の環境汚染産業である。工業用水汚染の約 20%が繊維製品の染色と仕上げによるものだとの推定や、米国では 85％の繊維製品が破棄されているなど、深刻な現状が数値で明らかになっている。環境問題に対する関心から、デザイン分野ではアップサイクル製品や SDGs に根ざしたアイデア等が数多く提案されているほか、製造サイドでも、廃棄される生地の再利用、生地製造過程での環境負荷軽減など、既存のシステムを一新させるような取組みが企業や団体で実施されている。消費者には「環境や人にやさしい」とされるオーガニック製品や手作業による製品を購入・使用することに価値を見出す者が増加している。このような大小の動向から、産業の間に立つデザイナーや作家の環境に対する意識も高まっており、染色においては、天然染料の植物染料による染色が再認識されている。これは、植物等を煮出し、抽出した色素によって繊維を染色しており、化学染料が開発される以前はこの方法により染色されていた。現代においては、プラントベースであること、環境や身体に優しいイメージ、深みのある風合いといった特徴から一定の支持があり、家庭環境で染色する者も多数存在する。しかし、特定の色を求めるためには特定の材料を大量消費する必要があり、自然配慮のイメージとは逆の行為につながることがある。例えば、タマネギの皮から抽出される色素を求めるために、大量のタマネギを消費する、といった行為が例として挙げられる。また、自然由来であるため染色が安定しないことや、経年や日光による退色といった機能的な問題を解決するために、薬品が使用されることも多い。

このように植物染料による染色への関心が高まる中、本研究では従来型の方法に疑問を投げかけ、家庭で必然的に発生してしまう野菜等の皮や屑といった不可食部を煮出して染色を行い、上記のような矛盾した状況から脱した方法で幅広い色彩を得られることを明らかにする。

2　方法

大量の食品廃棄物の有効活用ではなく、家庭環境での染色に着目する。一般的な食品廃棄物による染色は、例えばタマネギやアボカド、ザクロといった、植物毎に色素抽出して赤・ピンク・黄色など特定の色合いを求めるものである。本研究の染色方法は、特定の原料の大量消費に結びつかないよう、発生した食品廃棄物(野菜等の不可食部)を分類せずにまとめて色素抽出する。具体的には、一般的な家庭の例として筆者の自宅で発生する食品廃棄物を用いて染

色することとし、一定の期間を定めて食品廃棄物を収集･保存し色素抽出～染色を繰り返すことにより、幅広い色彩を取得していく。本研究のため植物性の食生活を実践することとし、廃棄物が野菜等に限定されることから、染色方法自体は従来の天然染料による染色方法を基本として実験を行う。「本来ならばゴミ」からどのような色を求めることができるのかを明らかにするため、堅牢度の向上や他の機能に関した調査は本研究では含めない。季節や状況により、食品廃棄物の分量や含有物割合に違いが生まれ、幅広い色合いが期待できるため、約１年間継続して同素材の布帛へ染色する。

３　実験内容

（１）事前調査

食品廃棄物の不可食部による染色を行うために、天然染料による染色方法について確認した。国内で使用される教本の多くは四半世紀～半世紀前から内容が変わっていないものが多数で、材料の販売業者も限られている為、近年の欧米圏での出版物を参考にした。本研究では主として、筆者が実際に参加し実体験したこともあり、2019 年夏にオランダ･ティルブルフで実施された天然染料によるワークショップで引用されていた実践本「The Art and Science of Natural Dyes」(2018, Boutrup)で示された手法を主に引用することとした。

染色方法として一般的であるのは、①染料となる植物等を乾燥させ粉末状にして準備、②①を湯で煮混み色素を抽出し染液を作成、③媒染液を作成、④繊維を②に浸し煮込む、⑤④の繊維を③に浸し媒染処理をするという手順である。これは染色後に媒染液に浸す「後媒染」であり、④と⑤が入れ替わることで「先媒染」となる。媒染は植物の色素を繊維に定着させるための工程であり、媒染剤として金属系の物質を使用する。代表的なものとして、アルミと鉄が用いられており、クロムや銅等他の金属系物質と異なり、入手・廃棄が容易とされている。一部媒染を必要としない植物もあるが、安定した染色に必要な工程であり、金属の重さによって発色が異なるため幅広い色彩を求めることができる。

（２）サンプル作成

布帛への染色は長期的に継続して行い、先述のとおり色素抽出は野菜・果物等の植物系の食品廃棄物に限定、１週間毎に収集・保存し１回分として染色することとした。(約１年間の継続で合計約５５回分となる）まず冒頭約１ヶ月(５週間分＝５回分)は１年間継続して染色する方法を決定するためのサンプル作成の期間とした（図１)。

主たる内容として、

①素材検討：コットン・ウール・シルク３種の平織代表的な繊維に対して染色し比較

②媒染方法検討:植物染料による染色方法で代表的な媒染方法であるアルミ媒染、鉄媒染を用い、媒染のタイミングでの染色結果を比較

工程は以下とし事前調査の内容を踏襲している。

(1) 染液抽出：煮込[2L の湯約 80°C, ２時間]

(2) 染色：布帛煮込[(2)の染液約 80°C, ２時間]

(3) 先媒染［アルミ媒染１晩, 鉄媒染約１分]

後媒染［アルミ媒染３分, 鉄媒染約１分]

各週の変遷は次のとおりである。

１週目：アルミ(先媒染, 後媒染), 鉄(後媒染)

２週目：アルミ(先媒染, 後媒染, 同時媒染, 後媒染), 鉄(後媒染, 先媒染)

＞アルミ後媒染にムラがみられた為、染液で煮込む際媒染剤を加える同時媒染、後媒染加熱を追加

３週目：２週目と同様

４週目：アルミ(先媒染, 後媒染, 後媒染), 鉄(後媒染, 先媒染, 同時媒染)

＞同時媒染はムラが激しいため削除し、逆に鉄の同時媒染を追加

５週目：４週目と同様

以上のサンプル作成から、次のことが分かった。

- アルミ後媒染は色が洗い流されているように見え、アルミ媒染特有の明るさが感じられない。
- アルミ媒染同様、鉄媒染同時加熱はムラがある。
- 鉄先媒染は後媒染より淡く、ムラが少しある。
- 中厚手コットン布帛は淡くしか染まらないため、一晩タンニン液(水にタンニン酸 20%混入)に浸けた薄手を追加し、ウール・シルクと同程度の濃度で染色することができた。



図１　サンプル一覧

（３）実験１ 浸染による染色

（２）サンプル作成の結果から、次の工程・媒染方法・素材で１週間毎の野菜等不可食部の食品廃棄物を材料とし､約１年間分を染色していくこととした。

(1) 染料準備［乾燥，粉砕］（図２）

(2) 各種布帛精錬

(3) 染液抽出：染料煮込[2L の湯約 80°C，２時間]

(4) 染色：布帛煮込[(2)の染液約 80°C，２時間]

(5) 後媒染［アルミ媒染液３分，鉄媒染約１分］

媒染:アルミ[水 100，明晩 12，酢酸ナトリウム 10]

鉄[水 100，硫酸鉄 2，酢酸ナトリウム 2]

素材：平織布帛４種［コットン(中厚手)，コットン(薄手/タンニン漬)，ウール，シルク］

全ての染色結果は週毎にカラーサンプルのようにしてまとめ、色彩を比較できるようにした（図３）。また色彩をアーカイブするために、Datacolor 社の ColorReader を使用し画面上の色彩とも比較できるようにした（図４）。



図２　染料準備(乾燥後、粉砕後) 10 週目分

図３、図４ともに、列は左から媒染方法：媒染なし、アルミ媒染、鉄媒染、行は上から素材別：コットン(薄手，タンニン漬)、コットン(中厚手)、ウール、シルクである。

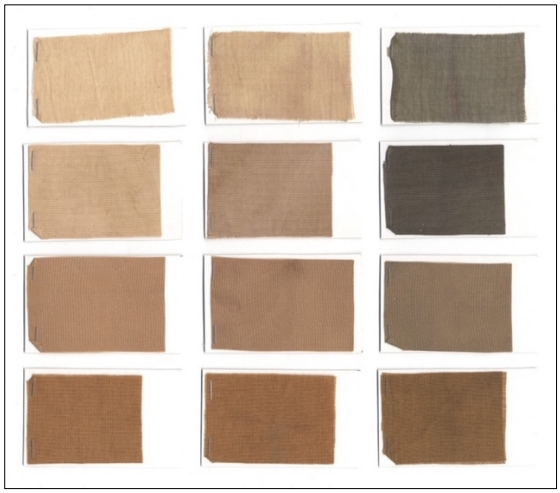


図３　染色結果 10 週目分

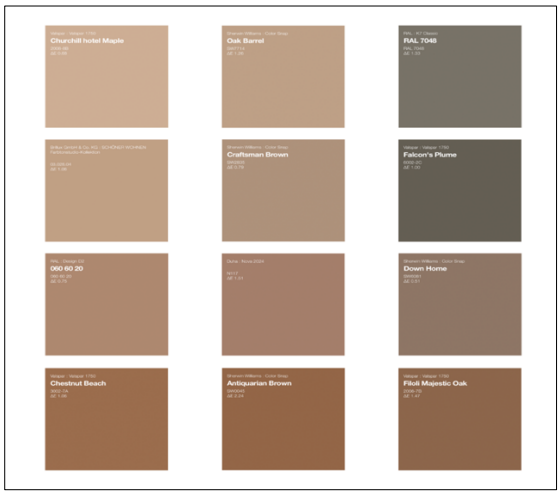


図４　染色結果デジタル化 10 週目分



図５　染色結果 26 週目分

週毎に染料として用いる廃棄物の分量と内容が異なるため、媒染と組み合わせて多くの色彩を求めることができた。サンプル制作時と同様、媒染なしとアルミ媒染とでは大きな色彩変化がみられないことが多いが、図5のように内容によって変化がみられることもあった。鉄媒染は総じて色彩変化が大きく、茶系から黒系になるが、動物系繊維がより黒くなる場合、コットンがより黒くなる場合と、その変化にはばらつきがあった。総じてウールがムラなく、かつ濃色に染まるという傾向も明らかになった。

(4) 実験2 捺染による染色

(3)での浸染と対比して、部分的に染色する捺染(模様染め)について実験を行った。まず全体を浸染し、次に部分的に媒染剤を混ぜた捺染糊を塗布することで色差を生み出す手法とした。今回の捺染では浸染時の残として蓄積していた染液を使用し、色素を最大限生かすようにした。布帛の素材は(3)の結果から、ウールを使用することとした。媒染剤を混ぜた捺染糊の効果と色彩の違いを比較するため、次の3種で浸染(地染め)した布帛を準備した。

①布全体を食品廃棄物の染液で染色
②布全体を同染液で染色後、鉄媒染液に浸す
③布全体をタンニン液(水にタンニン酸20%混入)に一晩浸し、鉄媒染液に浸し、同染液で染色

先述のように、部分的に染色し模様をつくりだすことを目的としている捺染では、大きな色彩変化がみられないアルミ媒染の捺染糊は作成せず、鉄媒染に焦点をあてることとした。加えて、今回は地染めしていることから、部分的に色を取り除く抜染糊も準備した。捺染糊作成方法は(1)事前調査で述べたBoutrup著の実践本を参考にし、結果を比較した。

鉄媒染糊：
1 [硫酸鉄2, 酢酸ナトリウム2, 水94, グアガム2]
2 [硫酸鉄2, 酢酸ナトリウム2, 水20, メイプロガム糊(水と9:1で混合したもの)100]
3 [硫酸鉄7.5, ソーダ灰3.7, 水150, グアガム3]
4 [硫酸鉄7.5, ソーダ灰3.7, メイプロガム糊100, 水50]
5 [硫酸鉄7.5, ソーダ灰3.7, 酢150, グアガム3]

抜染糊：
1 [クエン酸20, 水20, メイプロガム糊100]
2 [クエン酸5, 水20, メイプロガム糊100]
3 [クエン酸2, 水20, メイプロガム糊100]

浸染後の各工程は以下のとおりである。

(1) 捺染糊塗布、乾燥
(2) スチーミング [約100℃、30分]
(3) 水洗

図6のように、鉄媒染捺染糊の比較ではメイプロガム糊で増粘させ調合した2と4は効果が薄かった。グアガムで増粘させ調合した1、3、5はいずれもしっかりと染色されているが、鉄媒染で地染めを終えている②の布帛に対しては若干淡い。1がもっともシャープに染め付けられているように見える。

図7左部分のように、抜染糊は濃度別に作成、クエン酸の濃度が高いほどしっかり抜染できている。効果として、②に対してしっかりと脱色できることが分かった。一方、③についてはわずかに効果がわかる程度、①については全く効果がなかった。

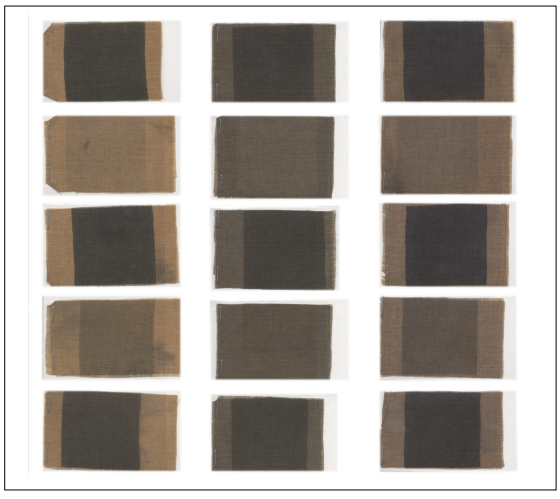


図6　媒染糊捺染結果
[左から浸染①, ②, ③、上から捺染糊1, 2, 3, 4, 5]

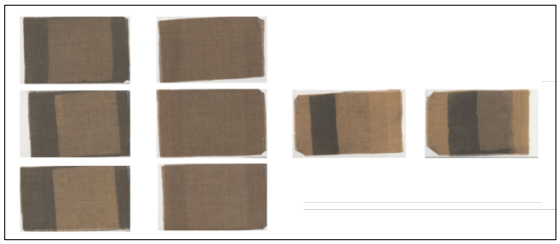


図7　抜染糊捺染結果
[左2列:左から浸染②, ③、上から抜染糊1, 2, 3
右2列:共に浸染②、左から抜染糊を先, 後に捺染]

各捺染糊を重ねた場合の効果については、①に捺染し比較した。図 7 右部分のように、鉄媒染糊を重ねた部分が濃色になるということはなく、防染効果が働き、先に捺染した方の色付きが優先された。抜染糊と鉄媒染糊を重ねた場合も同様にして、先に抜染糊を捺染した方が効果あり、後に捺染した場合は鉄媒染部分がトーンダウンしたような効果となった。抜染糊は地染め部分に対し効果がなく、鉄媒染部分に効果があることが分かった。

4　作品制作

これまでの実験内容を通して、染色技法を組み合わせて染色作品を制作した。

A 浸染・捺染

食品廃棄物をから抽出した染液で浸染したのち、捺染糊をヘラで塗り付けて染色した。(4)で作成した 3 種の地染め方法を応用し、図 8 右から①布全体を染色-布全体を鉄媒染液に浸す-捺染糊(脱色)で部分的に鉄媒染を除去、②布全体を染色-捺染糊(鉄媒染)を部分的に塗り重ね、③布全体をタンニン液に 1 晩浸す-布全体を鉄媒染液に浸す-布全体を染色-捺染糊(鉄媒染)を部分的に塗り重ねることで模様を作成した(図 9)。



図 8　浸染・染色を組み合わせた例

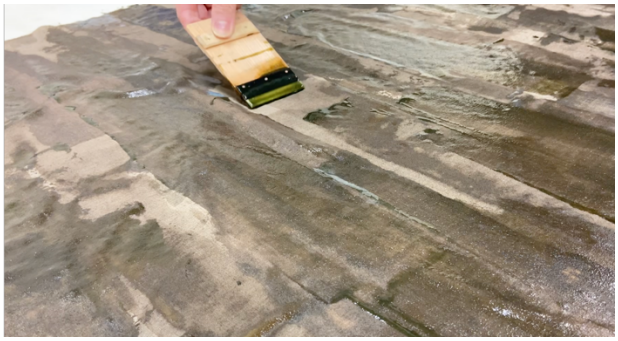


図 9　捺染糊をヘラで塗っている様子

B 浸染・捺染・スクリーン捺染

A の方法に加え、スクリーン捺染を組み合わせることで、シャープな線を組み合わせた作品を制作することができた。図 10 右から、①布全体を染色-捺染糊(鉄媒染)を部分的に塗り重ねる、②布全体を染色-布全体を鉄媒染液に浸す-捺染糊(鉄媒染)を部分的に塗り重ねる-捺染糊(脱色)で部分的に抜染することで模様を作成した。

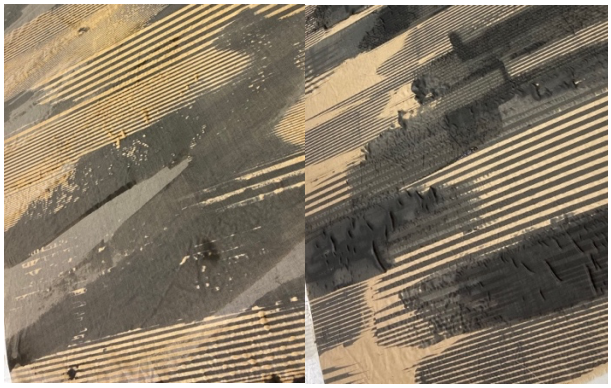


図 10　スクリーン捺染を組み合わせた例

研究発表

A の③はパネル張りにし、染に特化した展覧会「SQUARE 染 textile 8」(2022 年 3 月 14 日―19 日、東京都中央区京橋 3-9-2-4F ギャラリー檜 e・F)に出展し(図 11)、実物展示および制作プロセスに関する動画を公開した(図 12)。



図 11　展覧会会場風景

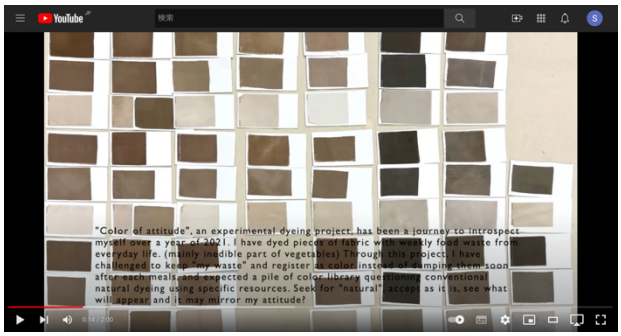


図 12　動画公開画面(YouTube)

5　結果

家庭で発生する食品廃棄物を用いて、特定の材料を染料として調達することなく、幅広い色彩を得られることが明らかになった。本研究では、色素抽出のための材料は複数の植物（野菜等）が混在した状態としたが、従来の植物染料を用いた染色と同様、媒染にともなう色合いの変化が見られた。浸染、捺染ともに媒染効果がみられ、技法を組み合わせることも可能であった。「家庭で発生する食品廃棄物を用いて染色する」という行為に焦点を当てた本研究を通して取得できた色合いは全体的を通して茶系であり、赤・紫・青など特定の色彩を求める場合は、従来通り特定の材料から色素抽出する必要がある。

環境への配慮が研究背景である以上、表現や染色を目的とするために廃棄物を増やすことはあってはならない。本来は食品廃棄物を減らすことが第一であり、本研究では故意に廃棄物を増やすようなことはしていない。研究期間を通して新たに明るみになったのは、一般的な小売店（スーパーマーケット等）で販売されている状態で入手した場合、特定の野菜等の不可食部の量が顕著であることである。例えばリンゴの皮、根野菜の皮等とは異なり、バナナの皮、アボカドの皮、玉ねぎの皮等は、ハードな繊維質であり食すことができないため、皮を剥かれた状態で入手しない限り廃棄物を生み出してしまうのである。

実際、本研究で取得した廃棄物の多くは上記の品目が占め、これらの繊維質は、色素抽出後・染色後も廃棄物として残った。しかし幾度もの加熱処理を経て原型を留めない土状になっており、腐葉土と１：１で混ぜ合わせ、土として使用できた(図 13)。最終的に、新たな植物のサイクルをつくることができた。



図 13　混合土から発芽した植物

6　展開

まず、捺染方法については更なる組み合わせ、捺染糊の調合方法を探求することができると考えられる。本研究の捺染では、地染めした布帛に対して部分的に媒染糊や抜染糊を捺染することで染め分けたが、染料と媒染剤を混ぜ合わせた捺染糊を作成することで、白地の布帛に対する直接捺染も可能である。

今回の実験結果は作品制作へと展開し展覧会を通じて公にすることができたが、実際に繊維への染着が可能であるということから、テキスタイルデザインとして繊維製品への展開も可能であると考えられる。一方、製品の過剰生産および在庫処分そのものが環境問題に抵触するため、実行に際しては熟考すべきである。今回の研究を通して、通常であればそのまま廃棄される運命にある物体が染色材料として使用できることが明らかとなり、廃棄物の新たな活路を染色という身近な手段から見出すことができたといえる。研究機関を通し、わずかな廃棄物からも色素が抽出できるという事実を体感し、筆者のライフスタイルの価値観にも大いに影響を与えた。社会情勢や現代文化の反映を創作源とする作家による作品制作においても材料ロスは問題視すべき課題であり、既存物を活用した創作は今後スタンダードになる可能性が高いと考える。

本研究を通して付随的に明らかになったこととして、一般的な小売店で販売されている状態で入手する特定の野菜等が、他の野菜等と比べて多量の不可食部を有し、家庭の食品廃棄物量を増加させているという事実である。これらの品目に対しては産業レベルで課題検討されるべきであり、本研究の観点だと粉末染料として展開することができると考える。

7　参考文献

Boutrup, J., & Ellis, C. (2018). The art and science of natural dyes: Principles, experiments, and results. Schiffer Publishing, Limited.

銀河中心方向から飛来する軽い暗黒物質検出の理論的研究

岡山理科大学　理学部　物理学科

長尾　桂子

（概要）

暗黒物質は宇宙に存在する未解明の物質であり、その正体は未発見の素粒子ではないかと考えられている。近年、暗黒物質粒子がこれまでの想定よりも軽いのではないかと予想されるようになった。この場合、私達の住んでいる銀河系の中心の方向から特に多くの暗黒物質粒子が地球に飛来する。現在主流である暗黒物質の検出実験では方向情報をとらえることができないが、研究開発が進んでいる「方向情報を検出できる検出器」では、銀河系の中心から多く飛来するという軽い暗黒物質粒子の特徴を捉えることができる可能性が高い。本研究では、方向情報を検出できる暗黒物質の検出実験において、銀河系の中心方向から飛来するという特徴を捉えることができるかを、数値シミュレーションから解析した。その結果、暗黒物質の銀河系内での分布モデルによらず、銀河系の中心方向から暗黒物質が多く飛来するという特徴が見られることがわかった。また、暗黒物質粒子の質量によって、方向的特徴が顕著に現れるエネルギー範囲が存在することや、それらを更に正確にシミュレーションするための理論的課題が明らかになった。

（本文）

1．研究の背景

宇宙に存在する暗黒物質は、様々な観測結果から存在が示されているものの、その正体についてはいまだに明らかになっていない謎の物質である。一方で、我々の身の回りにある普通の物質の約５倍、宇宙に存在しているため、宇宙の解明のためにはその正体を探ることが非常に重要である。数十年もの間、宇宙から地球に飛来する暗黒物質を捉える検出実験（以下、直接検出実験）が行われてきたが、いまだに明確な検出には至っていない。この結果を受けて、暗黒物質粒子の質量は、これまで想定されていた数100 GeV（およそ 10^{-25} kg）よりも軽いのではないかと考えられるようになった。暗黒物質粒子の質量が1 GeV（およそ 10^{-23}kg）より軽い場合、宇宙空間で暗黒物質が宇宙線と衝突して加速される現象が起き、速いスピードで地球に飛来すると考えられる（図１）。このような加速現象は、暗黒物質や宇宙線が多く存在する銀河系の中心方向で多く起こるはずである。また、加速現象を考慮することによって、これまで検出が難しいと考えられていた軽い暗黒物質粒子の検証が可能になる点でも興味深い。このような方向の情報が重要な現象の解明に適していると考えられるのが、方向情報を検出できる暗黒物質の直接検出実験である。従来の直接検出実験では暗黒物質の飛来方向を検出することができないが、現在研究開発が進み、実験が遂行されている「方向情報を検出できる検出器」を用いることで加速現象を伴う暗黒物質の検証ができると期待できる。そのため本研究では、方向情報を検出できる検出実験における、宇宙線との衝突によって加速される暗黒物質の検証をシミュレーションし、その検出信号の特徴を調べた。

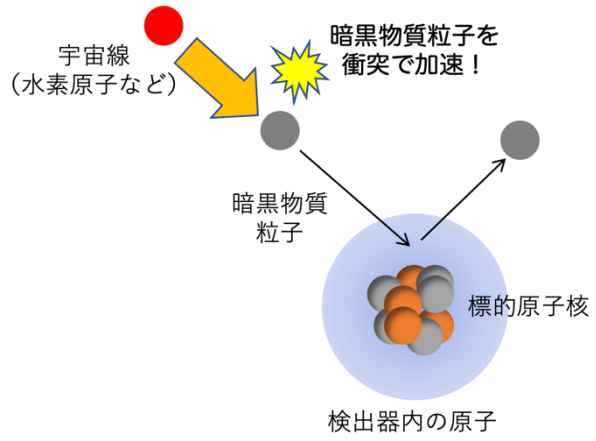


図１：銀河系の中心方向などで宇宙線に衝突して加速された暗黒物質が、地球上の検出器に飛来する。

2．研究の手法と結果

暗黒物質が銀河系でどのような分布をしているかは諸説あるが、本研究では主流と考えられる３つの分布モデルを採用し、そのそれぞれの場合に地球に飛来する暗黒物質の方向分布をシミュレーションした（図２）。いずれの場合も、銀河系の中心方向に対応する図中央から多くの暗黒物質粒子が飛来することがわかる。また、直接検出実験では、暗黒物質が検出器中の原子核と衝突して、蹴り出された原子核を検出することによって暗黒物質を検出する。その

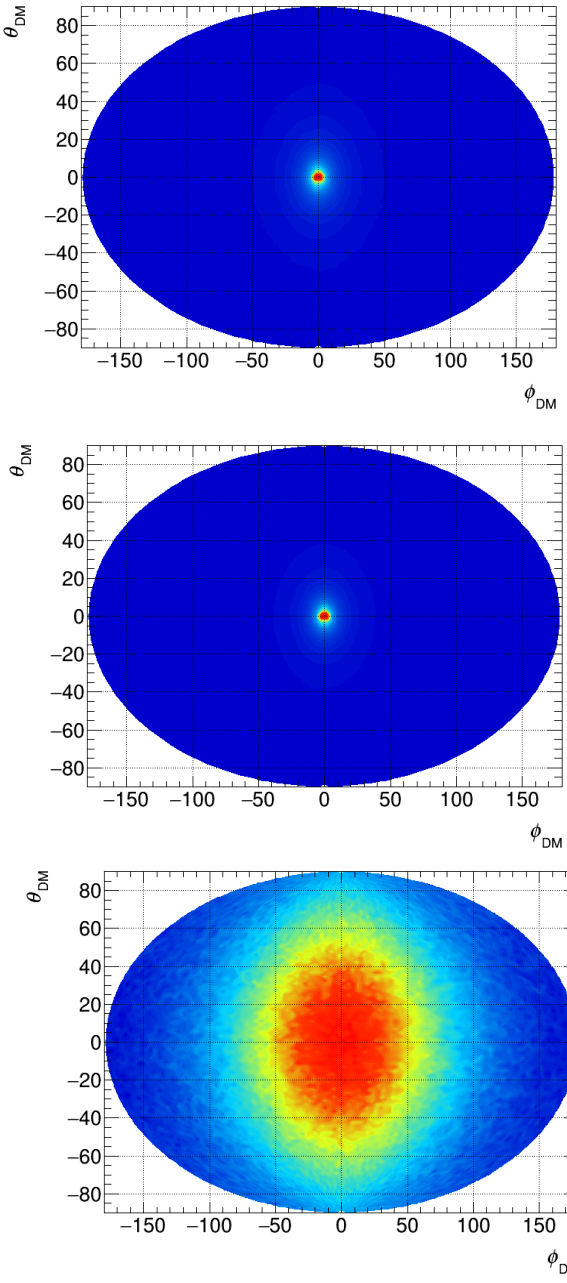


図２：銀河系における３種類の暗黒物質分布モデルである、NFW プロファイル（上）、Einasto プロファイル（中）、擬アイソサーマルプロファイル（下）を想定した場合に地球に飛来する暗黒物質の角度分布図。赤く示された部分が飛来量の多い方向で、いずれの場合にも、図中央に対応する銀河系の中心方向から暗黒物質粒子の飛来量が多い。

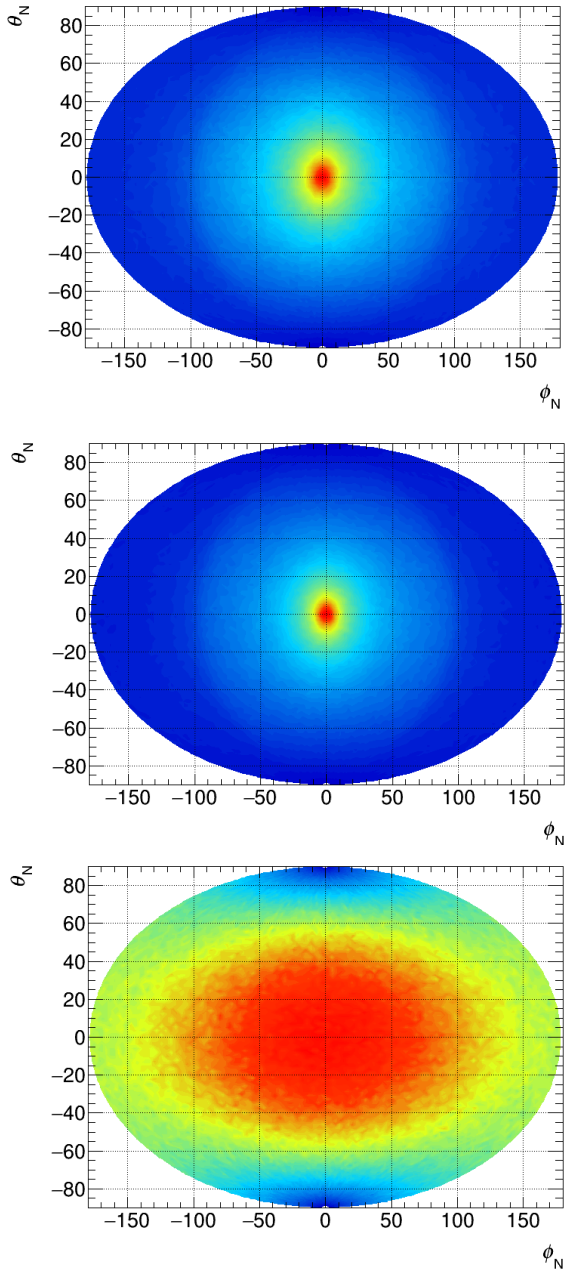


図３：図２と同様に、 NFW プロファイル（上）、Einasto プロファイル（中）、擬アイソサーマルプロファイル（下）を想定した場合に方向情報を検出できる検出器における標的原子核の角度分布図。暗黒物質の飛来（図２）に比べて銀河中心方向への検出信号の集中は衰えるが、やはりいずれの場合も銀河中心方向からの検出信号が顕著である。

ため、検出器中で暗黒物質によって蹴り出される原子核の方向もシミュレーションした。図３に、蹴り出された原子核による検出信号の方向分布を示す。暗黒物質粒子の飛来に比べると銀河中心方向の信号の集中は低下するが、いずれの密度分布を仮定した場合も銀河中心方向からの信号が顕著に多いことがわかる。図２・図３はどちらも、神戸大学が中心となって行っている方向情報を検出できる検出実験である、NEWAGE 実験を想定したシミュレーション結果である。

また、検出器で検出される、暗黒物質粒子によって蹴り出された原子核のエネルギー帯ごとの角度分布のシミュレーションを行い、その特徴を各場合について明らかにした。一例を、図４に示す。各図は、

- 図４上：神戸大学が中心になって行っている NEWAGE 実験で、暗黒物質粒子の質量が 0.01 GeV の場合
- 図４下：名古屋大学と東邦大学が中心となって行っている NEWSdm 実験で暗黒物質粒子の質量が 10^{-4} GeV の場合

を想定したシミュレーション結果である。想定する直接検出実験や暗黒物質粒子の質量によって、銀河中心方向から飛来する暗黒物質粒子の方向的特徴が見えやすいエネルギー帯が異なることがわかる。そのため、実験で得られるエネルギー帯ごとの角度分布から、暗黒物質の質量の情報を得ることができる可能性も明らかになった。

暗黒物質粒子のエネルギーが非常に高い信号は、暗黒物質粒子と標的原子核の衝突が弾性散乱として扱えないため、これらの図には記載していない。しかし実際は、高いエネルギーをもつ暗黒物質粒子も飛来するため、そのような信号の理論的な扱いを今後精査する必要があることもわかった。これらの研究結果は現在、論文にまとめ、投稿準備中である。

３．謝辞

本研究のきっかけともなった前研究［参考文献 1］に引き続き、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、科研費基盤（A）18H03699、（C）21K03562、（C）21K03583、岡山工学振興会の助成も受けております。

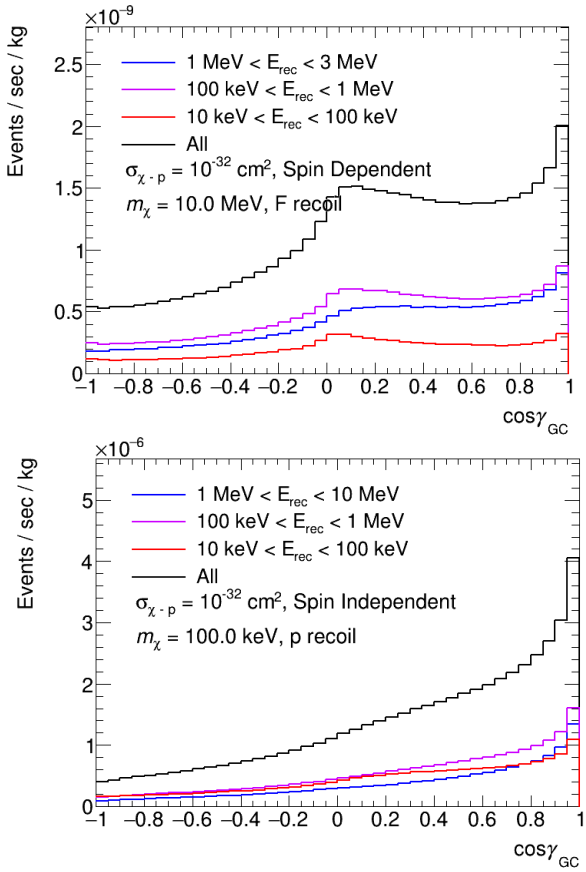


図４：実験で得られると予想される信号数を、角度分布として示したもの。NEWAGE 実験で暗黒物質の質量が 0.01 GeV の場合（上）、NEWSdm 実験で暗黒物質粒子の質量が 10-4 GeV の場合（下）。横軸は標的原子核が蹴飛ばされる角度を表しており、右端が銀河中心方向からの信号に対応している。

[参考文献]

1. Keiko I. Nagao, Tomonori Ikeda, Ryota Yakabe, Tatsuhiro Naka, Kentaro Miuchi, “Discrimination of anisotropy in dark matter velocity distribution with directional detectors”,
Phys.Dark Univ. 27 (2020) 100426

森林散策と都市散策における尿中タンパク質と脂質の酸化修飾バイオマーカーの比較研究

岡山理科大学　理学部　生物化学科

汪　達紘

（概要）緑地環境の多い地域で生活している人々は心血管代謝疾患や高脂血症などの疾病のリスクの低下が報告され、森林環境の健康増進に対する有用性が示唆された。しかし、そのメカニズムについては不明である。本研究は，昨年度に続き本年度でも森林または都市の散策後に、脂質過酸化マーカーである Hexanoyl-lysine (HEL)とタンパク質酸化マーカーである Dityrosine (DT)の尿中レベルがどのように変動するのかを検討することを目的とし、2021 年に 20 代の成人 8 名を対象に、森林・都市散策をそれぞれ 2 時間実施した。散策の前及び翌日に、参加者の随時尿を採取し、尿中 HEL と DT を競合 ELISA 法を用いて定量した。その結果、森林・都市での散策後は尿中 HEL および DT の濃度がともに微増傾向が見られたが、統計的に有意な差異は認められなかった。今後、研究の対象者数を増やして再現性の検証が必要であると考える。また、環境気中のフィトンチッド濃度については、森林内では 2ppb のβ-ピネンのみが検出されたが、ほかのフィトンチッド成分は検出されなかった。一方、都市部に気中フィトンチッド成分が検出されなかった。

「緒言」

緑地環境の多い地域で生活している人々は心血管代謝疾患、高脂血症、精神疾患などの疾病のリスクの低下や、免疫力の増強などが各国で報告され、森林環境の健康増進に対する有用性が示唆された[1-5]。樹木から大気にフィトンチッドという活性物質が分泌されることが知られている。*In vitro* 実験では、フィトンチッドには強い抗酸化能力が示されており、細胞内シグナル伝達因子 Akt 及び細胞外シグナル調節キナーゼ ERK の活性化を阻害して、抗炎症、がん細胞の増殖抑制等がもたらされたと推察されている[6-7]。また、奈良らは、一日森林環境中に滞在することで生体内に発生する ROS の約 10%を消去できると報告されているが[8]、森林環境がヒトの健康状態に干渉するメカニズムは解明されておらず、森林散策前後の生体内の酸化ストレスの変動に関する研究も少ない。その中でも特に、脂質過酸化マーカーである Hexanoyl-lysine (HEL) とタンパク質酸化マーカーである Dityrosine (DT)についての研究は見当たらない。

脂質過酸化の初期段階に生成される HEL は、脂質ペルオキシドの異性体であるリノール酸ヒドロペルオキシドとリジン残基との反応によって生じた脂質-リジン付加体である（図１）。DT は、タンパク質中や遊離のチロシンが酸化され、生成されたチロシルラジカルが架橋結合することによって形成されるチロシン 2 量体である（図２）。そこで、昨年度に続き本年度でも成人を対象に森林・都市散策を実施し、それぞれの散策後に尿中HEL及びDT レベルがどのように変動するのかを検討することに注目した。

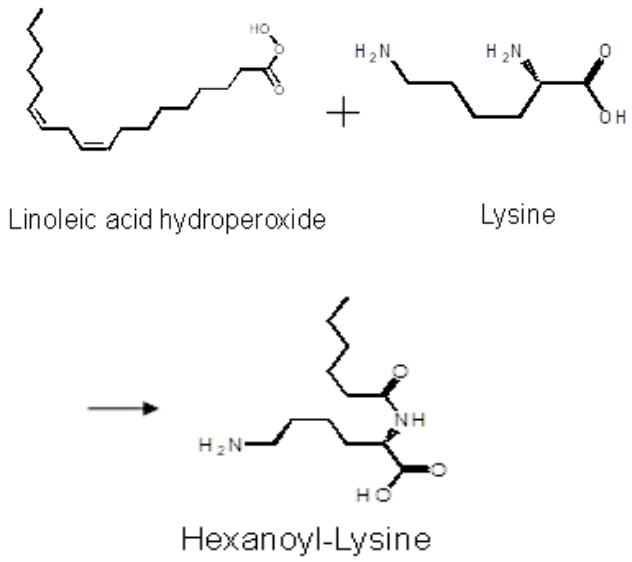


図１．HEL の生成機構

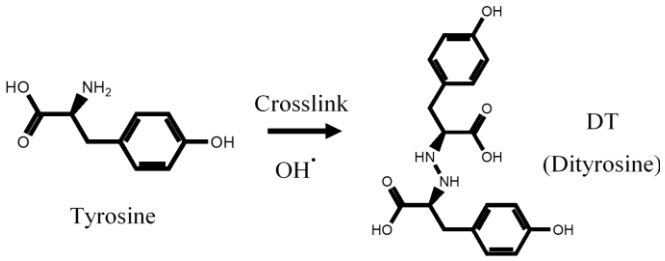


図２．DT の生成機構

「対象者と方法」

１）対象者

本研究は、20 代成人 8 名（男性 5 名、女性 3 名）を対象に、森林散策を 2021 年 6 月 29 日に岡山県県北の新庄村（図３）、都市散策は同年 9 月 29 日に岡山駅周辺で（図４）いずれも約 2 時間程度を行い、歩行速度が 60 m/min 未満であった。この研究はクロスオーバーデザインで、すべての参加者が森林と都市の両方の散策を参加した。また散策の前日・当日及び尿試料採取の当日にはタバコ・アルコール類や野菜・果実を含むジュース等の摂取を控えた。

新庄村ではスギ、ブナ、ヒノキ、カエデ等の多様な種類の樹木が群生していた。



図３．森林散策の様子



図４．都市散策の様子

２）測定方法

森林・都市環境において、それぞれ 5 ヶ所を選定し、気温、気圧、相対湿度、照度、風速、騒音を計測した。

気中フィトンチッドの捕集は、吸引ポンプによるアクティブサンプリング法を用いた。吸引ポンプの捕集速度は 0.3L/min に設定し、約２時間で捕集を行った。気中フィトンチッドの定量分析に GC／MS を用いた。

尿サンプルは森林・都市での散策前（散策日の１週間以内）、散策後（散策の翌日）の午前中に随時尿を採取した。 採取後、遠心分離を行い、上清を分析まで-80℃で保存した。

尿中 HEL は、競合 ELISA 法を用いて定量した。その結果は尿中クレアチニン補正値（pmol/mg Cr）で表した。尿中 DT は、競合 ELISA 法を用いて分析し、その結果は尿中クレアチニン補正値（μmol/g Cr）で表した。

尿中 HEL 及び DT の定量結果を補正するため、尿試料の除タンパクを行い、Jaffe 法により尿中クレアチニンを定量した。

さらに、森林・都市散策後に Semantic Differential (SD) 法を用いて対象者にアンケート調査を実施し、散策環境の評価を行った。

３）データの解析

散策前後における各測定項目の平均値の比較は対応のあるサンプルの t 検定で行い、有意確率 10%未満を有意差ありとした。なお、統計解析は IBM SPSS Statistics ver. 22 を用いた。

４）倫理的配慮

本研究は岡山理科大学倫理委員会の承認を得て実施した(No. 30-2)。対象者に対して研究の主旨、協力の任意性、匿名性の保持などについて書面により事前説明を行い、署名により同意を得たうえで実施した。

「結果と考察」

環境気中のフィトンチッドについては、森林（新庄村）内では 2ppb のβ-ピネンのみが検出されたが、

ほかのフィトンチッド成分は検出されなかった。一方、都市部の大気にフィトンチッド成分が検出されなかった。β-ピネンは主に針葉樹から放出されることが知られている。新庄村ではスギなどの針葉樹が多く占めており、気中のβ-ピネン濃度が高くなったことが推察されるが、大気の捕集時間が２時間で短く（散策時間を合わせた）、採気量が少なかったことがほかのフィトンチッド成分が未検出の一因と考えられる。今後は大容量の吸引ポンプで気中フィトンチッドの捕集を行うことを検討したいと考えている。

森林・都市散策における環境測定は、それぞれの地点で５カ所を選定し、気圧、照度、風速、騒音などを測定し、その概要を表１に示した。

表１　散策時の環境条件

散策場所	森林 (新庄村)	都市 (岡山駅周辺)
日時	2021年6月29日	2021年9月29日
散策時間	2時間	2時間
天気	曇り	晴れ
気温 (℃)	24.2 (22.0～26.6)	32.5 (30.9～33.8)
湿度 (%)	67.8 (60.4～76.6)	50.5 (46.9～53.8)
気圧 (hPa)	923 (921～925)	1010.9 (1010.3～1011.4)
照度 (lx)	17418 (735～39130)	33057 (19350～39340)
風速 (m/s)	0.3 (0.1～0.7)	0.78 (0.5～1.0)
騒音 (dB)	53.5 (41.4~82.7[a])	57.1 (45.1～72.5)

値は平均値（最小値～最大値）である。　a：渓流のせせらぎの音。

森林･都市における散策前後の尿中 HEL の濃度変動を比較したところ、森林・都市での散策後はともに微増傾向が見られたが、統計的に有意な差異は認められなかった（図５）。

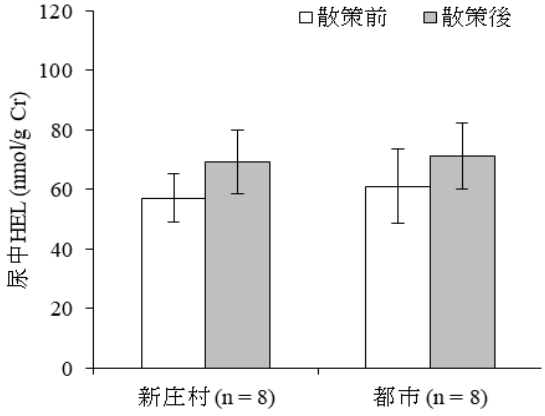


図５．森林･都市散策前後の尿中 HEL 濃度の比較。
（値は平均値±標準誤差）

森林･都市における散策後の尿中 DT の変動については、森林・都市での散策後はともに微増傾向が見られた（図６）が、尿中 HEL と同様に統計的に有意な差異は認められなかった。

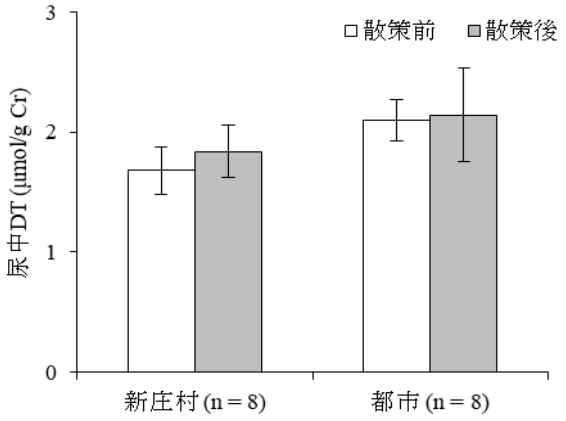


図６．森林・都市散策前後の尿中 DT 濃度の比較。
（値は平均値±標準誤差）

また、SD (Semantic Differential) 法による森林・都市散策環境の評価について、新庄村での森林散策は「快適な」、「ゆったりした」、「自然な」などのポジティブによりの評価が多く見られ（図７）、岡山駅周辺での都市散策は「こみこみした」、「きゅうくつな」、「うるさい」などネガティブによりの評価が目立った（図８）。このことは、都市特有の人込みや騒音などが、参加者に心理的な疲労を感じさせ、ストレスを増加させる可能性が示唆された。

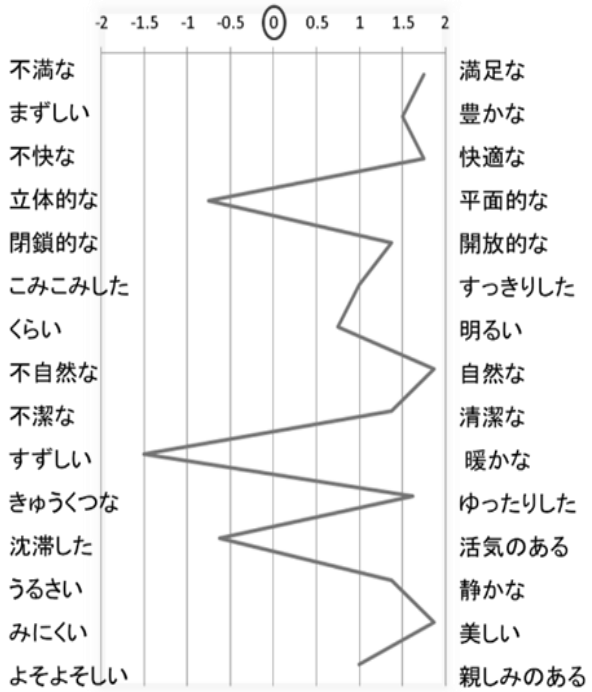


図７．SD 法による新庄村の散策環境の評価

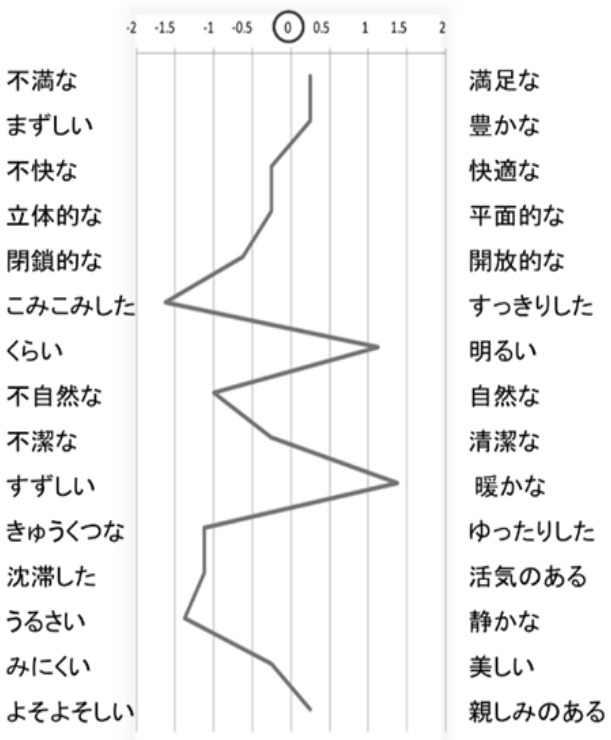


図８．SD 法による都市の散策環境の評価

「まとめと今後の課題」

尿中 HEL および尿中 DT は森林散策・都市散策前に比べ、散策後ではともに減少傾向が見られたが、統計的に有意な差異は認められなかった。本研究の対象者が若年層でありサンプル数が少ないため、2022 年度の研究助成を獲得し、さらに対象者数を増やして検討を積み重ねていくことにより、環境予防医学分野の進展に貢献したいと考える。

「謝辞」

本研究の遂行にあたりご支援を賜った公益財団法人ウエスコ学術振興財団および関係者各位には、心より感謝申し上げたい。また、本研究にご参加いただいた対象者の方々にも謝意を表します。

「参考文献」

1）Li Q, Morimoto K, Kobayashi M, Inagaki H, Katsumata M, Hirata Y, *et al.* (2008) : Visiting forest, but not a city, increases human natural killer activity and expression of anti-cancer proteins. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21, 117-127.

2）Richardson EA, PearceJ, Mitchell R, Kingham, S (2013) : Role of physical activity in the relationship between urban green space and health. *Public Health* 127, 318-324.

3）Kardan O, Gozydyra P, Misic B, Moola F, Palmer LJ, Paus T, Berman MG (2015): Neighborhood greenspace and health on a large urban center. *Scient Rep* 5, 11610, 1-14.

4）Richardson EA, Pearce J, Mitchell R, Kingham S (2013): Role of physical activity in the relationship between urban green space and health. *Public Health*,127, 318-324.

5）Kim H, Min J, Kim H, Min K(2016):Parks and green areas are associated with decreased risk for hyperlipidemia. *Int J Environ Res Public Health* 13,1205,1-11.

6）Huang BP, Lin CH, Chen YC, Kao SH (2014) : Antiinflammatory effects of Perilla frutescens leaf extract on lipopolysa-ccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Mol Med Rep* 10, 1077-1083.

7）Kang S, Lee JS, Lee HC, Petriello MC, Kim BY, *et al.* (2016) Phytoncide extracted from pinecone decreases LPS-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol* 26, 579-587.

8）奈良 松範, 堀井 充, 畔上 浩史 (2009) : フィトン・イフェクト : 森林の新しい活用, 地球環境研究論文集 17, 145-151.

9）包 海, 近 藤 明, 加 賀 昭 和, 井上 義雄, 多田 将晴 (2008) : オゾン曝露が樹木からの BVOC 発 生量に及ぼす影響に関する研究, 環境科学会誌 21(1), 17-26.

原生生物の細胞内共生現象を応用した新規生体触媒の創製と有用物質生産への応用

岡山理科大学理学部臨床生命科学科
石原　浩二

概要：本研究は原生生物であるミドリゾウリムシと緑藻との細胞内共生現象を高度に利用することで，遺伝子組換え技術に依存することなく，新規な原生生物を実験的に創製し，生体触媒として利用することを目標とした。 計画初年度にあたる本年は，研究全体の基盤となるミドリゾウリムシの大量培養条件のスクリーニングに必須である，二者培養用の餌となるクロロゴニウム緑藻の簡易維持培養法，および大量培養条件の検索，そして，クロロゴニウムを用いたカルボニル化合物の物質変換について検討した。

その結果，クロロゴニウム属緑藻のスラント寒天培地上での長期間の維持培養が可能なことを見出し，簡便な維持管理法を開発した。また，酢酸ナトリウムと酵母エキスからなる液体培地（クロロゴニウム培地）を用いた大量培養法についても確立した。さらに，クロロゴニウム属緑藻にケトエステル類に対する還元能力を見出し，ミドリゾウリムシの餌としてだけでなく，不斉還元用の触媒としても利用可能であることを発見した。

【研究背景と研究目的】

二十世紀は，人々が豊になるために数多くの化学物質が製造され，利用されてきた「大量消費」の時代であり，また同時に，多くの環境問題が発生した「汚染」の時代でもあった。この反省を踏まえ，21世紀の現代においては，世界的課題である環境保全・資源循環の実現に向けた，微生物機能を戦略的に活用した「省エネルギー・環境調和型物質生産システム」の早期確立が望まれており，我が国を含めた世界的規模での「応用微生物学」を基盤とした基礎的，および，応用・実用的研究が進められている。

そのような中，これまでに我々は，酵母や糸状菌，耐熱性細菌，放線菌，緑藻，藍藻等を中心とした種々の微生物の物質変換能力を精査することで「生体触媒」としての有用性を明らかにし，各種光学活性化合物や生理活性物質の高選択的・高効率的な合成を行ってきた。また，それら微生物由来酵素（酸化還元酵素を中心に）の触媒機能や構造機能相関についても解明してきた。しかしながら，我々には未だに知り得ない酵素や酵素反応が存在する無限の可能性があるにも関わらず，その触媒機能や物質変換能力が明らかになっている微生物は数少ない。

世界中を見渡した場合，遺伝子組換え技術を用いた既存微生物の機能改変に関する研究は数多く行われているものの，地球上には，未だ我々に発見されることなく自然界に眠っている有用微生物が存在しているにも関わらず，その優れた生物資源を利用せず，微生物が持つ重要で有用な機能を十分に活用しているとは言い難い状況にある。

そこで本研究は，我々の研究成果と実績を基礎として，原生生物であるミドリゾウリムシと緑藻との細胞内共生現象を高度に利用することで，遺伝子組換え技術に依存することなく，新規な原生生物を実験的に創製し，生体触媒として利用することを最終目標とした。

ミドリゾウリムシと緑藻クロレラの，両原生生物の物質変換機能を融合させた新規な生体触媒を創製するため，研究期間（３年計画）内に，1）ミドリゾウリムシの大量培養条件のスクリーニング，2）ミドリゾウリムシの物質変換能力の調

査, 3) 共生クロレラ株を変更することで新たなミドリゾウリムシを新たに創製し，最終的には，それら新規な共生生物を用いた医薬品合成中間体や液晶材料等の光学活性な有用機能性物質生産への活用を目指すこととした。

計画初年度の本年（令和 3 年度）は，ミドリゾウリムシの大量培養条件のスクリーニングに重点をおいて研究をスタートさせることとし，本研究全体の基盤となるミドリゾウリムシの大量培養探索に必須であり，二者培養の餌となるクロロゴニウム緑藻の簡易維持培養方法，および大量培養条件の探索と，それらクロロゴニウム属緑藻を用いた各種カルボニル化合物の物質変換について調査した。

【実験方法】

1．研究に使用した *Chlorogonium* 株

C. euchlorum NIES-760 株と *C. elongatum* NIES-1357 株については国立研究開発法人国立環境研究所微生物系統保存施設(NIES)より購入した。*C. capillatum* NIES-3374 株については，神戸大学大学院理学研究科の洲崎敏伸准教授より提供して頂いたものを使用した。各株は，NIES 推奨の AF-6 液体培地にて, 20°C, 光照射条件下 (2,000-3,000 lx) で継代培養を行って管理・保存した。

2．培地作製

○AF-6 液体培地の調製

蒸留水 500 mL を 1 L ビーカーに入れ，スターラーで撹拌しながら，Table 1 の培地成分を加えて溶解させた。PVI metals の組成は Table 2 に記載した。

pH メーターで pH を確認しながら 1.0 M HCl 溶液で pH を 6.6 に調整後，蒸留水で全量を 1 L として使用した。実際には 2 倍濃縮培地（保存用）を作製しておき，使用時に流水で溶解，pH を再度確認しながら蒸留水で希釈後に培地として使用した。

○クロロゴニウム液体培地の調製

冷凍保存用の 4 倍濃縮培地を作製した。蒸留水 700 mL を 1 L ビーカーに入れ，スターラーで撹拌しながら，4.0 g の酢酸ナトリウム，20.0 g の酵母エキスを加えて，1.0 M KOH で pH を 7.0 に調整後，蒸留水で全量を 1 L とした。使用時には，流水で解凍後，pH を再度確認しながら蒸留水で 4 倍へ希釈後に培地として使用した。

○スラント寒天培地の調製

上記 2 種類の培地に 1.6%(w/v)となるように粉末寒天を添加し，電子レンジで加熱して寒天を溶解後，試験管 (IWAKI TEST18NP) に分注，シリコセンで栓をして，オートクレーブにて滅菌後，約 30 度に傾けて室温にて冷却固化させてスラント培地として利用した。

3．クロロゴニウム緑藻の培養

○液体培地による大量培養

1-L 容ガラス製メジュームビンに培地 1 L を加えてシリコセンで栓をして，オートクレーブにて滅菌（AF-6 培地：115° C, 15 分間，クロロゴニウム培地：121° C, 15 分間）した。そこへ試験管内で液体培地にて維持培養していた菌株の一部（0.2 mL）をピペットを用いて無菌的に移植し，20° C, 明条件（2,000-3,000 lx の光照射), もしくは暗条件下にて好気的に 4 週間静置培養した。その後，冷却遠心機にて集菌，洗菌（生理食塩水を加えて懸濁，再び冷却遠心にて集菌）操作を 2 回行って, 湿潤菌体量を得た。

○スラント寒天培地上での培養（簡易維持）

ディスポループを用いて, AF-6 もしくはクロロゴニウムスラント寒天培地へ各株を植菌後, 20° C, 光照射 (2,000 lx) 下にて静置培養した。

4．各種カルボニル化合物の微生物還元

大型試験管（IWAKI TEST30NP）内にて，湿潤菌体 0.5 g (乾燥重量 0.12 g) を生理食塩水 20 mL に懸濁し，基質を 0.15 mmol (7.5 mM) 加えてシリコセンで栓をして, 約 30 度に傾斜させ, 25° C, 好気的条件下で 48 時間，往復振盪（120

stroke/min）した。その後，反応溶液の一部（0.5 mL）を採取し，珪藻土ショートカラム（直径 10 mm x 30 mm）へアプライし，5.0 mL のジエチルエーテルを用いて固相抽出を行い，減圧下で濃縮後, キャピラリーカラムを用いた GC 分析を行い，基質の還元率（還元体への変換率），生成物の立体選択性，および絶対配置を決定した。[1,2)]

【実験結果と考察】

１．クロロゴニウムの簡易維持培養法

一般的にクロロゴニウムの維持は液体培養中で行い，培養液の一部を新しい液体培地へと植え継いでいくが，保存期間が長くなると白化現象を起こして死滅したり等，同じ培地中での 3 週間以上の長期間の維持は困難であった。そこで，クロロゴニウム株の維持管理の簡便化を目指してスラント寒天培地上での培養を試みた。AF-6 スラント寒天培地では，菌体の生育は非常に遅く，その後の白化までの時間も短く，保存には適していなかった。しかし，酢酸ナトリウムと酵母エキスから調製したクロロゴニウムスラント寒天培地上では，試したクロロゴニウム 3 株全てにおいて良好な生育を示し，白化もほとんどすることなく，長期間の（２ヶ月）維持が可能であった。

２．クロロゴニウムの液体培養

AF-6 液体培地（光照射条件下），クロロゴニウム液体培地（光照射と暗闇条件下）の 2 種の培地を用いて，クロロゴニウム 3 株を 4 週間培養し，得られる湿潤菌体量を比較した（Table 3）。その結果，スラント培地での生育結果と同様に，AF-6 液体培地よりもクロロゴニウム液体培地の方が，生育速度が速く，得られる湿潤菌体量も多いことが分かった。特に，クロロゴニウム液体培地では，明条件と暗条件では得られた湿潤菌体量に約 2 倍もの差を生じた。一方で，各株間の相違はほとんど見られず，３株とも，４Ｌ液体培地あたりで 1.0 g 以上の湿潤菌体を得ることができた。この結果により，ミドリゾウリムシの大量培養に必須となる，二者培養用の餌であるクロロゴニウムを簡便に，継続的に得ることが可能となった。

３．クロロゴニウムを用いた各種カルボニル化合物の還元

次に，ミドリゾウリムシによる物質変換を行う際の比較参考データとなる，クロロゴニウム属緑藻による物質変換結果を調査するため，上記液体培養で得られた湿潤菌体を用いた各種カルボニル化合物の変換について調査した（図１）。明条件下，クロロゴニウム液体培地で培養した菌体を用いて，α-ケトエステル，芳香族α-ケトアミドに対する還元反応を調査した結果，いずれの株も，カルボニル化合物に対する還元活性を有していることがわかった（Table 4）。但し，これまでの我々の研究で扱ってきた放線菌と比較すると [3,4)]，還元率が低く，生成したアルコール体の立体選択性も低値を示した。その中でも，*C. elongatum* NIES-1357 株は, 比較的高い変換率を示していたので，この株について，添加剤導入による生成物の立体選択性の改善を試みた。その結果，グルコース，グルタミン酸，アラニンの添加によって還元率の改善が見られ，特に，アラニンを添加した場合に，生成物の立体選択性も大幅に改善されることがわかり，クロロゴニウム属緑藻は，ミドリゾウリムシの餌としてだけでなく，ケトエステル類の不斉還元用触媒としても利用可能であることを発見した。

【論文発表（研究成果発表）】

Ishihara K., Oka S., Hayashi Y., Kitagawa Y., Shimoda K., Masuoka N., and Nakajima N., Biocatalytic Preparation of Chiral Alcohols with Micro Green Algae: Bio-reduction of Carbonyl Compounds by *Chlorogonium* stSains as a Novel Biocatalyst, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*., 11(4) 2022, in press.

【引用文献】

1) K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka, and A. Ohno, *J. Org. Chem*., **53**, pp. 2589-2593 (1988).

2) K. Mitsuhashi and H. Yamamoto, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 2005-295817, Oct. 27, (2005).

3) K. Ishihara, H. Nagai, K. Takahashi, M. Nishiyama,

and N. Nakajima, *Biochem. Insights,* **4**, pp. 29-33 (2011).
4) K. Ishihara, H. Fujita, A. Sakiyama, Y. Kobayashi, K. Hori, K. Maruike, N. Masuoka, and N. Nakajima, *Open J. Appl. Sci.*, **3**, pp. 116-122 (2013).

Table 1. AF-6 培地組成

$NaNO_3$	140 mg
NH_4NO_3	22.0 mg
$MgSO_4•7H_2O$	30.0 mg
KH_2PO_4	10.0 mg
K_2HPO_4	5.0 mg
Fe-citrate	2.0 mg
Citric acid	2.0 mg
Biotin	2.0 μg
Thiamine•HCl	10.0 μg
Vitamin B_6	1.0 μg
Vitamin B_{12}	1.0 μg
PIV metals	5 mL
Distilled water	995 mL
pH	6.6

Table 2. PIV metals 組成

$Na_2EDTA•2H_2O$	100 mg
$FeCl•6H_2O$	19.6 mg
$MnCl_2•4H_2O$	3.6 mg
$ZnSO_4•7H_2O$	2.2 mg
$CoCl_2•6H_2O$	0.4 mg
$NaMoO_4•2H_2O$	0.25 mg
Distilled water	100 mL

Table 3. 各種培地と条件によるクロロゴニウム属緑藻３株の液体培養

学術名	NIES 番号	AF-6 培地	クロロゴニウム培地	
		明条件	明条件	暗条件
C. euchlorum	760	0.2	1.3	0.4
C. elongatum	1357	0.4	1.1	0.5
C. capillatum	3374	0.3	1.1	0.4

液体培地 4L あたりの湿潤菌体量(g)

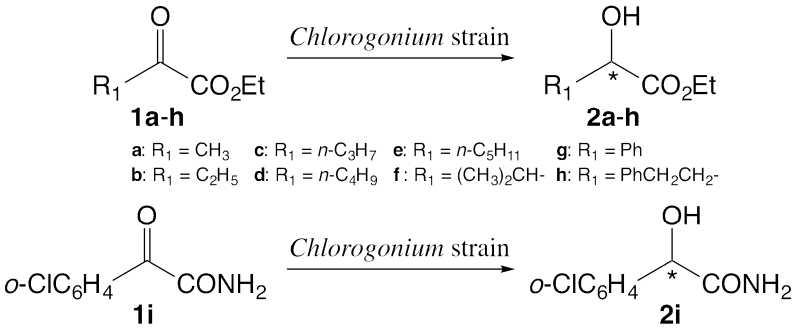


図１．クロロゴニウム属緑藻によるカルボニル化合物の還元

Table 4. クロロゴニウム属緑藻による各種カルボニル化合物の還元

Product	*C. euchlorum* NIES-760			*C. elongatum* NIES-1357			*C. capillatum* NIES-3374		
	Conv. (%)	e.e. (%)	*R*/*S*	Conv. (%)	e.e. (%)	*R*/*S*	Conv. (%)	e.e. (%)	*R*/*S*
2a	48	>99	*S*	>99	>99	*S*	42	41	*S*
2b	29	90	*S*	95	94	*S*	38	91	*S*
2c	10	87	*S*	>99	84	*S*	3	>99	*S*
2d	11	73	*S*	90	88	*S*	5	73	*S*
2e	<1	N.D.	N.D.	54	72	*S*	15	>99	*S*
2f	34	76	*S*	>99	70	*S*	6	91	*S*
2g	27	9	*S*	64	>99	*S*	18	6	*S*
2h	12	53	*S*	38	88	*S*	6	39	*S*
2i	50	80	*R*	>99	85	*R*	>99	42	*R*

Table 5. *C. elongatum* NIES-1357 株によるカルボニル化合物の還元における添加剤の効果

Product	D-グルコース			L-グルタミン酸			L-アラニン		
	Conv. (%)	e.e. (%)	*R*/*S*	Conv. (%)	e.e. (%)	*R*/*S*	Conv. (%)	e.e. (%)	*R*/*S*
2a	>99	83	*S*	>99	79	*S*	>99	>99	*S*
2b	96	81	*S*	>99	84	*S*	>99	99	*S*
2c	>99	62	*S*	>99	>99	*S*	>99	>99	*S*
2d	89	67	*S*	90	72	*S*	97	96	*S*
2e	66	68	*S*	98	69	*S*	98	>99	*S*
2f	>99	72	*S*	>99	68	*S*	>99	98	*S*
2g	68	8	*S*	87	16	*S*	91	68	*S*
2h	38	67	*S*	57	71	*S*	78	86	*S*
2i	>99	86	*R*	>99	83	*R*	>99	95	*R*

環境調和型オレフィン合成を活用した光電変換用色素の創製

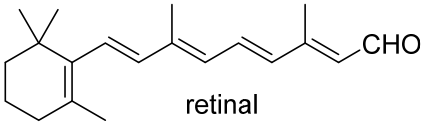
岡山理科大学工学部　応用化学科

折田明浩

炭素－炭素二重結合をもつ有機化合物はオレフィンと呼ばれ、様々なオレフィンが生理活性化合物や有機材料として利用される。とりわけパイ拡張したオレフィンは可視光を効果的に吸収することから、光電変換用色素として有望である。本研究では、申請者が開発した光駆動型オレフィン合成反応をさらに発展・高度化させ、光電変換用オレフィン色素の合成にも応用可能な共役ジエンの精密合成法を開発した。具体的には、容易に合成可能なパイ拡張化合物 1,3,6,8-テトラ(フェニルエチニル)ピレンを母骨格にもち、フェニル基のオルト、メタ、パラの位置に電子供与基として機能する分岐アルコキシ基を置換した光触媒を新たに開発し、可視光照射駆動によるエテニルスルホンの還元的脱スルホニル化反応を実施した。興味深いことにアルコキシ基はその置換位置によって電子的効果が異なることから、オルト、メタ、パラ置換光触媒はそれぞれ異なる触媒活性を示した。ここでは、これら 3 種類の光触媒の合成と電子的効果を巧みに利用した共役オレフィンの合成最適化について述べる。

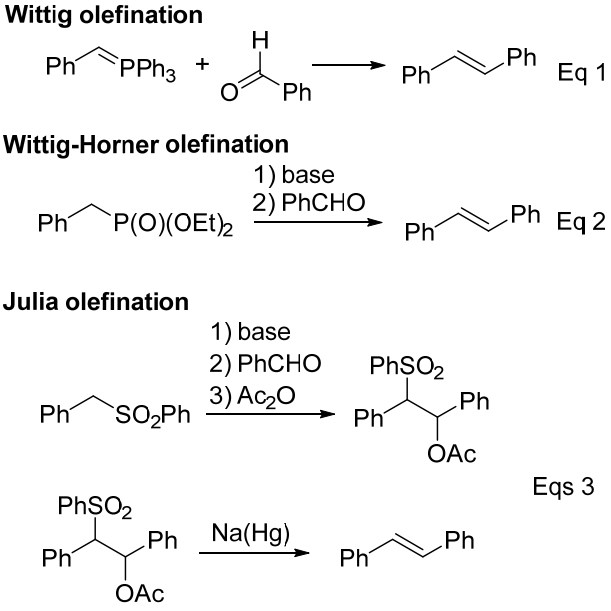
1．研究背景

炭素－炭素二重結合をもつ有機化合物はオレフィンと呼ばれ、生理活性化合物も数多く含まれる。特に共役オレフィンは可視光を効果的に吸収できることからビタミン A を酸化して得られるレチナールはオプシン中で光受容体として機能する（図 1）[1]。



Scheme 1. Structure of retinal

このような光機能を示すことからオレフィンは古くから有機化学者の合成ターゲットとして注目されてきた。例えば Wittig はリンイリドとカルボニル化合物からオレフィンを合成する方法を開発した（図 2，式 1）[2]。本反応は様々なオレフィンを合成できることから、エポックメイキングな合成反応として世界中で利用されてきた。その一方で大量に副生するホスフィンオキシドの除去には煩雑な操作が必要であった。Wittig-Horner 反応はリンイリドの代わりにホスホナートから調製したカルボアニオンを利用するオレフィン合成反応であり、反応後に生成するリン酸塩は分液処理により簡便に除去が可能である（図 2，式 2）[3]。一方、スルホンを出発原料に用いたオレフィン合成が Julia によって報告された（図 2，式 3）[4]。この反応は、1．スルホンから調製したカルボアニオンとカルボニル化合物とのアルドール型付加、続くアセチル化、2．ナトリウムアマルガムを用いたアセトキシスルホンの還元反応によるオレフィンへの変換反応から構成される。



Scheme 2. Conventional olefinations

この反応は比較的温和な条件で還元反応が進行することから、様々な官能基を損なうことなくオレフィン化が可能である。広い官能基許容性を示す Julia

反応ではあるが、環境負荷の大きな水銀反応剤の利用が避けられない。この問題を解決する方法として、アマルガムに替えてヨウ化サマリウム(SmI_2)を用いたオレフィン化が開発された[5]。反応メカニズムには不明な点も残されるが，水銀反応剤を回避しつつアセトキシスルホンをオレフィンへ効率良く変換することができる優れた官能基変換反応である。さて、近年世界中で SDGs(Sustainable Development Goals，持続可能な開発目標）を掲げた環境問題への取り組みが高まるにつれて、有限な化石燃料や金属資源の利用を避け持続可能なエネルギーを活用した変換反応への代替が求められてきた。このような社会的要請の下、我々はアマルガムやヨウ化サマリウムなど金属反応剤を回避した光駆動型還元的脱スルホニル化反応の開発に取り組んだ。我々はこれまでにペリレン光触媒－青色光[6]あるいはパイ拡張ピレン光触媒－緑色光を用いた還元的脱スルホニル化を確立したが[7]、本研究ではこの反応をさらに発展・高度化させ、精密オレフィン合成法へと展開した。具体的には、パイ拡張ピレンに置換したアルコキシ基の置換位置を変えることで、パイ共役系に電子的な摂動を与え、触媒の光還元力チューニングを試みた。

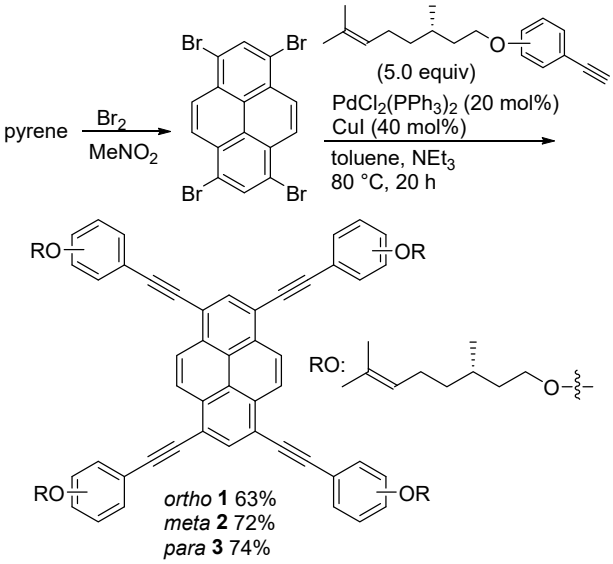
2．結果と考察

【触媒設計と合成】

光触媒は以下の３条件を満たすように分子設計を行い、ピレン触媒 **1-3** を合成した（図 3)。すなわち可視光駆動に必要な青色光や緑色光を充分に吸収可能なパイ拡張化合物に、分岐アルコキシ基を置換した。通常パイ拡張化合物は分子間のパイ相互作用のため難溶性を示す。一方触媒 **1-3** は分岐アルコキシ基の置換により、有機溶媒への充分な溶解性を担保すると同時に、酸素官能基に起因する適度な極性を示すことから生成したオレフィンとの簡便迅速な分離が可能と予想した。

1．パイ拡張－可視光駆動
2．分岐アルキル基－充分な溶解性を担保
3．酸素官能基－適度な極性

置換ピレン触媒 **1-3** はピレンの四臭素化に続く 4-(シトロネリロキシ)フェニルエチンとの薗頭－萩原カップリングから収率良く合成することができた。ピレン **1-3** はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで単離精製可能な安定な茶色固体であった（図 4)。



Scheme 3. Synthesis of pyrene photocatalysts **1-3**



ortho **1**　　*meta* **2**　　*para* **3**

Scheme 4. Pyrene photocatalysts **1-3**

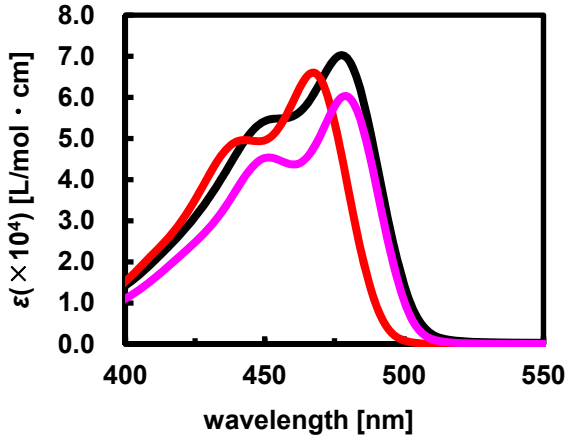
一般的な有機溶媒に対するピレン触媒 **1-3** の溶解性を調査したところ、パラ置換体 **3** が最も溶解性に乏しいものの充分に有機合成に利用可能なことが分かった。表 1 にはパラ置換体 **3** の溶解性を調査した結果を示す。

Table 1. 有機溶媒 1.0 mL に対するパラ置換ピレン光触媒 **3**(1.0 mg)の溶解性

溶媒	室温 (20 ° C)	加熱（還流）
塩化メチレン	可溶	可溶
酢酸エチル	可溶	可溶
クロロホルム	可溶	可溶
トルエン	可溶	可溶

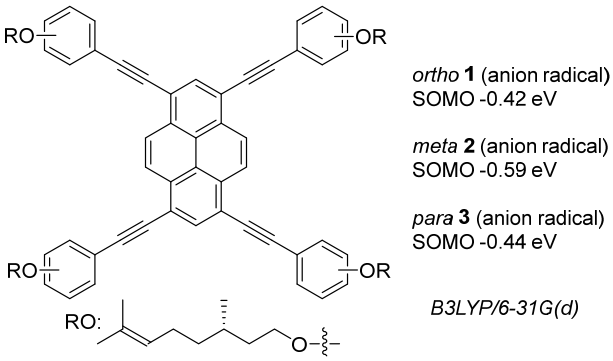
ベンゼン	可溶	可溶
ヘキサン	難溶	難溶（5.0 mL）
アセトニトリル	難溶	一部溶解（2.0 mL） 可溶（3.0 mL）
アセトン	可溶	可溶
THF	可溶	可溶
ジオキサン	可溶	可溶
メタノール	難溶	難溶（5.0 mL）
エタノール	難溶	一部溶解（5.0 mL）

光学的特性を調査するためにピレン触媒 **1-3** のクロロホルム溶液を用いて紫外可視吸収スペクトルを測定した（図 5）。オルト **1** およびパラ置換体 **3** は 478 nm 付近に最長極大吸収を示すが、パラ置換体 **3** の方がモル吸光係数は大きく、より効果的に可視光を吸収できることが分かった。一方、メタ置換体 **2** の最長極大吸収はオルト体 **1**, パラ体 **3** と比較して約 10 nm ほど短波長シフトしており、メタ位に置換した酸素官能基はパイ拡張への寄与が小さいことを示唆している。



Scheme 5. ピレン触媒 **1-3** の紫外可視吸収スペクトル（クロロホルム 1.0 x 10^{-5} mol/L），**1**（——），**2**（——），**3**（——）

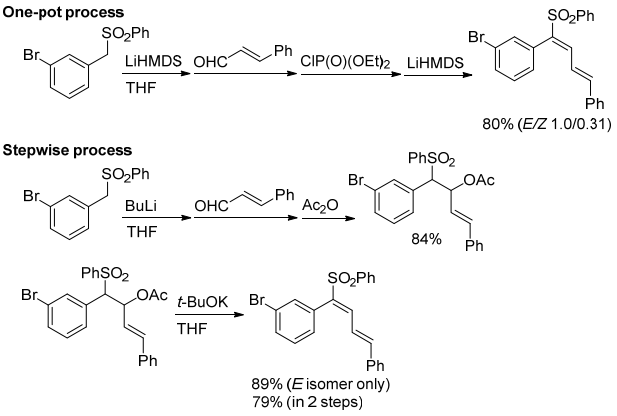
ピレン触媒 **1-3** に適切な可視光を照射した際には光励起の後に犠牲試薬からの一電子移動を経由してアニオンラジカルが発生すると予想される。本系では、こうして系中で生成したアニオンラジカルが鍵活性種として作用し、エテニルスルホンの還元的脱スルホニル化が進行することから、密度汎関数を用いた化学計算により **1-3** のアニオンラジカル還元電位を見積もった（図 6）。このシミュレーション結果はオルト体 **1** とパラ体 **3** がメタ体 **2** よりも強力な還元剤として作用することを示唆している。



Scheme 6. Simulated SOMO energy levels of **1-3**

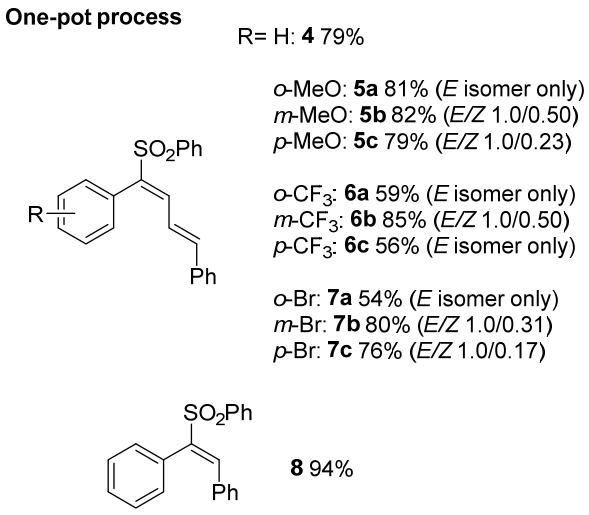
【ジエテニルスルホンの合成】

反応に利用するジエテニルスルホンはベンジルスルホンとシンナムアルデヒドとのアルドール縮合型反応から調製した。図 7 にはメタブロモ置換体の合成例を示すが、ワンポット法あるいはアセテートを経由する二段階反応から容易に合成することができた。



Scheme 7. Synthetic processes for dienyl sulfone

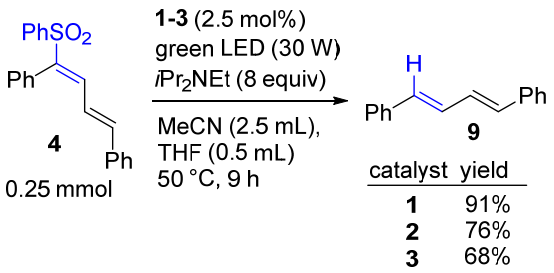
実験操作がより簡便なワンポット合成法を用いて無置換体、MeO、CF_3、Br 誘導体を合成し、続く還元的脱スルホニル化反応を検討した（図 8）。



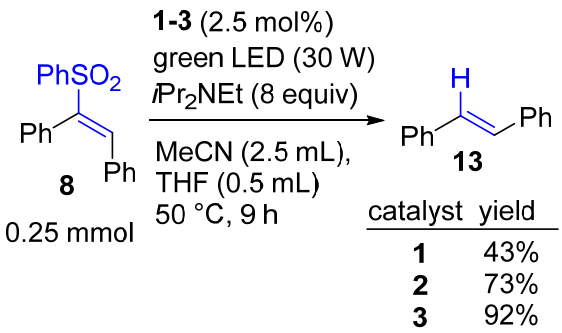
Scheme 8. Syntheses of dienyl sulfones

【ピレン光触媒を用いた還元的脱スルホニル化反応】

ピレン光触媒 **1-3** を用いてジエニルスルホン **4** の還元的脱スルホニル化を行った。アセトニトリルと THF との混合溶媒にジエニルスルホン **4**、犠牲還元剤ジイソプロピルエチルアミン、ピレン光触媒 2.5 mol%を溶解して緑色 LED（514 nm, 30 W）したところ、目的の還元的脱スルホニル化が進行し対応するジフェニルブタジエン **9** が得られた（図 9）。この反応ではオルト置換触媒 **1** が最も有効に働き、(*E,E*)体を 91%収率で与えた。**9** は強力な還元剤との共存下で一電子移動を経由してさらに還元を受けたり分解することが予想されるが、本系では還元力が異なる 3 つの光触媒を検討することで還元条件の最適化に成功した。単純なエテニルスルホン **8** の還元的脱スルホニル化も同条件下で速やかに進行し、スチルベン **13** を与えた（図 10）。この場合にも光触媒を検討することでオレフィンへの変換反応を最適化することができた。興味深いことに本反応ではパラ置換触媒 **3** が最も有効に働き、92%収率で **13** が得られた。



Scheme 9. Reductive desulfonylation of **4**



Scheme 10. Reductive desulfonylation of **8**

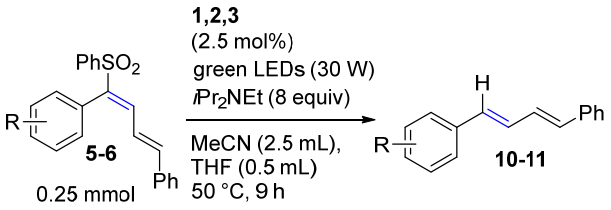
続いて、電子供与基 **5a-c** や電子求引基が置換したジエテニルスルホン **6a-c** の還元的脱スルホニル化を行った（図 11）。オルト、メタ、パラ置換メトキシ置換体 **5a-c** はいずれもメタ置換ピレン触媒 **2** を用いた場合に最も良好な収率で目的のメトキシ置換ジフェニルブタジエン **10a-c** を与えた（entries 2, 5, 8）。オルト位を CF_3 で置換した **6a** は、触媒 **1-3** を用いたすべての反応で目的とするジエンが得られなかった（entries 10-12）。一方、メタおよびパラ位置を CF_3 置換したジエニルスルホン **6b-c** では、メタ置換ピレン **2** を光触媒に利用することで速やかに対応する CF_3 置換ジフェニルブタジエン **11b-c** をそれぞれ 80%、85%収率で与えた（entries 14,17）。

本反応は温和な還元条件で進行することから、臭素で置換した **7a-c** もブロモ基を損なうことなく目的のブロモ置換ジフェニルブタジエンへ変換することができる（entries 19-27）。ブロモ基の置換位置によって、最適な光触媒が異なっており、オルトおよびパラブロモ置換体にはピレン光触媒 **1** が(entries 19, 25)、メタブロモ置換体には触媒 **2** が最も高い収率で対応するブロモジエンを与えた（entry 23）。ここで得られたブロモジエン **12b** は薗頭－萩原カップリングを経てジエンインなどさらにパイ拡張した誘導体へ導くことも可能である（図 12）。

3．まとめ

本研究ではジエニルスルホンの還元的脱スルホニル化を目指し、ベンゼン環上の異なる位置にアルコキシ基を置換したピレン光触媒を設計・合成した。オルト、メタ、パラ置換体のいずれも可視光を充分

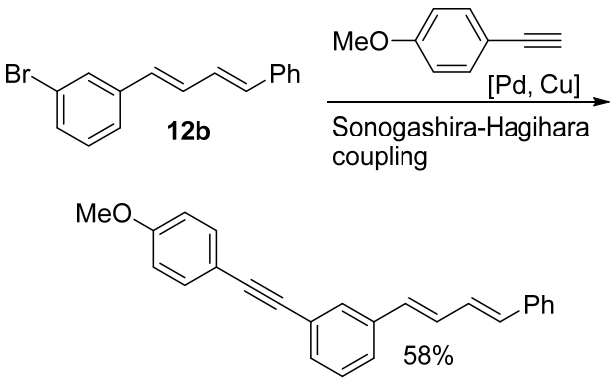
に吸収し、緑色光照射によって光反応を触媒した。我々が期待した通り、3 つの位置異性体はそれぞれ異なる還元力・反応性を示し、用いる光触媒を変更することでジエン合成の最適化条件を容易に探索することに成功した。ここで得られた成果を基に、さらにパイ拡張したオレフィン誘導体を合成し、構造と光学的特性との相関関係を明らかにするとともに光電変換に適した可視光色素の合成へ展開する。



	Ar	cat	product / yield	
entry 1	*o*-MeOC$_6$H$_4$- **5a**	**1**	**10a**	20%
entry 2		**2**		81%
entry 3		**3**		81%
entry 4	*m*-MeOC$_6$H$_4$- **5b**	**1**	**10b**	50%
entry 5		**2**		84%
entry 6		**3**		51%
entry 7	*p*-MeOC$_6$H$_4$- **5c**	**1**	**10c**	26%
entry 8		**2**		86%
entry 9		**3**		86%
entry 10	*o*-CF$_3$C$_6$H$_4$- **6a**	**1**	**11a**	decomp
entry 11		**2**		decomp
entry 12		**3**		decomp
entry 13	*m*-CF$_3$C$_6$H$_4$- **6b**	**1**	**11b**	68%
entry 14		**2**		80%
entry 15		**3**		73%
entry 16	*p*-CF$_3$C$_6$H$_4$- **6c**	**1**	**11c**	57%
entry 17		**2**		85%
entry 18		**3**		55%
entry 19	*o*-BrC$_6$H$_4$- **7a**	**1**	**12a**	49% (1.0 : 0.10)*
entry 20		**2**		23% (1.0 : 0.14)*
entry 21		**3**		9% (1.0 : 0.08)*
entry 22	*m*-BrC$_6$H$_4$- **7b**	**1**	**12b**	62%
entry 23		**2**		77%
entry 24		**3**		53%
entry 25	*p*-BrC$_6$H$_4$- **7c**	**1**	**12c**	80%
entry 26		**2**		64%
entry 27		**3**		60%

* Ratio (*E, E* : *Z, E*)

Scheme 11. Syntheses of substituted dienes **10a-12c**



Scheme 12. Synthesis of dienyne

4．参考文献

[1] *Carotenoids, Vol. 2. Synthesis*, ed. by G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkhäuser Verlag, Boston, 1996.

[2] a) G. Wittig, U. Scholkopf, *Ber.* **1954**, *87*, 1318. b) G. Wittig, U. Scholkopf, *Ber.* **1955**, *88*, 1654.

[3] Recent reviews: a) P. R. Blakemore, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 2563. b) D. Gueyrard, *Synlett* **2018**, *29*, 34.

[4] a) M. Julia, J.-M. Paris, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 4833. b) P. J. Kocienski, B. Lythgoe, S. Ruston, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 829.

[5] G. E. Keck, K. A. Savin, M. A. Weglarz, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3194.

[6] H. Watanabe, M. Takemoto, K. Adachi, Y. Okuda, A. Dakegata, T. Fukuyama, I. Ryu, K. Wakamatsu, A. Orita, *Chem. Lett.* **2020**, *49*, 409.

[7] H. Watanabe, K. Nakajima, K. Ekuni, R. Edagawa, Y. Akagi, Y. Okuda, A., K. Wakamatsu, A. Orita, *Synthesis* **2021**, 2984.

細胞死抑制技術を駆使した高機能立体組織の作製と応用性の検討

岡山理科大学　生命科学部　生物科学科

神吉　けい太

組織工学は体外で細胞の集合体である組織や臓器を作り出す技術であり、再生医療や創薬をはじめ幅広い分野での応用が期待されている。大量の細胞を用いて大型の組織を作ることは移植治療の向上や臓器構築を目指すうえで理想であるが、脈管系の内装を伴わない限り酸素、栄養、老廃物の代謝が滞り、細胞凝集体は細胞死を起こし死んでしまう。したがって脈管系構築までの期間、構成細胞の生存率を高める技術が組織工学分野におけるブレークスルーとなる。本研究では、細胞内エネルギー代謝の改変により低栄養、低酸素の環境でも細胞を生存させる技術を用い、より大型で細胞生存率の高い組織体を作ることを目的としている。これまでに筋芽細胞においてポリフェノールの一種であるレスベラトロールによる処理が解糖系を抑制し、グルコース消費を抑えることで低栄養、低酸素による細胞死が抑えられることを明らかにした。本研究ではこのメカニズムのより広い応用を目指し、間葉系幹細胞をはじめとする他組織の細胞を用いて検討を行った。

in vitro 細胞培養系は細胞機能や様々な処理に対する影響を評価する簡便な系であるが、平面培養は *in vivo* で細胞が機能する立体的な環境とはかけ離れており、細胞は本来の活性を発揮できない。そこで細胞同士の凝集や足場素材と組み合わせた立体組織構築技術が開発され、より機能的な立体組織を体外で構築する「組織工学」が種々の組織において進められている。このような機能性立体組織は、再生医療や創薬分野をはじめ幅広い分野での応用が期待されており、組織大型化や長期間維持は移植治療の向上や臓器構築を目指すうえで理想的な目標である。しかしながら脈管系を持たないままの組織体は酸素や栄養の供給と老廃物の代謝が滞り、中心部は細胞死を起こしてしまう。これを避けるため、100～200μm を超えるサイズの組織体構築の際は並行して脈管系構築が必要である。これまで血管内皮細胞との共培養、血管床からの血管新生誘導などの試みがなされてきたが、大型組織では脈管系構築に 2 週間近い期間を要すため、この期間における構成細胞の逸失や、移植後の生存率が低下する問題が避けられない。脈管系の整わない期間は「組織構築の死の谷」とされる課題であり、これを乗り越えるブレークスルーが必要である。そこで組織体に脈管系が備わらない期間における細胞生存を高く維持するという目標を掲げ、本研究を進めている。

細胞は低酸素状態にさらされると低酸素応答シグナルの活性化によりミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を抑え、解糖系中心のエネルギー生産をおこなう。解糖系の活性化はグルコース取り込みと乳酸排出を伴うが、この変化は立体組織内ではグルコース欠乏（低栄養）と老廃物滞留の原因となり、数日で細胞死を引き起こしてしまう。この問題に対し、研究代表者は解糖系活性を抑制することでグルコースの急激な消費を抑え、低栄養、低酸素環境による細胞死を抑制できることを明らかにした（Naito and Kanki, J Biosci. Bioeng. 2020）。この知見を応用することで、細胞凝集体の細胞生存率を向上させることが可能と考えられ、立体組織構築に大きな利益をもたらすことができる（図 1）。

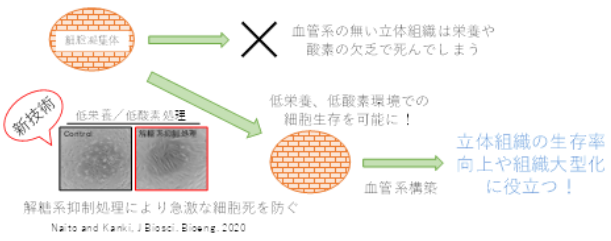


図 1．研究の概念図：立体組織構築時の細胞死を防ぐことで大型の機能性組織構築を目指す。

検討① 平面培養による細胞死抑制条件の検討

間葉系幹細胞（MSC）は体組織から採取される組織幹細胞であり、癌化しにくく移植治療に向いている。また中胚葉系組織を中心とする多分化能を有しており、様々な組織の治療への応用が期待されている。そこで平面培養された MSC を低栄養(低グルコース)、低酸素（1% O_2）環境にさらし、細胞生存を検討することで、最適な細胞死抑制処理条件を決定することを試みた。ヒト脂肪由来 MSC を培養し、様々なグルコース濃度の培地に置き換えたうえで、酸素濃度 1%の低酸素条件に 72 時間置いた。その結果、MSC ではいずれの処理条件においても細胞膜崩壊を指標とした死細胞の増加は認められず、顕微鏡観察においても MSC の形態に異常な所見は認められなかった（図 2)。過去に筋芽細胞において行った実験では、低グルコース低酸素の条件で処理することで急激な死細胞の増加が認められたが、今回の結果から MSC は低グルコース低酸素のストレス刺激に耐性があることが示唆された。この理由として、MSC がもともとニッチとする生体組織が低酸素環境であることから、細胞死に至らないことが挙げられた。

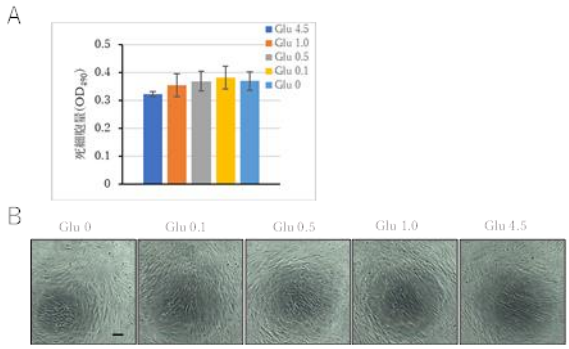


図２．低グルコース低酸素条件下における MSC の死細胞量の検討．（A）低酸素環境下の各 Glu 濃度（0～4.5mg/ml）による処理後 3 日目の死細胞量測定（LDH assay)．　（B）低酸素環境下の各 Glu 濃度（0～4.5mg/ml）による処理後 3 日目の明視野観察 Bar＝100μ,

検討② 軟骨前駆細胞を用いた立体組織作製の試み

MSC においては低グルコース低酸素のストレス刺激により細胞死を誘導できなかったため、ある程度分化の進んだ細胞として軟骨前駆細胞を使用した検討を行った。軟骨前駆細胞は分化誘導により細胞外マトリクスを産生することで大型化する。ラット軟骨前駆細胞を分化誘導刺激である TGFβ＋IGF-1 処理を行い、レスベラトロール（RSV）処理の有無により軟骨組織への分化誘導を検討した。遺伝子発現レベルでは軟骨誘導刺激に加え、RSV 処理することで分化マーカーである collA1, col2A1 の発現上昇が認められた。また 21 日間のスフェロイド培養によりスフェロイドの直径は 800～900 μm に達し、RSV 処理することで対照群に比べ有意に大きな組織となった。組織切片を作製し軟骨基質をアルシアンブル―染色で評価したところ、対照群に比べ RSV 処理群のスフェロイドでより厚い軟骨基質層が形成されていることが分かった（図 3)。したがって軟骨前駆細胞を用いた立体組織作製と軟骨分化誘導においては RSV の分化促進効果が寄与することが示唆された。一方でスフェロイド内部は成熟した軟骨組織になっていないことから、分化誘導期間や初期スフェロイドサイズの検討が必要と思われる。

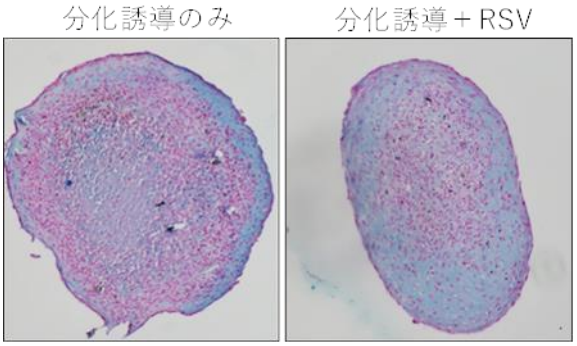


図 3. 軟骨前駆細胞スフェロイドからの軟骨組織分化誘導（アルシアンブル―染色)。TGFβ-1/IGF-1 刺激による分化誘導２１日後の組織像。青色部分は軟骨マトリクスを示す。

今後の展望として、大量のスフェロイドを凝集させることでより大きな立体組織を作製できるかについて検討を進める。また MSC は低栄養、低酸素のストレスに強く、RSV の細胞死抑制効果が得られにくいという結果となったことから、MSC から脂肪や軟骨細胞を分化誘導し、立体組織作製に応用することを試みる。

イナミンの渡環反応を利用した含窒素パイ共役系化合物の合成
－新奇含窒素ナノグラフェン創出への挑戦－

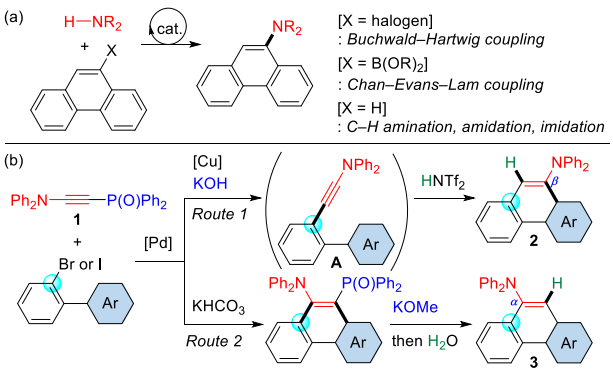
岡山理科大学　工学部　バイオ・応用化学科

奥田　靖浩

本研究では、塩基の添加により位置選択性を転換可能なホスフィニルイナミンと 2-ハロゲン化ビフェニルの [4+2] 環化反応を開発し、幅広い多環芳香族アミンを合成した。イナミンと 2-ブロモビフェニル、パラジウム触媒と強塩基 (水酸化カリウム) をジオキサン中で混合した場合には、脱ホスフィニル化と薗頭－萩原カップリング、続く分子内 Friedel-Crafts 反応が連続的に進行し、反応点の β 位にアミノ基をもつ多環芳香族アミンを得た。一方、イナミンと 2-ヨードビフェニル、パラジウム触媒と弱塩基 (炭酸水素カリウム) を DMF 中で混合した場合には直截環化が進行し、反応点の α 位にアミノ基をもつ多環芳香族アミンを選択的に得た。これらの反応で合成した (ジアミノ)ジベンゾアントラセンの位置異性体である２つの化合物を用いて紫外－可視吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した結果、アミノ基の置換位置によりモル吸光係数や蛍光量子収率が異なることを見出した。また、アミノ(ホスフィニル)フェナントレンの脱ホスフィニル化でアミノフェナントレンに変換し、その光学特性を調査した。さらにホスフィニル基を硫黄化および還元した誘導体も合成し、リン上の置換基が異なる場合でも光学特性が大きく変化することを見出した。

【緒言】

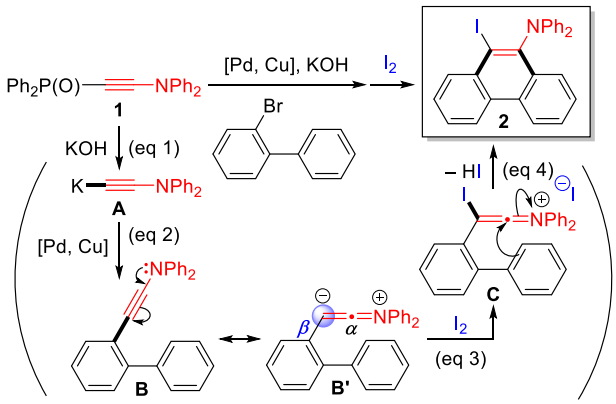
多環芳香族アミンはアミノ基による電子供与効果、また拡張パイ共役系による半導体特性を併せ持つため、ペロブスカイト太陽電池の正孔輸送材料として利用されている。実際、多環芳香族アミンとして spiro-OMe-TAD を正孔輸送層に利用したペロブスカイト太陽電池の光電変換効率は 20% 以上に達し[1]、持続可能な社会構築に向けて更なる研究が行われている。この多環芳香族アミンの合成法として、従来はパラジウムや銅触媒によるカップリング反応や[2]、近年では炭素－水素結合の直截アミノ化などが開発された (スキーム 1a)[3]。しかし、これらの方法論では入手困難な多環芳香族ハライドが原料として必要であり、溶解性が乏しいため反応は進行しにくい。本研究では、当研究室で先行開発した大気中安定なイナミン **1** を利用し[4]、パラジウム触媒を用いた 2-ハロゲン化ビフェニルとの芳香環形成反応で多環芳香族アミンを合成した (スキーム 1b)。また、申請者は脱ホスフィニル化段階を入れ替えることでアジド－アルキン環化付加の位置選択性を転換しており[5]、本研究でも同様の位置選択的な合成法を確立した。具体的には、脱ホスフィニル化と薗頭－萩原カップリングで中間体 **A** を形成した後、Brønsted 酸を用いた分子内 Friedel-Crafts 反応で反応点の β 位にアミノ基をもつ多環芳香族アミン **2** を合成した (Route 1)。一方、**1** と 2-ヨードビフェニルにパラジウム触媒、弱塩基である炭酸水素カリウムを添加すれば C–H 結合の活性化を経た直截環化が進行し、反応点の α 位にアミノ基をもつ多環芳香族アミン **3** が選択的に得られた。本研究では更にパイ拡張した誘導体の合成、ホスフィニル基の変換法の開発、および合成した多環芳香族アミンの光学特性について調査したので、それらの結果について以下詳細に述べる。



スキーム 1 ：(a) 従来の多環芳香族アミンの合成法、(b) 本研究で開発したイナミンの [4+2] 環化反応

【結果と考察】

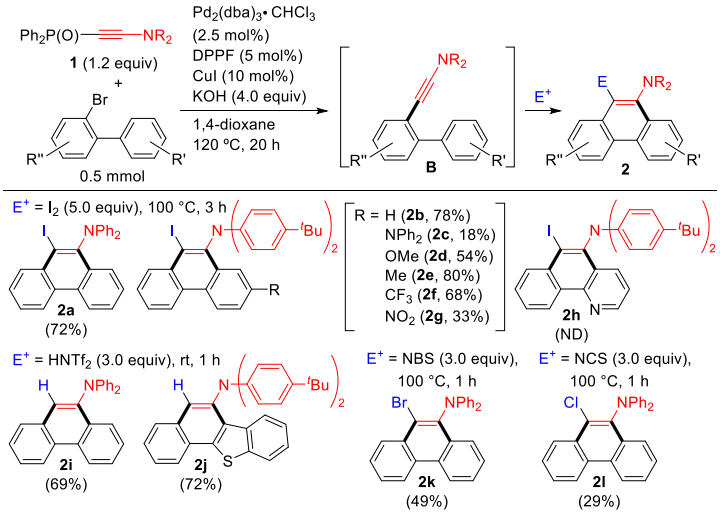
まず、イナミンと 2-ブロモビフェニルを出発原料に用いて多環芳香族アミン **2** を合成する反応開発を行った (主に本申請 1 年目に実施、論文発表済み[6])。実験結果の説明に先立ち、本研究で設計したメカニズムをスキーム 2 に示す。ホスフィニルイナミン **1** に水酸化カリウムを添加すると脱ホスフィニル化が進行してアセチリド **A** が発生し (eq 1)、続くパラジウムと銅触媒による薗頭－萩原カップリングで *o*-アリールイナミン中間体 **B** が得られる (eq 2)。この中間体では、アミノ基の強い電子供与効果により β 位の求核性が高く (**B'** としての寄与)、ヨウ素などの求電子剤を添加すればイミニウム中間体 **C** を形成し (eq 3)、分子内 Friedel-Crafts 環化が進行して目的とする多環芳香族アミン **2** が得られると考え、研究に取り組んだ (eq 4)。



スキーム２：イナミンの脱ホスフィニル化を経由する多環芳香族アミンの合成メカニズム

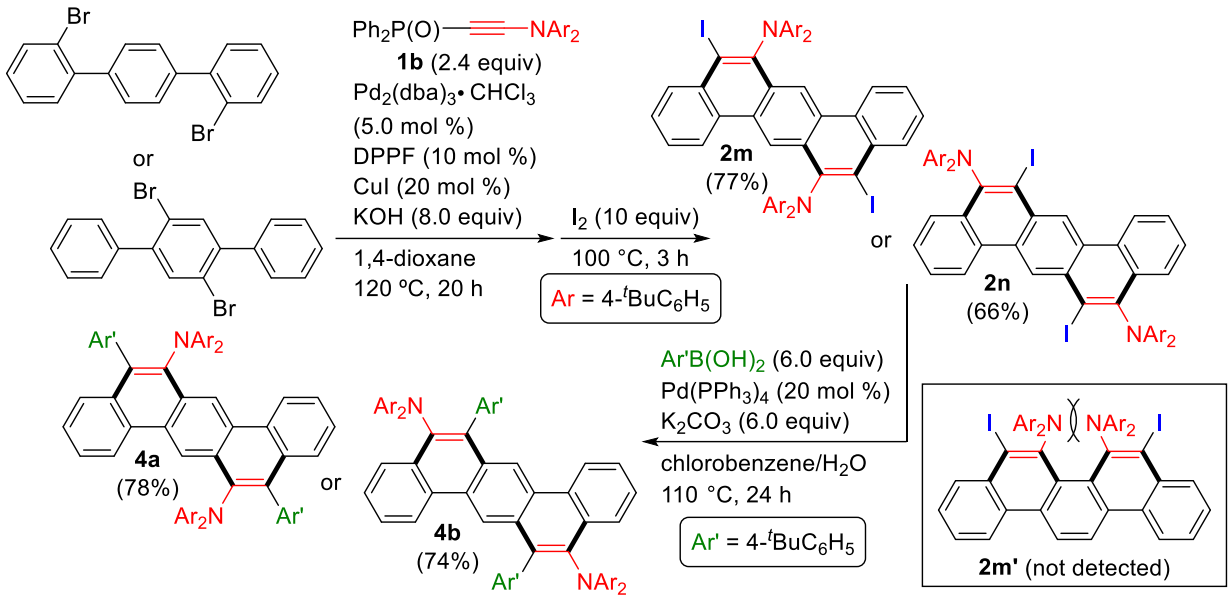
検討の結果、$Pd_2(dba)_3$•$CHCl_3$ と DPPF、ヨウ化銅を触媒とし、水酸化カリウムを添加して 1,4-ジオキサン中、120 °C (還流条件) で撹拌したところ、予想したイナミン中間体 **B** が効率的に生成した。続いてヨウ素を添加し、100 °C で 3 時間撹拌することにより目的とするアミノ (ヨード) フェナントレン **2a** を 72% の単離収率で得た (スキーム 3)。同様にイナミンや 2-ブロモビフェニルの基質適用範囲を検証した結果、パラ位に ^{t}Bu 基を置換したイナミンを用いた場合に収率が 78% に向上した (**2b**) ことに加え、溶解性が向上して取り扱いが容易になったため、このイナミンを用いて更に検証を進めた。その結果、ジフェニルアミノ基やニトロ基を置換したアミノフェナントレンは低収率であったが (**2c** 18%, **2g** 33%)、メトキシ基やメチル基、トリフルオロメチル基を置換した誘導体 (**2d** 54%, **2e** 80%, **2f** 68%) は良好な収率で目的とするフェナントレンを合成できた。電子不足な複素環であるピリジル基を含む誘導体の合成も行ったが、目的とする環化体は得られなかった (**2h**)。電子供与基を置換した 2-ブロモビフェニルはブロモ基の求電子性が低下しているため、パラジウムへの酸化的付加が遅い。また、電子求引基をもつ 2-ブロモビフェニルでは二段階目の Friedel-Crafts 環化が不利である。このような理由から、電子的に大きな摂動をもつ誘導体では収率が低下したと予想した。

また、二段階目の求電子剤として強い Brønsted 酸である $HNTf_2$ を用いるとプロトン化体である **2i** を 69% の収率で得た。またチオフェン環上でのヨウ素化が進行するため、チオフェンを含む誘導体ではヨードニウムによる環化付加を行うことはできないが、$HNTf_2$ によるプロトン化に変更すれば単一の生成物 **2j** を 72% の収率で得た。最後に、求電子剤として NBS を用いてブロモ化体 **2k** を 49%、NCS を用いてクロロ化体 **2l** を 29% の収率で合成した。



スキーム３：イナミンの脱ホスフィニル化を経由した多環芳香族アミンの合成

また、本反応を応用してパイ共役系をさらに拡張した芳香族アミンを合成した (スキーム 4)。パラ位に ^{t}Bu 基をもつイナミン **1b** にジブロモターフェニル位置異性体２種をそれぞれ用いて芳香環形成反応を行ったところ、対応するジベンゾ [*a*, *h*] アントラセン **2m** および **2n** が 77%, 66% の収率で得られた。



スキーム４：イナミンとジブロモターフェニルとの [4+2] 環化によるジベンゾアントラセンの合成と続く鈴木－宮浦カップリングによる分子修飾

2m の合成においては、ピセン骨格の形成 (**2m'**) も予想されたが、アミノ基間での立体障害によりジベンゾアントラセンのみが選択的に得られた。続いて、パラジウム触媒とボロン酸を用いた鈴木－宮浦カップリングによりヨウ素官能基を変換し、アミノ基とアリール基を置換したジベンゾアントラセン **4a** および **4b** を合成した。

この反応で合成した多環芳香族アミン **4a** および **4b** の光学特性を調査するため、紫外－可視吸収および蛍光スペクトルを測定した (図 1)。まず、**4a** では 409 nm が極大となる吸収スペクトルが得られ、モル吸光係数 0.7 ($\times 10^4$ M^{-1}•cm^{-1}) という値が得られた。この化合物の蛍光スペクトルを測定したところ、クロロホルム溶液中で 510 nm、粉末状態で 475 nm が最大となるスペクトルが得られ、蛍光量子収率はそれぞれ 0.14, 0.04 と弱い発光を示した。一方、アミノ基の位置異性体に相当する **4b** を用いて同様の測定を行った結果、吸収スペクトルでは 406 nm が極大となり波長自体には大きな変化がなかったものの、モル吸光係数は 2.1 ($\times 10^4$ M^{-1}•cm^{-1}) であり **4a** の三倍大きいことがわかった。また、クロロホルム溶液中での蛍光スペクトルでは 482 nm, 496 nm が最大となり、蛍光量子収率は 0.83 と大きく改善していた。また粉末状態においても蛍光波長は 474 nm と **4a** とほぼ同じであるが、蛍光量子収率は 0.15 と三倍近くまで改善していることがわかった。現在は、これらの反応を活用して更にパイ拡張した含窒素ナノグラフェンの合成に取り組んでいる。

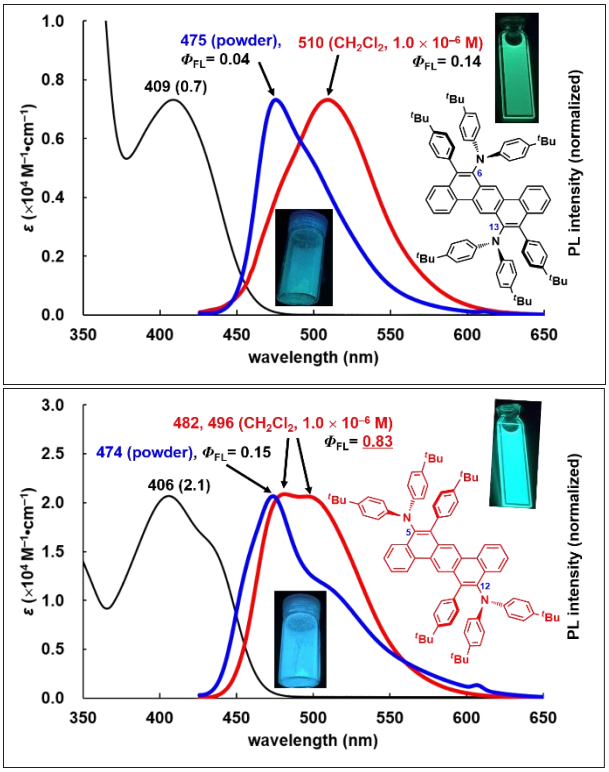
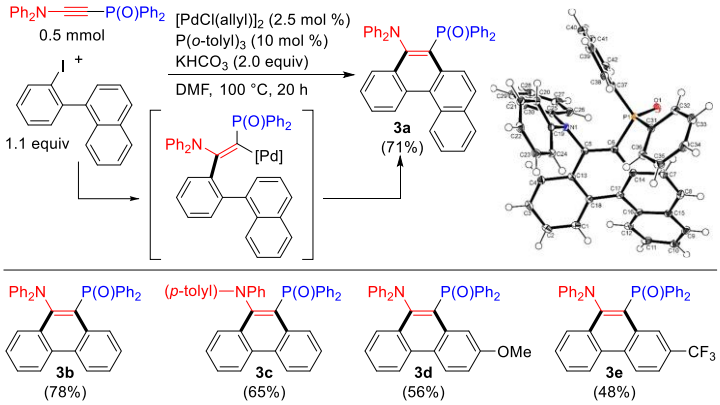


図１：(上) 多環芳香族アミン **4a**、(下) **4b** における紫外可視吸収および蛍光スペクトル

続いて、パラジウム触媒を用いたイナミンの直截環化により多環芳香族アミンを合成する反応 (スキーム 1b, Route 2) を検証した。イナミンと 2-ヨード

ビフェニルにパラジウム触媒、炭酸水素カリウムを DMF 中、100 °C で 20 時間撹拌することで目的とする環化体 **3a** を 71% で得た (スキーム 5)。また、1-(2-ヨードフェニル) ナフタレンを用いた生成物 **3a** の X 線結晶構造解析から、本反応における位置選択性を明らかにした。この反応を利用して関連誘導体の合成を行ったところ、無置換フェナントレン **3b** (78%) だけでなくトリル基を置換したイナミンによる環化体 (**3c**, 65%)、電子供与基であるメトキシ基を置換した環化体 (**3d**, 56%)、電子求引基であるトリフルオロメチル基を置換した環化体 (**3e**, 48%) をそれぞれ合成した。



スキーム５：パラジウム触媒によるイナミンの直截環化を経由した多環芳香族アミンの合成、および生成物の ORTEP 図

次に、合成したアミノ (ホスフィニル) フェナントレン **3** の脱ホスフィニル化を検討した。**3b** にメトキシカリウムを加え、1,4-ジオキサン中、加熱還流下で 30 時間撹拌したところ、溶液の発光色が黄色から青色へと変化し、対応した脱ホスフィニル化体 **5a** を 81% の収率で得た (図 2)。実際に、原料 **3b** と生成物 **5a** の紫外－可視吸収および蛍光スペクトルを測定したところ、吸収スペクトルは 413 nm (ε = 0.24×10^4 M^{-1}•cm^{-1}) から 358 nm (ε = 0.62×10^4 M^{-1}•cm^{-1}) へ 55 nm 短波長シフトしていた。また、発光スペクトルにおいても 537 nm から 461 nm へと 76 nm 短波長シフトしており、電子求引性のホスフィニル基が除かれることでドナーアクセプター型骨格が解消され HOMO–LUMO 準位のエネルギー差が大きくなるため、短波長シフトすることがわかった。

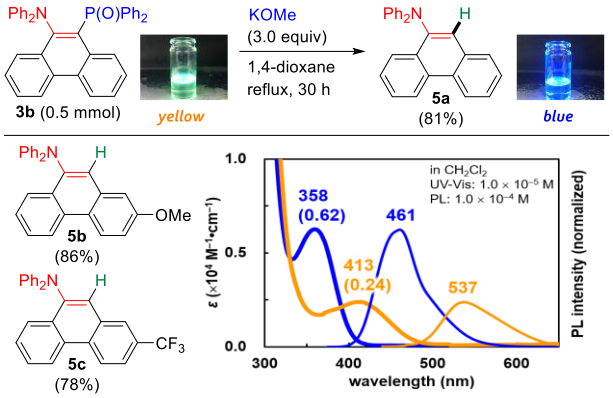
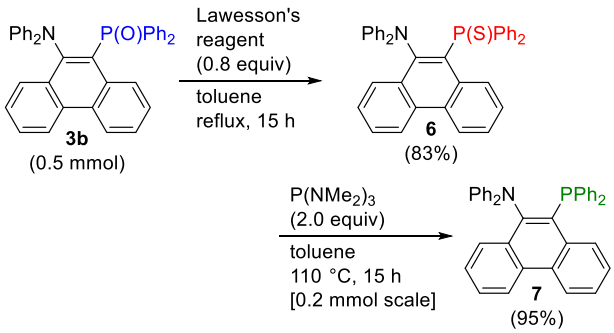


図２：アミノ (ホスフィニル) フェナントレン **3** の脱ホスフィニル化と光学特性の変化

さらに、直截環化により合成したアミノ (ホスフィニル) フェナントレン **3b** のホスフィニル基を変換し、リン上の置換基が異なる場合での光学特性に及ぼす影響を調査した。まず **3b** にローソン試薬を添加し、トルエン中、加熱還流条件で撹拌すると期待したホスフィンスルフィド **6** が 83% の収率で得られた (スキーム 6)。続いて、**6** にホスフィンアミドを加えて脱硫黄化を行い、対応するアミノ (ホスファニル) フェナントレン **7** を 95% の収率で得た。



スキーム６：ホスフィニル基の硫黄化－脱硫黄化による変換反応

上記の反応で合成した各誘導体を利用し、紫外－可視吸収および蛍光スペクトルを測定した (図３)。P(O)Ph$_2$ 基や PPh$_2$ 基をもつアミノフェナントレン **3b**,**7** では 500 nm 以上の長波長発光を示し、リン官能基を含まない **5a** やホスフィンスルフィド **6** ではそれぞれ 423, 453 nm と短波長での蛍光発光を示した。ホスフィニル基を除く、あるいは重原子である硫黄を導入すると励起状態における熱振動や構造緩和といった影響が小さくなり、ストークスシフトが小さくなったことに起因したと考えている。

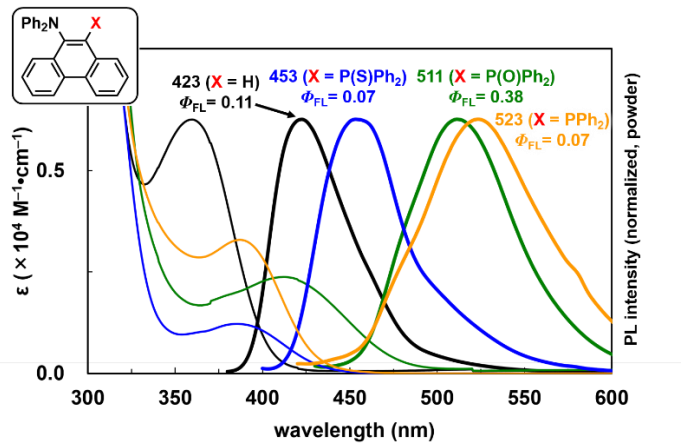


図３：ホスフィニル基を変換することによる蛍光スペクトルの変化

最後に、2-ナフチル基をもつ **8a,b** を用いて各反応での位置選択性の相違について調査した。イナミン **1a** とブロモビフェニル **8a** を用いて脱ホスフィニル化と続く薗頭－萩原カップリングを行い、$HNTf_2$ を用いた環化反応を行ったところ、アミノクリセン **2o** のみが選択的に形成し、ベンゾアントラセン **2o'** は全く生成しなかった (スキーム 7a)。一方、パラジウム触媒を用いた直截環化を行った場合には位置選択性は発現せず、環化生成物 **3f** と **3f'** の等量混合物が 55% の収率で得られた (スキーム 7b)。Friedel–Crafts 環化を経由する脱ホスフィニル型環化では、**2o'** を形成するために必要な中間体がキノイド型構造を取り、熱力学的に **2o** の形成と比較して不利であったため、明確な位置選択性が発現したと考えられる。

【まとめ】

本研究では、イナミンと 2-ハロビフェニルの [4+2] 環化により幅広い多環芳香族アミンを合成した。今後は、有機エレクトロニクス分子の設計に本反応を応用し、持続可能な社会の実現に大きく貢献する高機能材料を創出したい。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、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申し上げます。

【参考文献】

(1) L. Calió, S. Kazim, M. Grätzel, S. Ahmad, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*,14522–14545.

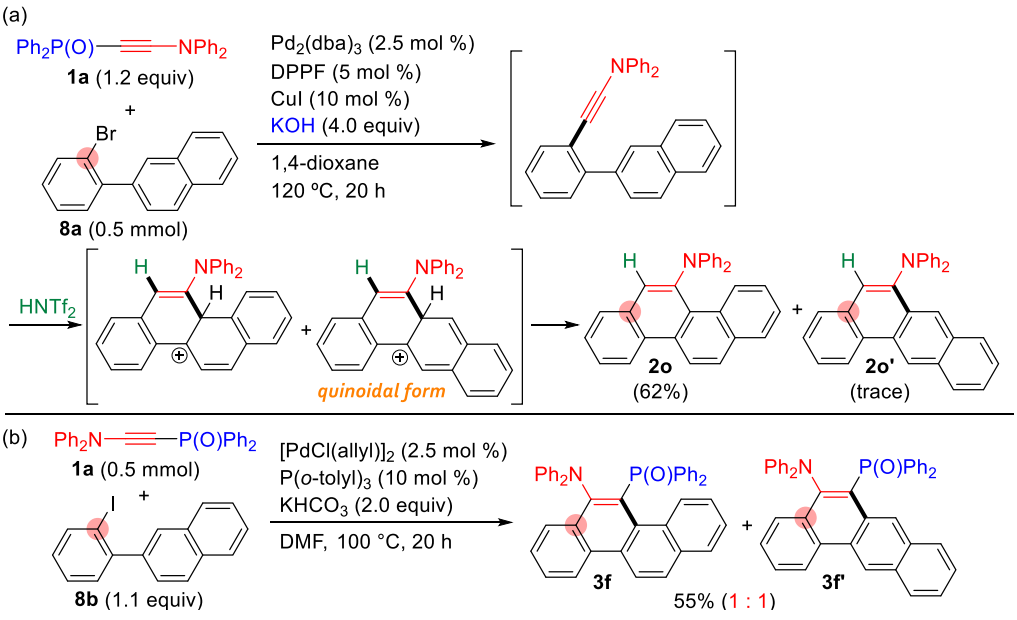
(2) (a) F. Paul, J. Patt, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5969. (b) A. S. Guram, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**. *116*, 7901–7902. (c) A. Guram, R. Rennels, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1348–1350.

(3) Y. Park, Y. Kim, S. Chang, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 9247–9301.

(4) Y. Okuda, T. Seo, Y. Shigezane, H. Watanabe, H. Akashi, T. Iwanaga, A. Orita, *Chem. Lett.* **2019**, *48*, 1484–1487.

(5) Y. Okuda, K. Imafuku, Y. Tsuchida, T. Seo, H. Akashi, A. Orita, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 5099–5103.

(6) Y. Okuda, M. Fujimoto, H. Akashi, A. Orita, *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 17651–17666.



スキーム７：(a) 脱ホスフィニル化環化、(b) 直截環化におけるイナミン **1a** とハロゲン化物 **8a,b** の反応

アブラボテ属のタナゴ類２種の自然分布域における交雑

岡山理科大学生物地球学部生物地球学科[1)]・愛媛大学大学院理工学研究科[2)]・大阪医科薬科大学医学部[3)]

武山智博[1)]・畑啓生[2)]・橋口康之[3)]

（概要）日本産タナゴ類の多くの種は，生息地の縮小や劣化，産卵基質であるイシガイ目二枚貝の減少などの複合的要因により絶滅の危機に瀕している。加えて，本来の生息域外への人為的移入（外来種）に起因し，在来種との間で交雑（雑種形成）が生じ，外来種問題において深刻な影を落とすようになった。国内外来種と在来の近縁種との間で交雑が生じた例としては，愛媛県松山平野における在来のヤリタナゴと移入されたアブラボテとの交雑が報告されており，生殖隔離機構が何らかの理由で機能していない事が推測されるが，その仕組みはよく分かっていない。本研究では，これら２種うち片方が移入された場合に交雑が生じる機構を明らかにする第一歩として，両種間の生殖隔離機構の頑強性を評価するため，まず２種が自然分布する岡山市内の農業用水路（旭川より取水）内の 4 ヶ所にて捕獲調査を実施し，遺伝子解析による交雑の発生頻度を明らかにした。その結果，捕獲した 271 個体の内訳は，ヤリタナゴが 90 個体，アブラボテが 173 個体，雑種一世代（F_1）が 5 個体，雑種二世代（F_2）以降が 3 個体で，3%が雑種であった。この低い雑種個体の出現率は，本調査地におけるヤリタナゴとアブラボテの交雑を回避する生殖隔離機構が働いていることを示唆する。

研究の背景と目的

進化の過程で種分化し，独立した種として存在していた 2 種が，交雑により 1 種へと融合する事は，種多様性の減少を促進する。種間での交雑に関する従来の研究は，2 種の分布域が地理的に隣接する地域に形成される「交雑帯」に着目し，理論的・実証的な側面で進められてきた（Barton and Hewitt, 1985; Buggs 2007）。国内では，キタノメダカとミナミメダカの分布の境界域において，両方の交雑集団を認めた研究（酒泉 1987）があるものの，日本産淡水魚に関する交雑の研究は限られている。

日本産タナゴ類の多くの種は，生息地の縮小や劣化，産卵基質であるイシガイ目二枚貝の減少などの複合的要因により絶滅の危機に瀕している。加えて，本来の生息域外への人為的移入（国内外来種）に起因し，在来種との間で交雑（雑種形成）が生じている。交雑による遺伝子浸透（遺伝子汚染）は，外来種による在来生物の捕食や生息地の侵略などの直接的な影響とは異なる側面において，生物多様性や在来種の保全における新たな脅威となっている（河村 2015）。国内では，固有亜種のニッポンバラタナゴと，移入されたアジア大陸原産の近縁亜種であるタイリクバラタナゴとの間で生じている交雑が一例として挙げられる（Kawamura et al. 2001）。他方で，国内外来種と在来の近縁種との間で交雑が生じた事例としては，愛媛県松山平野における在来のヤリタナゴと移入されたアブラボテとの交雑があり，産卵基質である二枚貝の不足が交雑の原因の一つとして指摘されている（Uemura et al., 2018; Hata et al. 2019）。移入先での交雑が生じている一方で，アブラボテとヤリタナゴ（図１）の自然分布域が重複する西日本から九州にかけての地域では，2 種は独立したまま共存しており，これは生殖隔離機構（交雑回避の仕組み）が働いていることを示す。ただ，ごく少数の例ではあるが，自然分布域においても遺伝子解析から両者の交雑が確認されている（Hashiguchi et al., 2006）。では，なぜ移入先において両種は容易に交雑するのであろうか。交雑の根本的な原因は，生殖隔離機構が何らかの理由で機能していない事にあるが，その仕組みはよく分かっていない。本研究では，これら２種うち片方が移入された場合に交雑が生じる機構を明らかにする第一歩として，両種間

の生殖隔離機構の頑強性を評価するため，まず２種が自然分布する岡山市内の農業用水路（旭川より取水）内の４ヶ所にて，タナゴ類の繁殖期である春から夏にかけて捕獲調査を実施し，遺伝子解析による交雑の発生頻度を明らかにした。さらに，雑種個体の出現と産卵基質となる二枚貝の生息密度や生息環境との対応から交雑に関係する要因を検討した。

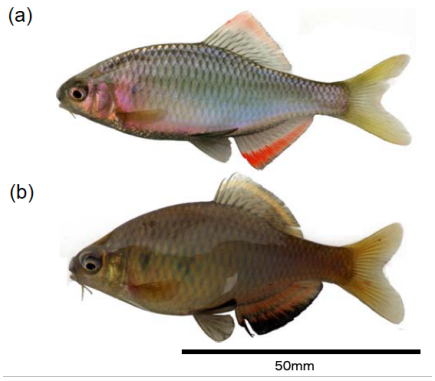


図1(a) ヤリタナゴ *Tanakia lanceolatal*（オス），(b)アブラボテ *Tanakia limbata*（オス）

方法

遺伝子解析に用いた個体の採取は，旭川本流の東側（岡山市中区）の農業用水路内に設定した４つの調査地点（図２，３）において，カゴ罠を用いて実施した。捕獲された各個体は，体側面の写真撮影と遺伝子解析用のサンプルを得た（ヒレの一部を切除後，捕獲地点に放流）。切除したヒレはエタノール（99.9%）中で解析まで保管した。撮影した写真の外部形態に基づき，(Hosoya 2013)に従って２種を同定した。加えて 3 調査地（ASU， SHK，SSR）において，生息環境の物理的要因（流速・流路幅・水深）の計測および産卵基質である二枚貝の徒手採集（1x1m 区画 x6 箇所）を行った。

交雑個体の出現頻度を評価するため，調査によって得られたサンプルの遺伝子解析を行った。捕獲個体より切除したヒレから DNA 抽出キットにより DNA を抽出した後，種特異的な 6 つの核遺伝子マーカー（一塩基多型）を用いた TaqMan プローブ法に基づき種特異的な遺伝子の有無を決定する。そのデータに基づき各個体の種(交雑個体)を判別した。

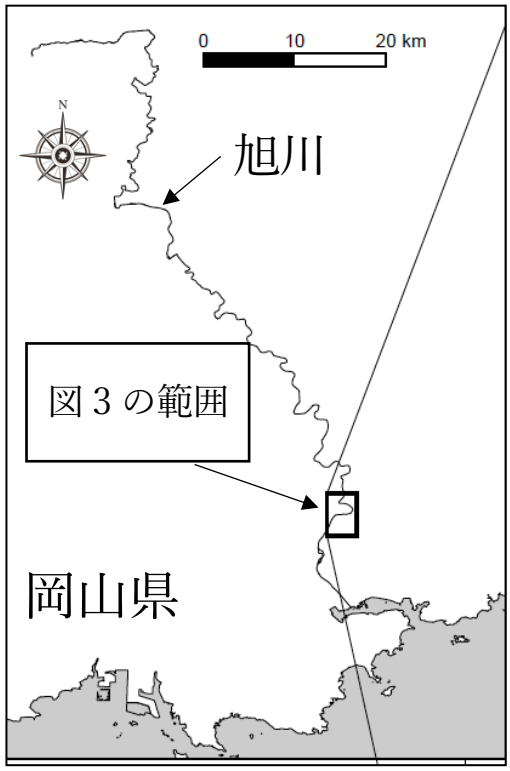


図２　調査地の概略図

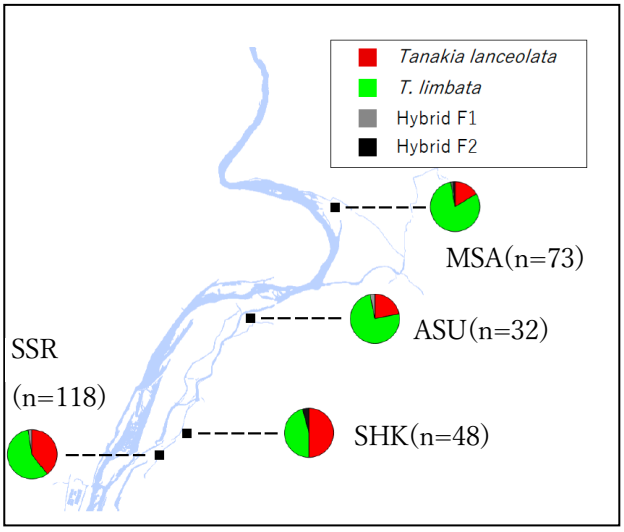


図３　調査地点ごとのヤリタナゴ（赤），アブラボテ（緑），両種の雑種（灰・黒）の出現個体数

結果

非灌漑期では，3 調査地点は流路幅（6-14m）が比較的狭く，水深は 1ｍ未満と比較的浅く（表１），流速も 30cm/s 以下と緩やかな流れであった（表 2)。

表１　各地点の流速　（平均値± SD，cm/s）

地点	表層	中層	底層
SSR	1.1 ± 2.5	1.2 ± 3.0	1.0 ± 2.5
ASU	27.2 ± 21.5	22.9 ± 18.4	16.2 ± 14.7
SHK	2.9 ± 6	2.8 ± 5.7	1.9 ± 3.8

表 2　各地点の流路幅(m)及び水深(cm)

地点	流路（平均値± SD）	水深（平均値± SD）
SSR	12.3 ± 0.8	36.0 ± 14.0
ASU	14.0 ± 3.3	37.1 ± 9.9
SHK	5.5 ± 0.9	61.2 ± 7.6

表 3　各地点の二枚貝の密度（$1m^2$あたり）

地点	種	密度（平均値± SD）
ASU	*I. yanagawensis*	0.00
	I. brandtii	0.00
	O. omiensis	0.17 ± 0.41
	N. douglasiae	0.00
	L. oxyrhyncha	0.00
SHK	*I. yanagawensis*	20.31 ± 4.17
	I. brandtii	1.83 ± 1.72
	O. omiensis	0.00
	N. douglasiae	1.67 ± 1.63
	L. oxyrhyncha	0.83 ± 1.33
SSR	*I. yanagawensis*	0.17 ± 0.41
	I. brandtii	0.00
	O. omiensis	0.33 ± 0.52
	N. douglasiae	0.00
	L. oxyrhyncha	0.00

4 地点での捕獲調査の結果，対象としたアブラボテ属２種は全地点で捕獲され，合計 271 個体が採集された（図３）。遺伝子解析の結果，271 個体の内訳は，ヤリタナゴが 90 個体，アブラボテが 173 個体，雑種一世代（F_1）が 5 個体，雑種二世代（F_2）以降が 3 個体で，全捕獲個体の 3.0%（8/271 個体）が雑種であった（図３）。地点間での雑種の出現率に違いは認められなかった（GLM，$p > 0.05$)。

本調査では 5 種の二枚貝（ニセマツカサガイ *Inversiunio yanagawaensis*，オバエボシガイ *Inversidens brandtii*，カタハガイ *Obovalis omiensis*，イシガイ *Nodularia douglasiae*，ササノハガイ *Lanceolaria oxyrhyncha*）が確認された（表 3)。地点 SHK ではニセマツカサガイが優先し 20 個体（/m^2）と高い密度であったが，他の種の密度は比較的低かった。

考察

本研究では，ヤリタナゴとアブラボテの両種の自然分布域である旭川水系において，遺伝子解析に基づき交雑による雑種個体の存在を示した。雑種個体の出現率は 3.0%（8/271 個体）であった。先行研究（Hashiguchi et al., 2006）では，本調査地に近接する場所でヤリタナゴ 20 個体およびアブラボテ 11 個体を遺伝子解析(mtDNA)により交雑を判定したが，雑種は含まれていなかった。一方，両種が分布する西日本や九州（人為的な移入による分布も含む）においては，外部形態と遺伝子型（ハプロタイプ）が一致しない雑種個体が見つかっている。Hashiguchi et al.（2006）によると，ヤリタナゴでは，国近川（愛媛県）の 15 個体のうち 12 個体（80.0%）が雑種であり（ただしアブラボテが外来種），アブラボテにおいては，駅館川（大分県）で 5.56%（1/18 個体），木屋川（山口県）では 10.0%（2/20 個体），江の川（島根県)では 5.88%(1/17 個体)が雑種であった。これらの他地域の交雑個体の出現率に比べ，本研究の調査地における出現率は低かったことは，2 種の生殖隔離機構が比較的強く働いていることを示唆する。ヤリタナゴとアブラボテが交雑して生じた雑種には稔性があるが（Suzuki & Hibiya, 1986），稚魚の段階では雑種の生残率が低く，交配後の生殖隔離の存在が示唆されている（Kawamura & Hosoya, 2000)。本研究では成魚段階での雑種の出現率を検討しているため，二枚貝内の受精卵の段階における雑種の割合は分かっていない。よって，今後は，２種

の産卵時における生殖隔離機構（例えば配偶相手の認識や選択）や貝内の受精卵における雑種の出現率の解明が課題である。

本研究の調査地とした水路では，5 種の淡水性二枚貝（ニセマツカサガイ，オバエボシガイ，カタハガ，イシガイ，ササノハガイ）が確認された。このうち，カタハガイとニセマツカサガイはヤリタナゴに，またカタハガイはアブラボテの産卵基質としてそれぞれ好まれる(Kitamura, 2007)ことから，両種のタナゴ類にとって共通の産卵基質となる二枚貝が分布していた。他の地域における，これらの二枚貝の生息密度に関する情報が不足しているため，本調査地における二枚貝の密度との直接の比較は難しいが，地点 SHK におけるニセマツカサガイの密度（20.31 個体/m^2）は比較的高いものと推測される。今後は，２種のタナゴにおける産卵基質としての二枚貝の種およびサイズに対する選好性や 1 個体の貝の利用方法(産卵数や産卵の位置)の違いの解明が，今後の課題であると考えられた。

謝辞

本研究における野外調査・タナゴ類の採集は，谷口倫太郎氏（岡山大学大学院環境生命科学研究科）によって実施された。また，遺伝子解析に関しては山下尚希氏（愛媛大学理学部）に進めて頂いた。ここに謝意を表します。本研究の遂行に当たり，公益財団法人ウエスコ学術振興財団に多大なご支援を賜りましたことに感謝申し上げます。

引用文献

Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of Hybrid Zones. Annu Rev Ecol Syst 16:113-148.

Buggs RJA (2007) Empirical study of hybrid zone movement. Heredity (Edinb) 99:301-312.

Hashiguchi Y, Kado T, Kimura S, Tachida H (2006) Comparative phylogeography of two bitterlings, *Tanakia lanceolata* and *T. limbata* (Teleostei, Cyprinidae), in Kyushu and adjacent districts of western Japan, based on mitochondrial DNA analysis. Zoolog Sci 23:309-322.

Hata H, Uemura Y, Ouchi K, Matsuba H (2019) Hybridization between an endangered freshwater fish and an introduced congeneric species and consequent genetic introgression. PLoS One 14:e0212452.

Hosoya, K. (2013) Acheilognathinae. In Nakabo, T. (Ed.) Fishes of Japan with pictorial keys to the species (3rd edition) Tokyo: Tokai University Press, pp. 310-316.

河村功一（2015）交雑がもたらす遺伝子汚染の実態. 遺伝 116-122.

Kawamura, K., & Hosoya, K. (2000) Masculinization mechanism of hybrids in bitterlings (Teleostei: Cyprinidae). Journal of Heredity, 91, 464-473.

Kawamura K, Ueda T, Arai R, Nagata Y, Saitoh K, Ohtaka H, Kanoh Y (2001) Genetic introgression by the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*, into the Japanese rose bitterling, *R. o. kurumeus* (Teleostei: Cyprinidae). Zoolog Sci 18:1027-1039.

Kitamura, J. (2007) Reproductive ecology and host utilization of four sympatric bittering (Acheilognathinae, Cyprinidae) in a lowland reach of the Harai River in Mie, Japan. Environmental Biology of Fishes, 78, 37-55.

Suzuki, N., & Hibiya, T. (1986) Hybridization experiments in Acheilognathine fishes (Cyprinidae), intrageneric hybrids between *Acheilognathus lanceolata* and *A. limbata*. Bulletin of the College of Agriculture and Veterinary Medicine Nihon University, 43, 151-164.

Uemura Y, Yoshimi S, Hata H (2018) Hybridization between two bitterling fish species in their sympatric range and a river where one species is native and the other is introduced. PLoS One 13:1-14.

交通障害を引き起こす突発的な濃霧の予測可能性

岡山理科大学 生物地球学部 生物地球学科

大橋　唯太

本研究では、頻繁に交通障害を引き起こす濃霧を予測することを目標に、現地で濃霧の実態を捉えた。本稿では、高速道路が通行止めとなるほどの濃霧が記録される大分県別府市での調査結果と予測可能性について、報告する。

１．はじめに

大分県の日出（ひじ）・速見・別府・湯布院を結ぶ高速道路（東九州自動車道、日出バイパス、大分自動車道）では、霧による通行止め時間が年間 200～300 時間を記録している（国土交通省 HP)。大分県はその経済損失を年間約 1.8 億円と試算しており（大分県、2020)、地域や自治体にとって大きな問題で、対策が急務である。その対策に重要となるツールの一つに、霧の予測情報があげられる。高速道路の運用では、①霧によって視程がどの程度まで悪化するか、②いつ頃に霧が消散するか、の２点が事前に取得したい情報とされる。

一方で、この地域で頻発する霧の気象学的な発生メカニズムは不明であり、既往研究も存在しない。霧を予測するために発生メカニズムの把握は不可欠で、現地での気象観測によって霧と視程、気象データを取得することは第一段階といえる。

そこで本研究では、以下の課題に重点を置いた。①霧の実地観測をおこなう。

② 気象モデルによって霧の発生メカニズムを明らかにする。

③ 霧発生の予測に有用な気象パラメータを探す。

図１に、本研究で対象となる霧による通行止め発生 IC の位置を示す。

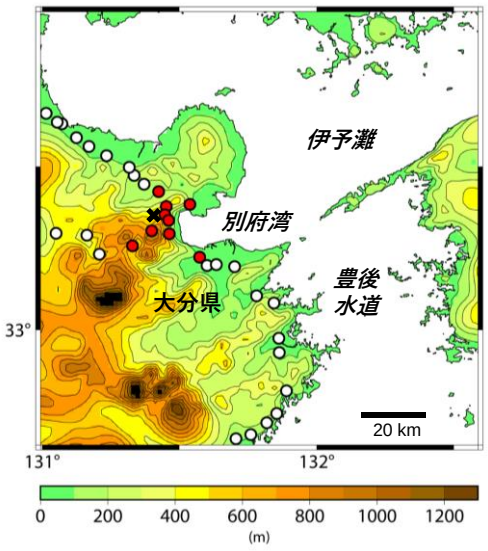


図１　濃霧による通行止めが頻発する高速道路 IC の地図と周辺地形図。丸印が IC の位置で、このうち赤丸は濃霧によって通行止めとなる IC である。×印は、本研究で実施した気象観測の地点を示す。

２．研究方法

2-1　現地での気象観測

別府湾沿岸から西へ約 5.5km の地点で、霧の画像、視程、気象の観測をおこなった。この地点の標高は 585m であり、鶴見岳の北部山系の山頂付近に位置する（**図１**の×印)。霧のカメラ画像、視程、気温、相対湿度、気圧を、2021 年 6 月 24 日から同年 11 月 1 日まで観測した（**表１**)。観測機器を設置した様子を図２に示す。１節で述べた高速道路で霧による通行止めが２回、50km 速度規制が９回、NEXCO 西日本の記録から確認された。

2-2　メソ客観解析

霧で高速道路の通行止めが発生した過去の事例から、気象条件の特徴を統計的に明らかとする目的で、気象庁が配信する数値予報 GPV を解析した。京都大学生存圏研究所が WEB 上に公開しているデータベース（http://database.rish.kyoto-u.ac.jp/）より、メソ数値予報モデルによる出力値をダウンロードし、このうち初期値となる解析値（メソ客観解析値）を解析した。

表１　現地で観測に用いた機器と測定項目など。

設置機器	型番	機器メーカー	測定要素	測定間隔など
自動撮影カメラ	400-CAM067	サンワサプライ（株）	静止画像	10分間隔
視程計	MiniBSV	（株）アイ・アール・システム	水平視程	10分間隔で30秒間測定後方散乱式
温湿度計	RTR-507BL	（株）ティアンドデイ	気温 相対湿度	10分間隔
気圧計	TR-73U		現地気圧	10分間隔

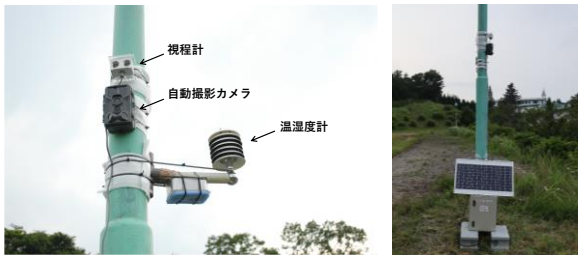


図２　設置した観測機器の様子。気圧計は右写真のソーラーパネルの裏面に設置してある。

メソ客観解析では、地上 5km 間隔、各気圧面 10km 間隔に気象要素が 3 時間毎に出力されており、本研究ではおもに地上の気象要素を解析に用いた。別府周辺におけるメソ客観解析の格子点の位置を、**図３**に示す。

2019 年 4 月から 2021 年 9 月までに発生した霧による通行止め事例を、解析対象とした。月別にまとめた事例件数を**表２**に示す。全部で 14 事例が、NEXCO 西日本の記録から確認されていた。

2-3　数値シミュレーション

霧の発生メカニズムを明らかにする目的で、気象モデルを用いて霧の数値シミュレーションをおこなった。アメリカ大気研究センター（NCAR）らが開発した WRF（Weather Research and Forecasting Model）-ARW を本研究では用いた（https://www2.mmm.ucar. edu/wrf /users/）。バージョンは 3.8.1 であり、モデルの水平格子間隔を 500m にして別府湾周辺の大気状態を計算した。このモデルでは様々な物理プロセスに関する設定がユーザー側で必要となるが、紙面の都合上、割愛する。大気の気象要素はもちろん、雲や雨、霧の時空間的な再現も可能である。

シミュレーション計算は、2020 年 5 月 3 日から 4 日にかけて発生した霧による速度規制および通行止めの事例を対象とした。

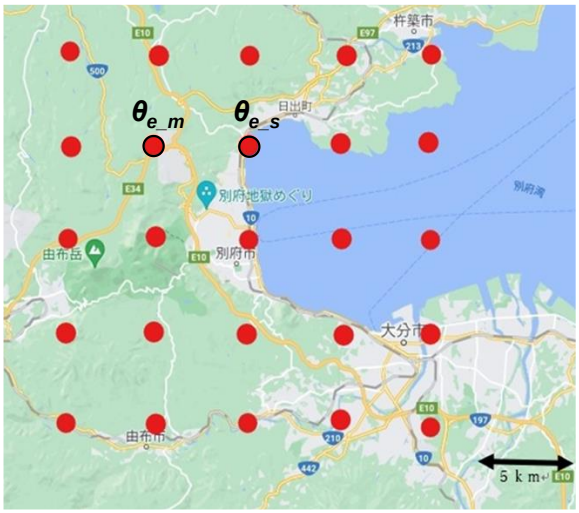


図３　メソ客観解析の格子点の位置（赤丸）。
θ_{e_s} と θ_{e_m} は、相当温位差を計算した格子点。
地図は google map より引用。

表２　メソ客観解析データを解析した霧による通行止め事例（全 14 事例）。

(月)	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
2019年度	1		1	2		1	1					
2020年度		2	1							1	1	1
2021年度				1		1						

３．結果と考察

3-1　数値シミュレーション

図４に、霧発生時（2020 年 5 月 3 日 18 時）の数値シミュレーション結果を示す。実際に高速道路で霧による 50km 速度規制が出ていた時間である。高速道路（東九州自動車道）が南北に通っている別府湾西側の山斜面（図中の破線赤丸）で、霧の発生が再現されている。ここでは別府湾からの東風が吹き込む様子がわかり、これは日本南岸を通過する温帯低気圧の影響によるものと考えられる（図省略）。

興味深い特徴は、この霧を鉛直方向からみると（右図）、別府湾から入り込んでくる地上の東風は山の斜面を滑昇したあと上空で反転した流れ（つまり西風）となっており、その結果として別府湾上で鉛直循環を形成している点である。山の中腹にある別府湾 IC（右図の黒丸）で視程は 50m 以下となっており、また鉛直循環内でも霧の広がりによって 50m 未満の濃霧となっているのがわかる。

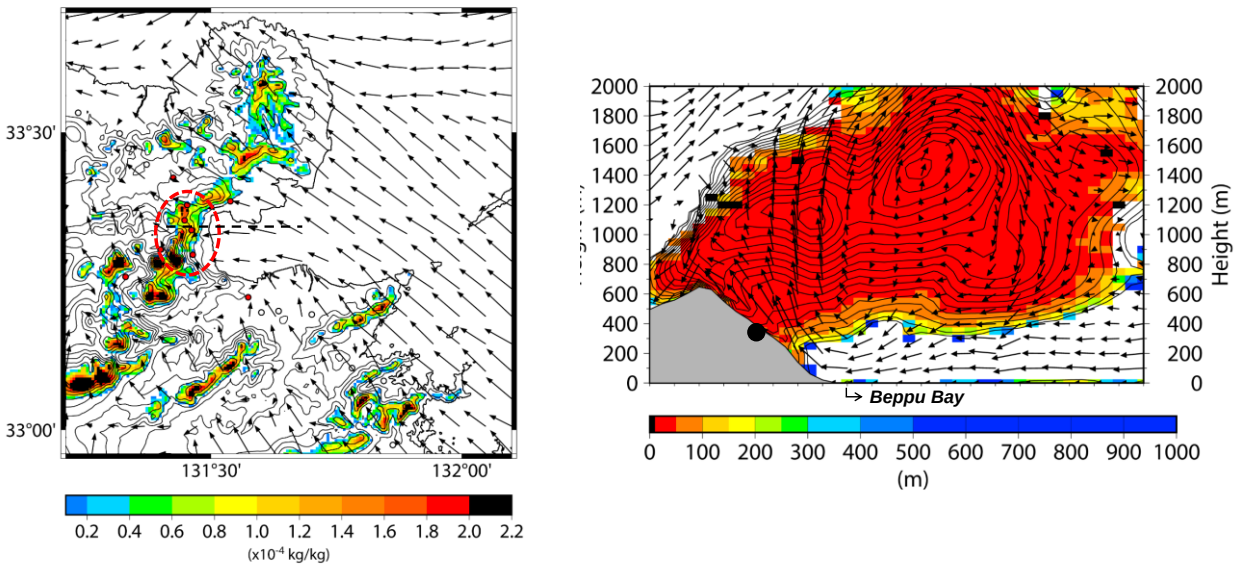


図４　気象モデルで再現された 2020 年 5 月 3 日 18 時の（左）地上における霧水量（色塗り）と水平風（ベクトル）の水平分布と、（右）視程（色塗り）と鉛直風（ベクトル）の鉛直断面図。鉛直断面図の断面位置は左図の破線である。視程は、計算された霧水量をもとに推定した値である。

以上のシミュレーション結果から、高速道路で発生する霧は、気象学的には滑昇霧という現象と明らかとなった。別府湾が東風の場となる条件で、空気塊が風下の山斜面を滑昇することで、霧が連続的に形成される。山の斜面を横切るように作成した、地上の相当温位と水平風の時間変化を**図５**に示す。相当温位は気象学でよく用いられる物理量で、値が高いほど暖湿な空気塊であることを表し、一方で相当温位が変化しない（相当温位が保存されている）ときは同一の空気塊が輸送されてきているという目安にもなる。5 月 3 日の 15 時頃には、別府湾から東風の流入がみられ、山の斜面全体が東よりの風に覆われている。このとき相当温位の値も高く、かつ斜面全体の相当温位の値も等しくなっていることから、東風によって暖湿気塊が山の斜面を滑昇している証拠だといえる。これが濃霧を引き起こす原因である。

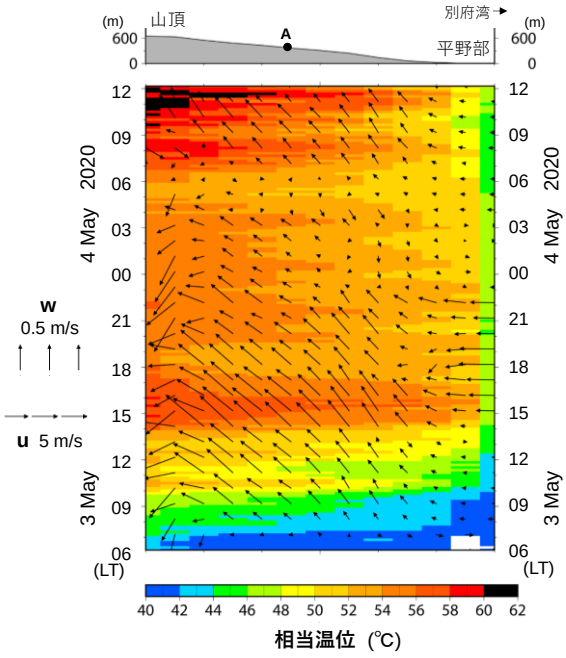


図５　地上における相当温位（色塗り）と水平風（ベクトル）の時間変化。縦軸が時間変化、横軸は図４左図の破線で示した山の斜面を横切る断面位置を示す。

3-2　メソ客観解析

3-1 節の数値シミュレーションの結果から、別府湾の西側にある山を空気塊が滑昇する現象が重要だとわかった。そこで、気象庁が配信する過去のメソ客観解析データを使って、山の麓と頂上付近が含まれる格子点を選び、相当温位の差 $\Delta\theta_e$ を計算することで、濃霧との関係性を調べてみた（**図３**）。

$$\Delta\theta_e = \theta_{e\_s} - \theta_{e\_m} \qquad (1)$$

ここで、θ_{e_s} は山の麓（平野部）の格子点における相当温位、θ_{e_m} は山の山頂の格子点における相当温位をそれぞれ表している。

【事例１】2019 年 6 月 26 日

霧による速度規制は 6 月 26 日 8 時 5 分から 6 月 27 日 10 時 35 分まで、このうち通行止めが 6 月 26 日 16 時 0 分から 6 月 27 日 9 時 5 分まで発生した。約 27 時間にわたり、高速道路の運用障害がみられた事例である。九州に梅雨前線がかかり、やや北上していくことで暖湿な気流が別府湾へ入り込んだと考えられる（天気図略）。メソ客観解析を水平面に対して図化した結果を、**図６**に示す。高速道路の規制前にはみられなかった高い相当温位と南東の風が、霧による通行止めが発生した時間帯に顕著となり、暖湿な空気塊が別府湾内に侵入していると予想される。

【事例２】2020 年 5 月 31 日

霧による速度規制は 5 月 30 日 23 時 35 分から 6 月 1 日 11 時 40 分まで、このうち通行止めが 5 月 31 日 10 時 50 分から 5 月 31 日 16 時 55 分まで発生した。約 36 時間にも及ぶ高速道路の運用障害がみられた事例で、事例１よりも長い。日本の南海上を、前線を伴った温帯低気圧が通過する際に暖湿気流が南から流入してきたと考えられる（天気図略）。メソ客観解析の結果からは、通行止め発生時には事例１と同様に、相当温位が規制前の時間帯よりも高くなり、かつ地上風も南東の風が現れていた。したがって別府湾へも暖湿な空気塊が流入しやすい条件だったと考えられる。

図３で示した山の頂上と麓の格子点のあいだの相当温位差Δθ_eの時間変化を、**図７**に示す。両事例とも、

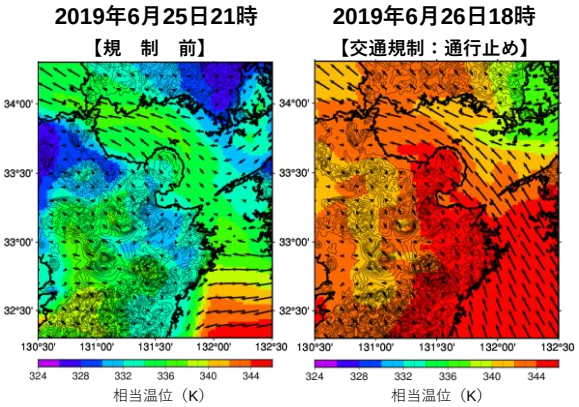


図６　メソ客観解析による地上の相当温位（色塗り）と水平風（ベクトル）の水平分布図。（左）通行規制前の 2019 年 6 月 25 日 21 時、（右）霧による通行止め発生時の 2019 年 6 月 26 日 18 時の結果。

霧による 50km 速度規制が発生する１日ほど前から東よりの地上風が出現しており、12 時間または 9 時間前からΔθ_eの値が小さくなり、ゼロへ近づいていく様子がわかる。速度規制の時間帯には、東風と±1K（℃）未満のΔθ_eが持続していることが、両事例に共通している。

この２事例を含めた、2019 年 4 月から 2021 年 9 月までに発生した霧による通行止め 14 事例を統計解析した結果を、**図８**にまとめる。先述の２事例でみたように、速度規制発生 9 時間前にはすべての事例で東風が地上で解析されていた（図略）。3 時間前にはΔθ_eが

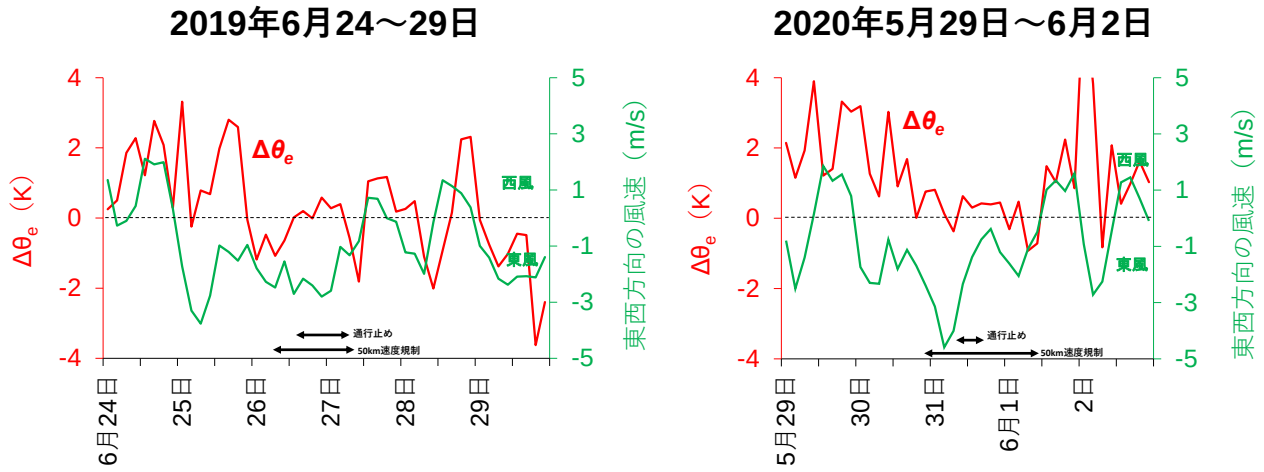


図７　霧による高速道路規制が発生した２事例で、メソ客観解析から得られた地上のΔθ_eと東西方向の風速の時間変化。（左）2019 年 6 月 24～29 日、（右）2020 年 5 月 29 日～6 月 2 日。グラフ中に 50km 速度規制と通行止めの時間帯を示してある。

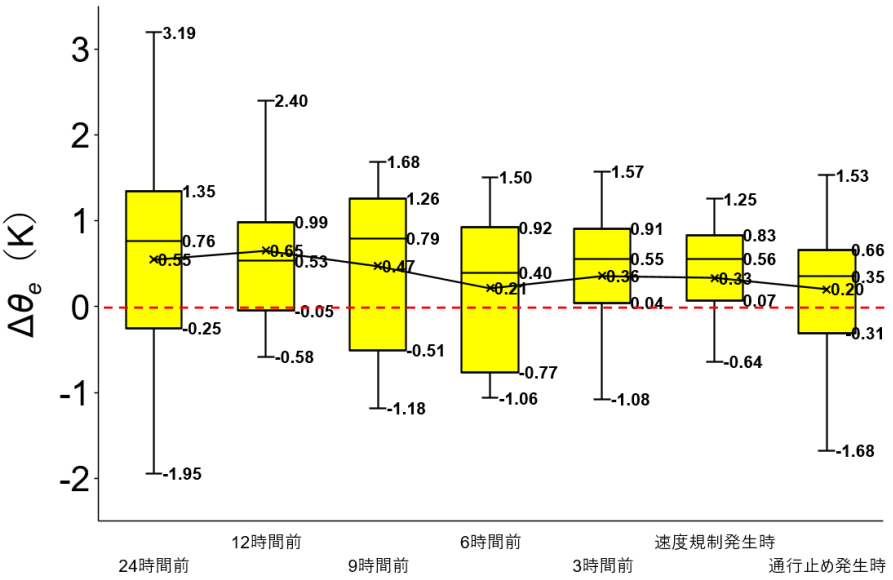


図８　2019 年 4 月から 2021 年 9 月までに発生した霧による通行止め 14 事例における、メソ客観解析で得られた地上のΔ θ_eの結果。速度規制発生 24 時間前から 3 時間毎に、平均値（×）・中央値（箱中の横線）・25 パーセンタイル（箱の下線）・75 パーセンタイル（箱の上線）・最小値（下バー）・最大値（上バー）を示している。

14 事例の差異も小さくなり（図中の箱ひげグラフの箱の長さが小さくなり）、多くが正の値をもつようになっていた。

したがって、客観解析データの解析からも、相当温位がこの地域の滑昇霧発生に重要な物理量であり、（1）式で定義した相当温位差Δ θ_e が発生の予測指標に使える可能性が示唆される。

3-3　現地での気象観測

2020 年 6 月 26 日から 11 月 11 日までに観測された視程の時間変化を、**図９**に示す。観測期間中にも視程が 1km 未満となる「霧」状態が頻繁に観測されていた。特に視程が 100m 未満として定義される「濃霧」は、断続的に 10 事例も確認されている。

このうち、高速道路の速度規制が発生した 6 月 26～28 日と、一部通行止めも含む規制が発生した 9 月 13～17 日の 2 事例を詳しく調べた。両事例とも、日本の南海上に停滞前線が存在することに起因した濃霧である。このとき現地で観測された視程と相対湿度の時間変化を、濃霧発生前後の時間帯に限って図 10 に示す。グラフからもわかるように、相対湿度が 100%に達した瞬間に視程が急激に低下しており、本研究のような 1 地点での観測であっても濃霧発生時の気象と視程の変化をよく捉えることが明らかとなった。6 月 26 日（図 10 上段）は湿度 100%に達してから 20 分以内で視程は 293m まで悪化し、9 月 13 日（図 10 下段）は湿度 100%に達して 10 分以内に視程 127m まで悪化していた。

3-1 の数値シミュレーションや 3-2 のメソ客観解析による結果からは、暖湿空気の目安となる相当温位の上昇が濃霧発生の指標となることが指摘されていた。そこで、現地観測の気象データから相当温位を算出してみた（図省略）。すると霧の発生時に相当温位の上昇がみられており、暖湿空気塊の流入が示唆された。

４．得られた研究成果

本研究では、気象モデルを用いた数値シミュレーション、気象庁メソ客観解析データ、現地での気象と霧の観測によって、大分県別府湾周辺の高速道路で発生する霧を調査した。この霧は過去の研究がほとんど存在しておらず、今研究が最初の詳しい研究成果となった。明らかになった点を以下にまとめる。

（1）この地域で発生する霧は、暖湿空気塊が山を上昇して発生する滑昇霧であることが、数値シミュレー

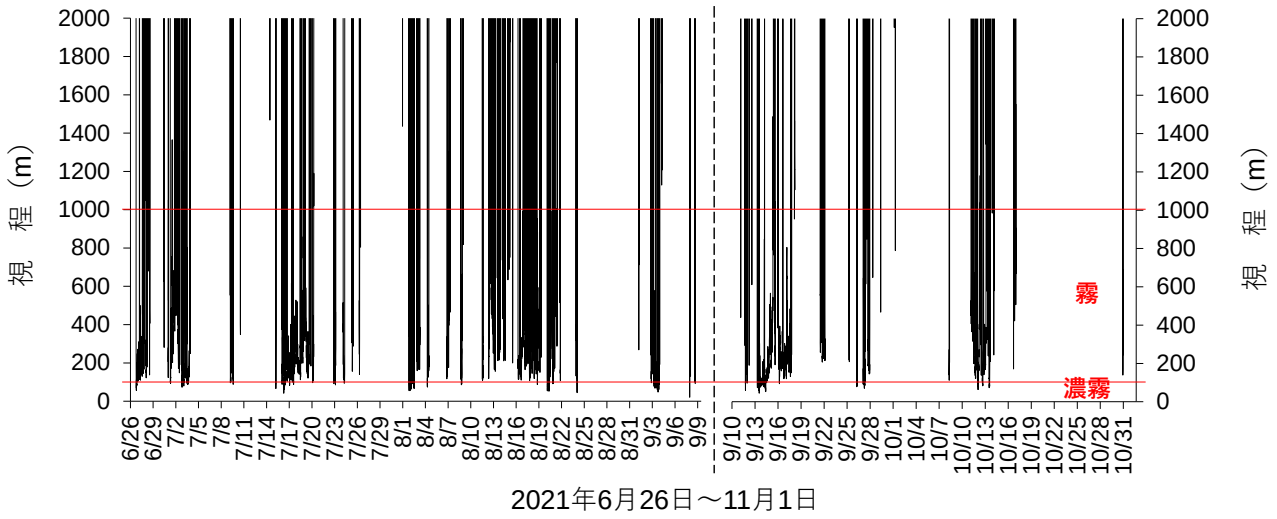


図９　2021 年 6 月 26 日から 11 月 1 日まで現地（図 1 の×地点）で観測された視程の時間変化。10 分毎の測定値で、9/9 と 9/10 のあいだでデータ回収に伴う欠測時間がある。視程 100m 未満の濃霧と 1km 未満の霧を赤い横線で示してある。

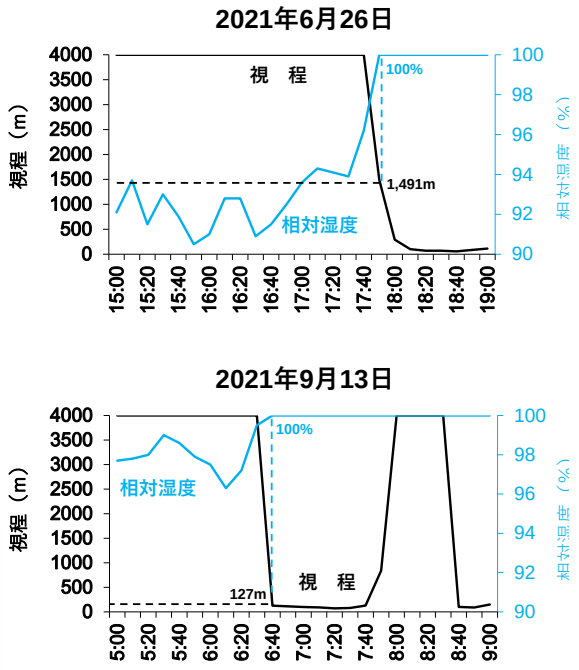


図 10　高速道路の規制が発生した事例で現地観測された視程と相対湿度の時間変化。（上）2021 年 6 月 26 日 15～19 時、（下）2021 年 9 月 13 日 5～9 時の結果。

ションから初めて示された。

（2）高速道路の運用に影響するときの霧は、視程 100m 未満の濃霧状態であり、20m まで視程が悪化する日もあることが現地観測から明らかとなった。

（3）濃霧の発生 9～12 時間前には、暖湿空気の目安となる相当温位の値が変化しはじめており、特に山の麓と山頂のあいだの相当温位差 $\Delta\theta_e$ が小さくなっていた。これはメソ客観解析データから統計的に見出すことができ、$\Delta\theta_e$ を濃霧予測の指標として用いることができる可能性を示すことができた。

今後も同様の調査を継続してデータを蓄積することで、濃霧の予測に向けて実用的な成果を上げていく予定である。同時に、関係地域の方々からの協力も得ながら地元のニーズを探り、「使ってもらえる、役に立つ」成果物を創出していきたい。

謝　辞

霧による速度規制・通行止めの情報の提供や、現地観測の実施など、本研究の遂行に多大なご尽力を頂いた株式会社ウェザーニューズの出納 誠様に心より感謝申し上げます。長期間にわたる観測機器の設置をご快諾頂きました、お告げの聖母トラピスト修道院ならびに別府市観光戦略部観光課の関係皆様に心より感謝申し上げます。

引　用　文　献

国土交通省ＨＰ：高速道路の通行止めワーストランキング（平成 28 年度）http://www1.mlit.go.jp/road/ir/ir-data/congestion-loss-time/road_closed_h28.html（平成 27 年度）http://www1.mlit.go.jp/road/ir/ir-data/congestion-loss-time/road_closed_h27.html

大分県（2020）：高速道路の霧対策における 5G の活用について．大分県商工観光労働部情報政策課．https://www.its-jp.org/wp-content/uploads/2020/12/muto.pdf

（表　題）

ウシの乳汁中上皮細胞解析で明らかにする泌乳量と乳腺分化の関係

（所　属）岡山理科大学　獣医学部

（氏　名）佐伯　亘平

（概要）

本研究はウシの乳汁中上皮細胞の解析を通じて、ウシの乳腺分化度と乳汁分泌量の関係性を探ることを目的とする。本年度は、イヌ乳腺をモデルとして効率的な乳腺上皮消化法を検討し、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ディスパーゼ、トリプシンによって生存率の高い 1 細胞懸濁液を得ることができた。また凍結解凍後も高い生存率を得ることができ、多量のウシ検体を解析する準備を整えた。また、ウシ乳腺のシングルセル遺伝子発現データの解析を通じて、各上皮ポピュレーションのマーカー候補分子を探索し、Cd49f、Cd24 を用いてフローサイトメトリーにより上皮を分画する条件を検討した。本年度の成果により、ウシの乳腺上皮細胞を単離・保存し、1 細胞レベルでの解析の実施ができる準備が整った。今後も研究を継続し、泌乳量データとウシ乳腺上皮細胞のポピュレーションの解析を明らかにしていく。

（本文）

1.　研究の背景

牛乳の安定生産は酪農家と消費者の双方にとって非常に重要な意義を持つ。牛群中の低泌乳牛の存在により日本全体では 1500 億円以上の潜在的な収益を損失していると推計される。近年、ヒト乳汁中の上皮細胞を解析することで、泌乳中の乳腺組織の分化度を推測できることが判明し、また個体間でその分化度に大きな差異があることが報告された(Twigger et al. bioRxiv 2020, 11.06.371443)。しかし、乳牛においては泌乳量と乳腺分化の関係は不明である。このような背景から申請者らのチームは､「乳牛の泌乳量の違いは泌乳期の乳腺分化度を反映しており、乳汁中細胞の分化度解析より泌乳量と乳腺分化の関係性を明らかにできるのではないか」と考えた。本研究の目的は、乳牛の乳汁中細胞の分化度と泌乳量の関連を明らかにすることである。研究期間内に、乳期を通じた乳汁中細胞のポピュレーション解析（フローサイトメトリーによる乳汁中筋上皮細胞、乳汁分泌細胞､ホルモン受容細胞の数と割合の評価）及びそれらと泌乳量・乳質との関連を検討することを目的とした。

2.　乳腺組織からの上皮組織分離法の開発

研究の第一段階として、ウシ乳汁中の上皮細胞を生存率良く 1 細胞化するために、イヌ乳腺をモデル組織として組織分散法の検討を行った。

材料には異なる目的のために安楽死となった雌ビーグルの正常乳腺を利用した。プロトコールは過去のヒトやマウスでの検討に基づき(Cui J, Guo W. STAR Protocols.2021;2(2):100577, https://cdn.stemcell.com/media/files/techbulletin/TB29179-Monolayer_Culture_Mouse_Mammary_Epithelial_Cells.pdf)、以下の通りとした：乳腺を摘出し、5%FBS+DMEM/F-12 培地にて氷上で保管する｡PBS にて洗浄し、メスにて細切し、5%FBS+DMEM/F-12+1mg/mL コラゲナーゼ I+100U/mL ヒアルロニダーゼ溶液で再懸濁し、37℃チャンバー内で 75rpm の振盪を加えながら 2-3 時間培養する。途中 1 時間ごとに軽いピペッティングを行う。大きな組織塊が無くなった後に RBC lysis buffer により溶血させ、トリプシン・EDTA を加えて 3 分ほど優しくピペッティングする。その後ディスパーゼ(5U/mL)+DNaseI(1mg/mL)でさらに処理し、40μm フィルターを通し、1 細胞懸濁液と

した。作成した細胞懸濁液はセルバンカー1 を用いて、推奨プロトコール通り凍結保存した。
正常犬 5 頭から乳腺組織分散を試み、概ね全ての検体で 80%以上の良好な生存率を得られた(表 1)。

	組織片の大きさ	安楽死から採取/処理開始までの時間	Snap frozen	回収細胞数/生存率	保存	備考
Dog 1	0.5 cm	1h / 3-4h	3 tube	2.7 × 10^7 cell/ ~80%	3.3 × 10^6 cell/8本	乳腺発達良好
Dog 2	1.0 cm	1h / 3-4h	3 tube	4.8 × 10^6 cell/ ~50%	2.4 × 10^6 cell/2本	乳腺は薄い
Dog 3	1.0 cm	1h / 3-4h	3 tube	4.2 × 10^7 cell/ ~70%	4.0 × 10^6 cell/10本	乳腺発達良好
Dog 4	1.0 cm	1h / ~2h	3 tube	5.6 × 10^7 cell/ ~80%	3.7 × 10^6 cell/15本	乳腺発達良好
Dog 5	1.0 cm	1h / ~2h	3 tube	1.7 × 10^6 cell/ ~90%	8.4 × 10^5 cell/2本	乳腺は薄い

表 1 正常犬を用いた乳腺分散法の検討結果

Dog2 では生存率が減少したが、組織学的に乳腺が発達しておらず、組織内の細胞密度が低かったため、相対的に酵素処理時間が長くなり細胞障害が生じてしまったのかもしれない。
また、組織分散処理後も数～数十細胞の集塊が散見された(図 1)ため、実際の検討の前にはフローサイトメトリー等を用いた multiplet 除去が必要であると考えられた。

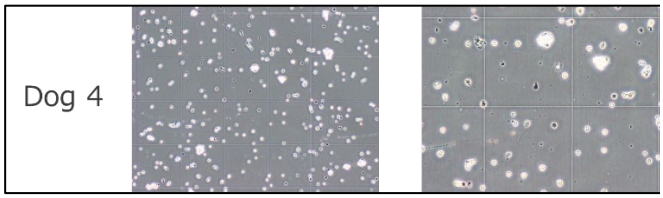


図 1 Dog4 の分散後の乳腺細胞。低倍率(左)及び高倍率(右)。トリパンブルー染色。細胞生存率は良好だが、様々な大きさの細胞集塊が散見される。

保存された細胞は解凍後も 70-90%の生存率を維持しており、のちの解析にも十分利用可能であった。

3. ウシ乳腺上皮細胞のマーカー探索
フローサイトメトリーにてウシ乳腺上皮細胞のポピュレーション解析を行うためには、適切なマーカー分子を同定する必要がある。文献調査により、ヒト、マウス、ウシの乳腺上皮細胞のマーカーに関して検討し、CD49f と CD24 の組み合わせによる分類が最も適切であると考えた。
続いて、マーカー発現を既存のデータセット上で確かめるために、ウシの乳汁中細胞のシングルセル遺伝子発現解析データを公共データベースより入手した(Becker D, Weikard R, Hadlich F, Kühn C. Sci Data. 2021;8(1):177. doi:10.1038/s41597-021-00972-1)。In silico で再解析を行い、CD24 及び CD49f の発現を確認したところ上皮細胞(“Epithelial cells”)に両マーカーの発現が確認された(図 2)。

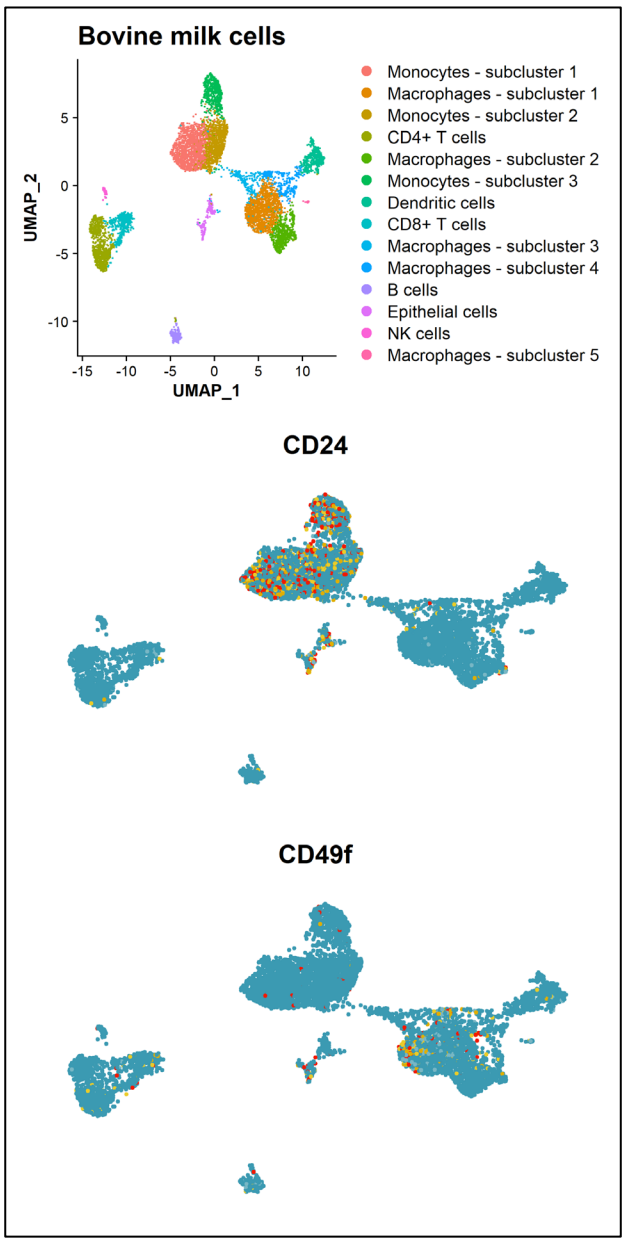


図 2 ウシ乳汁中細胞のシングルセル遺伝子発現解析結果。細胞分類(上)、CD24 発現(中)、Cd49f(下)。

そのためこれら二つのマーカーは細胞分類に適切であると考えられた。

4. フローサイトメトリーによるマーカー発現検討法の確立

これまでの結果から CD24 抗体(Clone M1/69)及び CD49f 抗体(Clone GoH3)を購入し、凍結保存してあるイヌ乳腺細胞を用いてフローサイトメトリーによる上皮細胞の分画を検討した。細胞は同時に LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit で染色し、multiplet と死細胞の除去を試みた(図 3)。

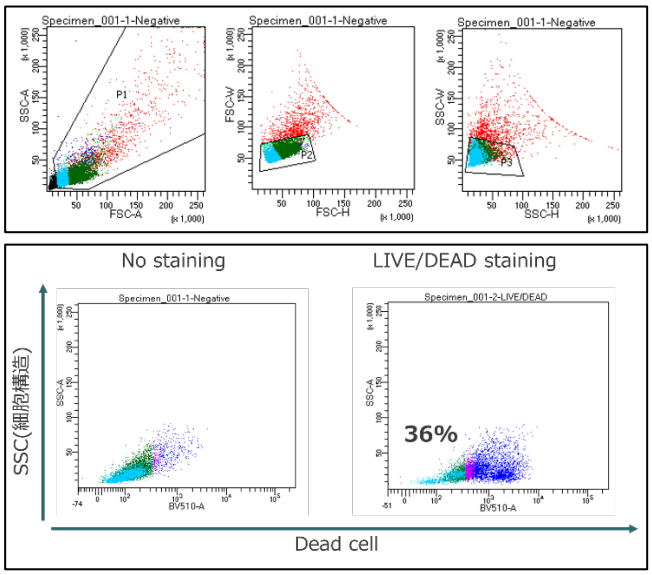


図 3 FSC/SSC に基づく multiplet の除去(上)及び LIVE/DEAD stain kit による死細胞の除去(下)

その結果、FSC、SSC 及び LIVE/DEAD staining プロファイルに基づき、生存率の高いシングルセルをソーティングすることができた(図 4)。

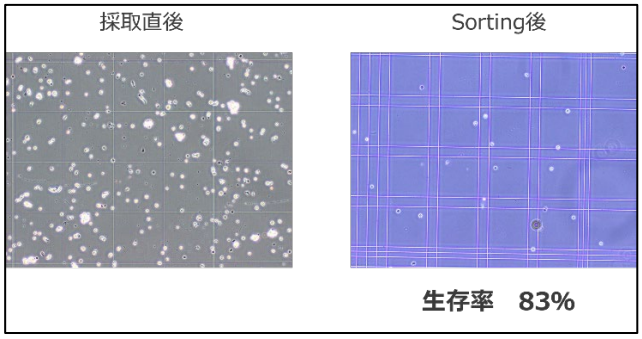


図 4 FACS 前後の細胞の乳腺細胞

さらに CD24/CD49f プロファイルにより乳腺細胞から基底細胞と管腔上皮細胞に分けられる可能性が示された(図 5)。

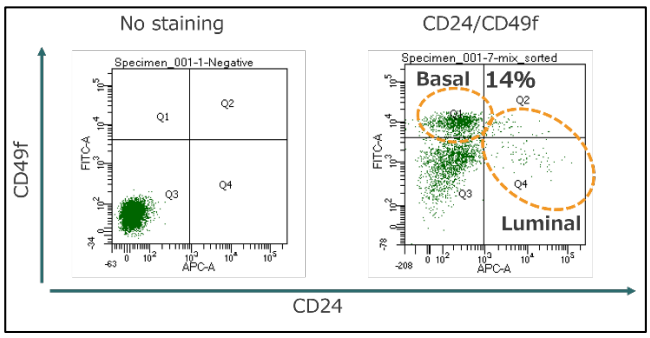


図 5 CD24/CD49f によるイヌ乳腺細胞のプロファイリング

5. 結語と今後の展望

これまでの検討により、ウシの乳腺上皮細胞を単離・保存し、1 細胞レベルでの解析を実施ができる準備が整った。しかしながら、COVID-19 による世界的なプラスティック製品の供給不足に、ロシアのウクライナ進行に伴う更なる不安定が重なり、乳汁からの細胞分離に必須の 500mL サイズの遠心管が発注から半年ほど経過した現在も納期未定となり、研究の進展が停止してしまっている。

本年度に行った予備検討の成果と、購入した試薬・物品により、当初の計画は今後十分に遂行可能であり、遠沈管が届き次第、解析を再開していく予定である。

オートリソソーム形成における認知症原因タンパク質プログラニュリンの役割

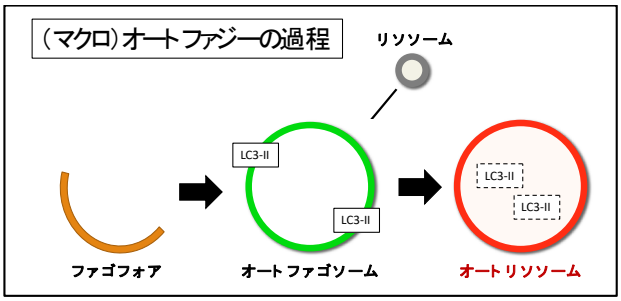
岡山理科大学　獣医学部　生化学講座

田中 良法

プログラニュリン(PGRN)遺伝子の変異によって生じるハプロ不全は、核タンパク質 TDP-43 の細胞質内蓄積が特徴的な前頭側頭葉変性症（FTLD-TDP）の原因となる。PGRN は細胞内分解系の 1 つであるオートファジーの制御に関与していることから、TDP-43 の分解を制御することで FTLD-TDP の発症を抑制していることが示唆されている。しかし、PGRN がオートファジー過程のどこで機能しているかは明らかとなっていない。本研究ではまず、PGRN を培養細胞に過剰発現させ、オートファジーにおける PGRN の役割を詳細に調べた。PGRN はオートファゴソームとリソソームが融合して生じるオートリソソーム形成を制御していることが明らかとなった。次に、オートリソソーム形成における PGRN の機能を解析するために、CDK4/6 や PIKfyve の阻害剤で誘導される空胞様のオートリソソーム形成に着目した。PGRN の過剰発現は空胞様のオートリソソーム形成を促進し、PGRN の発現抑制は空胞様のオートリソソーム形成を抑制したため、PGRN によるオートリソソーム形成には CDK4/6 や PIKfyve の関与が考えられた。

プログラニュリン(PGRN)は 30 年ほど前に同定された分泌タンパク質で、炎症、腫瘍形成、インスリン抵抗性など様々な生理的及び病理的な過程に関与する。2006 年、PGRN がハプロ不全によって生じるユビキチン陽性の細胞質内封入体を特徴とする家族性前頭側頭葉変性症(FTLD-U)の原因遺伝子であること、及び FTLD-U の細胞質内封入体を構成するタンパク質が核タンパク質 TDP-43 であることが同定され、PGRN 遺伝子変異によって核タンパク質 TDP-43 の細胞質内蓄積を特徴とする前頭側頭葉変性症（FTLD-TDP）が生じることが明らかとなった。その後、TDP-43 の遺伝子変異が筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因となること、TDP-43 が核内で細胞の生存に不可欠な役割を果たすこと、患者脳における TDP-43 の細胞質内蓄積が認知機能低下と強い相関を示すことが明らかとなり、核タンパク質 TDP-43 の細胞質内蓄積が単なる疾患の終末像ではなく、疾患発症の原因となることが示された。したがって、神経変性疾患の原因となる核タンパク質 TDP-43 の細胞質内蓄積を制御するタンパク質の 1 つとして、PGRN の機能が注目されている。

申請者は、PGRN 遺伝子欠損マウスや培養細胞を用いた解析から、PGRN がリソソームの酸性化などを介して、リソソームの量や機能を制御していることを明らかにした(Tanaka *et al.*, 2013a, 2013b, 2014, 2017)。リソソームは種々の加水分解酵素を含む細胞内小器官で、(マクロ) オートファジーやエンドサイトーシスによって輸送される細胞内外の成分を分解する。したがって、PGRN はリソソームを仲介する細胞内分解系であるオートファジーの制御を介して TDP-43 の蓄積を抑制しているのではないかと仮説を立てた。オートファジーは不要な細胞質成分を取り囲んだオートファゴソームと呼ばれる小胞がリソソームと融合することでオートリソソームを形成し、細胞質成分を分解する（下図）。



本研究では、PGRN 過剰発現がオートファジーに与える影響を調べることを最初の目的とした。第一に、PGRN 過剰発現がオートファゴソーム形成に与える影響を調べた。オートファゴソームはファゴフォアと呼ばれる扁平な小胞が伸長・湾曲しながら細胞質の一部を取り囲む過程を経て形成される。ファゴフォアマーカーである ATG16L1 及び WIPI2 陽性の輝点

を指標に、PGRN 過剰発現がファゴフォア形成に与える影響を HeLa 細胞と SH-SY5Y 細胞で調べたところ、PGRN の過剰発現は ATG16L1 及び WIPI2 陽性の輝点の形成に影響を与えなかった。次にイムノブロットを用いてオートファゴソームマーカーである LC3II を指標に PGRN 過剰発現がオートファゴソーム形成に与える影響を HeLa 細胞で調べた。オートファゴソームはリソソームと融合しオートリソソームとなるため、オートファゴソームの産生量を調べるために、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害する薬剤である bafilomycin A1(Baf)を培地に添加した。Baf 添加条件下では、PGRN の過剰発現によって LC3II 発現量に変化は認められなかった。したがって、ファゴフォア形成の結果と同様に、PGRN の過剰発現はオートファゴソームの産生には影響しないことが明らかとなった。一方で、Baf を添加しない条件下では、PGRN の過剰発現によって LC3II 発現量が増加した。したがって、PGRN の過剰発現によって、オートファゴソームとリソソームの融合が阻害され、オートファゴソームの数が増加する可能性が考えられた。この可能性を検証するために、オートファジーの流れ（オートファゴソームが生じてから、リソソームと融合するまで）を評価するプローブ GFP-LC3-RFP-LC3deltaG（Kaizuka *et al.*, 2016）を用いた。このプローブが細胞内で発現すると、ATG4 による切断を受け、GFP-LC3 と RFP-LC3deltaG が 1:1 の比で発現する。GFP-LC3 はオートファゴソームに、RFP-LC3deltaG は細胞質に局在するため、GFP-LC3 と RFP-LC3deltaG の発現比を比較することでオートファジーの流れを評価することが可能となる。HeLa 細胞では、PGRN の過剰発現によって、GFP-LC3/RFP-LC3ΔG の発現比が増加した。したがって、PGRN 過剰発現によって、オートファジーの流れが抑制されることが考えられた。そこで、PGRN の過剰発現がオートリソソームの形成に与える影響を調べるために、オートリソソームまーあ k―である DALGreen を用いた。DALGreen はオートファゴソームに取り込まれた後、リソソームと融合してオートリソソームとなることで生じる pH の低下によって発光するプローブである。HeLa 細胞、及び SH-SY5Y 細胞では、PGRN の過剰発現によって、DALGreen の発光は抑制された。したがって、PGRN の過剰発現はオートリソソーム形成を抑制することが示唆された。以上の結果から、PGRN の過剰発現によって、オートリソソーム形成が抑制される結果、オートファゴソームの数が増加することが示唆された。

次に、PGRN の過剰発現がリソソーム数に与える影響を調べた。リソソームマーカーである LAMP1 に GFP が融合したハイブリッドタンパク質を安定発現する HeLa 細胞を作製し、PGRN の過剰発現がリソソーム数に与える影響を調べた。PGRN を過剰発現させると、LAMP1-GFP のシグナルが増加した。さらに、リソソーム染色試薬である Lysotracker を用いて、PGRN の過剰発現がリソソーム蓄積に与える影響を HeLa 細胞と SH-SY5Y 細胞で調べた。PGRN を過剰発現させると、いずれの細胞でも Lysotracker のシグナルが増加した。以上の結果から、PGRN の過剰発現によってリソソーム数が増加することが示された。リソソーム数の増加がリソソーム産生の増加によるものかを調べるために、リソソーム遺伝子発現のマスターレギュレーターである転写因子 TFEB に GFP が融合したハイブリッドタンパク質 TFEB-GFP を安定発現する SH-SY5Y 細胞を用意した。TFEB は通常細胞質に局在するが、リソソームタンパク質の産生が増加する条件では核に移行する。TFEB-GFP は通常の培養条件下では、細胞質に局在した。一方、リソソームの酸性化を阻害する作用のある Baf を添加すると、TFEB-GFP は核に移行した。次に PGRN 過剰発現が、TFEB-GFP の局在に与える影響を調べたところ、PGRN の過剰発現は TFEB-GFP の局在に影響しなかった。さらに、TFEB の核移行を制御する mTORC1 の活性を mTORC1 下流標的である p70 のリン酸化を指標に調べた。TFEB-GFP の局在と同様に、PGRN の過剰発現は p70 のリン酸化に影響しなかった。以上の結果から、PGRN の過剰発現はリソソーム産生を増加しないことが示唆された。したがって、PGRN 過剰発現によるリソソーム数の増加は、オートリソソーム形成が抑制される結果、リソソームの消費が減少するからであると考えられた。

神経変性疾患の原因タンパク質である変異ハンチ

ンチンや TDP-43 の蓄積はオートファジーによって制御されていることが知られている。PGRN の過剰発現が、変異ハンチンチン（74 個のポリグルタミンリピート）の凝集に与える影響を ATG16L1 陽性の HeLa 細胞と陰性のオートファジー欠損 HeLa 細胞で免疫細胞化学的手法を用いて調べた。ATG16L1 陽性の HeLa 細胞では、PGRN の過剰発現によって、変異ハンチンチンの凝集が増加した。一方で、ATG16L1 陰性のオートファジー欠損 HeLa 細胞では、変異ハンチンチンの凝集が ATG16L1 陽性の HeLa 細胞と比較して大きく増加したが、PGRN 過剰発現による影響は認められなかった。次に、PGRN の過剰発現が、神経変性疾患で蓄積する TDP-43 凝集体のコア領域を含む C 末端側の TDP-43 に GFP が融合したハイブリッドタンパク質 162C（aa: 162-414）の蓄積に与える影響をイムノブロットで調べた。ATG16L1 陽性の HeLa 細胞では、PGRN の過剰発現によって、162C の蓄積が増加した。一方で、ATG16L1 陰性のオートファジー欠損 HeLa 細胞では、162C の蓄積が ATG16L1 陽性の HeLa 細胞と比較して大きく増加したが、PGRN 過剰発現による影響は認められなかった。さらに、SH-SY5Y 細胞において PGRN 過剰発現が 162C の凝集に与える影響を調べた。PGRN の過剰発現によって、162C の凝集は 1.5 倍程度増加した。一連の結果から、PGRN を過剰発現すると、オートリソソーム形成が抑制され、神経変性疾患で蓄積する病的なタンパク質の蓄積が増加することが示唆された。本研究成果は、国際誌 Biochemical Biophysical Research Communication に掲載された。

PGRN のオートリソソーム形成における役割を調べるために、CDK4/6 を阻害する Abemaciclib（Abe）、PIKfyve 阻害する Vacuolin-1（Vac）がオートリソソーム様の空胞を形成することに着目した。まず、Abe と Vac によって生じる空胞がどの膜成分に由来するかを調べるために、初期エンドソームマーカーRab5、後期エンドソームマーカー（オートリソソームにも局在）Rab7、リソソームマーカーLAMP1 を安定発現する Neuro-2a 細胞をそれぞれ作製した。Abe 及び Vac によって形成された空胞におけるそれぞれのマーカーの局在を調べたところ、Rab５は空胞に局在しなかったが、Rab7 と LAMP1 は空胞に局在した。さらに、mRFP-GFP-LC3 プローブを用いて、空胞がオートリソソームであるかを検証した。mRFP-GFP-LC3 がオートファゴソームに局在する場合は、赤（RFP）と緑（GFP）の蛍光を発するが、リソソームと融合してオートリソソームとなると、pH 低下によって GFP が消光するために、赤(RFP)の蛍光のみを発する。この性質を利用して、mRFP-GFP-LC3 を安定発現する HeLa 細胞に Abe と Vac を添加し、形成される空胞がオートリソソームであるかを調べた。空胞中には、RFP 陽性のシグナルは確認できたが、GFP 陽性のシグナルはほとんど確認できなかった。したがって、Abe と Vac によって誘導される空胞はオートリソソームの膜成分をもつことが示された。次に Abe と Vac によって誘導される空胞がオートリソソーム様の性質を持つかどうか調べた。オートリソソームは栄養飢餓条件下では速やかに消失することが知られている。HeLa 細胞において Abe と Vac によって空胞形成を誘導した後、HBSS で 18 時間培養したところ、ほとんどの空胞が消失した。したがって、Abe と Vac によって誘導される空胞はオートリソソーム様の性質を持つことが示唆された。次に Abe と Vac によって形成される空胞がオートファジーに依存しているかどうかを調べた。ATG16L1 陽性の HeLa 細胞では、Abe と Vac によって空胞形成が誘導されたが、ATG16L1 陰性のオートファジー欠損 HeLa 細胞では、同濃度の Abe と Vac を添加しても空胞形成が誘導できなかった。さらに、ATG16L1 陰性の HeLa 細胞に FLAG タグ付きの ATG16L1 を発現させた後、Vac を添加すると、空胞形成が部分的に回復した。したがって、Abe と Vac による空胞形成は ATG16L1(オートファジー)依存的であることが示された。次に、オートファゴソームとリソソームの融合を促進あるいは抑制する因子が Abe と Vac による空胞形成に与える影響を調べた。オートファゴソームとリソソームの融合を促進するラパマイシン及び Beclin1 の過剰発現は、いずれも Abe と Vac による空胞形成を促進した。一方で、オートファゴソームとリソソームの融合を抑制する Baf は、Abe と Vac による空胞形成を抑制した。したがって、Abe と Vac による空胞形成はオートリ

ソソーム形成を評価する指標となると考えられた。そこで、PGRN の過剰発現や発現抑制が Abe と Vac による空胞形成に与える影響を調べた。PGRN の過剰発現は、Abe と Vac による空胞形成を促進した。一方で、PGRN の発現抑制は、Abe と Vac による空胞形成を抑制した。したがって、PGRN によるオートリソソーム形成は、CDK4/6 や PIKfyve の機能と関係しているものと推察された。本研究成果は、国際誌に論文投稿中である。今後は、本研究で得られた成果をさらに発展させ、PGRN によるオートリソソーム形成機構の解明、及びその機構に基づいた認知症の予防法・治療法の開発を進めていく。

自然由来メゾスコーピック構造体を用いた神経変性疾患関連因子の分解技術の開発

岡山理科大学獣医学部獣医学科食品衛生講座

作道　章一

（概要）私たちは、植物やサンゴ由来の炭酸水素カルシウムを含むミネラル水に高電圧を持続的に印加して作製した CAC-717 と名付けたメゾスコーピック構造体を含有する消毒薬が細菌やウイルスなどの病原体に対して強力な殺菌効果を持つことを明らかにしてきた。これらの結果を発展させ、神経変性疾患で蓄積する蛋白質への作用について検討することとした。本研究では、アルツハイマー病の原因蛋白質であるアミロイドβに対する CAC-717 の効果を調べた。アミロイドβは 37℃でインキュベートすることで凝集体を形成したが、インキュベート時に CAC-717 を添加すると、凝集体の形成量が有意に減少した。さらに、蒸留水で希釈した CAC-717 をインキュベート時に添加すると、CAC-717 の濃度依存的にアミロイドβ凝集体の形成量が減少していた。これらのことから、CAC-717 はアミロイドβの凝集体形成を濃度依存的に阻害することが示唆された。

1.背景

プリオン病やアルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患では、異常な蛋白質の凝集体が神経細胞に蓄積することによって神経細胞死が引き起こされる[1]。プリオン病ではプリオン病原体が増殖することが知られているが、近年は、他の神経変性疾患の原因蛋白質もプリオン様の挙動を示すことからプリオンの一種であると考えられるようになった[2,3]。例えば、アルツハイマー病のアミロイドβはアミロイドβプリオンと呼ばれている。また、これらのプリオンは伝播し、二次感染を引き起こすことが示されつつある。

植物の成長点やサンゴの骨格には天然の炭酸水素カルシウムからなるメゾスコーピック構造体（50～500nm 程度の微粒子構造）が豊富に含まれている。菊、バラ、タケノコの皮などの植物やサンゴを粉砕混和して得られた炭酸水素カルシウムをゆっくりバラバラにして分離したのち、超音波振動（50 kHz、振幅 1.5 / 1000mm）をかけながら直流高電圧（8300 V、100 mA）を印加した後に 6～14 μm の波長の遠赤外線を照射するとメゾスコーピック構造体（図１）が再形成されることを私たちは発見し、このメゾスコーピック構造体結晶を水の中に入れて作製した懸濁液（CAC-717）が細菌やウイルスなどの病原体に対して殺菌効果を持つことを報告してきた[4-9]。さらに、最強の病原体とされるプリオンに対しても CAC-717 は不活化効果を持つことを報告してきた[3]。

そこで、それらの結果を発展させ、本研究では CAC-717 を神経変性疾患関連因子の制御に用いるための基礎研究を行うことを目的に、CAC-717 によるアミロイドβへの作用を調べた。

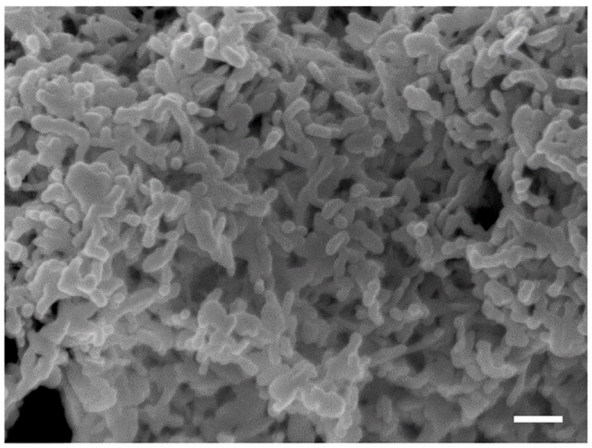


図 1. 電子顕微鏡で観察された CAC-717 のメゾスコーピック構造体

CAC-717 を四酸化オスミウム処理後に走査型電子顕微鏡で観察を行った（JSM-7500F, JEOL）. スケールバー:100 nm.　Sakudo et al.,2020 [5]より引用。

2.材料と方法

2.1 試薬とアミロイドβの凝集体形成

Amyloid β-Protein (Human, 1-42)（ペプチド研究所）を 10μM に調整し、アミロイドβサンプルとして用いた。そこに、蒸留水（大塚製薬）や原液もしくは希釈した CAC-717 を等量添加し、37℃で 24h インキュベートすることで、アミロイドβの凝集体を形成させた。なお、インキュベート後に HEPES buffer を加えることで、CAC-717 の反応をストップさせた。

2.2 凝集体の蛍光検出

ブラックプレート（Thermo Fisher Scientific-Nunclon 96 Flat Black）の well 中に入れたアミロイドβサンプルに終濃度 200μM となるように蛍光色素チオフラビン T を添加後に、蛍光プレートリーダーSpark Control(テカンジャパン)を用いて蛍光測定を行った(Excitation:450nm; Emission:570nm)。

2.3 統計解析

GraphPad Prism 7.02(GraphPad Software)を用いて統計解析を行った。P<0.05 を有意差ありと判定した。

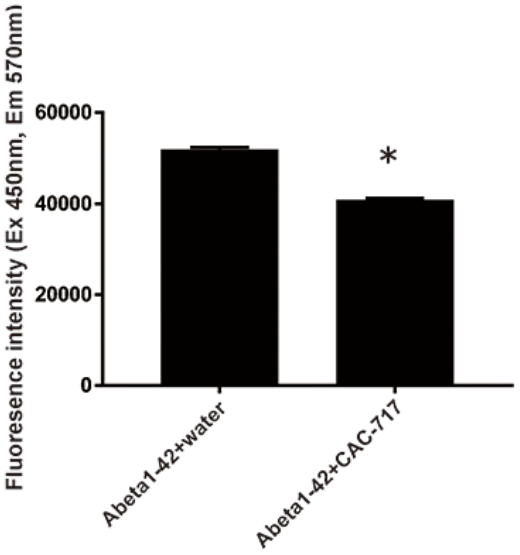


図 2. CAC-717 によるアミロイドβ1-42 の凝集阻害効果

アミロイドβ1-42 は 37℃インキュベートすることで凝集体を形成する。その凝集体はチオフラビン T に反応し、蛍光強度を上昇させる。この凝集体形成時に CAC-717 と共存させることで阻害が起こるかについて調べた。Abeta1-42 + water: アミロイドβ1-42 を蒸留水共存下でインキュベート；Abeta1-42 + water: アミロイドβ1-42 を CAC-717（原液）共存下でインキュベート。*p<0.05; Mann-Whitney test.

3.結果と考察

アミロイドβ1-42 を 37℃でインキュベートすることで凝集体が形成されることが知られているが、その凝集体をアミロイド反応蛍光試薬チオフラビン T で検出することができる。そこで、CAC-717 によるアミロイドβ1-42 に対する阻害効果を見るために、アミロイドβ1-42 と蒸留水もしくは CAC-717 の共存下で凝集体を形成させ、その後にチオフラビン T で検出をおこなった。その結果、蒸留水共存下でアミロイドβ1-42 を凝集体形成させたものに比較して、CAC-717 を共存させたものは有意に蛍光強度の低下が観察された（図 2)。

さらに、この阻害効果が CAC-717 の濃度依存的にみられるのかについて調べるために、CAC-717 を蒸留水で希釈したものをアミロイドβ1-42 と共存させ、その効果をチオフラビン T の蛍光強度を指標に比較を行った。その結果、原液(1 CAC-717)や 2 倍希釈液(1/2 CAC-717)は蒸留水を共存させたアミロイドβ1-42 と比較して有意な蛍光強度の低下が見られたが、4 倍希釈液(1/4 CAC-717)や 8 倍希釈液(1/8 CAC-717)では有意な違いが見られなかった（図 3)。これらのことから、CAC-717 によるアミロイドβ1-42 の凝集体形成阻害効果は、濃度依存的に起こることが示唆された。

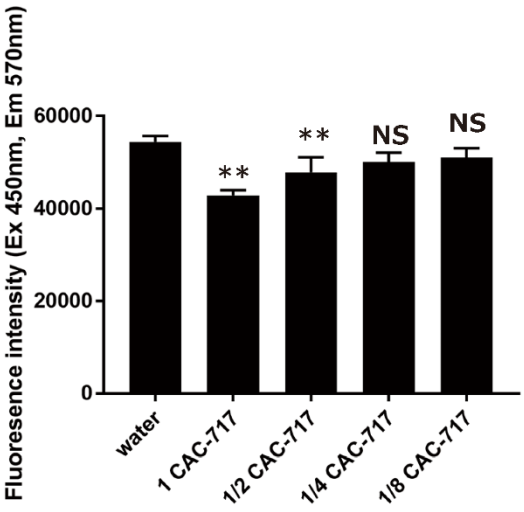


図 3. 様々な濃度の CAC-717 による Aβの凝集阻害
アミロイドβ1-42 をインキュベートし凝集体を形成させる際に様々な濃度の CAC-717 と共存させることで、その阻害効果をチオフラビン T を用いた蛍光検出により調べた。1 CAC-717: CAC-717 原液; 1/2 CAC-717: 2 倍希釈の CAC-717; 1/4 CAC-717: 4 倍希釈の CAC-717; 1/8 CAC-717: 8 倍希釈の CAC-717。
**p<0.01; One-way ANOVA followed with Bonferroni's multiple comparisons test.
NS: not significant difference.

「ポストコロナ」時代は社会秩序の大きな変化(ニューノーマル）が迫られることで、持続可能な社会づくりのための SDGs（Sustainable Development Goals：持続可能な開発目標） の実現が急速に加速するものと期待される。私たちは生物機能を SDGs に活用する研究を長年行っており、植物の成長点やサンゴの骨格に見られるメゾスコーピック構造体に着目して様々な研究をおこなっている。本研究では、メゾスコーピック構造体 CAC-717 に関する研究を行った。

人々の環境意識の着実な高まりもあいまって、これからのウィズコロナ時代は環境負荷が少なく持続可能なかたちでの消毒薬の開発が求められるものと考えられる。CAC-717 は、ウイルスや細菌およびプリオンに対する消毒薬として使用できるため、特に医療分野や衛生分野への社会貢献できるものと考えられる。さらに今回、アミロイドβの凝集体形成阻害効果もみられたことから、アルツハイマー病などの神経変性疾患の治療薬としての利用も期待される。今後、消毒薬や治療薬としての有効性の検討を進めていくとともに、作用メカニズムの解明などを通じてメゾスコーピック構造体の学理探求への寄与も期待できる。

4. まとめ

近年、社会の環境意識の着実な高まりもあいまって、自然界の物質を利用し、かつ環境負荷が少ない持続可能な社会を目指すための研究開発が求められている。本研究では、そのような SDGs 時代を見据え、メゾスコーピック構造体 CAC-717 の研究に取り組んだ。その結果、CAC-717 懸濁液はアミロイドβ1-42 の凝集体形成を濃度依存的に阻害することが明らかとなり、消毒薬や治療薬などの産業利用への発展が期待される。

謝辞

本研究の推進にご支援いただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に感謝申し上げます。

参考文献

1: Prusiner SB. Prions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(23):13363-83.
2: Catania M, Di Fede G. One or more β-amyloid(s)? New insights into the prion-like nature of Alzheimer's disease. Prog Mol Biol Transl Sci. 2020;175:213-237.
3: Sakudo A, Iwamaru Y, Furusaki K, Haritani M, Onishi R, Imamura M, Yokoyama T, Yoshikawa Y, Onodera T. Inactivation of Scrapie Prions by the Electrically Charged Disinfectant CAC-717. Pathogens. 2020;9(7):536.
4: Sakudo A, Haritani M, Furusaki K, Onishi R,

Onodera T. Electrically Charged Disinfectant Containing Calcium Hydrogen Carbonate Mesoscopic Crystals as a Potential Measure to Control *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Cabbage Seeds. Microorganisms. 2020;8(10):1606.

5: Sakudo A, Yamashiro R, Haritani M, Furusaki K, Onishi R, Onodera T. Inactivation of Non-Enveloped Viruses and Bacteria by an Electrically Charged Disinfectant Containing Meso-Structure Nanoparticles via Modification of the Genome. Int J Nanomedicine. 2020;15:1387-1395.

6: Nakashima R, Kawamoto M, Miyazaki S, Onishi R, Furusaki K, Osaki M, Kirisawa R, Sakudo A, Onodera T. Evaluation of calcium hydrogen carbonate mesoscopic crystals as a disinfectant for influenza A viruses. J Vet Med Sci. 2017;79(5):939-942.

7: Shimakura H, Gen-Nagata F, Haritani M, Furusaki K, Kato Y, Yamashita-Kawanishi N, Le DT, Tsuzuki M, Tohya Y, Kyuwa S, Saito H, Horimoto T, Onodera T, Haga T. Inactivation of human norovirus and its surrogate by the disinfectant consisting of calcium hydrogen carbonate mesoscopic crystals. FEMS Microbiol Lett. 2019;366(19):fnz235.

8: Yokoyama T, Nishimura T, Uwamino Y, Kosaki K, Furusaki K, Onishi R, Onodera T, Haritani M, Sugiura K, Kirisawa R, Hasegawa N. Virucidal Effect of the Mesoscopic Structure of CAC-717 on Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. Microorganisms. 2021;9(10):2096.

9: Kirisawa R, Kato R, Furusaki K, Onodera T. Universal Virucidal Activity of Calcium Bicarbonate Mesoscopic Crystals That Provides an Effective and Biosafe Disinfectant. Microorganisms. 2022;10(2):262.

モンゴル国南ゴビ県南東部シャルツァフにおける小型獣脚類の集団行動解析

岡山理科大学　古生物学・年代学研究センター

石垣　忍

モンゴル国ゴビ砂漠に分布する上部白亜系から産出する恐竜足跡化石は，これまでに二万個以上が発見されて来た．足跡化石が特に多数産出するのは南ゴビ県東部のシャルツァフ（43° 34′ N, 107° 46′ E　地点周辺）である．同産地から産出する足跡化石のほとんどは獣脚類恐竜の印跡によるもので，さらにそのほとんどは足印長 30 cm以下の足跡化石である．このような産出状況から同地は中―小型獣脚類の古生態研究に非常に適した産地であるといえる（Ishigaki et.al 2009）．先行研究でこれら足印長 30 cm以下の小型獣脚類足跡化石は，しばしば第三指の方向，すなわち印跡動物の進行方向がそろうことが見られ，集団行動の証拠を示すと考えられてきた（Ishigaki et al. 2004）．本研究では，シャルツァフの足跡化石を含む地層面が広く露出している中央露出地南部の南端において，2001 年の林原自然科学博物館―モンゴル科学アカデミー古生物学センター共同古生物学調査隊（以下 HMNS-MPC-JPE とよぶ）の発掘調査の際に撮影された銀塩フィルム画像をもとに，足跡化石印跡面の集成画像を作成し，印跡動物の集団行動解析を行うことを試みた．その結果，*Avimimus* とみられる印跡動物の 2 つの群れの集団行動が復元できた．

1. はじめに

モンゴル国ゴビ砂漠は，1992 年から始まるアメリカ自然史博物館の中央アジア調査隊によって本格的な古生物学的調査が行われ，それ以来，ソ連隊，ポーランド―モンゴル共同調査隊，ソ連―モンゴル共同調査隊などの精力的な調査によって 1990 年頃までに多数の恐竜骨化石が発見されてきた．その一方で恐竜足跡化石の正確な情報は得られていなかった．1995 年に HMNS-MPC-JPE が南ゴビ県南東部シャルツァフの上部白亜系河川性堆積層において，大量の足跡化石を発見し，1996 年に同隊による大規模な発掘が，さらに 2001 年に同隊による追加の小規模発掘が行われた．その結果，発見された足跡化石は 1 万 8 千個を超えた（Ishigaki et al. 2009）．

これらの足跡化石群は，主に 2001 年に銀塩カメラによるフィルム撮影や，1 m 四方の木枠に水糸を張って 10 cmグリッドを作り，それを通して行うハンドスケッチによって記録された．記録された地域は広大な産地のごく一部であるが，その記録解析から以下のことが判明した（Ishigaki et al. 2004）．

1）足印長 35 cm以上の足印からなる行跡には，平行する行跡群など，集団行動を示唆するものは全く見られないこと．

2）足印長 35 cm未満 18 cm以上の足印からなる行跡では，小さい足印からなる行跡ほど，平行する行跡の割合が多くなること．これら平行行跡群を集団行動の結果と仮定した場合，その集団を構成する個体の数は 2 個体から 21 個体で，集団構成個体数に顕著な特徴は無いこと．

3）足印長 18 cm未満の足印群では，単位面積あたりに印跡される足印の数が多くなり，その足印群の第三指が示す進行方向は，統計の結果，一方向に集積する傾向があること．これを仮に印跡動物の集団行動の結果と仮定した場合，集団を構成する個体の数は 10 頭前後から多い場合は 100 頭にも及ぶこと．

現在（2022 年），2001 年調査から 21 年が過ぎ，その間に，水平な露頭における 3D デジタル記録技術は格段に進歩した．2001 年の段階では全体の広大な露頭の一部しか調査できなかったが，現在の技術を使えば広範な範囲の調査が可能となり，より精密な獣脚類の集団行動を解明できることが予想される．

本研究では 2001 年までの銀塩フィルムデータの中から，未処理であった中央露出地南部の南端地域について，当時に比して，より簡易にできるようになったデジタル画像技術を用いて小型獣脚類の集団行動の解析を試みた．

2. 対象と方法

シャルツァフの足跡化石集積地域は東西約 1ｋm，南北約 500mにわたる広大な露頭露出地である．その中で特に足跡化石の印跡が著しい中央露出地の南部には足印長 10-12 ㎝程度の涙滴型の小型獣脚類足印の多数の印跡が見られる．また中央露出地南部の露頭面の，南西方にも同様の集積が見られる．

2001 年の発掘調査の際に，現場で手持ちカメラによる，1mグリッドごとに撮影された銀塩フィルムが残されている．これらは砂漠の過酷な環境下で，しかも地層面に足跡の印影が現れる，日の出直後または日没直前の太陽光下で撮影されたものである．手持ち撮影であるがゆえにフィルム面と地層面とが平行でない状態の写真がほとんどである．

今回はこれらのカラーネガフィルム資料を獣脚類の行動解析に供するために，スキャナーで読み込んでデジタル化し，Photoshop®を使用して露頭面の画像集成を行った．地層面には 1mグリッドで釘を打ってあり，1mごとの指標として用いた．この指標に合わせる作業は自動化できず，手作業で行った．そのうえで小型足印群の移動方向解析を行った．

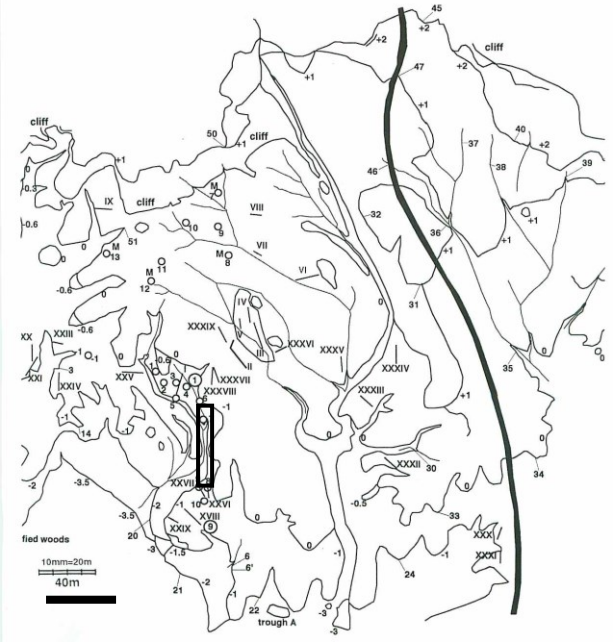


図 1:シャルツァフ足跡化石集積地域東部の地形図．スケールバーは 50m．黒枠で囲んだ部分が中央露出地南部で，この長方形の南端が「南端露頭」である．（原図は Watabe et al. 2010　による）

今回調査を行ったシャルツァフの足跡化石中央露出地南部は幅 15m 長さ 63mにわたって地層面の露出がある．足跡の印跡のある面は白色細粒砂岩からなる．地層面は浸食により虫食い状に分布する．この露出地最南端に位置する「南端露頭」は，北西-南東方向に，幅 4m，長さ 15m にわたって細長い分布を示す露頭である（図 2）．



図 2：中央露出地南部の露頭面分布図．スケールバーは 10m．楕円形枠が今回分析を行った南端露頭．

この露頭の画像集成を行い，地層面上に分布する，足印長 10-12ｃｍの小型獣脚類の足印化石に着目し，その第三指が突出する方向について記録をとり，Georose®によってローズダイアグラムにプロットして移動方向の傾向を解析した．

また，調査の際に得られた凸型足印標本（足跡の窪みに堆積した粗粒砂が膠結し，硬い砂岩の「足型」となったもの）を観察したうえでデジタル写真を多方向から撮影し，Metashape®に取り込んで 3D モデルを作成した．またそのデータを Cloudcompare®によって三次元表示を行った．

3．結果と考察

3-1　足印の特徴と印跡動物の推定

シャルツァフの足跡化石集積地域の中央露出地南部に見られる涙滴型の小型獣脚類足印化石は，印跡される支持基体（地層面）の状態によって形態が大きく変わる．最も基本的な形は図 3A（写真），3B（スケッチ）に示すような，特に第三指が突出した特徴を持つ三指性の足印である．本足印の形状は図 4 の右から左への変化が示すように，支持基体との関係によって三指性から類滴型へと変化する．足印の深さは 0.5cm から 6 cmまで多様に変化する．

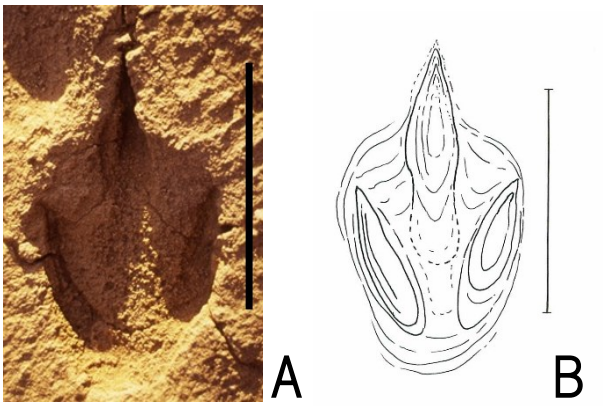


図 3：第三指が突出した三指性小型獣脚類足印（スケールバーは 10 cm）．A（写真），B（スケッチ）．



図 4：右から左へと三指性から涙滴型へと形状が変化する例．（スケールバーは 10 cm）．

シャルツァフ西部からは *Avimimus* の化石が発見されている．その全身骨格を図 5 に，その足部の骨格を図 6 に，シャルツァフの中央露出地南部で採集された凸型足印を図 7 にその三次元処理画像を図 8 に示す．図 3, 7, 8 に見られる足印の形態的特徴と，図 5，6，に見られる *Avimimus* 骨格の特徴は，第三指の突出，足部の着地部分の前後長が約 10 cm，前後方向に伸長し，幅の狭い着地部分という点で一致





図 5（上）：シャルツァフで発見された *Avimimus* 骨格の非交連全身骨格（モンゴル古生物学研究所蔵）．

図 6（左）：足部の拡大写真．



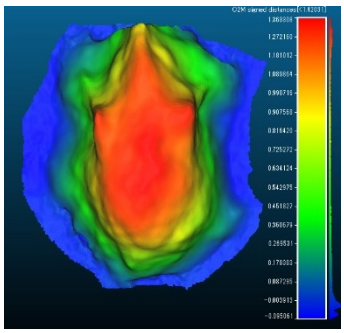


図 7（左）：シャルツァフ産の小型獣脚類凸型足印化石（スケールバーは 10 cm）

図 8（右）：図 7 の凸型足印 E の深度表示画像

する．このためこれらの小型獣脚類足印の印跡動物は *Avimimus* である可能性が高い．

3-2　足印群の画像集成と移動方向の解析結果

シャルツァフの足跡化石集積地域の中央露出地南部の南端露頭の画像集成結果を図 10 に示す．この画像に現れた涙滴型の小型獣脚類足印の第三指の指し示す方向（≒移動方向）を測定しローズダイアグラムにした．その結果，移動方向に二つの集中が見られることとその集中方向が，露頭の南東端と，北西端で異なることが判明した．

この結果からは，小型獣脚類の集団は少なくとも二つの集団が推定され，そのうちの一つの集団は，露頭の南東端から中央部分に向けて，北北東から北北西へと進路を変えながら北進し，その一方で，南へ向かった集団はやや南東から南南西へと方向を変えた可能性が考えられるが露頭が狭く，確たることは言えない．集団を構成する個体数等は移動速度を示す証拠がないため推定できない．

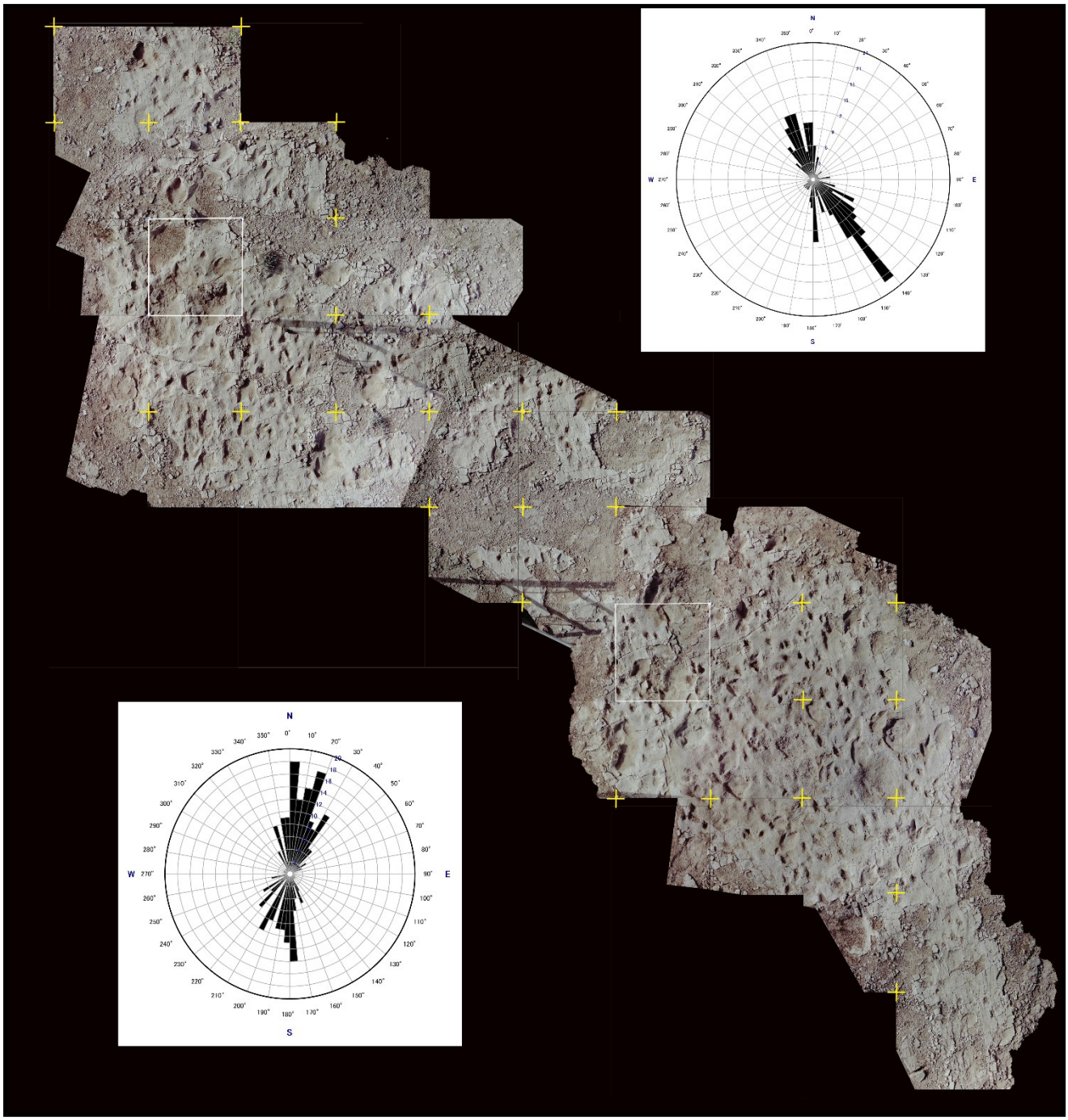


図 9：中央露出地南部の南端露頭の集成画像．黄色点は 1mメッシュ．図において上が北である。右上のローズダイアグラムは，露頭北西部の，同じく左下は露頭南東部の集積結果を示す．

4. 結論

現生鳥類の集団行動は頻繁に観察される現象であり，そこには多様な社会的行動が見られる．それらは，①自己組織化としての行動，②①とは別に祖先である非鳥類型恐竜の段階で過去に獲得し受け継がれた行動，③①及び②とは別に鳥類の系統で独自に獲得した行動，があるはずである．鳥類を含む恐竜を，生物として総合的に理解するには，「恐竜から鳥類へ進化する過程の，どの段階でどんな行動を獲得してきたのか？」という問いに答えることが望まれる．

シャルツァフに分布する地層は上部白亜系であるが、地層の年代は7000万年前という説と9000万年前という説がある．したがって，そこに見られる涙滴型で小型の足跡をつけたと考えられるアヴィミムスは，非鳥類型恐竜から鳥類の系統が分かれてから6～8千万年が経過した段階の獣脚類である．その行動と現在の鳥類の行動を比較することはこの問いに答える手掛かりとなる．

シャルツァフでは広大な露頭が分布しており，ドローンや3Dレーザースキャナーのような新技術をもって足跡化石のデジタルデータを取得したうえで，本研究のような作業を行えば，上記の基本的な問いに答えるためのデータを充実させることができるであろう．

コロナ禍により滞っていた現地調査が2022年度より遂行可能になり，今後はデータの取得が進むことが期待される．また，モンゴルだけでなくモロッコのジュラ系における同様の調査も異なる時代のデータが得られると期待される．

謝辞

本研究において使用した写真と地質関係の情報及び標本はHMNS-MPC-JPEによって1996年と2001年に取得されたものであり，同隊の調査の実現と実行にかかわったすべての人々に感謝いたします．

また，画像の集成と3D処理については山本和雅氏の作業に負うものであり，同氏の粘り強い作業遂行に深く感謝いたします．

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を得て実施しており，ここに記して深く感謝いたします。

参考文献

Ishigaki, S., Watabe, M., Tsogtbaatar, K. and Barsbold, R. (2004) Footprint evidence of gregarious theropod dinosaurs from the upper Cretaceous of Shar Tsav, South Gobi Aimag, Mongolia. Journal of Vertebrate Paleontology, Abstract of Papers 24 (3): 74A.

Ishigaki, S., Watabe, M., Tsogtbaatar, Kh. and Saneyoshi, M.,(2009) Dinosaur footprints from the Upper Cretaceous of Mongolia. Geological Quarterly 53 (4): 449-460.

Watabe, M., Tsogtbaatar, Kh., Suzuki, S. and Saneyoshi, M., (2010) Geology of dinosaur-fossil-bearing localities (Jurassic and Cretaceous: Mesozoic) in the Gobi Desert; Results of the HMNS-MPC Joint Paleontological Expedition. Hayashibara Museum of Natural Sciences Research Bulletin 3: 41-118.

ビスシリル置換ピリジンの白金錯体触媒反応

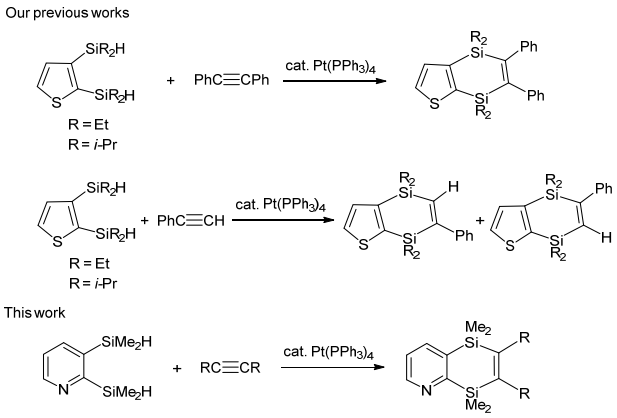
倉敷芸術科学大学　生命科学部

仲　章伸

（概要）これまで、遷移金属錯体触媒存在下、ヒドロシランを利用することにより、様々な含ケイ素化合物が合成されてきている。その中で、白金錯体触媒存在下、脱水素ビスシリル化反応を利用したケイ素化合物の合成が報告されている。本研究では、ジシリル置換ピリジン誘導体の合成法を確立し、アルキン存在下、それらの白金錯体触媒反応を行った。その結果、高収率で六員環化合物であるピリジノジシラシクロヘキセン誘導体を得ることに成功した。生成した化合物の光学的性質を明らかにし、発光材料やセンサー、導電材料など、新規機能性材料開発につなげていきたいと考えている。

はじめに

これまで、遷移金属錯体存在下、ヒドロシランを利用することにより、様々な含ケイ素化合物が合成され、その機能について報告されてきている[1]。その中で、白金錯体触媒存在下、脱水素ビスシリル化反応も報告されている。例えば、1,2-ビス(ヒドロシリル)ベンゼンを白金錯体触媒存在下、アルキン、アルケン、ジエン、ニトリルと反応させることにより、様々な含ケイ素化合物が得られることが見出されてきている[2-8]。当研究室でも、2,3-ビス(ジエチルシリル)チオフェン、2,3-ビス(ジイソプロピルシリル)チオフェン、3,4-ビス(ジメチルシリル)チオフェン、2,3,4,5-テトラキス(ジメチルシリル)チオフェン、2,3-ビス(ジエチルシリル)フランの白金錯体触媒存在下、アルキン、アルケンとの反応を行い、様々な含ケイ素化合物が合成できることを報告してきた[9-12]。また最近、ピリジンを含有した化合物が、それらの光学的、物理的特異性により注目を集めてきている[13]。例えば、ピリジンを含むドナー−アクセプター型π−共役色素を使用した色素増感太陽電池が評価されている。電子求引性であるピリジンがアンカーユニットとなり、電極である酸化チタンのルイス酸サイトに接着することが報告されている[14]。本研究では、機能性材料を指向し、含ケイ素ピリジン誘導体の合成ルートを確立することを目的とした。今回、2,3-ビス(ジメチルシリル)ピリジンの白金錯体触媒存在下、モノ置換アセチレン、ジ置換アセチレンの反応を行ったので、報告する。



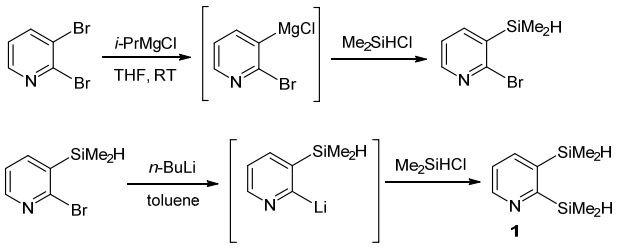
結果と考察

まず、原料である2,3-ビス(ジメチルシリル)ピリジン(**1**)の合成を行った。2,3-ジブロモピリジンとイソプロピルマグネシウムクロライドを室温で反応させ、その後クロロジメチルシランを滴下し、2-ブロモ-3-ジメチルシリルピリジンを71%で得た。合成した2-ブロモ-3-ジメチルシリルピリジンを*n*-ブチルリチウムと反応させリチオ化し、トルエン中、クロロジメチルシランと反応させ、2,3-ビス(ジメチルシリル)ピリジン(**1**)を 66%で得ることに成功した。(Scheme 1)

白金錯体に対する化合物**1**の化学的挙動を見るために、化合物 **1** を触媒量のテトラキス(トリフェニルホスフィン)白金(0)を室温で反応させた。GLC による反応追跡により、原料 **1** が徐々に消失し、1 時

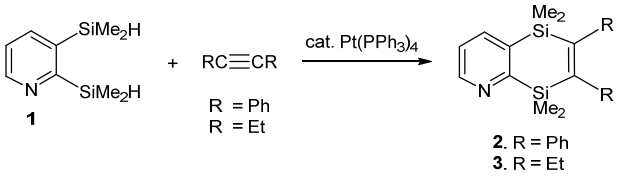
間後には多くの揮発性生成物に変換されることが分かった。

Scheme 1



そこで、化合物 **1** とジフェニルアセチレンとの反応を行った。触媒量のテトラキス(トリフェニルホスフィン)白金(0)存在下、化合物 **1** とジフェニルアセチレンを室温で反応させたところ、化合物 **2** が 94%の収率で得られた。化合物 **2** の構造は、質量分析および NMR 測定によって決定した。(Scheme 2)

Scheme 2



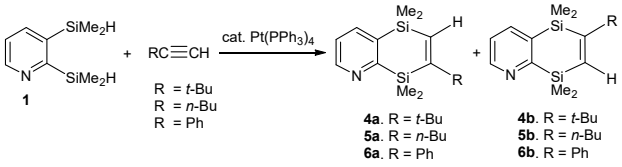
次に、同条件下、化合物 **1** を 3−ヘキシンと反応させたところ、化合物 **3** が 27%の収率で得られた。GLC 分析により、多くの揮発性生成物の存在が確認出来た(Scheme 2)。

化合物 **1** とフェニルトリメチルシリルアセチレンの反応を同条件下で行ったところ、化合物 **2** や **3** のような環状化合物は得ることが出来なかった。

次に、化合物 **1** とモノ置換アセチレンとの反応を検討した。触媒量のテトラキス(トリフェニルホスフィン)白金(0)存在下、化合物 **1** と *t*-ブチルアセチレンの反応を行ったところ、化合物 **4a** および **4b** を 6.3:1 の比率で 83%の収率で得ることが出来た。化合物 **4a** と **4b** の分離は、カラムクロマトグラフィーにより行った。化合物 **4a** および **4b** の構造は、質量分析および各種 NMR により決定した。また、それらの置換基の位置は、NOE 差スペクトルにより決定することが出来た(Scheme 3)。

同条件下、化合物 **1** と 1-ヘキシンとの反応を行うと、化合物 **5a** および **5b** を 5.2:1 の比率で 83%の収率で得ることが出来た。化合物 **5a** は、カラムクロマトグラフィーにより単離することが出来た。化合物 **5b** は、単離することが出来ず、混合物の NMR によりその構造を決定した。

Scheme 3



化合物 **1** をフェニルアセチレンと、同条件下、反応させると、化合物 **6a** および **6b** が 4.6:1 の比率で 93%の収率で得られた。化合物 **6a** および **6b** はそれぞれ単離することが出来なかったが、混合物の NMR によりそれらの構造を決定した。

白金-ケイ素錯体のケイ素原子上の電子求引性置換基が、白金-ケイ素結合を強くする事が報告されている[15,16]。Pt-Si-C-N 側の白金-ケイ素結合が、Pt-Si-C-C 側の白金-ケイ素結合よりも強いと考えられる。そのことにより、化合物 **4a-6a** と化合物 **4b-6b** の生成比に違いが出てきたものと予想している。

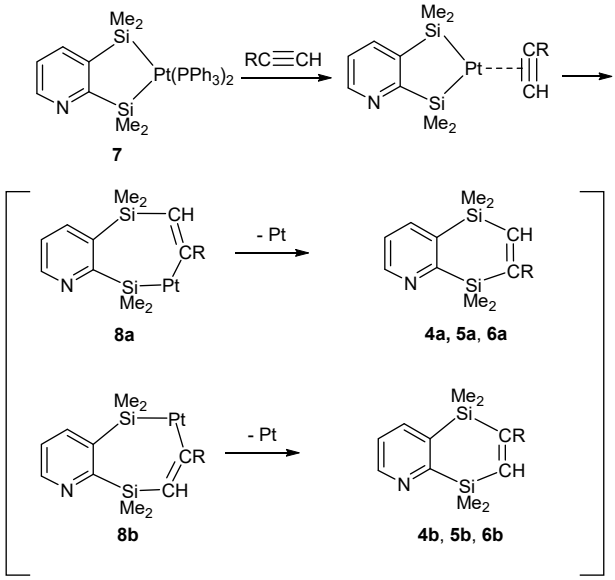
化合物 **1** をトリメチルシリルアセチレンとの反応は、化合物 **4-6** のような生成物は与えなかった。反応後、多くの揮発性生成物が得られていることが、GLC 分析により明らかとなった。

反応中間体を明らかにする目的で、化合物 **1** とテトラキス(トリフェニルホスフィン)白金(0)錯体の当量反応を行った。その結果、プラチナジシラシクロペンテン誘導体 **7** が生成していることを見出した。プラチナジシラシクロペンテン誘導体 **7** は、室温で徐々に分解していくことも明らかとなった。

以上の結果より、化合物 **1** とモノ置換アセチレンとの反応での化合物 **4a-6a** と化合物 **4b-6b** の位置選択的生成は、Scheme 4 のように説明できる。(1) 化合物 **1** とテトラキス(トリフェニルホスフィン)白金(0)錯体が反応することにより、脱水素反応が起こり、

プラチナジシラシクロペンテン誘導体 **7** が生成する。(2) 白金-ケイ素結合にアセチレン類の炭素-炭素三重結合が挿入し、白金錯体 **8a** および **8b** が生成する。(3) 白金錯体 **8a** および **8b** からの白金種の脱離により、化合物 **4a-6a** および化合物 **4b-6b** が生成する。白金-ケイ素結合の炭素-炭素三重結合への選択的付加は、白金錯体 **8a** を優先的に与えるものと考えている。

Scheme 4



まとめと今後の展望

以上述べてきたように、本研究では、2,3-ビス(ジメチルシリル)ピリジン **1** の合成とアセチレン類との白金錯体触媒反応を行った。化合物 **1** とジ置換アセチレンであるジフェニルアセチレンおよび 3-ヘキシンの反応は、脱水素ビスシリル化反応が進行し、おのおの六員環生成物を与えた。化合物 **1** とモノ置換アセチレンである *t*-ブチルアセチレン、1-ヘキシン、フェニルアセチレンとの反応では、環状位置異性体の混合物が得られた。これらの反応は、プラチナジシラシクロペンテン誘導体 **7** を経由して進行していることが明らかとなった。これらの結果により、ピリジンユニットを持つジシラシクロヘキサジエン誘導体を効率よく合成するルートを確立できた。

今後は、生成した化合物の光学的性質を詳細に検討し、発光材料やセンサー、導線材料など新規機能性材料開発につなげていく必要があると考えている。

謝辞

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

参考文献

[1] J.Y. Corey, Chem. Rev. 116 (2016) 11291-11435.

[2] M. Tanaka, Y. Uchimaru, H.-J. Lautenschlager, Organometallics 10 (1991) 16-18.

[3] Y. Uchimaru, H.-J. Lautenschlager, A.J. Wynd, M. Tanaka, M. Goto, Organometallics 11 (1992) 2639-2643.

[4] M. Tanaka, Y. Uchimaru, H.-J. Lautenschlager, J. Organomet. Chem. 482 (1992) 1-12.

[5] M. Tanaka, Y. Uchimaru, Bull. Soc. Chim. Fr. 129 (1992) 667-675.

[6] Y. Uchimaru, A.M.M. El Sayed, M. Tanaka, Organometallics 12 (1993) 2065-2069.

[7] H. Tsutsumi, Y. Sunada, H. Nagashima, Organometallics 30 (2011) 68-76.

[8] Y. Sunada, H. Nagashima, Dalton Trans. 46 (2017) 7644-7655.

[9] A. Naka, T. Mihara, H. Kobayashi, M. Ishikawa, J. Organomet. Chem. 822 (2016) 221-227.

[10] A. Naka, S. Takase, A. Shimada, H. Kobayashi, M. Ishikawa, J. Organomet. Chem. 853 (2017) 13-17.

[11] A. Naka, T. Mihara, H. Kobayashi, M. Ishikawa, ACS omega 2 (2017) 8517-8525.

[12] A. Naka, T. Mihara, M. Ishikawa, J. Organomet. Chem. 879 (2019) 1-6.

[13] T. L. S. Kishbaugh, Six-membered ring systems: pyridine and benzo derivatives. Prog. Heterocycl. Chem. 24 (2012) 343-391.
[14] Y. Ooyama, S. Inoue, T. Nagano, K. Kushimoto, J. Ohshita, I. Imae, K. Komaguchi, Y. Harima, Angew. Chem. Int. Ed. 50 (2011) 7429-7433.
[15] F. Ozawa, J. Kamite, Organometallics 17 (1998) 5630-5639.
[16] S. Sakaki, N. Mizoe, M. Sugimoto, Organometallics 17 (1998) 2510-2523.

ママカリの資源回復と食文化の保護・継承のための分子遺伝学的研究

倉敷芸術科学大学　生命科学部生命科学科

山野ひとみ

概要　サッパは日本の沿岸から中国の沿岸に分布し，河口近くの砂泥底に生息するニシン科の魚類である．瀬戸内海，特に岡山ではママカリと呼ばれ郷土料理や名産品として知られているが，岡山県における漁獲量は以前の半分以下に減少している．そこで，資源の管理や保全に有用な情報として，ミトコンドリア DNA の塩基配列を基に，日本周辺における本種の集団構造を明らかにした．また，瀬戸内海を重点的に調べ，岡山県産ママカリがもつ遺伝的特殊性についても検討した．本種には進化史が異なる大きく分化した 4 つの系統が存在し，各系統の出現頻度は海域により異なった．そのうちの 1 系統は日本では有明海と瀬戸内海にしかみられず，大陸沿岸性遺存系統と考えられた．日本周辺のサッパは（1）有明海を含む九州沿岸および瀬戸内海を含む伊豆半島以南の太平洋沿岸、（2）伊豆半島以北の太平洋沿岸、および（3）本州の日本海沿岸の 3 つの管理単位に分かれることが示唆された．また，大陸沿岸性遺存系統は岡山県の笠岡と寄島で他の地点よりも高頻度で出現したことから，この系統の存在はママカリが岡山県で名産品になったことと何らかの関係があると考えられた．

背景

サッパ *Sardinella zunasi*（図 1）は，瀬戸内海や有明海を含む北海道南部から九州南部沿岸，東シナ海，朝鮮半島南岸，渤海，黄海，杭州湾以北の中国沿岸，および台湾に分布するニシン科の魚類である．湾内の河口近くの砂泥底に通常群れで生息し，動物プランクトンを摂食する．平均 1 年で成熟し春から夏に浅海域で浮性卵を産むが，冬には深場へ移動する[1, 2, 3]．



図 1　サッパ *Sardinella zunasi*

本種は中国や韓国では水産上の価値が高いが，近年，乱獲により漁獲量が減少している[1, 4, 5]．日本では一般的な価値は高くないものの，瀬戸内海，特に岡山県ではママカリと呼ばれ郷土料理や名産品として知られている．岡山県における本種の年間の漁獲量は，1956 年から 1989 年には 118－287 t（1981 年の 653 t を除くと平均 185 t）で推移していたが，1990－1994 年には約半分まで減少した[6]．近年，主な産地である備讃瀬戸の漁獲量は市場に出回る量の 3 割にも満たず，岡山で買われる贈呈用のママカリの多くは県外産，あるいは厳重な加工規格を満たした東南アジアからの輸入品であると言われている[7]．

ママカリ資源を回復するためには，資源の変動単位である時間的･空間的に均一な集団を明らかにし，それぞれの集団に適した管理や保全の対策を考える必要がある．本種の遺伝的集団構造については，これまでにいくつかの研究があり，本種には大きく分化した 3 つの系統が存在することや，黄海，東シナ海，および日本近海の集団間に遺伝的分化があること，愛知と香川の集団間には遺伝的差異があることなどが示唆されている[2, 8, 9]．しかし，それらの研究には，日本からは愛知と香川の地理的集団しか含まれておらず，日本周辺における集団構造についてはほとんど分かっていない．

そこで，資源の管理や保全に有用な情報を得るために，日本の各地からサッパの標本を採集し，ミト

コンドリア DNA 調節領域（mtCR）の全塩基配列を基に，本種の遺伝的集団構造を明らかにした．また，管理すべき単位を設定するための重要な情報となる，本種の進化史を明らかにした．さらに，岡山県産ママカリがもつ遺伝的特殊性を明らかにするため，瀬戸内海で重点的に採集を行い，瀬戸内海の各地点における各系統の出現頻度の違いを調べた．なお，これらの研究成果は学術雑誌[a)]に掲載されたほか，新聞[b)]でも紹介された．

材料と方法

標本の採集は，主に釣りにより行った．日本周辺における集団構造の推定では，日本海の 3 地点（伊万里：30 個体，鳥取：25 個体，京都：25 個体），太平洋の 3 地点（愛知：25 個体，静岡：26 個体，神奈川:26 個体），有明海の 1 地点（佐賀:26 個体），および瀬戸内海の 2 地点【岡山：24 個体（笠岡：18 個体，寄島：6 個体），兵庫：31 個体（芦屋）】の 9 地点から合計 238 個体を採集した（図 2）．

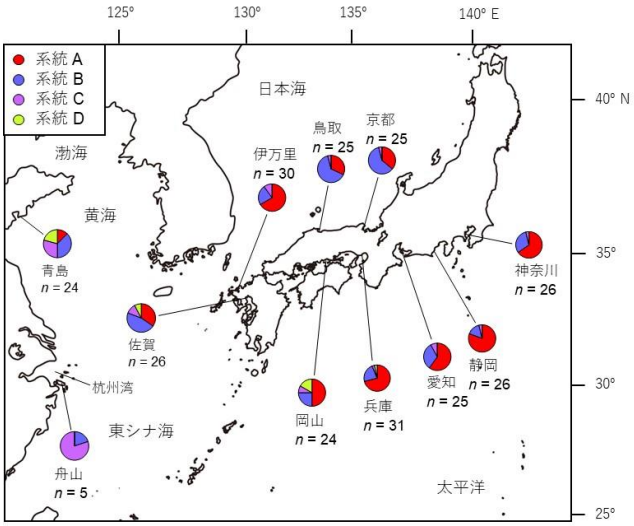


図 2 サッパの集団構造の推定に用いた標本の採集地点とミトコンドリア DNA の系統の地理的分布．青島と舟山における系統の頻度は，Wang et al.[2)] から引用

また，岡山県産ママカリの遺伝的特殊性を明らかにするために瀬戸内海でさらに採集を行い，大分（中津：32 個体），愛媛（伊予：10 個体），広島（福山：32 個体），岡山（笠岡：14 個体，寄島：26 個体，岡山港：32 個体），および兵庫（芦屋：1 個体）の 7 地点から合計 147 個体を採集した（図 3）．

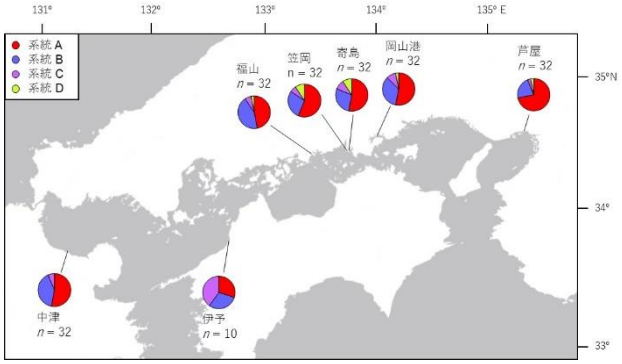


図 3 岡山県産ママカリの遺伝的特殊性の解明に用いた標本の採集地点とミトコンドリア DNA の系統の地理的分布．

mtCR を含む約 690 塩基対（bp）を本種専用のプライマー[2)]を用いて PCR により増幅し，増幅産物の塩基配列を DNA シーケンサーを用いて決定した．

日本周辺における集団構造の推定　Wang et al.[2)] により決定された本種の塩基配列は，産地や個体数が不明であったため，集団構造の解析には用いなかった．遺伝的多様性の指標としてハプロタイプ多様度（h）および塩基多様度（π）を算出した．ハプロタイプの系統樹およびネットワーク樹を推定し，系統間の分岐年代を，系統間の塩基置換率を基に，変異率 10%/100 万年を用いて算出した．遺伝的分化の指標である各地点間の Φ_{ST} 値を算出して多次元尺度構成法（MDS）により視覚化し，階層的分子分散分析（AMOVA)により，地点の最適なグループ化を行った．ベイジアンスカイラインプロットにより，過去から現在に至る有効集団サイズの変化を推定した．

岡山県産ママカリの遺伝的特殊性の解明　瀬戸内海各地点から採集した標本の塩基配列に，集団構造の推定で用いた瀬戸内海産（笠岡，寄島，芦屋）標本の塩基配列を加え，瀬戸内海の各地点における各系統の出現頻度の違いを調べた．

結果

日本周辺における集団構造の推定　日本の 9 地点から採集した 238 個体から，mtCR の全塩基配列である相同な 647 bp が得られ，合計 146 のハプロ

タイプが認められた.

系統樹（図 4）では大きく分化した 4 つの系統が見られた. 系統 A と C は Wang et al.[2] と一致した. 系統 B と D は, Wang et al.[2] では 1 つの系統（系統 B）として扱われていたが, これらは十分に分化しているため別々の系統として扱った. Wang et al.[2] の系統樹では, 系統 D に相当する系統には黄海の青島からの 4 つのハプロタイプが含まれていた. 各系統間の塩基置換率は 3.1－4.1% で, 各系統の分化は 15.5－20.5 万年前に起こったと推定された.

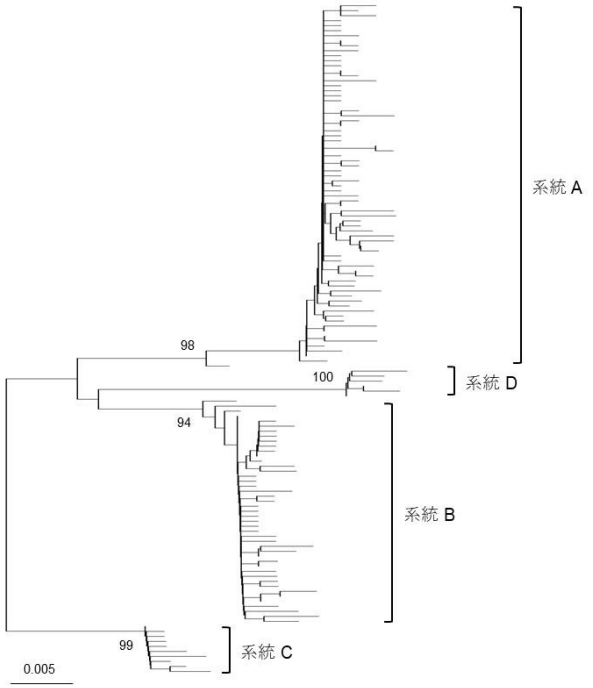


図 4 ミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列を基に作成した, サッパにおけるハプロタイプの系統樹

ネットワーク樹（図 5）では, 系統樹と同様に 4 つの系統に分かれ, 系統 A－C には 9 地点すべてが含まれたが, 系統 D には有明海（佐賀）と瀬戸内海（岡山, 兵庫）のみが含まれた.

遺伝的多様性は, どの系統でも h が高く π は低かった（h = 0.8952－0.9524, π = 0.0040－0.0055）. 日本の 9 地点, および黄海の青島と東シナ海の舟山[2] における各系統の出現頻度を図 2 に示した. 系統 A の頻度は太平洋沿岸（愛知, 静岡, 神奈川）, 瀬戸内海（岡山, 兵庫）, および九州の日

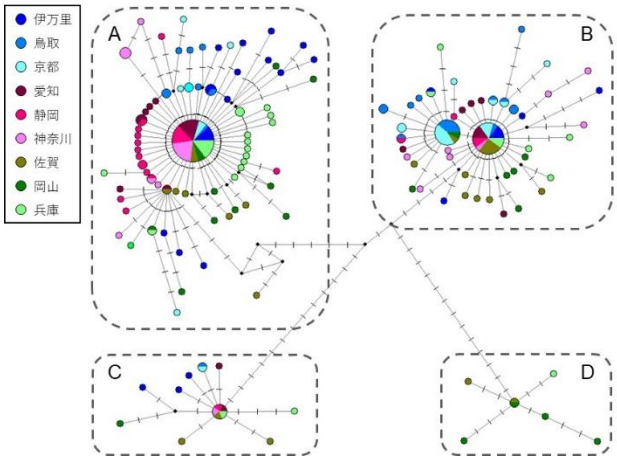


図 5 ミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列を基に作成した, サッパにおけるハプロタイプのネットワーク樹. それぞれの円は, ハプロタイプを示す

本海沿岸（伊万里）で高く, 系統 B の頻度は本州の日本海沿岸（鳥取, 京都）, 有明海（佐賀）, および黄海（青島）で高かった. 系統 C の頻度は, 日本のすべての地点で系統 A と B よりも低かったが, 東シナ海(舟山)で極めて高かった. 系統 D の頻度は, 瀬戸内海（岡山, 兵庫）と有明海（佐賀）よりも黄海（青島）で高かった.

系統 A の標本のみを用いた MDS（図 6）では, 伊万里・佐賀・岡山の 3 地点, 鳥取・京都の 2 地点, および愛知・静岡・兵庫の 3 地点がそれぞれ別のグループを形成する傾向があり, 神奈川は他の地点から大きく離れた. 系統 B の標本のみを用いた MDS では, 愛知・佐賀の 2 地点および静岡・岡山・兵庫

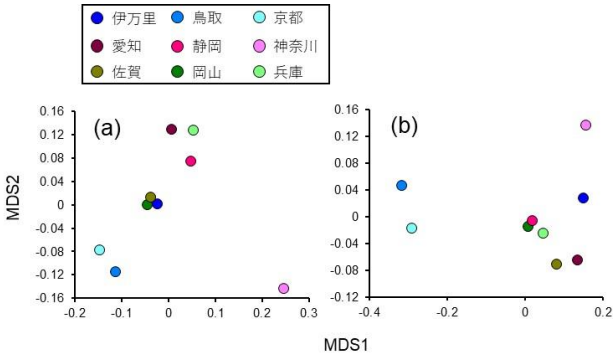


図 6 サッパのミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列から算出した地点間の Φ_{ST} 値を基に作成した, (**a**) 系統 A と (**b**) 系統 B における多次元尺度構成法による 9 地点のプロット.

の 3 地点がそれぞれ別のグループを形成する傾向があり，伊万里と神奈川は中程度に鳥取と京都は大きく他の地点から離れた．

系統 A のみの標本および系統 B のみの標本を用いた AMOVA では，いずれも日本の 9 地点を伊万里・愛知・静岡・佐賀・岡山・兵庫，鳥取・京都，および神奈川の 3 つのグループに分けるのが最適であることが示された．

ベイジアンスカイラインプロット(図 7)により，系統 A−C の有効集団サイズは 1.5−2.0 万年前に著しく増加した一方，系統 D は徐々に少しだけしか増加しなかったことが示唆された．

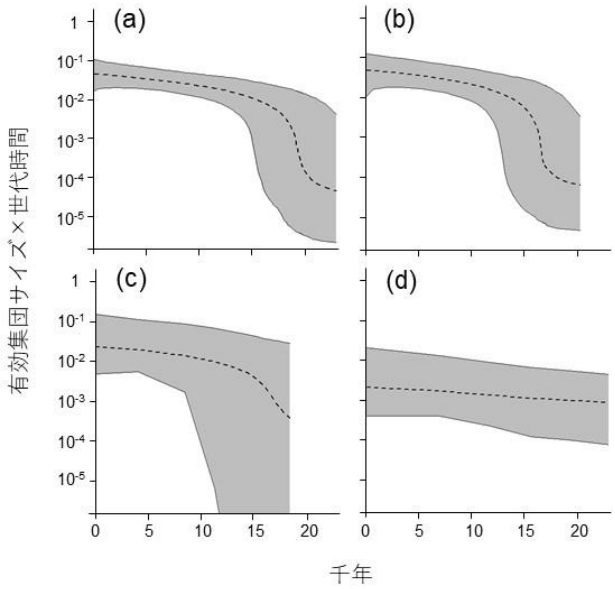


図 7 ミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列を基にした，サッパにおける（**a**）系統 A，（**b**）系統 B，（**c**）系統 C，および（**d**）系統 D のベイジアンスカイラインプロット

岡山県産ママカリの遺伝的特殊性の解明 瀬戸内海の 7 地点から採集した 147 個体に集団構造の推定で用いた岡山（笠岡，寄島）および兵庫（芦屋）の 55 個体を加えた合計 202 個体から，mtCR の全塩基配列である相同な 647 bp が得られ，合計 134 のハプロタイプが認められた．

系統 A の頻度は，中津，福山，笠岡，寄島，岡山港，および芦屋で高かった．系統 B の頻度は，伊予を除く 6 地点で系統 A の次に高かったが，伊予では系統 A と同頻度だった．系統 C の頻度は，伊予を除く 6 地点では低かったが，伊予では他の系統よりも高かった．系統 D は，中津と伊予を除く 5 地点で見られたが，笠岡と寄島では福山，岡山港，および芦屋よりも高かった（図 2）．

考察

日本周辺における集団構造の推定 日本周辺のサッパは遺伝的に，伊万里・愛知・静岡・佐賀・岡山・兵庫，鳥取・京都，および神奈川の 3 つのグループに分けるのが最適であることが示された．しかし，サッパと近縁のコノシロでは，日本周辺における集団の分化は認められていない[10]．瀬戸内海における卵・仔魚の出現時期と分布域の調査[11]により，サッパの卵・仔魚はコノシロよりも沿岸に分布し分散しにくいことが示されており，サッパにおける地理的構造の存在は，生活史初期の分散が少ないことを反映していると考えられる．日本海側で，伊万里と鳥取・京都の間に遺伝的分化が見られたのは，卵・仔魚の分散の少なさに加え伊万里と鳥取の間にサッパの生息に適した大きな内湾がないことも関係していると思われる．太平洋で，神奈川が他の地点と遺伝的に異なるのは，ウミタナゴやハゼ類で知られている系統の分離[12, 13]と同様に，伊豆半島が分散の障壁になっているためと考えられる．

系統 A の標本のみを用いた MDS（図 6）で，兵庫は岡山よりも愛知と静岡に近い位置にあった．一方，岡山は伊万里と佐賀に近かったことから，兵庫と愛知間と同様に岡山と伊万里間には，岡山と兵庫間よりも頻繁な交流があることが示唆され，瀬戸内海内にも，ある程度の地理的構造が存在すると考えられた．

サッパに見られた 4 つの系統が分化した 15.5−20.5 万年前は，リス氷期（12.5−20.0 万年前）にあたる．氷期の海面は現在よりも 115−130 m 低く，東シナ海は日本と大陸を結ぶ陸橋により半閉鎖的となり，日本海は狭く浅くなった対馬海海峡によりほぼ孤立した[14, 15]．系統 A の頻度は太平洋沿岸に多く，系統 B は本州の日本海沿岸に多い(図 2)ことから，それぞれ氷期に太平洋と日本海で分化したと考えられる．系統 C と D は東シナ海において，氷

期における沿岸の産卵場や成育場の減少により分断された別々の逃避場所で，それぞれ分化したと考えられた.

系統 A－C における集団サイズの拡大（図 7）が最終氷期（1.9－2.65 万年前）後に起こったのは，氷期が終わり北太平洋の多くの沿岸域が沿岸性魚類の生息に適した環境になった[16] ためと考えられる.

現在のサッパの分布パターンは，それぞれ進化史の異なる 4 つの系統の 2 次的接触により形成されたと考えられる．4 系統のうち系統 D は，黄海（青島）に加え，日本では有明海（佐賀）と瀬戸内海（岡山，兵庫）にしか分布せず（図 2），他の 3 系統とは異なり集団の急速な拡大が見られない（図 7）点が特徴的である．魚類や甲殻類，二枚貝類，多毛類を含む海洋生物には，現在の分布が有明海のみ，あるいは有明海と瀬戸内海に限られる種がいくつか知られている．それらの種では，同種（あるいは近縁種）が韓国から中国の大陸沿岸に分布している．海面は最終氷期における最低の水準から，現在の水準まで変動しながら急激に上昇した．日本では約 1.5 万年前から始まったこの最終氷期後の海進は，縄文海進とよばれている．有明海と瀬戸内海は，縄文海進により約 8 千年前までに形成されており，そのような種は，縄文海進により大陸の集団から隔離された大陸沿岸性遺存種と考えられている[17]．日本におけるサッパの系統 D は，大陸沿岸性遺存種と同様な歴史的過程を経た系統で，河口の干潟と泥環境に深く関係していると考えられる.

mtDNA の解析結果から，日本周辺におけるサッパは（1）有明海を含む九州沿岸および瀬戸内海を含む伊豆半島以南の太平洋沿岸、(2）伊豆半島以北の太平洋沿岸、および（3）本州の日本海沿岸の 3 つの管理単位に分かれることが示唆された．本種の大陸沿岸性遺存と考えられる系統は他の系統より美味なのか，あるいは過去には岡山県にこの系統が現在よりも多く生息していたのかは分からない.しかし，日本では岡山県でこの系統の出現頻度が特に高いことから，この系統の存在は，ママカリが岡山県において名産品になったことと何らかの関係があると考えられる.大陸沿岸性遺存種のうちいくつかの種は，かつては日本沿岸に広く分布していたものの，沿岸開発で生息地が失われたことにより，他の海域の集団がすべて絶滅した[17]．サッパの大陸沿岸性遺存系統において，現時点では遺伝的多様性の減少はみられないが，ママカリ資源の回復と伝統的な食文化を継承するためにも，種としてのサッパと同様にこの系統を護っていく必要がある.

岡山県産ママカリの遺伝的特殊性の解明　大陸沿岸性遺存系統である系統 D は，福山や芦屋でもわずかながら出現したものの岡山県の笠岡と寄島で他の地点よりも高頻度で出現し，また，伊予では系統 C が他の地点よりも極めて高頻度で出現した.（図 3）．これらのことから，瀬戸内海には，ある程度の地理的構造が存在すると考えられるが，伊予では分析個体数が少ないため，今後個体数を増やす必要がある．また，瀬戸内海の中で，より多くの地点から標本を採集して解析に加える必要がある.

笠岡周辺には，環境汚染や埋め立てでその数を激減させているカブトガニが未だ繁殖できるような大きな干潟が残っている．笠岡や寄島に系統 D が他の地点よりも高頻度で出現したのは，そのような干潟の環境と関係があると考えられる．一方，大分県の中津にも大きな干潟が残っておりカブトガニが生息しているが，系統 D は出現しなかった．系統 D が生息できる環境要因は，干潟という環境以外にもあると考えられるが，現在のところ不明である.

今後，山口県，香川県，大阪府，および和歌山県などからも標本を採集して詳しく解析することにより，瀬戸内海における遺伝的集団構造を明らかにしたい．また，瀬戸内海における地史、海流、および各地点の環境の違いなどの情報を基に、地点間における各系統の出現頻度の違いや現在の遺伝的集団構造が形成された過程を明らかにし，岡山県産ママカリがもつ遺伝的特殊性およびその要因を解明したい.

研究成果

a）Yagishita N, Kumashiro M, Matsumoto M, Yamano H (2021) Genetic population structure of Japanese sardinella *Sardinella zunasi* around Japan. Fish Sci 87:80-5816

b) 信定佑紀 (2021) 倉敷芸科大の山野准教授，ママカリ　秘密に迫る　名産の裏に特殊な遺伝子？ 山陽新聞，倉敷・総社圏版，ホットタウン 2021 倉敷市連島地区（2021 年 12 月 15 日）

引用文献

1) 山田梅芳・時村宗春・堀川博史・中坊徹次（2007）東シナ海・黄海の魚類誌．東海大学出版会，秦野．lxiii + 1262 pp
2) Wang M, Zhang X, Yang T, Han Z, Yanagimoto T, Gao T (2008) Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the *Sardinella zunasi* Bleeker. Afr J Biotechnol 7:4384-4392
3) 中坊徹次（2018）サッパ属．中坊徹次（編），p. 82．日本魚類館．小学館，東京
4) FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2021). Species fact sheets. http://www.fao/fihsery/species/2891/en. Accessed 19 March 2021.
5) Dou CY, Ye ZJ, Gao TX, Zhang XM, Ren YP, Lou D (2002) Study on reproduction biology of *Sardinella zunasi* Bleeker in the coastal waters of Qingdao. Trans Oceanol Limnol 2:24-32 (in Chinese with English abstract)
6) 池原宏二・小川泰樹（2000）各都道府県における地方設定魚種の漁獲量：1956～1994 年の全国統計対象種以外の漁獲量．水産庁資源生産推進部，東京．241 pp
7) 窪田清一（2010）ママカリ　ヒラに　まったりサーラ．日本文教出版株式会社，岡山．156 pp
8) Ying Y, Gao T, Lin L (2011) Complex genetic structures of *Sardinella zunasi* in the Northwest Pacific detected by AFLP markers. Biochem Syst Ecol 39:339-345
9) Ying Y, Gao T, Miao Z (2011) Genetic differentiation of Japanese sardinella (*Sardinella zunasi*) populations in the Northwest Pacific revealed by ISSR analysis. J Ocean Univ China 10:417-424
10) Gwak W-S, Lee Y-D, Nakayama K (2015) Population structure and sequence divergence in the mitochondrial DNA control region of gizzard shad *Konosirus punctatus* in Korea and Japan. Ichthyol Res 62:379-385
11) 唐川純一（2001）瀬戸内海備讃瀬戸およびその周辺海域におけるサッパ卵・仔魚の出現時期と分布域．月刊　海洋，33:263268
12) Katafuchi H, Kai Y, Nakabo T (2011) Genetic divergence in *Ditrema jordani* (Perciformes: Embiotocidae) from the Pacific coast of southern Japan, as inferred from mitochondrial DNA sequences. Ichthyol Res 58:90-94
13) Hirase S, Ikeda M, Kanno M, Kijima A (2012) Phylogeography of the intertidal goby *Chaenogobius annularis* associated with paleoenvironmental changes around the Japanese Archipelago. Mar Ecol Prog Ser 450:167-179
14) Kobayashi I (1996) The Sea of Japan in Early and Middle Pleistocene times. H G I Rep (5):263-285 (in Japanese with English abstract)
15) Kitamura A, Takano O, Takata H, Omote H (2001) Late Pliocene-early Pleistocene paleoceanographic evolution of the Sea of Japan. Paleogeogr Paleoclimatol Paleoecol 172:81-98
16) Grant WS, Liu M, Gao TX, Yanagimoto T (2012) Limits of Bayesian skyline plot analysis of mtDNA sequences to infer historical demographies in Pacific herring (and other species). Mol Phylogenet Evol 65:203-212
17) Sato M (2010) Anthropogenic decline of the peculiar fauna of estuarine mudflats in Japan. Plankton Benthos Res 5 (Suppl):202-213

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：抗うつ作用の機序の解明

倉敷芸術科学大学生命科学部

岡田誠剛

（概要）マウスに慢性予測不能軽微ストレスを負荷すると、うつ様行動が認められるが、個体差がありストレス感受性にうつ様行動を示すマウス(Stress-S)とストレス抵抗性にうつ様行動を示さないマウス(Stress-R)に分けられた。このマウスの個体差に着目し、興奮性のマーカーである c-Fos 免疫染色の反応性を指標にして、Stress-S と Stress-R マウス間で興奮性が異なる神経核を検討した。視床室傍核、青斑核、縫線核は、Stress-S と Stress-R の間に c-Fos 免疫反応性には差は見られなかったが、帯状皮質では Stress-R でのみ、外側中隔腹側部には Stress-S のみで c-Fos 陽性細胞が認められ、うつ様行動への関与が示唆された。慢性ストレスは特定の神経核の興奮性を変化させることで、うつ様行動をきたすという可能性について議論する。

緒言

慢性のストレスは、うつ病を始めとする精神疾患発症のきっかけとなる。マウスでも類似の現象をおこすことができ、慢性予測不能軽微ストレス(CUMS)を数週間負荷すると、行動実験でうつ様行動(学習性無気力)を示し、うつ病のモデルとして有用である。しかし、慢性ストレスがどの神経核のどの分子を変化させて、行動を変えるかは未解明である。一方、難治性のうつ病患者に、電気けいれん療法、脳深部刺激、経頭蓋磁気刺激などの神経刺激(ニューロモデュレーション)を加えると、寛解する例がある。これらを考え合わせると、慢性のストレスは特定の神経核の興奮性を変化させ、この興奮性の異常がうつ様行動をきたしたのかもしれない。そして、ニューロモデュレーションはこの異常を正常化して効果を発揮したと考えられる。しかし、どの神経核の興奮性のモデュレーションが寛解に関与したかは様々な報告があり、未解決の問題として残されている。

本研究は「慢性ストレスは特定の神経核の興奮性を変化させることで、うつ様行動をきたす」という仮説に基づき、マウスへの CUMS 負荷への感受性/抵抗性の個体差に着目し、興奮性のマーカーである c-Fos 免疫染色の反応性を指標にして、ストレス反応性にうつ様行動を示すマウスと、ストレス抵抗性にうつ様行動を示さないマウスの間で興奮性に差がある神経核を明らかにすることを目的とする。

材料および方法

1)実験動物：雄性 ICR マウス(5 週齢)対照マウス 5 匹、ストレス負荷 12 匹。

2)慢性予測不能軽微ストレス(CUMS)：短時間の拘束、照明の昼夜逆転、ストロボ照明、夜間の照明、床敷の水浸、ケージの振動または傾斜、強制水泳、絶食 12 時間を疑似ランダム化した順に毎日 2 つずつ 5 週間負荷した。対照マウスは体重測定のみでストレスは負荷しなかった。

3)うつ様行動試験：飼育最終日前日にストレス負荷マウスの自発的な運動量をアクティビティホイール試験(AWT)で検討した。最終日に対照マウス、ストレス負荷マウスに尾懸垂試験(TST)を行った。それぞれ回転数が少ない事と無動時間が長い事をうつ様行動とみなした。

4)c-Fos 免疫染色：尾懸垂試験 30 分後に4%PFAでかん流固定し、薄切後抗 c-Fos 抗体で免疫染色した(ABC ペルオキシダーゼ)。ストレス、うつ、不安様行動に関連する神経核(帯状皮質、視床室傍核、外側手綱核、海馬歯状回、扁桃体中心核、扁桃体基底外側核、視床下部室傍核、外側中隔、青斑核、縫線核)の c-Fos 免疫反応性を検討した。

結果

CUMS 負荷後に尾懸垂試験によりうつ様行動の指標となる無動時間を測定し、ストレス未負荷の対照マ

ウスと比較すると、無動時間の延長傾向(p=0.053)が認められ(図1)、CUMS 負荷がうつ様行動をきたしたと考えられる。

次に、この CUMS 負荷群の各個体の無動時間をアクティビティホイール試験での回転数とプロットすると(図2)、有意な負の相関が認められ(R=-0.64)、この 2 つのうつ様行動試験の結果から各マウスの感受性/抵抗性を分類できると考えた。具体的には、TST の無動時間が 40 秒未満で AWT での回転数が 40 以上の個体を Stress-R に、逆に無動時間が 40 秒以上、回転数が 40 未満の個体を Stress-S に分類した。この分類に従ってこれ以降の実験を行った。

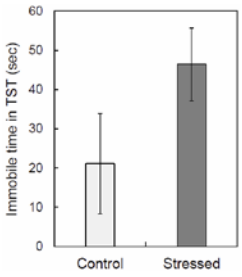


図 1. CUMS 負荷による尾懸垂試験(TST)での無動時間の延長傾向(p=0.053)

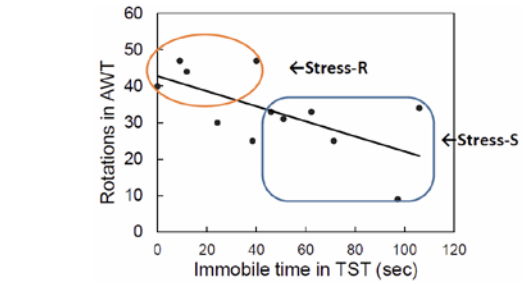


図 2. CUMS 負荷群の、Stress-R と Stress-S の分類。

次に、うつ様行動、不安様行動、ストレスに関与する以下の神経核の興奮性を神経活動マーカーである c-Fos の免疫染色によって検討した。その結果、ストレスに敏感に反応する視床室傍核各では、対照を含めすべての個体で c-Fos 陽性細胞が見られた(図 3)。これは対照マウスにも TST を行ったので、そのストレスの結果だと考えられる。

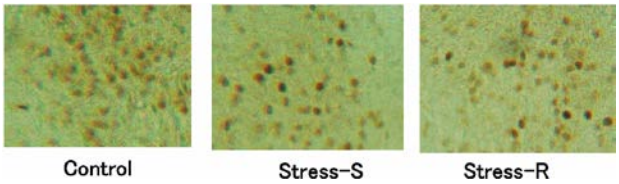


図 3. 視床室傍核

次に、抗うつ薬の作用点であるノルアドレナリン神経系の起始核である青斑核(図4)、セロトニン神経系の起始核である縫線核(図 5)の c-Fos 免疫反応性を検討すると、いずれも顕著な免疫反応性は認められず、ストレス負荷による変化は認められなかった。

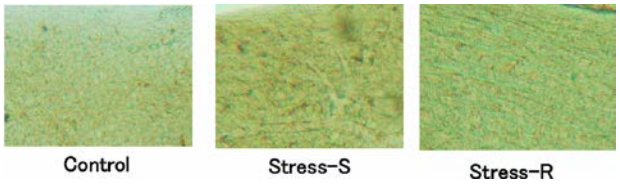


図 4. 青斑核

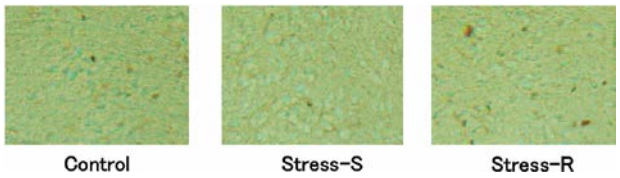


図 5. 縫線核

興味深いことに、内側前頭皮質は対照、Stress-S にはほとんど c-Fos 陽性細胞が見られなかったが、Stress-R でのみ陽性細胞が認められた(図 6)。

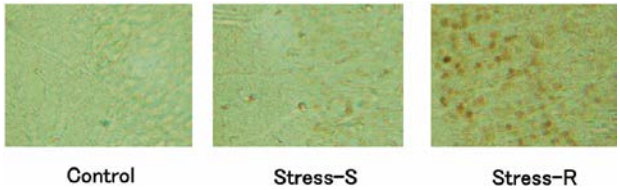


図 6. 内側前頭皮質(帯状皮質)

最後に、ストレス情報を中継する役割をはたすと考えられている外側中隔腹側部では、対照、Stress-R にはほとんど c-Fos 陽性細胞が見られなかったが、うつ症状を示した Stress-S でのみ陽性細胞が認められ(図 7)、症状と興奮性の間に正の相関が認められた。

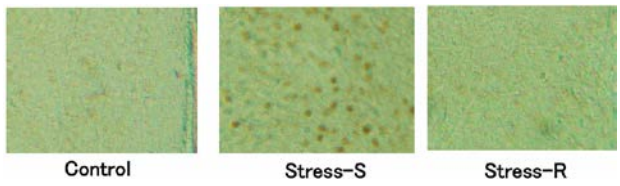


図 7. 外側中隔腹側部

うつ様行動/神経核	対照	ストレス-S	ストレス-R
うつ様行動の有無	—	+	—
視床室傍核	+	+	+
青斑核	—	—	—
縫線核	—	—	—
帯状皮質	—	—	+
外側中隔腹側部	—	+	—

表. うつ様行動と c-Fos 反応性のまとめ

考察

本研究で、CUMS 負荷後の Stress-S/R で、c-Fos 免疫染色で興奮性に違いがある神経核を検討すると、うつ様行動と外側中隔腹側部との間に正の相関がみられた(図 7、表)。逆に、内側前頭皮質(帯状皮質)では、Stress-R マウスにのみ c-Fos 陽性細胞が認められた(図 6)。これらの2つ神経核の活動が慢性ストレスによるうつ様行動に関与していることが示唆された。外側中隔の興奮性の上昇が慢性ストレスによるうつ様行動に関与しているのかもしれない。外側中隔はストレス情報を中継し、不安様行動に関与することが報告されているが、うつ様行動については報告がなく、今後因果関係を解明する必要がある。

本研究では、これらの神経核で興奮性の変化をもたらした分子は検討していないが、K^+チャネルの関与が推測される。本研究の実験手順では、5 週間にわたりストレスを負荷しているが、うつ様行動試験自体はストレス負荷と別のタイミングで行っている。したがって、ストレス情報がシナプス伝達を介して即時性に興奮性を変化させているとは考えにくく、慢性のストレスが特定の神経核のニューロンの内在性興奮性を変化させている可能性がより高い。内在性興奮性は主に K^+チャネルによって制御されており、CUMS によってK^+チャネル発現が変化し、うつ様行動をきたした可能性が推測される。事実、我々と米、仏の研究グループは、うつ様行動への K^+チャネルの関与を見出している。例えば米のグループは KCNQ 遮断薬が、仏のグループは TREK-1 遮断薬が抗うつ作用を持つことを、我々は TREK-1 活性薬[4]と ROMK 遮断薬[2]が抗うつ作用を示すことを見出している。さらに我々は、その作用機序はとして、K^+チャネル遮断薬/活性化薬が外側中隔ニューロンの興奮性を抑制することであることを示唆しており、本研究の結果とも合致する(図7)。

本研究で、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神経の起始核である青斑核・縫線核には Stress-S/-R の間に差は認められなかった(図 4、5)。これは慢性ストレスによるうつ様行動の出現にはセロトニン、ノルアドレナリン神経伝達が関与していないことを示唆している。この結果は、既存の抗うつ薬(セロトニン、ノルアドレナリン再取込阻害薬)が 1/3 の患者に無効であることの鏡像なのかもしれない。

このように、マウスに慢性予測不能軽微ストレスを負荷し、感受性の個体差から Stress-S/-R に分ける方策は有効であると考えられる。しかし、本研究では例数が不足しており、統計的な有意差が取れていない。本研究の継続し、ストレスによってうつ様行動をきたす原因となる神経核を解明するだけでなく、その興奮性の変化をおこす分子(K^+チャネル？)を解明することで、慢性ストレスによりうつ病を発症しする機序が解明されるだけでなく、新たな治療薬の標的が見出されることが期待される。

参考文献

[1] Okada M, Ortiz E. Therapeutic potential of viral vectors that express venom peptides for neurological diseases. Medical Hypotheses 161, 110809, 2022.

[2] Okada M, Kozaki I, Honda H. Antidepressive effect of an inward rectifier K^+ channel blocker peptide, tertiapin-RQ. PLoS One 15(11): e0233815, 2020.

[3] Okada M, Ortiz E, Corzo C, Possani LD. Pore-forming spider venom peptides show cytotoxicity to hyperpolarized cancer cells expressing K^+ channels: a lentiviral vector approach. PLoS ONE 14 (4): e0215391, 2019.

[4] Joseph A, Tran TTT, Tah LT, Okada M. Antidepressive and Anxiolytic effects of ostruthin, a TREK-1 channel activator. PLoS One 13 (8): e0201092, 2018.

スポーツ現場で筋音図・筋電図を筋コンディショニングに活用する

倉敷芸術科学大学

枝松千尋

（概要）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であるが難しい。そこで、平成 30 年度・令和元年度にウエスコ学術振興財団の助成を受けて研究を行った。その結果、アスリートの筋コンディションを筋音図・筋電図（Measee システム）を用いて評価できる可能性を示した。本研究では、スポーツ現場における日々の練習の中で筋コンディションを即時に定量し評価できるかを検討することを目的とした。被験者は陸上短距離選手 5 名であった。対象筋は半腱様筋（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、冬季トレーニング期間に測定した。その結果、今回の研究では Measee システムを用いて筋コンディションを評価するには至らなかった。スポーツ現場での測定スケジュールの検討や Measee システムの改良の必要性が明らかとなった。

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。そこで、我々は平成 30 年度・令和元年度にウエスコ学術振興財団の助成を受けて研究[1,2]を行った。その結果、アスリートの筋コンディションを筋音図・筋電図（MMG/EMG ハイブリットセンサ：Measee システム）を用いて評価できる可能性を示した。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[3]。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[3]。我々の先行研究でもこの変位型 MMG/EMG ハイブリットセンサを用いて時系列データを 1000Hz で取得し、実験室において解析を行った。しかしながら、スポーツ現場では評価を即時フィードバックすることが求められる。そこで本研究では 1000Hz で取得した信号を 10Hz でパソコンに Bluetooth 転送する新 Measee システムを用いて、スポーツの現場での利用を想定した実験を行った。具体的には、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主観的な調子との関係を検討することで、筋コンディションをスポーツ現場において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

被験者は陸上短距離選手 5 名（年齢 19.6±0.8 歳、身長 169.0±3.3 ㎝、体重 63.2±3.9 ㎏）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。2 名が左脚、3 名が右脚であった。被験肢の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）に新 Measee システムの MMG/EMG ハイブリットセンサをメジャー付きの専用のバンドで固定した。測定部位はノートに記録しておき、毎回同じ部位を測定するようにした。また、バンドの締め付け具合も周囲径より 2 センチ締め付けるようにし、毎回同じになるようにした。

半腱様筋（HAM）の最大等尺性収縮中の筋音図・筋電図を測定した。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、日曜のレスト日の翌日の月曜に行った。

測定日のHAMのハリ・疲労感、走りの調子を含めた全体的な調子の2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、測定期間中の練習内容を1日ずつ質的強度、主観的な質的強度、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。測定日は令和 3 年12月6日～2月17日であった。

3. 解析

新 Measee システムは、センサ内回路においてEMG 信号の全波整流およびスムージングした後にMMG信号と共に10Hzにて Bluetooth でパソコンまたはタブレットに転送する [4]。したがって、パソコン内で全波整流等の解析処理を行う必要はない。本研究ではパソコン側に表示された時系列データグラフから、筋音図・筋電図の数値を目視により読み取った。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. 結果と考察

令和元年度の研究では、被験者 3 名について図 1 で示すように練習量とハムストリングスの筋音振れ幅には関係性がみられた。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。それに対して、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。このことについて、先行研究 [5-8] より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、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く、そのために筋音振れ幅が大きくなったと考えられた。

しかしながら、今回の研究では5名の被験者に練習量と HAM 筋音振れ幅には関係性がみられなかった（図 2)。さらに HAM 筋電図や HAM のハリ・疲労感、走りの調子にも練習量との関係性はみられなかった。この原因として考えられることとしては、1．新型コロナ蔓延の影響や年末年始を挟んだため十分な練習ができていないこと。2．測定日をレスト日の翌日にしたこと。3．新 Measee システムを用いて計測したことが考えられる。

1．新型コロナ蔓延の影響や年末年始を挟んだため十分な練習ができていないことについては、令和元年度の研究では測定日が 10 月～11 月のシーズン中だったのに対して、今回の研究では新型コロナ蔓延の影響によりシーズンオフである12月～2月の時期に行った。さらに年末年始のオフ期間及び1月21日からのまん延防止等重点措置を受けて大学での練習ができなくなったこともあり、令和元年度の研究

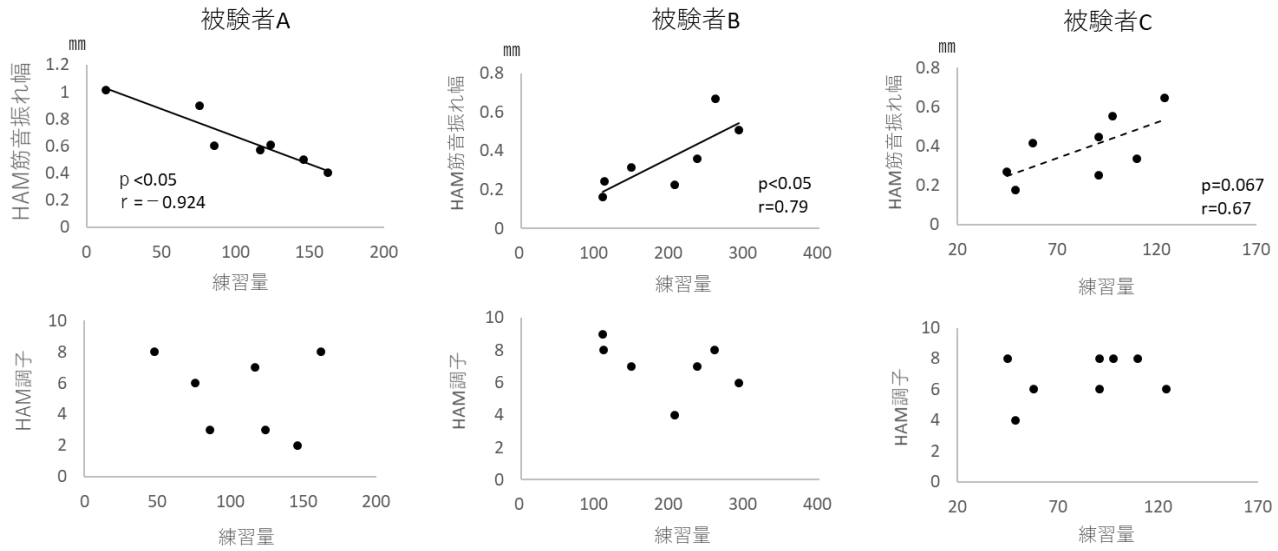


図1　練習量とHAM筋音振れ幅、HAM調子の関係

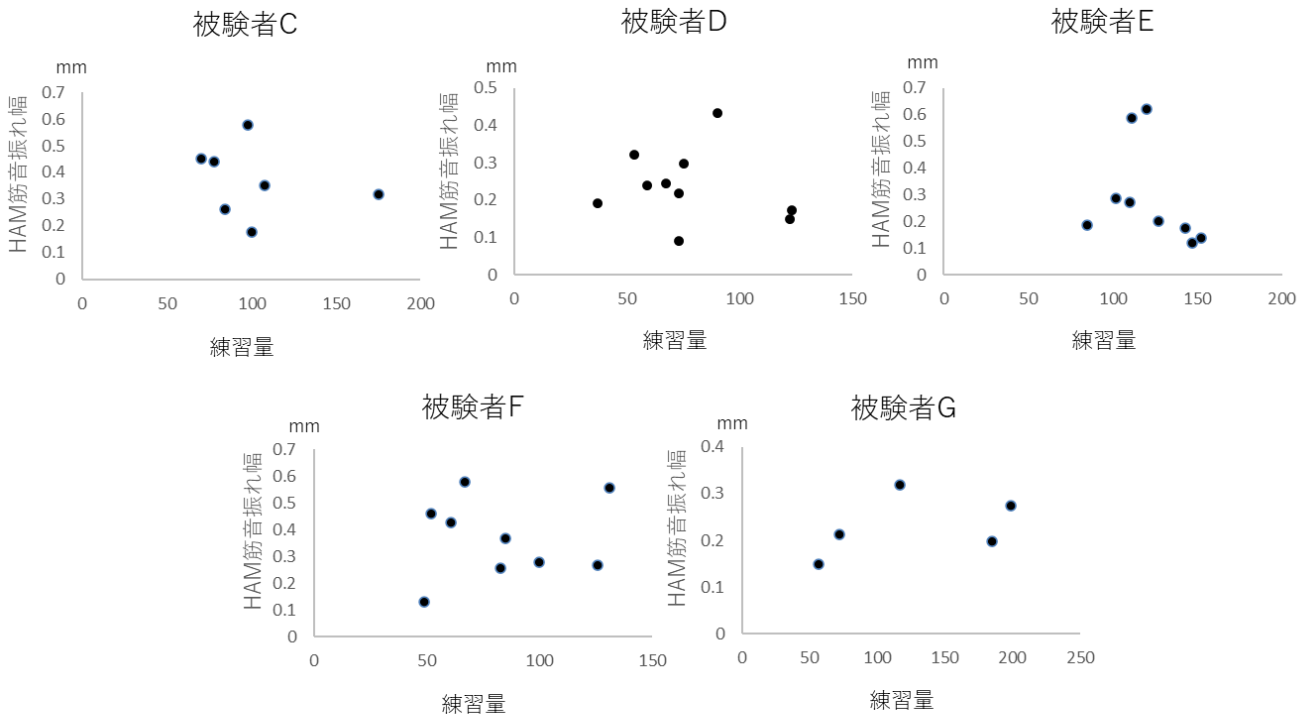


図2　練習量とHAM筋音振れ幅の関係

の時とは練習に取り組むモチベーションと練習強度も異なったと考えられる。被験者 C は令和元年度と今回の研究の被験者であるが、練習量を見ると令和元年度は 50～120 の間でばらついているのに対し、今回はほとんどが 70～100 付近に集中していた。また、練習量は練習の質と量を主観的に評価したものを掛け合わせたものであり、その質と量の評価も今回のように充実した練習ができていない状況では相対的に高く見積もっているようであった。

２．測定日をレスト日の翌日にしたことについては、令和元年度の測定が主に木曜日に測定していたのに対し、今回は月曜に測定した。陸上部の練習は月曜～土曜に実施し日曜をオフ日としている。今回の研究では週の初めに測定することで、前週の練習による筋コンディションの変化を捉えたいと考えたわけだが、ただでさえ練習量が少ないと考えられるうえに日曜のレストによって筋の疲労が完全に抜けたと考えられた。そのため練習量と筋音振れ幅に関係がみられなかった可能性も考えられた。今後もこの測定を継続していく予定であるが、シーズンに入ることもあり測定日を木曜にし、週半ばでの筋コンディションを測定し週末に開催される試合の記録との関係性も調査する予定である。

３.新 Measee システムを用いて計測したことについては、令和元年度の解析は 1000Hz でデータ取得した EMG および MMG 信号から最大値や RMS 値を算出したのに対し、今回は 10Hz で転送されパソコン上に表示されたグラフから最大値を目視で読み取った。10Hz で転送する新 Measee システムのデータの信頼性は先行研究 [4]によって報告されているが、今回は表示されたグラフから目視でデータを読み取ったため多少の誤差が生じたと考えられた。このことについては新 Measee システムにおいてタブレットや PC 上で簡便に選択部分の最大値や RMS 値が算出できるように改良が望まれる。

Ⅴ．結論

本研究では、スポーツ現場における日々の練習の中で、Measee システム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。その結果、今回の研究では筋コンディションを評価するには至らなかった。スポーツ現場での測定スケジュールの検討や Measee システムの改良の必要性が明らかとなった。

【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) 枝松千尋：筋音図・筋電図を用いた筋コンディションの定量評価法の開発，ウエスコ学術振興財団研究成果報告書集，平成 30 年度，97-99，2019
2) 枝松千尋：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，ウエスコ学術振興財団研究成果報告書集，令和元年度，84-86，2020
3) 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
4) 枝松千尋，綾部誠也，早田剛，村上浩茂，前村和佳：MMG/EMG ハイブリットセンサを用いた Measee システムの評価方法の信頼性検証，岡山体育学研究，第 29 号，23-27，2022
5) 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
6) 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
7) 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
8) 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

避難行動促進におけるメカニズムの解明-生理心理学的アプローチを用いて-

[1)]吉備国際大学心理学部・[2)]広島文化学園大学看護学部・[3)]吉備国際大学心理・発達総合研究センター

橋本翠[1)]・森井康幸[1)]・金澤寛[2)]・小西賢三[3)]

（概要）

本研究は，昨今の想定を上回る大規模な自然災害に対する防災及び減災に焦点を当て，危険だとわかっていても「なぜヒトは逃げないのか?」さらに，「どうすれば避難行動を促進できるのか？」という素朴な疑問について認知レベルと行動レベルの両側面から心理生理学的な実験手法を用いて探索的に検証することを目的としている。応募者は，2018 年の西日本豪雨災害で被災し，改めて「正常性バイアス」の認識の重要性と認知的メカニズムの解明が重要であることについて身を持って体験した。「なぜヒトは危険だと分かっていても逃げないのか？」その時の脳内の認知活動はどのようになっているのか？さらに，どのようにすれば認知レベルと行動レベルが結びつき(行動のパッケージ化)，早急な避難行動へと繋がるのかを解明することはとても重要であると考える。

そこで本研究では,「正常性バイアス」が働いている時の認知レベルと行動レベルとの関連性について心理生理学的手法を用いて検討を行うことを目的とした。

本研究は，危険だとわかっていても「なぜヒトは逃げないのか?」さらに，「どうすれば避難行動を促進できるのか？」という素朴な疑問について認知レベルと行動レベルの両側面から心理生理学的な実験手法を用いて探索的に検証することを目的として，研究を遂行する予定であった。2020 年度に続き，2021 年度も新型コロナウイルス感染拡大防止により，対面実験を予定通り実施することができず，研究目的を達成することができなかった。2022 年度に入り，漸く対面実験が可能となったが，再び感染拡大により実験を中止することとなった。感染拡大状況を見ながら引き続き実験を継続していく。

具体的な研究計画は，①危険だとわかっていても「大丈夫」「逃げない，逃げなくても良い」と判断している時の脳活動はどのようになっているのか？②どのような危機的状況になれば，いち早く「危険だ」と判断し，避難行動へと繋がっていくのか？③危機的状況と行動をパッケージ化することによって避難行動が促進されるのか？の 3 点について脳活動から探索していくことであった。

具体的な研究方法としては,[研究 1]　災害場面の VR を作成する　(災害場面は phase5 に分類し，官公庁が出す避難指示レベルと合わせる)。

[研究 2]　作成した VR を用いて phase ごとの ERP を測定・分析する。指標は P300 を用いて，注意の定位により脳活動を捉える。

[研究 3]　phase ごとに避難行動をパッケージ化させ，学習させ，[研究 2]と同様の手続きで ERP を測定・分析する。

[研究 4]　[研究 2]と[研究 3]の条件を within 計画で実施し，ERP を測定分析する。

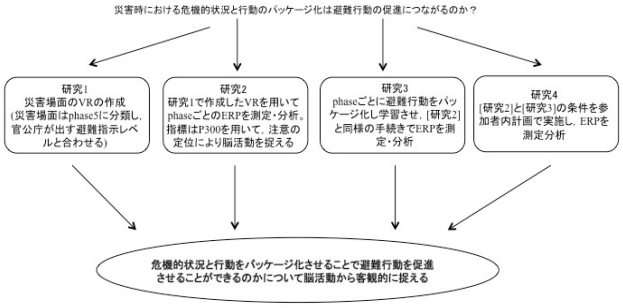


図1. 研究の全体計画

上記の 4 つの研究の遂行を想定していた。

しかし，[研究 2]から[研究 4]の実験遂行が出来なかったため, [研究 1]の災害場面の VR の作成を実施した。

実際に VR ソフトによる作成を試みたが，既存の災害 VR 動画のような刺激を作成することは非常に難しく，専門的知識を有する者でなければ困難であることが分かった。

そこで，既存の VR 動画(内閣府 TEAM 防災ジャパン)からいくつかの場面を静止画像として保存し，刺激を作成した（図 2)。



図 2.標準刺激(上)，逸脱刺激(中)，標的刺激(下)

図 2 に示した 3 種類の刺激(標準刺激/逸脱刺激/標的刺激)の視覚オドボール課題を作成する。

3 種類の刺激の割合は，標準刺激(70%)，逸脱刺激(15%)，標的刺激(15%)とし，参加者は，標的刺激に対しボタン押しで反応し，その時の事象関連電位(ERP)を測定分析し，注意を反映するとされる P300 を指標とする。

[手続き]

1 ブロックは 120 試行からなり，計 6 ブロック実施する。

その後，参加者は，図 3 の 5 段階の警戒レベルをしっかり記憶したのち，再び，同様の課題を計 6 ブロック実施する。

2021 年度も継続研究として採択されたが，新型コロナウイルス感染拡大に伴い，対面実験を実施することができなかった。2022 年 1 月に，防災訓練 VR(田中電気株式会社製)をレンタルできたため，現在，実験で使用する図 2 のような実験刺激を作成している。

引き続き，実験を継続し，避難行動促進におけるメカニズムの解明へとつなげていきたい。



図 3. 5 段階の警戒レベル

引用文献

内閣 TEAM 防災ジャパン：https://bosaijapan.jp/library/

硫化チタンを介した熱分解反応によるチタン製造プロセスの検証

Efficiency of Production Process of Metallic Titanium by Thermal-Decomposition via Titanium-Sulfide

津山高専
National Institute of Technology, Tsuyama college.

関　一郎
Ichiro Seki

（概要）　　チタン鉱石として一般に産出されるチタンは酸化物の状態であり，これは非常に高い熱力学的安定性を有しているため，これを分離して金属チタンにすることは容易ではない．しかしながら，酸化物以外のチタン化合物の結合エネルギーは酸化物である場合に比較して一般的に低く，現行プロセスのクロール法も含めて中間化合物を介して金属チタンを製造プロセスが一般的である．本研究ではこれまでに硫化チタンの熱分解温度が比較的低いことに注目し，炭硫化反応を用いた硫化チタンの製造プロセスの検証および市販のアーク溶解炉を用いた硫化チタンの熱分解反応により金属チタンが実際に得られることを明らかにしてきた．本年度は，さらにここから昨今，顕著化している環境問題に鑑み，硫化チタン製造の際に利用してきた炭素熱還元法に替わる還元反応として水素を用いた反応の有効性についてもも検証したのでその結果も報告する（詳細は現在論文を専門誌に投稿中であり，その紙面上にて報告する）．

【緒言 Introduction】

チタンおよびチタン合金は，特に高い化学的安定性と強度を有した信頼性の高い金属材料として熱交換器設備や航空機，生体医療用インプラント，スポーツ用品に至るまでの比較的高付加価値を必要とした用途を中心にその需要が増加してきている．特に高い信頼性を必要とする用途に対しては現行のクロール法により製造した高純度のチタン原料を用いることが現在は確定的であり，チタン製造各社の増産体制により高い需要に応えようとする動きはあるものの，その価格は鉄鋼材料の 10 倍に及ぶため，鉄鋼材料の置換目的の需要には応えらない現状がある．一方でチタンおよびその合金中に不純物として酸素等が溶解することで高強度化が実現できることが知られており，構造材については必ずしも極低酸素濃度を必要としないため，コスト面からも高品位で高価なチタン材よりも安価で適切な性能を有した中品位のチタン材の供給の方が市場からは求められることは大いに予想できる．また，この様な中品位のチタン材を供給するためにリサイクル材を利用する方法も有効ではあるものの，チタンは鉄鋼材料に比較して高い化学的安定性を有するが故にライフタイムが長く，チタン材がリサイクル材として回ってくることを待つよりは適切な品位のものを鉱石から製造した方が現実的である．この様な中程度の品位を有したチタン材の製造を目指した研究も少なからず報告がなされており，私共の研究グループで過去に報告した窒化チタンを熱分解して金属チタンを製造する方法もそのひとつである．本報は，窒化チタンと同程度に比較的低い熱分解温度を有する硫化チタンについても窒化チタンと同様の熱分解によるチタン製造プロセスが実現可能であるか否かを実証するとともに熱力学的な検討を行った．さらに昨今，顕著化している環境問題に鑑み，硫化チタン製造の際の炭素熱還元法に替わる還元反応として水素を用いた場合の反応機構の検証およびチタン製造プロセスとしての有効性について検証したので報告する．

【実験方法 Experimental　procedure】

二か所の温度制御部を設けた横型の電気抵抗炉内に石英管を設置し，その中央部に炭素熱還元プロセスの場合には適量の黒鉛粉末を混合した酸化チタン粉末，水素還元プロセスの場合には酸化チタン粉末を入れたアルミナボートを設置した．実験では石英管

内部をロータリーポンプによる真空引きの後に炭素熱還元プロセスでは Ar ガス置換するとともに上流側の電気炉内で硫黄粉末を適宜加熱することで下流側の試料粉末に硫黄とアルゴンの混合気流が供給される様にし，水素ガス還元の場合には Ar-4%H_2 混合ガスで置換，必要に応じて硫黄の蒸気も供給される様にし，所定時間の保持の後に試料を室温にまで空冷し，実験前後の試料粉末は生成相の同定を行った．ここで作製した硫化チタン粉末は市販のアーク溶解炉を用いてアーク炎等によって適宜加熱を行い，実験前後の酸化チタンおよび硫化チタン粉末，熱分解反応後に得られたの金属塊はエックス線回折法による生成相の同定を行った．

【結果 Results】

硫化後の酸化チタン粉末の表面性状は薄く黄色みがかかった様に変化しており，エックス線回折法による相同定では硫化チタン(TiS_2)であることが判った．また，ここで得られた粉末をアーク炎により加熱すると視覚的には粉末状から金属光沢を有した塊状に変化するとともに相同定の結果から回折ピークとして金属チタンが存在することが判った．このような生成相の変化について熱力学的文献値を用いて描くことのできる図 1（a,b）に示す Ti-O-S 系相安定図に照らし合わせて反応時の酸素および硫黄分圧を推定すると，炭素熱還元法による硫化チタン生成の場合(a)には酸素分圧が 10^{-15}atm 以下，硫黄分圧は 10^{-5}atm 以上であり，炭材混合により期待される Boudoir 反応で規定される酸素分圧(P_{O2}=10^{-17}atm at 1500K)より十分に大きく，熱力学的にも合理的であることが示されている．また，熱分解により金属チタンにまで還元する場合には，TiS_2 を介すことにより，10^{-5}atm 程度の比較的高い酸素分圧下でも金属チタンを容易に得ることができることが熱力学的にも現実的にも可能なことが分かった＜[1] I. Seki, *Mater. Trans.*, **62** (2021) 1533-1540.＞.

他方，中間化合物の製造プロセスにおいて水素還元を行った場合には，実験前には白色に見える酸化チタン粉末ではあるが，実験後には上流側の炉を用いて硫黄粉末を加熱して硫化させたものについては僅かに黄色みがかかった性状に変化しており，硫黄を用いなかった試料については黒色に性状が変化していた．詳細は現在論文を専門誌に投稿準備中であり，その紙面上にて報告する予定である．（一部日本金属学会・2021 年春季講演大会において報告済み）

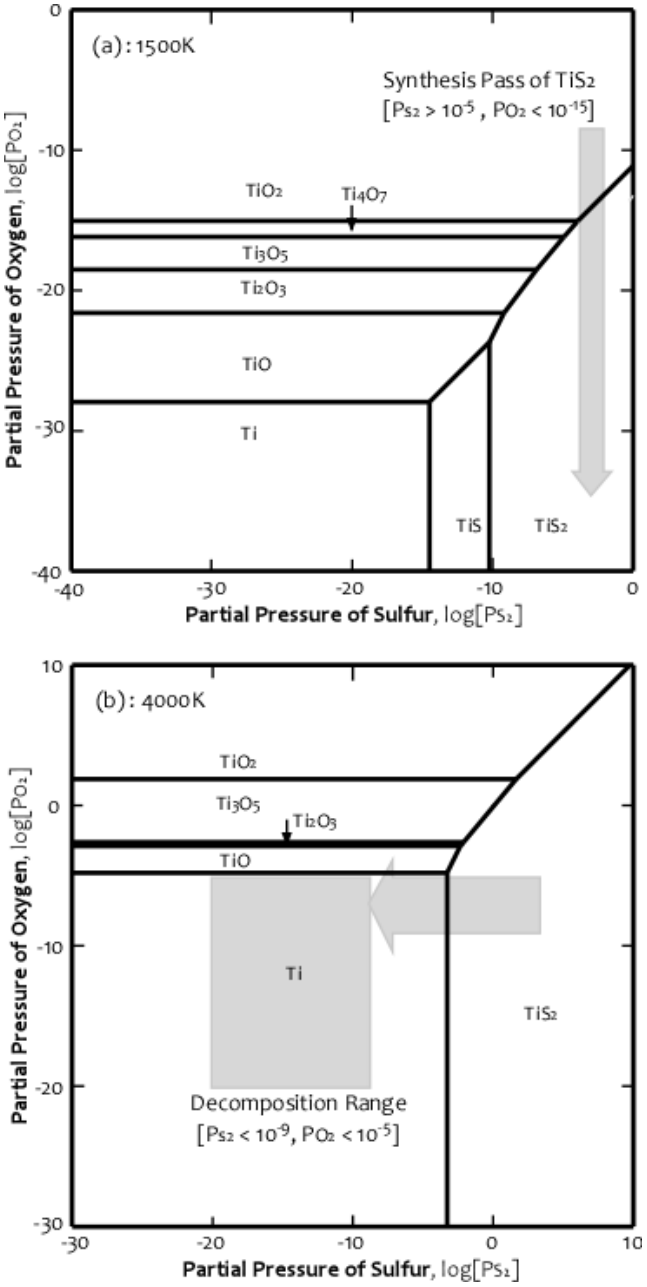


Fig.1. Ti-O-S phase diagram at 1500 K and 4000 K[1]

謝辞：本研究は公益財団法人・ウエスコ学術振興財団・令和３年度学術研究活動費助成研究，一般財団法人・向科学技術振興財団・令和２年度助成研究，東北大学金属材料研究所附属新素材共同研究開発センターの共同利用研究(課題番号 202011-CRKEQ-0003)として実施した．

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．これまで提案した機構では，剛性の可変において動力伝達部とその方式に課題があった．そこでまず機構部の設計を見直すこととしたが，動力伝達部の局所的な応力集中を克服する中で，可変剛性機構部の根本的な見直しと計画変更を余儀なくされた．この新たな設計では，伝達部を外骨格的な構造でカバーし，剛性を可変することとした．そこでまずこれらの機能が再現可能か，設計を調整し検証した．その後剛性可変に影響ない動力伝達部を考案した．提案機構を 3D プリンターで造形し試作機を完成させ，実験検証によりその有効性を検討した．

1.　はじめに

近年下肢切断者の活動レベル向上のため，義足の研究や技術向上が行われている[1][2]．従来の義足では，一般的に弾性体として空圧や油圧などが用いられている．しかしこれらの弾性体では事前に設定された単一方向の剛性設計しか行えない．

そこで先行研究にて，二重ばね構造を用いて双方向への可変剛性機構を提案し（図１），この構造を基に設計・試作と歩行実験を行った[3][4]．これにより先行提案義足での，剛性の可変と弾性の活用が確認されている．しかし問題点として，重量化・大型化，重心の偏りなどが挙げられた．改善のためには，圧縮の動力伝達部のスペースを抑える必要があり，また同時にばね部のスペース確保が必要となった．

そこで，本テーマではこれらを解決する新たな義足機構の開発を目的として，図２，図３のような螺旋型ばね締緩機構を提案する．本機構は螺旋状のカバーでばねを圧縮させることで圧縮距離を固定しながら回転により効率的な可変ができる．また動力伝達部により常に反力を得ることができる．外骨格的な構造にすることで，ばね部のスペース確保も期待できるものと考えた．製作した機構を用いて実験を行い，可変剛性に必要なトルクを計測することで機構の有効性を確認する．

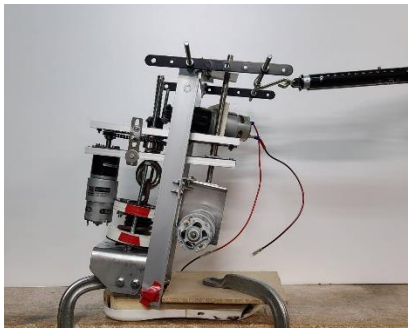


図１　先行提案義足の機構

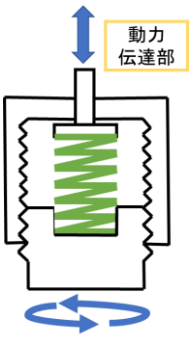


図２　ばね緩締装置

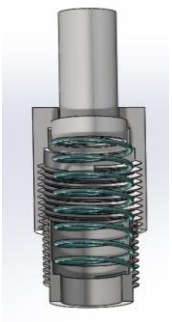


図３　3D 設計モデル

2.　機構の提案

2.1.　従来義足の問題点

先行研究で提案された従来機構（図４）では実用化が難しい．その理由は大きく分けて３つある．１つ目は重量である．従来機構ではばねの固定や軸にステンレス素材を使用している．またチェーンの使

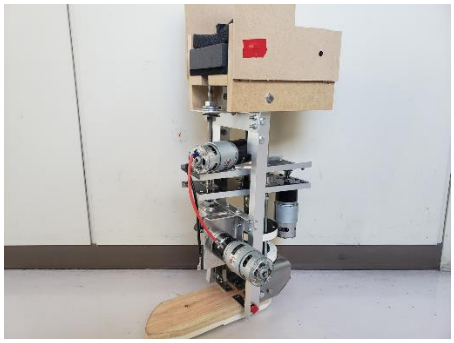


図４ 先行研究提案義足

用や安定性を考慮したため，全体的に金属を多く使用している．他にも必要なトルクが大きいため，出力トルクが大きいモーターや減衰機を使用することで重量化に繋がったと考えられる．２つめの理由としては，重心の分散化が挙げられる．重量が重たいモーターや減衰機を縦横の向きを統一していないことや，配置が適切な場所ではないことから原因だと考えた．３つ目としては，動力伝達の不具合が起こりやすいことである．従来機構はチェーンの使用やスライダ機構を使用しているため，動作が不十分な場合がある．そのため課題として，軽量化・重心の安定化・効率の上昇が挙げられる．

2.2. 提案義足の概要

コイルばねを用いた機構は，空気圧や油圧などに比べて装置の小型化・構造の簡易化が実現しやすいという利点がある．それに対し，従来機構はコイルばねを用いたにもかかわらず，各々の機構が大きく複雑に作られており．これらの利点が得られていない．この問題を解決するため，螺旋状での剛性変化が可能な螺旋型ばね締緩機構を提案した．本機構は雌ねじや雄ねじの役割をするばねカバーを製作し，提案機構の影響を受けずにばねからの力を受けられる動力伝達部品を図５のようなハンコ型の形状で製作し，装置の概要である図２，図３の上部に示すような形で配置した．また回転方向のねじり方向へ力を加えることで，ばねの剛性変化が起こり，動力伝達部に出力するような機構を提案する．また提案機構では，右方向への力を加えるとばねが硬くなり，左方向への力が働くとばねが柔らかくなる．本稿ではこの機構を螺旋型ばね締緩機構と呼称する．

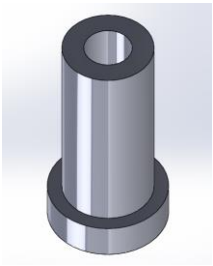


図５ 動力伝達部

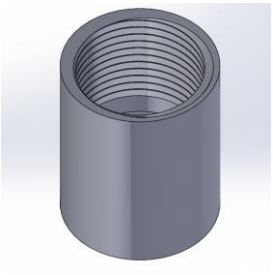


図６ 上部ばねカバー

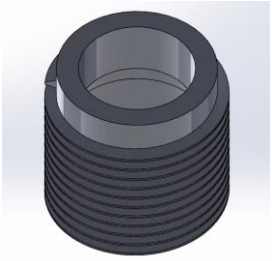


図７ 下部ばねカバー



図８ 上部の断面図

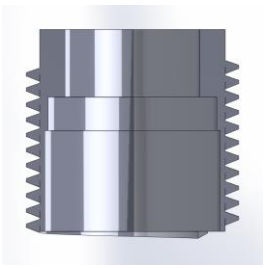


図９ 下部の断面図

2.3. 機構部の試作

ばねカバーの上部を図６，下部を図７にその断面図をそれぞれ図８，９に示す．構造としては筒状のカバーを上部と下部に分けて作り，上部をめねじ，下部がおねじの役割を持ち，ねじることで剛性の変化が可能であるものとした．螺旋型ばね締緩装置は従来機構に比べて装置の小型化・構造の簡易化が期待できる．従来機構では圧縮ばね上部の板にめねじを切り，スライダ機構に用いているねじをモーターによって回転させることで圧縮ばねにたわみを与えていた．そのため横方向からモーターを回転させる必要があり，横にはみ出るため装置自体が大きくなる．それに対し提案機構ではカバーがそれぞれおねじ・めねじの役割があり，直接モーターからをカバーの下部に出力することが可能になる．そのためモーターがカバーの中に収まることができ，小型化・構造の簡易化が図れると考えた．

3.　提案機構の動作検証

3.1.　動作検証方法

製作した螺旋型ばね締緩装置の有効性を検討するため，動力伝達部におもりを載せ，動力伝達部での変位量で剛性の変化を確認する検証を行った．本実験では，動力伝達部の変化量を見るため，特徴点をマーキングして行った．その後動画による運動解析を行うことで，可変剛性機構が機能しているか検証をした．また，ばねカバーの上部と下部のそれぞれのねじの始点に印をつけ開始地点がわかるようにし，自然長とばねカバーをねじり 1 周，2 周，3 周，4 周，5 周の計 6 回行う．動画解析には kinovea Ver.0.8.15 を使用する．検討は図１０の様に正面の定点からの撮影と解析によって行った．

3.2.　動作検証条件

機構の最大高さ 203 [mm]から最小高さ 181 [mm]と変動するのに対し，カメラの設置高さ 170 [mm]の点に固定することとした．おもりは 20 [kg]のものを使用する．変位量を確認する際のばねの硬さは，回転数で設定し，それぞれピッチより求めると，1 周 4.5 [mm]，2 周 9.0 [mm]，3 周 13.5 [mm]，4 周 18 [mm]，5 周 22.5 [mm]の圧縮距離として設定した．

また変位量の計測のため，1 [mm] 当たりのピクセル数を求め，ピクセルの単位からメートル単位に戻す．上部ばねカバーの y 軸方向のサイズは 715 [pix]であり，実際の寸法は 90 [mm] である．これを用いて 1 [mm] 当たりのピクセル数は約 8 [pix] だということが確認される．それぞれの点での変位の様子を図１１に示す．

3.3.　動作検証結果

回転数による圧縮距離とばねの変位量の関係を表１に示す．これをグラフにしたものを図１２に示す．これらの結果から，圧縮距離と変位量は比例関係にあり，剛性が高まる程に変位量が小さくなっていることが確認できる．このとき，各圧縮距離に対する変位の時間変化を図１３に示す．これらの結果から可変剛性が実現していることが確認できる．

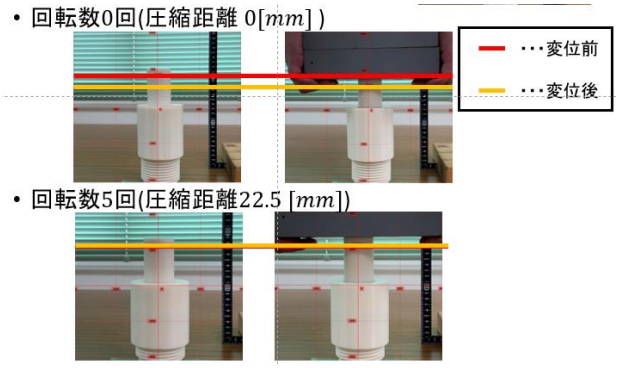


図１０ Kinovea による動画解析の様子

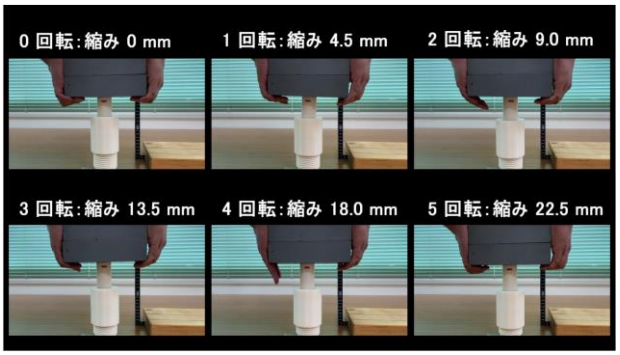


図１１ 各圧縮距離に対するばねの縮み比較

表１ 各圧縮距離における変位量の測定結果

ばね圧縮距離 x [mm]					
0	4.5	9	13.5	18	22.5
変位量 y [mm]					
1.2	1.71	2.14	2.58	2.92	3.25

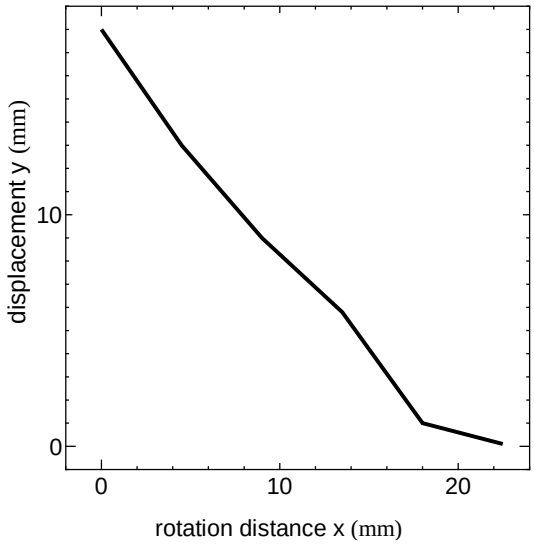


図１２ 各圧縮距離における変位量の関係

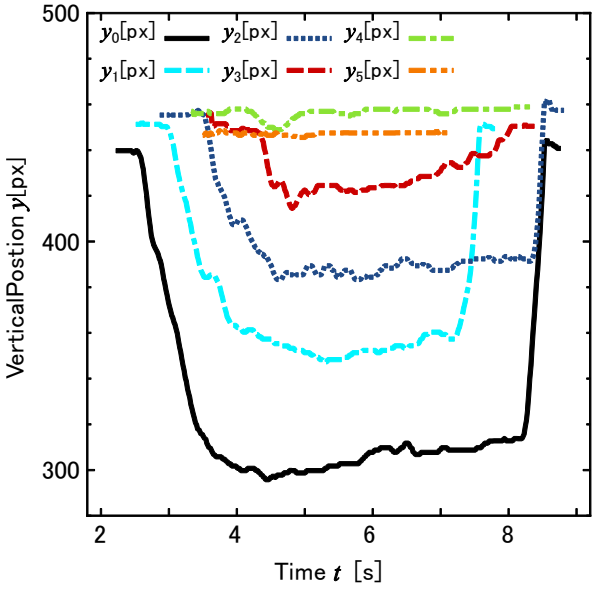


図１３ 各圧縮距離に対する y 方向変位の応答



図１４ デジタルトルクレンチ

表２ デジタルトルクレンチの仕様

仕様要素	パラメータ
全長［mm］	218
質量［g］	560
差し込み角［mm］	9.5
最小目盛［N・m］	0.01
トルク調整範囲［N・m］	1.5～30

4. 提案機構のばね緩締トルク検証

4.1. 垂直変位における仕事との比較

提案機構の有用性を調べるため，提案機構にかかるトルクを測定した．使用したデジタルトルクレンチを図１４に，その仕様を表２に示す．またトルクを測定するために，図１５のような出力部分がない トルクレンチ用の穴が開いた上部ばねカバーを新た

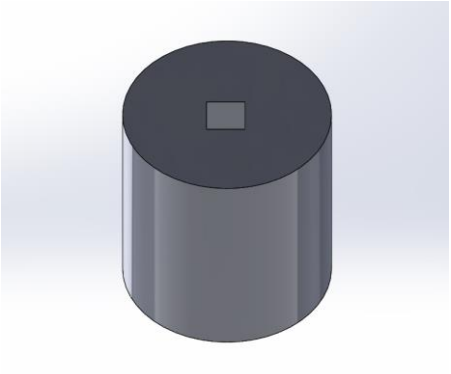


図１５ 測定用カバーパーツ

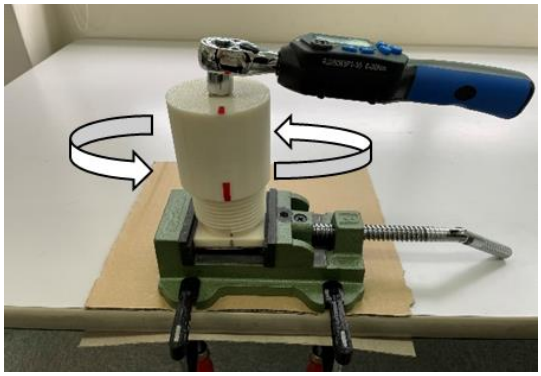


図１６ トルク測定実験の様子

に 3D プリンターで作成した．これを用いて図１６のように，下部のばねカバーを固定し．製作した上部ばねカバーを一周ごとにトルクの最大値を測定した．

測定値を仕事変換するには仕事とは距離と力をかけたものであるため，1 周当たりの 2π[rad]を距離とし，トルクの測定値にカバーの半径より求めた T を，上部ばねカバーにかかるトルクとし

$$W = 2\pi T \tag{1}$$

と計算した．ばねにかかる力は図 6.1 より弾性力はばね定数と変位量の積で求めることができる．この式をもとにたわみ量をxとしグラフで表したものを図 6.6 に示す．図 6.6 より，の面積が仕事となるため，三角形と捉え

$$\mathrm{W} = \frac{1}{2}kx^2 \tag{2}$$

により求めた．ただしkはばね定数，xをたわみ量とする．これらの式から仕事に変換し垂直方向の仕事と比較を行った．

表３ 巻き数に対するトルクの測定結果

巻き数［Rota.］								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
トルク T［N･m］								
1.2	1.71	2.14	2.58	2.92	3.25	3.56	4.13	4.4

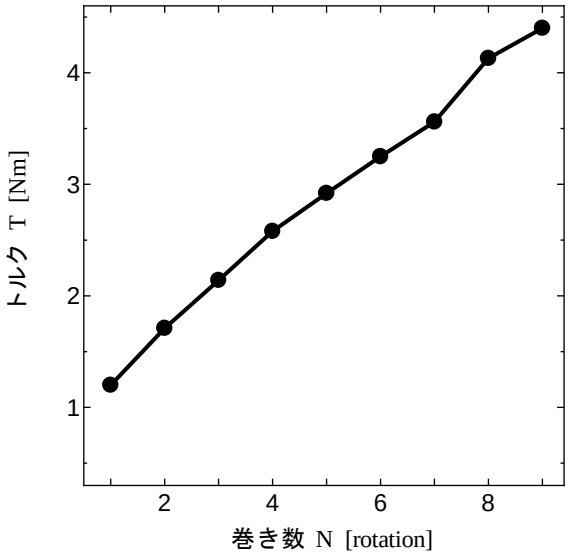


図１７ 巻き数とトルクの関係

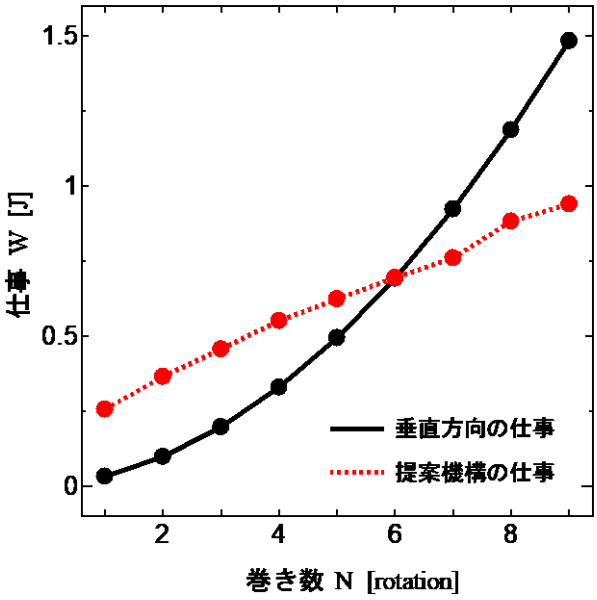


図１８ 計測したトルクと垂直変位の仕事比較

4.2. 比較検証結果

巻き数による各点での提案機構にかかったトルクの変化を表３に示す．この関係を示す図１７より，徐々にトルク数が上がっていっていることがわかる．これはばねが固くなるにつれ反力が大きくなり，回す力のトルクが大きくなっているからだと考えられる．またおおよそ一定の傾きであることから比例関係であるといえる．この理由としては，測定値のため，多少の誤差は生じているがもともとのトルクの式が距離と力の関係である 一次関数であるからだと考えた．また巻き数 8 回では比例関係と比べ少し大きく傾いている．これはトルクの最大値をとっているため，回す力にばらつきがあり余分なトルクを出力してしまったためだと考えられる．

4.3. 考察

式（1），（2） から垂直方向のばねにかかる仕事の理論値と提案機構にかかる仕事を導出した．その関係を図１８に示す．これをみると，巻き数 5 回未満では垂直方向にかかる仕事のほうが低くなっているが，一方で 5 回以降では提案機構の方が低くなっている．これは式（1）と式（2）から 1 次関数と二次関数の関係からだと考えた．提案機構では一次関数の傾きとなっており，比例関係である．また，垂直方向の仕事では二次関数の放物線を描き上昇している．そのため垂直方向の仕事は提案機構と比べ傾きが大きく，波がある．一方提案機構では，垂直方向の仕事と比べ傾きが一定でありあまり変化していないことがわかる．また最大仕事量の減少が確認でき，変位する距離が大きくなるほど提案機構の仕事量が垂直方向の仕事より有用性があることがわかった．これによりモーターの定格出力の低下や減速機の減速比が減少できる．また，最大仕事量の減少の理由として，提案機構ではばねの剛性を固定することができるため，弾性力を抑制する省エネルギー化のためだと考えた．これらのことからロボット義足の小型化や軽量化につながることから有用性を確認できた．

5. おわりに

本研究では，先行研究での双方向可変剛性機構を用いた義足機構の改善のために，新たな可変剛性機構の設計・試作・検証を行った．試作した装置を用いた動作検証の結果から可変剛性が可能の有効性を確認できた．また，トルク検証の結果から最大仕事量の減少を実現した．これによってロボット義足の小型化や軽量化が可能であると考えられる．今後この機構を組込むたの検討を進めたい．

謝辞

この度，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.

[4] 井上勝登，野中摂護，剛性制御機構を有するバイオニック義足の開発と構造及び身体的基礎評価の検討,日本ロボット学会学術講演会,3H2-02, pp.1-41, 2020.

放線菌における Sec 系分泌促進因子の探索

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

楊　霊麗

（概要）放線菌 *Streptomyces* 属は、環境へ適応や養分の獲得のため、細胞外へ多様な加水分解酵素を分泌する。これらの加水分解酵素は、食品加工分野でよく使われている。生産性向上及び新種有用酵素の開発には、分泌量の増強方法を検討する必要がある。放線菌におけるタンパク質の分泌は、多くの場合は Sec 経路を通る。本研究は、*Streptomyces* 発現系における分泌酵素の生産性増強のために、分泌酵素の大量発現に対する Sec 経路に関する分泌因子の影響について検討した。昨年度は、デュアル発現ベクターを構築し、分泌酵素と分泌因子の同時発現を実現した。*S. mobaraensis* 由来のトランスグルタミナーゼ（SMTG）を分泌酵素の対象として、宿主（*S. lividans*）由来５種類の分泌因子（FtsY, SecA, CssS, CssR と SPase）を選択し、スクリーニングを行った。その結果、CssR の大量発現は、SMTG 分泌を増強した。一方、FtsY、SecA 及び CssS は、分泌を抑制した。今年度は、分泌量の少ないアミノペプチダーゼ M1-TH2 について、CssR の応用を検討した。その結果、CssR の大量発現は培地中のアミノ酸濃度を増加したが、M1-TH2 の安定性が低いため、培地中に殆ど保持できなかった。

1. はじめに

放線菌、特に *Streptomyces* は、抗生物質の生産者として知られているが、環境へ適応や養分の獲得のため、細胞外へ多様な加水分解酵素も分泌する。これらの加水分解酵素は、工業や食品加工などにもよく使われている。ゲノム解析を行い、遺伝子情報から新たな酵素も次々と報告されており、申請者が所属する研究グループが見出したアミノペプチダーゼ（Wan et al. 2019）及びカルボキシペプチダーゼ（Wan et al. 2016）は、それぞれの基質特異性や適応条件があるため、食品中のアレルギー源や苦味の減少に効果が期待される。しかしながら、これら遺伝子情報を元に大量発現させた酵素は、微量にしか分泌されない場合が多い。このように、新種有用酵素の開発において、分泌量の増強が重要である。

放線菌におけるタンパク質の分泌メカニズムについて、近年理解が進み、大腸菌と同様に、多くの場合は Sec 経路を通る。Sec 経路は、リボソーム合成中および合成したタンパク質を認識し、細胞膜内在チャンネル複合体 SecYEG を通らせ、細胞膜外へ輸送する。この過程は、細胞内タンパク質の認識因子（SRP、trigger factor など）、細胞膜への導き因子（FtsY、SecA）、細胞膜貫通の助力因子（SecA）、細胞膜から分泌タンパク質を切り出す因子（SPases）などいくつかのタンパク質因子に作用される（図 1）。そして、細胞外に分泌されたタンパク質のミスフォールディングが大量に起こし、生育に影響を与えた場合の分泌ストレス感知と除去因子（CssS と CssR）も、タンパク質の分泌に重要である（図 1）。

分泌タンパク質の大量生産に連れて、これらの分

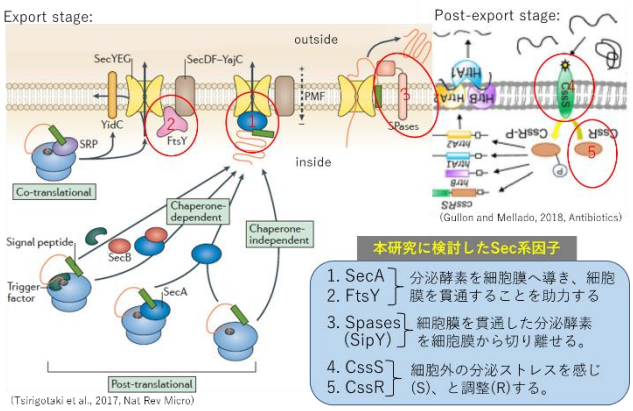


図１　放線菌 Sec 分泌系に関わる因子

泌因子が律速になる可能性があると考えられる。放線菌と同じグラム陽性菌である *Bacillus Megaterium* を宿主とする発現系について、SPase（SipM）の大量発現により、酵素 dextransucrase の分泌量約 3.5 倍が増強した（Malten et al. 2005）。更に、異種由来組み換えタンパク質について、分泌タンパク質に対する分泌因子の特異性も分泌量と関わ

るとされる。SecA の C-末端は、分泌タンパク質を proof reading する役割があると言われ、C-末端を削った SecA を用いて、*Bacillus subtilis* を宿主とした、異種由来のタンパク質の分泌量を増強した報告がある(Kakeshita et al., 2010)。しかしながら、放線菌 *Streptomyces* 発現系におけるこれらの研究は殆ど知られていない。そこで本研究は、*Streptomyces* 発現系における分泌タンパク質の生産量を増強できる分泌因子をスクリーニングし、それらの応用性について検討した。

2. 昨年度のまとめ

（1）宿主 *Streptomyces lividans* におけるデュアル発現ベクターpTSKr を構築し（図２）、二種の遺伝子の共発現を達成した。



図 2. デュアル発現ベクターpTSKr duet。

（2）デュアル発現ベクターpTSKr を用いて、安定性の高い分泌酵素トランスグルタミナーゼ SMTG と５種の分泌因子（図１）とそれぞれ共発現し、スクリーニングした。SMTG の生産量に対して、増強因子 CssR（分泌ストレス除去因子）を見出した（図３）。

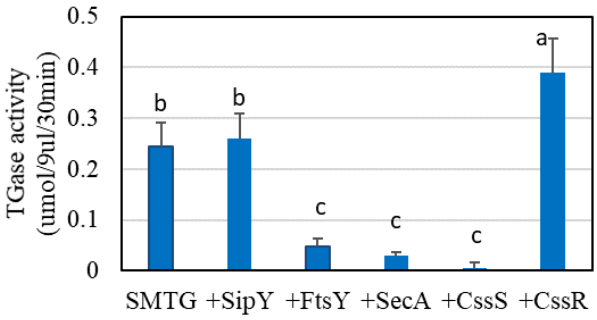


図 3. 培地中に分泌された SMTG 活性に対する分泌因子の影響。異なるアルファベットは有意差を示している（ANOVA, n=3, エラーバーは標準偏差）。72 時間培養時点での比較。

3. 今年度の進捗状況

昨年度見出した分泌増強因子 CssR 及び無抑制の因子 sipY と、培地中に微量しか分泌されない酵素アミノペプチダーゼ M1-TH２をそれぞれ共発現し、M1-TH2 分泌量への影響を検討した。

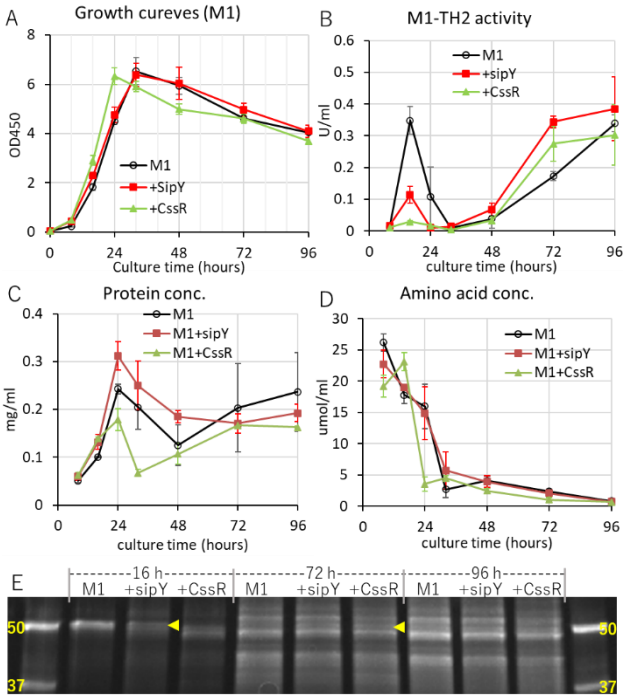


図 4. 分泌因子 sipY もしくは CssR と分泌酵素 M1-TH2 との共発現。A : 成長曲線、B : 培地中 M1-TH2 活性の経時変化、C : 培地中のタンパク質濃度の経時変化、D : 培地中のアミノ酸濃度の経時変化(n=3±標準偏差)。E : SDS-PAGE。三角は M1-TH2 (52.4kDa) のバンドを指す。両側のバンドは分子量マーカーの 50 kDa と 37 kDa を表し、それぞれの数字で示している。

因子 CssR と分泌酵素 M1-TH2 と共に大量発現させた *S. lividans* の増殖は、M1-TH2 のみ大量発現されたものより、対数増殖期に若干速まった（図 4 (A)、16 時間と 24 時間）。それと対応し、24 時間と 32 時間培養後、培地中タンパク質濃度の減少と、16 時間際に培地中アミノ酸濃度の急増とその後（24 時間）の急減であった。CssR は、本来細胞外アミノ酸濃度の低い環境下で CssS によりリン酸化され、細胞外ミスフォーディングや安定性の低いタンパク質を分解する膜タンパク質の遺伝子を誘導する働きをもつ。16 時間に M1-TH2 のみ大量発現させた *S. lividans* の培養液に高い M1-TH2 活性値を示し（図 4(B)）、SDS-PAGE に M1-TH2 の分子量と相当するバンドも確認できた。一方、CssR と共発現された培養液には、M1-

TH2 の活性も SDS-PAGE に対応するバンドも殆ど検出されなかった（図 4（B&E））。その原因として、M1-TH2 の安定性が非常に低いため、CssR との共発現により、細胞外に分泌された M1-TH2 は素早く分解され、培地中に殆ど保持できなかったと考えられる。72 時間以降 M1-TH2 活性の増加と相当するバンドは SDS-PAGE で確認できなかった（図 4（B&E））ことから、検出された活性は培地中にある他のアミノペプチダーゼの働きと考えている。

SipY との共発現により、静止期に入る前(図 4(A))に培地中のタンパク質濃度を増加した（図 4（C））が、M1-TH2 の活性（図 4（B））と SDS-PAGE 上で M1-TH2 のバンドは減少した。この結果から、sipY の共発現により、M1-TH2 の分泌は促進しなかったものの、宿主である *S. lividans* の他のタンパク質の分泌を促進したと示唆された。M1-TH2 の分泌が促進されなかった一つの理由として、*S. lividans* 由来の sipY は *S. cinnamonues* 由来の M1-TH2 に対する特異性の低さがあるものと推察している。

昨年度 SMTG と共発現した結果とまとめて言うと、因子 CssR は培地中のアミノ酸量を増やす効果があるため、安定性の高い分泌酵素 SMTG などの生産には増強効果がある一方、安定性の低い分泌酵素の生産には応用できなかった。因子 sipY は異種由来分泌酵素に対する特異性が低いため、分泌増強効果がなかった。

謝辞

本研究をご支援いただきましてウエスコ学術財団に、深く感謝いたします。

参考文献

Gullon S and Mellado R. The cellular mechanisms that ensure and efficient secretion in *Streptomyces*. Antibiotics 2018;7(33).

Kakeshita H, Kageyama Y, Ara K et al. Enhanced extracellular production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* by deleting the C-terminal region of the SecA secretory machinery. Mol Biotechnol 2010; 46:250–7.

Malten M, Nahrstedt H, Meinhardt F et al. Coexpression of the type I signal peptidase gene SipM increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941. Biotechnol Bioeng 2005; 91:616–21.

Tsirigotaki A, De Geyter J, ˇSoˇstaric´ N et al. Protein export through the bacterial Sec pathway. Nat Rev Micro 2017;15: 21–36.

Wan K., M. Uraji, J. Arima, T. Hatanaka. Characterization of a novel metallocarboxypeptidase from *Streptomyces cinnamoneus* TH-2. Bioresour. Bioprocess. 2016; 3:211-218.

Wan K., M. Uraji, S. Tokai and T. Hatanaka. Enzymatic degradation of allergen peptides from bovine casein by a combination of *Streptomyces* aminopeptidases. Appl. Biochem. Biotechnol. 2019; 187(2):570-582.

日本の伝統食材サトイモを疫病から守る！
RNAseq による防御マーカーの作製と免疫力の向上による防除技術の開発

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

鳴坂　真理、鳴坂　義弘

Phytophthora colocasiae を病原菌とするサトイモ疫病は、2014 年頃から多発するようになり、サトイモの国内主要生産地に甚大な被害をもたらしている。サトイモの日本への渡来は古く、縄文時代から食されていたとの説もあり、稲作よりも歴史のある作物である。また、サトイモは伝統的な和食の食材としてだけではなく、近年では介護食、離乳食としても活用されている。しかしながら、疫病の急激な蔓延により、国産サトイモが大きく減産し、生産農家の離農、栽培地の荒廃が懸念されている。本研究では、疫病を防除するため、サトイモの免疫力を高める 次世代型の農薬である“プラントアクチベーター（抵抗性誘導剤）”を選抜･評価した。その結果、独自に開発したサトイモの防御マーカー遺伝子を用いた選抜･評価により、サトイモの免疫を活性化するプラントアクチベーター候補剤アシベンゾラル S-メチルを得た。さらに、本剤をサトイモに処理することで、疫病菌の感染を抑制することに成功した。今後、サトイモにおける本剤の作用機作および、疫病菌の感染抑制機構を解明することで、本剤の社会実装の実現をめざす。

1. はじめに

サトイモ疫病（Taro leaf blight）は、*Phytophthora colocasiae* を病原菌とする病害で、海外のサトイモ類の栽培地では以前から広く発生している。本菌は、卵菌類に属し、鞭毛を持つ遊走子が水中を泳ぎ、サトイモ属にのみ感染する。また、本菌は、10～35°C で生育し、発病（感染）の至適温度は 27～30°C である。国内では、以前（1971 年）から発生の報告があるものの、経済的に重大な被害をもたらすことはなかった[1-3]。ところが、2014 年に宮崎県で多発し 40%以上の減収になった[4]。その後は、鹿児島県（九州）、愛媛県（四国）、千葉県、埼玉県（関東）に蔓延し、その被害は全国のサトイモ（*Colocasia esculenta* (L.) Schott）の主要産地に拡大している（図 1）。サトイモは、比較的栽培が容易であり、発生する病害虫の種類も少なく、殺菌剤の散布を必要とする病害の被害がなかった。しかしながら、急激に疫病が蔓延したため防除対策は進んでおらず、疫病の防除のために殺菌剤の計画的かつ連続散布が必要となり、生産農家の離農および栽培地の荒廃が既に始まっている[4-6]。また、サトイモの葉はロータス効果(Lotus effect) により撥水性が非常に高く、散布した農薬の付着が困難であることから、農薬処理法についても検討が必要である。このままでは産地が崩壊し、日本産のサトイモは日本の食卓から消える可能性があ



図 1. サトイモ疫病が発生した圃場（鹿児島県）

る。サトイモは伝統的な和食の食材としてだけではなく、近年では介護食、離乳食として活用されたり、ぬめりに含まれる水溶性食物繊維のガラクタンおよびグルコマンナンは便秘の予防改善をするのと同時に、血糖値やコレステロール値を下げる働きがあるといわれ、生活習慣病の予防が期待されている。

近年、ヒトの免疫と同様に、植物も類似した免疫機構を有することが明らかになってきており、植物自身が備えている病気に対する“抵抗力”を強化することで病気にかかりにくくなり、病害防除による生産量損失の抑制と、従来の農薬の使用量を大幅に削減することが期待されている。これにより、環境への負荷を軽減しつつ、植物を通した循環型社会の構築が期待できる。

この植物自身が持つ防御システムを活性化して病害を防除する環境低負荷型の病害防除法として、プラントアクチベーター（plant activator、抵抗性誘導剤）が知られている[7]。プラントアクチベーターは、それ自身には殺菌作用はなく、植物の免疫力を活性化することで病気の感染を防ぐ農薬であり、環境への影響は小さいと考えられている。

本研究では、疫病を防除するプラントアクチベーターを選抜・評価し、疫病の防除法を確立することを目的とする。

2. 研究方針

現在、サトイモ疫病を防除するために農薬登録された農薬はアミスター20 フロアブル、ジーファイン水和剤、ダイナモ顆粒水和剤、MIC ペンコゼブ水和剤、ランマンフロアブルのみであり、これらでローテーションをするしかない。このようにサトイモ疫病を防除する殺菌性の農薬は限られており、新剤の開発には 10 年以上の期間を要するため、早期に市場に投入できる資材の開発が求められている。サトイモ疫病の防除は喫緊に解決すべき課題であり、当面の課題の解決のためには、栽培環境の改善などにより疫病の防除対策を行うしかないが、今後の戦略としては、

・既存の農薬の登録拡大による防除に使用できる農薬の種類を増やす

・プラントアクチベーターなどにより、疫病に対する抵抗力（免疫力）の向上によるサトイモの健全化

・疫病に対する抵抗性品種の開発

が考えられる。抵抗性品種の育種には少なくとも数年以上を要するため、本研究では、サトイモが本来備えている病気に対する免疫力を向上させることで疫病を防除することをめざし、病原菌に対する作物の病害抵抗性を誘導する“プラントアクチベーター”を開発する。

3. サトイモへの薬剤散布法の検討

サトイモやハスの葉は、その微細構造と表面の化学的特性により、葉の表面についた水は表面張力によって、丸まって水滴になり、転がり落ちる。この撥水現象をロータス効果という（図 2）。

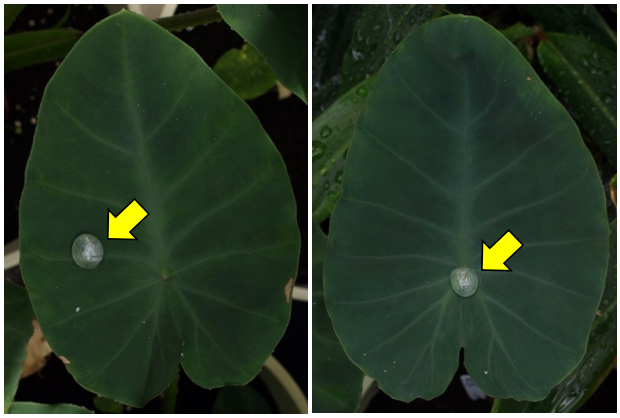


図 2. サトイモ葉のロータス効果

矢印は葉の上の水

サトイモの葉はロータス効果により濡れが悪く、散布した農薬が葉に付着しにくいため、散布時に展着剤の加用を必要とする。しかし、展着剤の種類によっては薬害を生じることが報告されており、注意を要する[8]。

本研究において、薬剤の処理方法について検討した。数種類の展着剤について検討した結果、いずれにおいても葉が薬液をはじいてしまった。また、撥水性は新葉（上位葉）は強く、古い葉（下位葉）は弱い傾向が認められた。疫病は、上位葉に比べて下位葉において発病しやすいことが報告されており[9]、ロータス効果の強弱が感染に影響していることが示唆された。

既存のプラントアクチベーター（アシベンゾラル S-メチル、プロベナゾール、チアジニルなど）は、薬剤の土壌混和により根から有効成分を吸収させて植物自身が持つ病害抵抗性を活性化することで病害を防ぐ。そこで、本課題では、ポット植えのサトイモにプラントアクチベーター溶液を潅注処理することにより病害抵抗性を誘導することを考えた。

4. サトイモの RNAseq 解析による防御マーカーの開発

2020 年 8 月にサトイモのドラフトゲノム（ゲノムサイズは約 2.4Gbp、推定遺伝子数 28,695。参考としてイネのゲノムサイズの 6 倍に相当）が発表された[10]。しかしながら、遺伝子の機能情報などの詳細な解析はなされていない。そこで、前年度に、サトイモの免疫活性化を評価するための防御マーカーを作製するため、サトイモの RNAseq 解析を実施して発現遺伝子の情報を得、防御マーカー候補遺伝子の取得を試みた。

プラントアクチベーターであるアシベンゾラル S-メチルの 0.5mM 溶液をポット植えのサトイモに潅注処理し、経時的にサンプリングした。本試料から前年度に報告した方法で RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNAseq 解析（150 bp paired-end、5G）（DNBSEQ、MGI 社）に供した。その結果、アシベンゾラル S-メチル処理により 5 倍以上発現誘導された遺伝子は 353 個であり、そのうち BLASTX 解析により推定防御関連遺伝子は 26 遺伝子であった。また、リアルタイム PCR 法により、アシベンゾラル S-メチルを処理したサトイモ葉において *CePR1* および *CeLRK91*（*L-type lectin-domain containing receptor kinase IX.1*）遺伝子の発現が認められ、防御（抵抗性誘導）マーカーとして活用できることが示唆された。用いたプライマーは *CePR1*（Forward: AGA ACC TCT TCT GGG GCA GC、Reverse: TTG GCG CCG TAG TCG TAG TC）および、*CeLRK91*（Forward: GGC TGA TGG TGG TGG GTT TG、Reverse: CAT CTC GGC TGG CAG TTT CG）、鋳型 RNA の補正にハウスキーピング遺伝子として *CeEF1α*（Forward: CGT GAG CGT GGT ATC ACC ATT G、 Reverse: GCC TGA GAA GTC CCG GTA ATC A）を用いた。

5. サトイモの病害抵抗性誘導処理

前述の通り、サトイモ葉に薬剤処理してもロータス効果により全てはじかれてしまう。一方で、農薬の付着を向上させるため展着剤を加用するとサトイモ葉が褐変するなどの薬害を生じた。そこで、薬害を避けるため、潅注処理による薬剤処理を実施した。前年度に報告した方法により人工気象器で育成したサトイモ（品種：土垂、本葉 2～3 枚）に 0.5mM アシベンゾラル S-メチルを潅注処理した（容量 300ml のポットに対して 30ml の薬液）（図 3）。

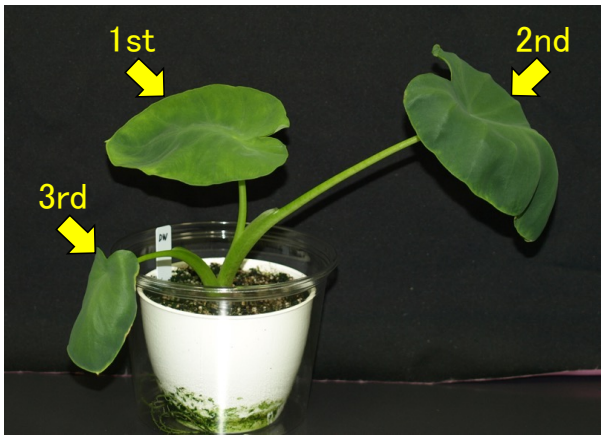


図 3. サトイモとその葉位
展開した新葉から順番に第 1 葉～第 3 葉とした。

処理して 2 日間後にサトイモ葉をサンプリングして RNA を抽出し、遺伝子発現解析に供した。本処理により、サトイモに薬害は生じなかった。また、処理 2 日後のサトイモ葉から 2cm 角の葉片を切り取り、DW を十分に含ませ 2 重にしたプロワイプ（ソフトマイクロワイパーS220、エリエール）を敷いた直径 4cm シャーレ中に置いた。次いで、V8 平板培地で培養した疫病菌をコルクポーラーで寒天ごと打ち抜いて、菌そうをサトイモ葉に置床することで接種した。その後、24°C、16 時間明下/8 時間暗下、湿室下の人工気象器内に静置し、5 日後に病徴を検定した。発病指数は、0：発病無し、1：菌そう直下のみが褐変、2：葉片の 25%未満が褐変、3：葉片の 25%以上～50%未満が褐変、4：葉片の 50%以上が褐変の 5 段階とした。発病度は、Σ（発病指数別箇

所数×発病指数）÷（全調査箇所数×4）×100 により算出した。

サトイモへのアシベンゾラル S-メチルの潅注処理により、防御応答遺伝子 *CePR1* および *CeLRK91* の発現が認められ、サトイモの免疫が活性化していることが明らかになった（図 4）。

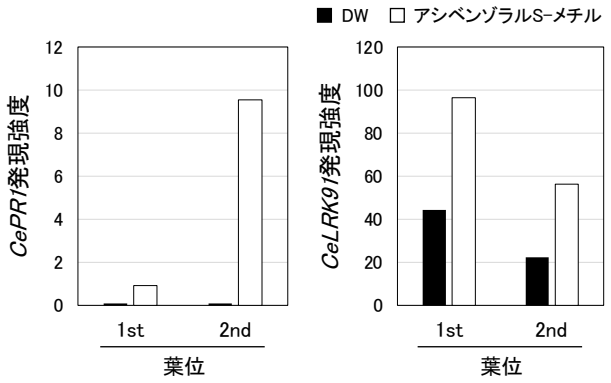


図 4. 抵抗性誘導剤を処理したサトイモにおける防御応答遺伝子の発現解析

サトイモに DW またはアシベンゾラル S-メチルを潅注処理し、48 時間後に第 1 葉および第 2 葉から RNA を抽出してリアルタイム PCR 法により防御応答遺伝子 *CePR1* および *CeLRK91* の発現を解析した。

また、アシベンゾラル S-メチルを潅注処理したサトイモ葉は疫病の感染が有意に抑制された（図 5、表 1）。さらに、その葉位により、発病度が異なることが明らかになった。

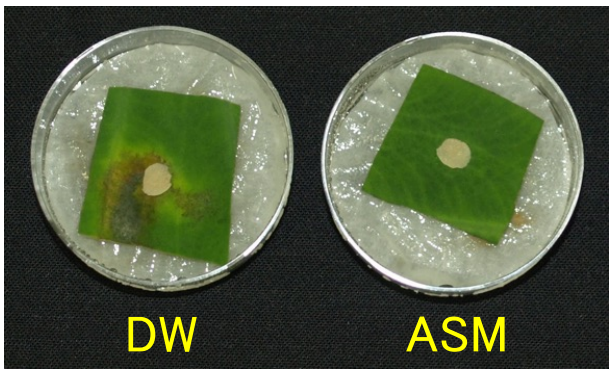


図 5. 疫病菌を接種して 5 日後の病徴

サトイモに DW またはアシベンゾラル S-メチル（ASM）を前処理して 2 日後に、サトイモ葉片に疫病菌を接種した。接種 5 日後に病徴を検定した。

表1. 抵抗性誘導剤のサトイモ疫病菌に対する防除効果

処理	発病度（葉位）*	
	1st	2nd
DW	25	75
アシベンゾラルS-メチル	0	0

*接種5日後に検定した。

アシベンゾラル S-メチルは植物の主要な防御応答経路であるサリチル酸シグナル伝達経路を活性化して抵抗反応を誘導することで病害を防除することが知られている。今後、サトイモの防御応答機構を明らかにすることで、疫病の防除に貢献することが期待される。

6. おわりに

本研究において、世界で初めてサトイモの防御応答遺伝子を明らかにし、さらに、これを防御マーカーとして、サトイモの抵抗性誘導を解析することが可能となった。また、サトイモの重要病害である疫病を防除するプラントアクチベーターの取得に成功した。

日本において、サトイモは伝統的な食材として和食を中心に食されており、また、加工、業務用野菜として多く利用されている。さらに、最近では、健康機能野菜として注目されている。一方で、国産サトイモは作付面積（10,700ha、2020 年）、生産量（139,500 トン、2020 年）ともに年々減少しており、価格の安い輸入サトイモが多く流通している。2017 年の冷凍サトイモの輸入量は 31,191 トンで、日本の供給量に占める割合は 17％であり、そのほとんどが中国産である。輸入冷凍食品の農薬混入事件以来、国民の食の安全、安心に対する意識の向上から、国産野菜の供給に対する要望が高いが、全国的なサトイモ疫病の蔓延により、国内主要生産地の生産量が一時 40％以上も減じ、国産サトイモの生産が危機的状況にある。本研究により、サトイモの免疫力を高める次世代型の農薬である“プラントアクチベーター”を用いて疫病の発生を抑制できる可能性が示唆された。今後、サトイモにおけるプラントアクチベ

ーターの作用機作および、疫病菌の感染抑制機構を解明することで、本剤の社会実装を実現し、サトイモの生産量を回復・増産することで、産地の荒廃を防ぎ、安全な国産のサトイモを国民の食卓に届けることが可能となる。消費者にとっては、良質な食料の安定供給と合理的な価格での入手が達成される。以上により、縄文時代後期から続く日本古来の食文化を守ることが可能となる。

謝辞

本研究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深く感謝申し上げます。また、本研究におけるサトイモ疫病菌の分譲および情報の提供は鹿児島県農業開発総合センターにお世話になりました。関係者の方々に深く感謝申し上げます。

引用文献

(1) 桂琦一. 植物の疫病. 誠文堂新光社, 東京, 128pp. (1971)

(2) Tamori M. The Influence of Light and temperature on the sporulation, germination, and infection of *Phytophthora colocasiae* Rac. *Journal of Okinawa Agriculture*, 3(2), 43-49 (1964)

(3) 景山幸二, 植松清次. 植物防疫 特別増刊号, 17, 6-12 (2007)

(4) 黒木修一. 宮崎県におけるサトイモ疫病の被害と今後の防除対策. *植物防疫*, 71(7), 458-462 (2017)

(5) 本橋令子. サトイモの分子育種と遺伝資源. *アグリバイオ*, 2(4), 58-61 (2018)

(6) 黒木修一, 松田透. サトイモ疫病の総合防除対策技術の確立. *植物防疫*, 74(11), 616-621 (2020)

(7) 鳴坂義弘, 平塚和之, 能年義輝. プラントアクティベーターによる植物免疫の活性化と化学遺伝学への利用. *化学と生物*,Vol.48,706-712 (2010)

(8) 黒木修一, 廣瀬雄信, 臼井真奈美, 寺本敏. サトイモの葉に対する展着剤による薬害の発生と温度条件. *宮崎県総合農業試験場研究報告*, 51, 19-26 (2017)

(9) 芝田秀明. サトイモの葉位および損傷が疫病の発生に及ぼす影響. *植物防疫*, 76(2), 76-80 (2022)

(10) Yin J, Jiang L, Wang L, Han X, Guo W, Li C, Zhou Y, Denton M, Zhang P. A high-quality genome of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), one of the world's oldest crops. *Molecular Ecology Resources*, 21(1), 68-77 (2021)

ナス病原性に重要な青枯病菌エフェクターの同定と耐病性母本選抜

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

向原隆文

ナスは phylotype IV 青枯病菌が持つ HopBF1 エフェクターを認識して強い病害抵抗反応を惹起する。青枯病菌 HopBF1 は植物の分子シャペロン HSP90 を標的として壊死病斑形成を誘導することが知られている *Pseudomonas syringae* の HopBF1 と高いアミノ酸相同性（38% identity, 79% similarity）を示した。青枯病菌 HopBF1 には HSP90 リン酸化に重要とされるアミノ酸残基が全て保存されており、タバコ本葉で一過的に発現させるとこれら残基依存的に壊死病斑の形成を誘導した。ナスの HopBF1 認識もこれら残基に依存することから、ナスは HopBF1 のプロテインキナーゼ活性を何らかの機構で検出して病害抵抗反応を惹起すると考えられる。一方、phylotype IV 青枯病菌の Δ*hopBF1* 変異株はナス内である程度増殖が可能となり、ごく弱くではあるがナス病原性を示すようになった。また、アジア・アフリカに分布する phylotype I 及び phylotype III のナス青枯病菌は共通に同一の *hopBF1* null 変異を持っていた。以上の結果から、青枯病菌の病原性進化において *hopBF1* 変異はナス病原性獲得の「はじめの第一歩」であったと考えられる。

はじめに

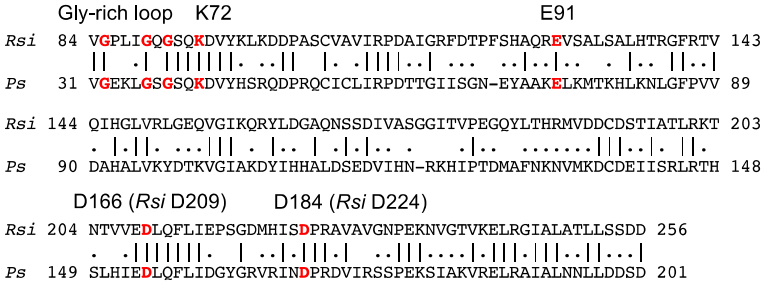
ジャガイモはイモ類で最大の栽培面積を誇る重要作物であり、国内の年間生産量は 250 万トンに達する。ジャガイモ栽培で最も大きな被害の出る病害の一つが植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* によって引き起こされる「青枯病」である。青枯病菌の宿主範囲は非常に広く、ナス科を中心に 50 科 200 種以上の植物を加害することが知られている（Hayward, 1991）。本菌は土壌中に生息しており、植物の根や傷口から植物体内に侵入すると維管束内で増殖して植物全身に広がり、最終的に植物を枯死させる（Genin and Denny, 2012）。本病の抑制には土壌消毒が有効であるが、強力な化学殺菌剤が環境への配慮から使用禁止になったことや地球温暖化による地温の上昇で青枯病が頻発する状況となっている。特に、東南アジアから侵入した phylotype IV 青枯病菌が定着している九州・沖縄では、日本産青枯病菌（phylotype I）を対象に育種された既存のジャガイモ品種が phylotype IV に弱いため、毎年大きな被害が発生している（菅ら, 2013）。このため phylotype IV 抵抗性ジャガイモ新品種の開発が急務となっているが phylotype IV 抵抗性遺伝子に関する知見はない。

近年の研究から、植物が持つ病害抵抗性（*R*）遺伝子の産物は病原菌が感染時にタイプ III 分泌系を介して植物細胞内に注入する病原タンパク質（エフェクター）を認識する細胞内レセプター（NBS-LRR 抵抗性タンパク質）であることが明らかとなっている（Jones and Dangl, 2006）。植物は百種類以上の抵抗性タンパク質を持っており、これを介して多様な病原菌を認識し、病害抵抗反応を誘導することで身を守っている。この図式は青枯病菌とナス科植物の相互作用においても成り立つ。

わが国に分布する phylotype IV 青枯病菌は同じナス科作物のジャガイモに強い病原性を示すにも関わらず、ナスを発病させることができない（菅ら, 2013）。このことは、ナスは phylotype IV 青枯病菌が持つ何らかのエフェクターを認識し、病害抵抗反応を惹起していることを強く示唆する。

筆者は昨年度の本研究でナスが phylotype IV 青枯病菌の HopBF1 エフェクターを認識して強力な病害抵抗反応を惹起することを見出した。今年度、ナスがどのように青枯病菌 HopBF1 を認識するのかについて詳細な分子機構の解析を行なった。また、青枯病菌がどのようにしてナス病原性を獲得したかを知る目的で phylotype IV 青枯病菌の Δ*hopBF1* 変異株を作出してナス病原性を調べると共に世界に分布する青枯病菌で *hopBF1* 遺伝子分布を調査した。

(a)



(b)

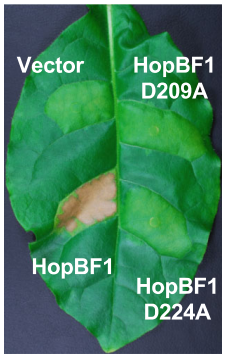


図 1. HopBF1 のアミノ酸配列比較及び植物本葉に対する壊死病斑の誘導

(a) Phylotype IV 青枯病菌（*Rsi*）由来 HopBF1 と *P. syringae*（*Ps*）由来 HopBF1 のアミノ酸配列の部分比較。両端の数字はアミノ酸位置を示し、赤字はプロテインキナーゼ活性に重要なアミノ酸残基を示す。

(b) HopBF1 を一過的発現したタバコ本葉で観察される壊死病斑。写真は接種 6 日後。

結果と考察

1. 青枯病菌 HopBF1 のアミノ酸相同性解析

phylotype IV 青枯病菌の HopBF1 エフェクターは植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* の HopBF1 と高い相同性（38% identity, 79% similarity）を示した。*P. syringae* の HopBF1 については 2019 年に病原因子としての機能が報告されており、(1) プロテインキナーゼとして宿主植物の HSP90 をリン酸化し、シャペロン機能（ATPase 活性）を失わせること、(2) それにより植物細胞にダメージを与え、壊死病斑を形成させること等が明らかになっている（Lopez *et al.*, 2019）。HopBF1 は多くの動物及び植物病原細菌で保存されており、真核生物が共通に持ち、植物の NBS-LRR 抵抗性遺伝子や転写因子の活性維持を担う分子シャペロン HPS90 を標的とすることから大きく注目された。青枯病菌 HopBF1 には *P. syringae* HopBF1 で HSP90 のリン酸化に重要とされるアミノ酸残基（Gly-rich loop, K72, E91, D166 及び D184）が全て保存されていた（図 1a）。青枯病菌 HopBF1 をアグロバクテリウムを用いた一過的発現系を利用してタバコ本葉で高発現させると特徴的な壊死病斑が誘導された（図 1b）。また、HSP90 に対するリン酸化活性に重要とされる 2 つのアミノ酸残基 D166 及び D184（phylotype IV 青枯病菌では D209 及び D224）を変異させた HopBF1 D209A 及び HopBF1 D224A では壊死病斑の誘導能が消失した。以上の結果から、青枯病菌 HopBF1 も *P. syringae* HopBF1 と同様、宿主 HSP90 を標的とするプロテインキナーゼである可能性が高いと考えられる。

２．HopBF1 の認識は植物に強い青枯病抵抗性を惹起する

ナスは phylotype IV 青枯病菌の HopBF1 を認識して強い HR を誘導する。ナスに適応し、強い病原性を示すナス青枯病菌 RS1002 株に野生型 *hopBF1* 遺伝子（*hopBF1*$^{+}$）を導入すると、*hopBF1*$^{+}$導入菌株はナス本葉に対して強い HR を誘導するようになり（図 2a）、同時にナスに対する病原性が完全に消失した（図 2b 及び 2c）。*hopBF1*$^{+}$導入株はナスの維管束組織内で全く増殖できなくなること（図 2d）から、HopBF1 を認識して惹起されるナスの病害抵抗反応は非常に強力であることが明らかになった。興味深いことに、HopBF1 の HSP90 リン酸化活性に重要とされるアミノ酸残基を変異させた HopBF1（HopBF1 D209A 及び HopBF1 D224A）遺伝子を導入した RS1002 株ではナスに対する HR 誘導能と病害抵抗性誘導能は全く観察されなかった（図 2）。以上の結果はナスが HopBF1 の HSP90 リン酸化活性を何らかの機構で検出して病害抵抗反応を惹起していることを強く示唆しており、ナスは自身の細胞機能に重要な HSP90 を病原菌の攻撃から守る機構を発達させていると考えられる。

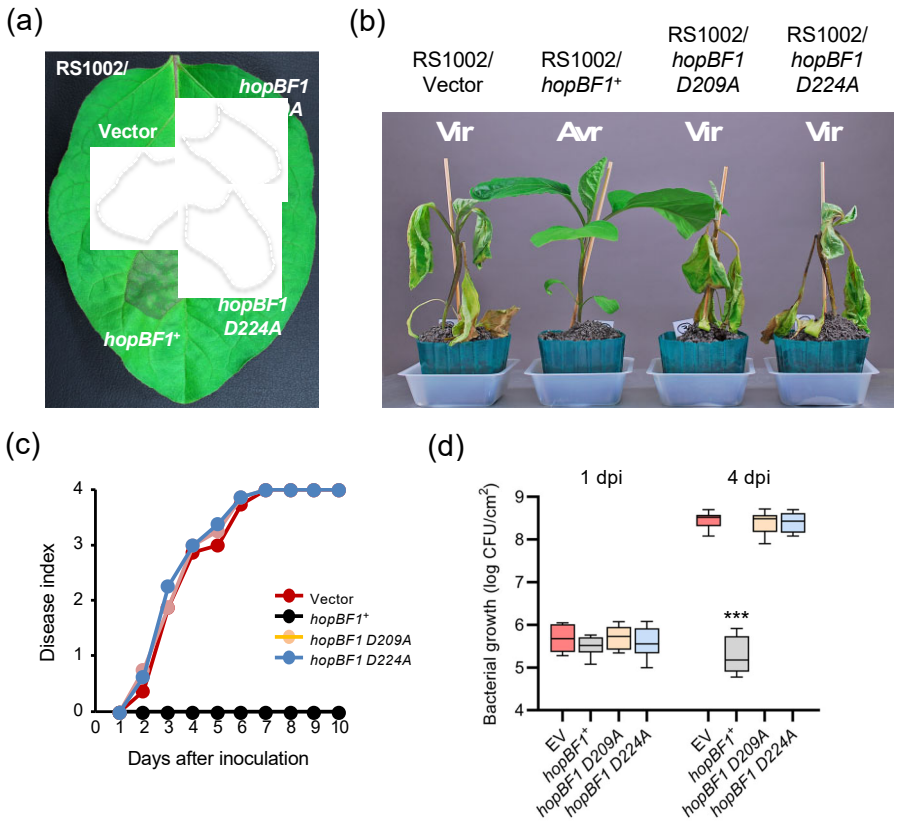


図 2. HopBF1 及びその変異体を発現するナス青枯病菌 RS1002 株のナス病原性

(a) ナス本葉に対する HR 誘導能。写真は接種 1 日後。(b) ナスに対する病原性。植物の本葉を青枯病菌に浸漬したハサミで切断して接種。写真は接種 7 日後。(c) ナスに対する病徴の継時変化。病徴は index 0（無病徴）から index 4（枯死）の 5 段階で評価。(d) 接種 1 日後（1 dpi）及び 4 日後（4 dpi）の本葉維管束組織内での病原菌増殖。

3. phylotype IV 青枯病菌の Δ*hopBF1* 変異株はナスに弱い病原性を示すようになる

これまでの結果から、phylotype IV 青枯病菌は *hopBF1* 遺伝子を持つためにナスを発病させることができない可能性が考えられた。これを検証する目的で phylotype IV 青枯病菌の遺伝子破壊を行い、Δ*hopBF1* 変異株を作出した。phylotype IV 青枯病菌の Δ*hopBF1* 変異株はナス本葉に対する HR 誘導能を完全に消失した（図 3a）。この結果から、HopBF1 はナスに認識される主要 Avr エフェクターと考えられる。Δ*hopBF1* 変異株をナス本葉に切断接種したところ、ナスを発病（萎凋）させることはできなかったが、接種部位から本葉維管束内に侵入し、部分的に拡がったと考えられる V 字型病斑の形成が観察された（図 3b 及び 3c）。本葉接種部位から 1cm 内側の主葉脈を回収し、病原菌の増殖を調べたところ、phylotype IV 青枯病菌の野生株は接種後に本葉内で日を追って菌数が減少して排除されるのに対して、Δ*hopBF1* 変異株は菌数が接種 4 日後では約 10 倍、接種 7 日後では約 1,000 倍も増加することが明らかとなった（図 3d）。ナス青枯病菌では接種 4 日後で約 1,000 倍以上も菌数が増加する（図 2d）ため、ナスを発病（萎凋）させる能力は植物内での増殖能力に依存すると考えられる。Δ*hopBF1* 変異株に野生型 *hopBF1* 遺伝子（*hopBF1*⁺）を導入すると HR 誘導能と病原菌の増殖抑制能が復帰するが、HopBF1 D209A 及び HopBF1 D224A では相補性は観察されなかった。この結果も、ナスが HopBF1 のプロテインキナーゼ活性を検出して抵抗反応を惹起している可能性を強く示唆する。

おわりに

本年度の研究から、青枯病菌の HopBF1 が宿主 HSP90 を標的とする病原性因子である可能性とナスが HopBF1 のプロテインキナーゼ活性を検出して抵抗反応を惹起することが明らかとなった。この結果から、植物（ナス）が重要な分子シャペロンである HSP90 を病原菌の攻撃から防御する仕組みを発達させていることを示しており、大変興味深い。ナスが持つ phylotype IV 青枯病抵抗性はエフェクター認識を介して惹起されるため、ナスは HopBF1 を特異的に認識する NBS-LRR 抵抗性タンパク質遺伝子（*R-BF1*）を持つと考えられる。将来、*R-BF1* 遺伝

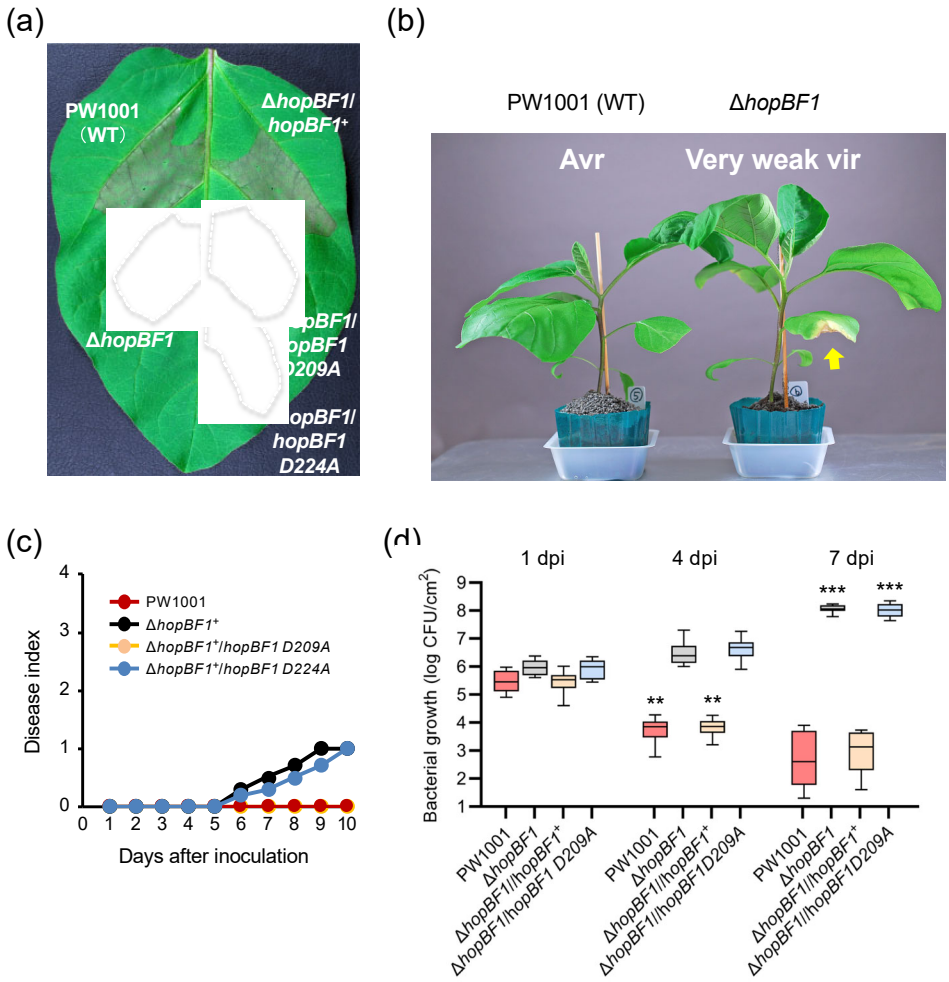


図 3. phylotype IV 青枯病菌及びその変異体のナス病原性

(a) ナス本葉に対する HR 誘導能。写真は接種 1 日後。(b) ナスに対する病原性。植物の本葉を青枯病菌に浸漬したハサミで切断して接種。写真は接種 7 日後。(c) ナスに対する病徴の継時変化。病徴は index 0（無病徴）から index 4（枯死）の 5 段階で評価。(d) 接種 1 日後（1 dpi）、4 日後（4 dpi）及び 7 日後（7 dpi）の本葉維管束組織内での病原菌増殖。

子を同定することで phylotype IV 青枯病菌に対する抵抗性育種と HSP90 を守る分子メカニズムの解明が期待できる。また、*R-BF1* が誘導する青枯病抵抗性は病原菌の増殖を完全に抑制するほど強力であるため、ゲノム編集技術を利用して青枯病抵抗性植物をデザインできる可能性がある。一方、phylotype IV 青枯病菌 Δ*hopBF1* 変異株はナスに対してごく弱くではあるが病原性（植物内増殖）を示すようになった。Δ*hopBF1* 変異単独では効率良くナス内で増殖できないが、さらに病原性を上昇させるような適応変異（pathoadaptation）が生じることでナス青枯病菌が出現したと推察される。最近、我々はアジア・アフリカに分布する青枯病菌（phylotype I 及び phylotype III）は共通の Δ*hopBF1* 変異をゲノムに持つことを明らかにした（データ示さず）。この結果は、病原性因子として HopBF1 を利用していた青枯病菌祖先株の中に Δ*hopBF1* 変異を持つ菌株が出現してナス病原性を獲得し、ナスが世界的に分布を拡大するとともに青枯病菌も世界に拡がったという仮説を導き出す。青枯病菌は *hopBF1* が変異して初めてナス内で増殖可能になることから、phylotype I 及び phylotype III のゲノムに痕跡が残る *hopBF1* 変異はナス病原性獲得の「はじめの第一歩」であったと考えられる。

謝辞

本研究は岡山大学大学院環境生命科学研究科の一瀬勇規教授との共同研究によるものです。研究を支援していただいたウエスコ学術振興財団に深く感謝致します。

引用文献

Genin and Denny (2012) Annu. Rev. Phytopathol. 50:67–89, 2012.

Hayward AC (1991) Annu. Rev. Phytopathol. 29: 65–87.

Jones and Dangl (2006) Nature 444: 323–329.

Lopez *et al*. (2019) Cell 179: 205-218.

菅ら (2013) 植物防疫 67: 612–617.

多様な白花のモモが生まれた遺伝的要因の解明

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

小田賢司

3 月末から 4 月初め、岡山県内ではモモの花が各地できれいに咲き誇る。モモは果実を楽しむ果樹であるだけでなく、花を愛でる花木でもある。モモの花は、食用品種で馴染みのあるピンク色の他、赤や白の花色の品種も存在する。しかし、多様な花色を生み出す遺伝的背景については未だ不明の点が多い。そこで、本研究はモモの多様な花色を分子レベルで理解する一歩として白花に着目し、花色が白くなる遺伝的原因の解明を試みた。白花をつける 17 の品種、実生等を解析した結果、解析対象のすべてにおいて同じ *GST* 遺伝子に変異が見出された。*GST* 遺伝子は赤色色素アントシアニンの液胞輸送に関わるとされる。変異は長い挿入変異やフレームシフト変異の 4 種類があり、これらにより遺伝子の機能が失われていると推察された。以上のことから、白花のモモが生まれた遺伝的要因は複数あるが、いずれも *GST* 遺伝子の機能欠損と考えられる。

1．はじめに

モモ（*Prunus persica*）は甘くて美味しい人気の果物である。特に、岡山のモモは、果皮が白く上品で果肉が柔らかく瑞々しいのが特徴で、市場からも高い評価を受ける県の代表的ブランド農作物である。一方、モモは食用だけでなく、春に咲き誇る花も美しく、観賞用としても日本人に広く親しまれている。モモの花を愛でる風習は古くに中国から伝わったと言われ、万葉集にもモモの花の歌が詠われている。

現在、食用として栽培されている品種の花弁はほぼすべてピンク色の似た花をつけるが、観賞用の花モモは江戸時代以降、多様な品種が育成されてきた。例えば、形に関して言えば、花弁の多い八重のものや花弁が細い菊咲きのものなどがある。花弁の色に着目すると、赤色、ピンク色、白色のものがあり、さらに、白地に部分的に赤が入る絞り咲き（源平咲き）の品種も作り出されている（図 1 ）。このような花色の違いは容易に目につき、注目を集めやすい。実際、山に自生する野生のモモにも白花や絞り咲きの樹が見出されている（苅田、未発表）。また、台木に用いられている品種の中にも白花のものがあるが、このような台木は花色を指標にすれば接木の成否を



図1. モモ種に見出されるさまざまな花色

簡便に判別できるという利点がある。

一方、多様な花色のモモが生まれる遺伝的背景については解析が進んでおらず、不明な点が多い。そこで、本研究では、特に白花に焦点を当て、花弁が白くなる遺伝的原因を明らかにすることを目指す。

2．結果

モモ花弁の着色は赤色色素アントシアニンの蓄積による。白花のモモは花弁が白いだけでなく、萼や花糸も赤味が一切ない。さらには、成葉や枝、果実といった花以外の組織も赤味がなく、アントシアニンが全く合成できないアントシアニン欠損変異体であると考えられた。アントシアニンは、植物体内においてアミノ酸のフェニルアラニンを初発物質として、フェニルプロパノイド経路およびフラボノイド経路と呼ばれる多段階反応を経て生合成される（図2)。白花モモがアントシアン生合成経路のどの部分に異常があるかを明らかにするため、岡山県農林水産総合センター農業研究所のジーンバンクの台木白

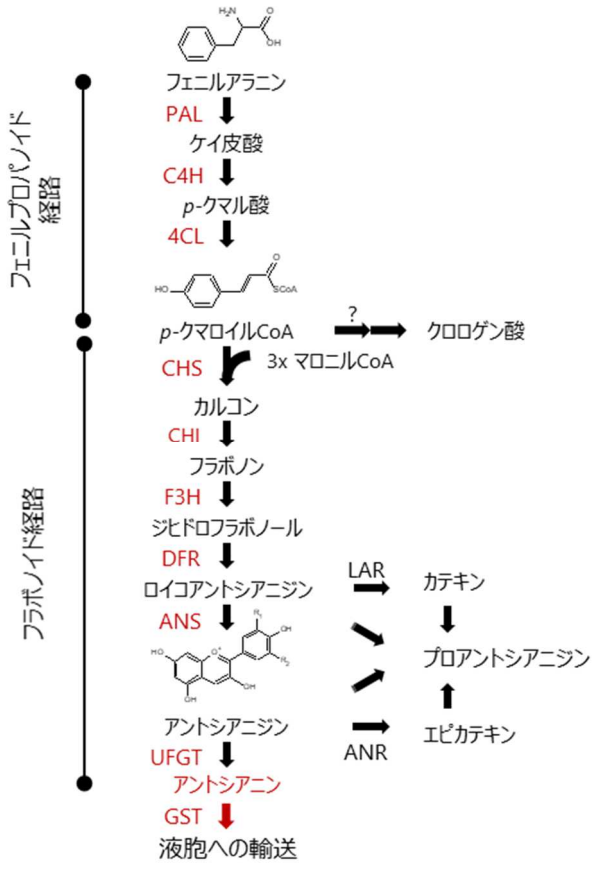


図2．アントシアニンの生合成経路

花から収穫した果実のポリフェノールを定量した。モモ果実にはクロロゲン酸や、カテキン、エピカテキン、プロアントシアニジンといったフラボノイド系のポリフェノールが多く含まれているが、台木白花の果肉からもこれらのポリフェノールが少なからず検出された（データ非掲載)。このことは、台木白花のアントシアン生合成における異常は合成経路の終盤、フラボノイド系ポリフェノール合成経路との分岐以降にあると推察された。そこで、*ANS* や *UFGT* 遺伝子の塩基配列を調べたが、これらの遺伝子には変異が一切見出されなかった。アントシアニンの欠損変異については、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた解析がよく進んでいる。それによると、アントシアニンの液胞への輸送に関わると推察される *GST*（*Glutathione S-transferase*）遺伝子に異常を持つ変異体 *tt19*（*transparent testa 19*）もアントシアニンを欠く（Sun et al. 2012)。そこで、台木白花の *GST* 遺伝子を調べたところ、第3エクソンに5塩基の欠失変異を有することが明らかとなった（図3)。この変異によりフレームシフトが起こりGST 活性を失うことで台木白花が白色化していると考えられる。

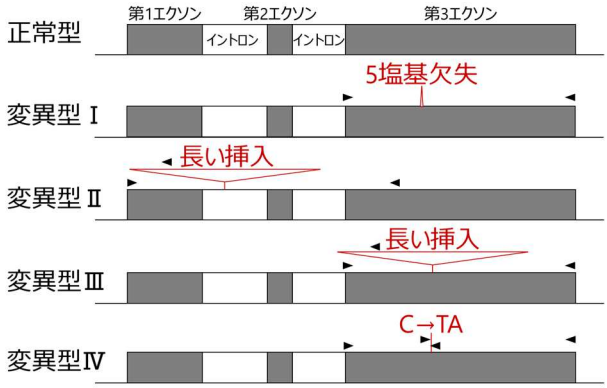


図3．白花モモに見出された *GST* 遺伝子の4種類の変異の模式図
▲は変異の検出に用いたプライマーの位置

白花をつける花モモの寒白、照手白、寿星桃白花八重についてもアントシアニンの合成異常が生じる原因を調べたところ、興味深いことに、いずれも同じ *GST* 遺伝子に異なる変異を有することが分かった。

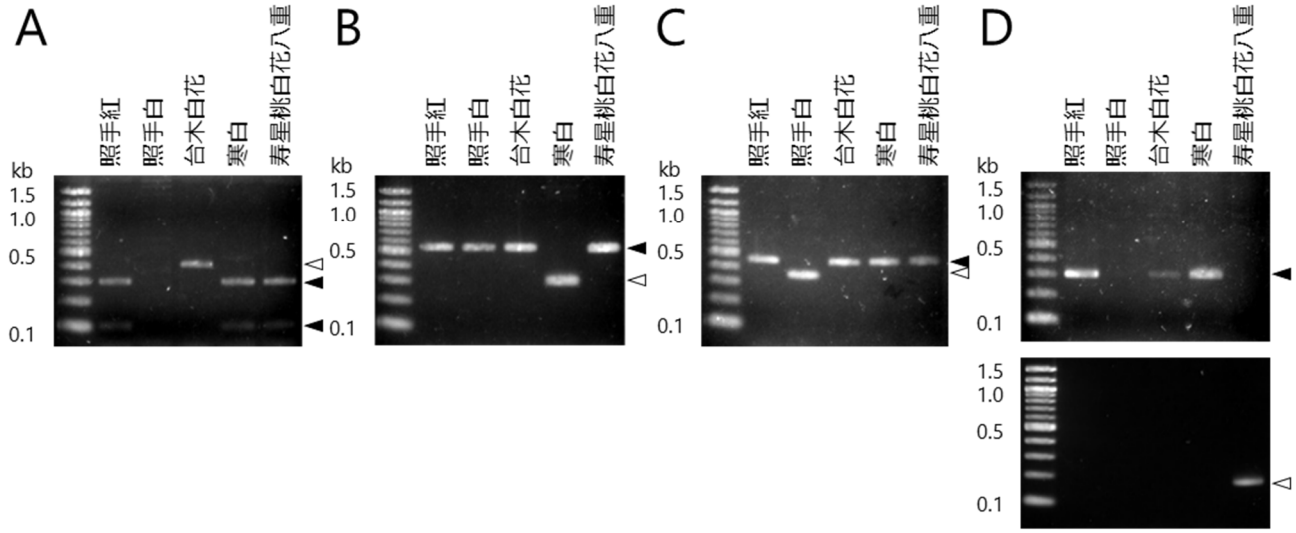


図4. *GST*遺伝子に見つかった4種類の変異を特異的に検出するDNAマーカー
A、B、C、Dはそれぞれ変異型Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳの変異を検出する。▲は正常型、△は変異型の存在を示すシグナル。

すなわち、寒白は第 1 イントロンに 10kb 以上の長い挿入変異を、照手白は第 3 エクソンに 10kb 以上の長い挿入変異を、寿星桃白花八重は第 3 エクソンに C が TA に変化する変異を有していた。これらの変異により *GST* 遺伝子は機能を喪失していると推察される。

次に、これらの変異を特異的に検出する DNA マーカーの開発を行った。図 4 のパネル A は、台木白花の変異（変異型Ⅰ）の検出の様子で、PCR の後、制限酵素処理を行っている。PCR 産物は制限酵素で切断されて 2 本のバンドに分かれるが、変異があると認識部位が失われて切断されず、サイズの大きなバンドが一つだけ検出される。照手白は PCR の領域内に長い挿入変異をもつため PCR で DNA が増幅できず、シグナルが検出されない。パネル B、C は、寒白の変異（変異型Ⅱ）および照手白の変異（変異型Ⅲ）の検出の様子である。変異の有無によってバンドサイズが異なっている。パネル D は寿星桃白花八重の変異（変異型Ⅳ）の検出の様子で、変異箇所が C に特異的な PCR の結果（上）と TA に特異的な PCR の結果（下）である。照手白は PCR の領域内に長い挿入変異をもつため PCR で DNA が増幅できず、シグナルが検出されない。

開発したこれらの DNA マーカーを用い、他の白花の品種や実生の変異を調査した。その結果を表 1 に示す。実験に供した 17 の品種、実生等は本研究で見出したⅠ～Ⅳのいずれかの変異をホモに有していた。

３．考察

本研究では、多様な白花のモモが生まれる遺伝的要因について解析した。白花モモはアントシアニン欠損変異と考えられた。しかし、詳細な解析を行った台木白花ではアントシアン生合成経路に異常は認

表1. 白花のモモの変異型による分類

変異型	変異の種類	品種、実生等
Ⅰ	第3エクソンの5塩基欠失変異	台木白花、払子台、初雪一歳桃、入野枝垂実生、更紗雲竜枝垂実生、秩父5
Ⅱ	第1イントロンの長い挿入変異	寒白、中生白、白雪姫一歳桃、野生モモ
Ⅲ	第3エクソンの長い挿入変異	照手白、残雪枝垂、白楽天、白枝垂、楽翁枝垂
Ⅳ	第3エクソンのCからTAへの変異	寿星桃白花八重、幸ホワイト実生

められず、*GST* 遺伝子に変異が見出された。この結果は、*GST* がアントシアニンの液胞輸送に関わるとのこれまでの知見を支持している。

アントシアニンは、図 2 に示すように、多くの生合成酵素が作用する多段階反応を経て作られる。生合成酵素の中には複数の遺伝子によってコードされるものがある。例えば、フラボノイド経路の初発酵素遺伝子 *CHS* の場合、モモゲノムには 3 コピーの遺伝子が存在する。また、*UFGT* の場合、花弁のアントシアニンは配糖化の様式が異なる複数の分子が知られていて、それぞれの合成に異なる *UFGT* 遺伝子が関わると考えられている。このように複数遺伝子が関わる合成段階は冗長性があり、変異による反応停止が起こりにくい。これに対し、例えば *CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*GST* 遺伝子は、ゲノム中に 1 コピーしか存在しないと考えられ、どれかの遺伝子に重大な変異が起こるとアントシアニンが合成できなくなる。その中で、モモの白花の変異は *GST* 遺伝子に集中して見つかった。このことから、*GST* 以外の遺伝子はアントシアニン合成と異なる重要な生理機能を有する可能性が考えられる。アントシアニンと合成経路がほぼ重なるフラボノイド系のポリフェノールにモモの生存に必須の機能があるのかも知れない。

本研究の解析により、モモには 4 種類の異なる *GST* 変異が存在することが明らかになった。一方、本研究を進めていく過程で、モモのアントシアン欠損に関する論文が発表された（Lu et al. 2021）。その報告は、やはり *GST* 遺伝子の変異が原因とするものであったが、報告された 2 つの変異は本研究で見出されたものとは異なっており、モモには全部で 6 種の変異が存在することになる。

本研究で見出された変異のうち、変異型Ⅲで見出された長い挿入配列は、両端に同方向の繰り返し配列を有することや、似た配列がゲノムのあちこちに見つかることなどから、トランスポゾンと考えられる。トランスポゾンはゲノム内を移動できる DNA であり、ゲノムの別のところから *GST* 遺伝子に移動してくることでⅢ型の変異が生じたと推察される。逆に、トランスポゾンは抜け出ていくこともある。その際、挿入されていた場所に数塩基の挿入/欠失などの変異を生じることがあり、これをフットプリントと呼ぶ。Ⅳ型変異の存在場所は、Ⅲ型変異のトランスポゾンの挿入部位にあたる。このことから、Ⅳ型変異はトランスポゾンが抜けてできたフットプリントなのかも知れない。また、中国の論文で見出された 2 つの変異のうちの一つもやはりⅢ型変異のトランスポゾンの挿入部位に 2 塩基の挿入変異をもつものであった。この変異もⅢ型変異のトランスポゾンのフットプリントに起因することが考えられる。そうであれば、モモの白花変異は元来 4 種類であり、そのうちの一つから別の 2 つが派生したと言える。

近年、ゲノム解析が盛んにおこなわれるようになり、モモについても多くの品種のデータが公開されている。中国のモモ類縁種である山桃（*Prunus davidiana*）の白花品種 Bai Hua Shan Bi Tao（白花山碧桃）についてもゲノムデータが公開されており、それを解析してみると *GST* 遺伝子にⅢ型と思われる変異を有することが分かった。Ⅲ型変異は広く存在する変異なのかもしれない。

アントシアニン欠損変異は、これまで観賞用花モモに白花のバリエーションを生み出すという形で主に利用されてきた。しかし、全組織に赤味を帯びないという表現形には、別の有用性も考えられる。例えば、果肉の黄色い黄肉モモにアントシアニン欠損の形質を付与すれば、果皮や果肉に赤味が差さず、きれいな黄色の黄肉果実ができると期待される。このようなことを狙ってアントシアニン欠損形質をモモ育種に取り入れていく場合、本研究で開発した DNA マーカーは育種を効率化する選抜マーカーとして利用可能と期待できる。

４．謝辞

本研究を実施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感謝申し上げます。また、岡山県農林水産総合センター農業研究所、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、飯坂温泉はなももの里、中嶋久夫氏（神奈川）には、実験材料に用いた白花モモのサンプルを譲渡いただきました。深くお礼申し上げます。

５．参考文献

Sun et al., *Arabidopsis* TT19 Functions as a Carrier to Transport Anthocyanin from the Cytosol to Tonoplasts. ***Mol Plant***, 5: 387-400 (2012)

Lu et al., Two loss-of-function alleles of the *glutathione S-transferase* (*GST*) gene cause anthocyanin deficiency in flower and fruit skin of peach (*Prunus persica*). **Plant J**, 107:1320-1331

DAMPs ネットワークによる炎症性疾患の制御メカニズムの解明

就実大学 薬学部

渡邊 政博，豊村 隆男，森 秀治

これまでに我々は，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現象を見出し，解析を進めてきた．その中で，新たに複数の AGEs 結合分子を見出した．これらの分子について検討を進める中で，分子のひとつである Ribosomal protein L9（RPL9）は，内在性の起炎分子であるダメージ関連分子パターン（Damage-associated molecular patterns，DAMPs）に特徴的な分子挙動を示しながら，既存の DAMPs の作用を阻害する分子であることが示唆された．本研究では，DAMPs 関連分子としての RPL9 の作用を検討するためのツールとしてリコンビナント RPL9 分子の大量調製法の構築を試みた．

1. 背景と目的

炎症反応の制御不全が原因となる可能性が指摘されている疾患として，メタボリックシンドロームや，新型コロナウイルス感染症の重症化に関与することが示唆されているサイトカインストーム等が存在する．これらの炎症性疾患の新たな治療標的として，近年新たな起炎分子として同定された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分子に注目が集まっている．通常，細胞内に局在している DAMPs は，細胞が傷害された際に細胞外に放出され，Receptor for AGEs（RAGE）等の細胞表面受容体を刺激して炎症反応を誘導する．

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 endproducts，AGEs）の作用メカニズムの解析を行ってきた．AGEs は，DAMPs と同様のメカニズムにより慢性炎症に寄与することが示唆されている．これに加えて，申請者らは，AGEs が内在性の機能性分子と直接的相互作用することにより，生理機能に干渉する作用を有する可能性を見出している［1–3］．また，AGEs と DAMPs の相互作用が炎症反応の増悪化を導くことを見出した［4］．

この新規メカニズムに焦点を当てた解析を行う中で，AGEs と細胞内に局在する分子である Ribosomal protein L9（RPL9）が相互作用することを見出した［5］．リボソーム構成分子である RPL9 は，多くの細胞に恒常的に発現しており，細胞内において機能する分子である．さらに我々は，RPL9 が既知の DAMPs と同様に，細胞が破壊された際や炎症性疾患モデル動物の血液中に放出されることを見出した［5］．これらの特徴は，DAMPs の属性と一致していることから，RPL9 は新規 DAMPs である可能性が考えられた．一方で，興味深いことに，RPL9 を代表的な DAMPs である High mobility group box-1（HMGB1）と同時に細胞に与えると，HMGB1 による炎症反応を抑制することが示された［5］．また，この現象は RPL9 と HMGB1 との間の相互作用を介して生じている可能性を見出した［5］．これらの知見は，RPL9 は，これまでに報告されたことがない抑制性 DAMPs である可能性を強く示唆している．

続いて，RPL9 以外のリボソーム構成分子について同様の検討を行ったところ，一部の分子が抑制性 DAMPs として機能することを見出した．これらの知見は，既知の DAMPs と抑制性 DAMPs が対となって炎症反応を制御する未知のメカニズム【DAMPs ネットワーク】が存在する可能性を示唆している．そこで現在我々は，この可能性を実証することを目的とした検討を進めている．

検討を進める上では，抑制性 DAMPs の大量発現系が必要となると考えられた．これまでの RPL9 を対象とした検討では，バキュロウイルスを用いたタグ

配列を付加したリコンビナント RPL9 を，昆虫細胞 Sf9 において発現させ，タグ配列を用いて精製することにより調製した RPL9 を用いてきた．RPL9 においてこの方法を用いることは，LPS を含まないリコンビナント分子を調製することが可能であるという利点をもつ一方で，分子の発現量もしくは精製量が少ないという問題点が存在していた．今後，実験動物レベルでの検討を進める上で，これまでよりも多くリコンビナント RPL9 を調製できる手法を構築することが必要と考えられた．

そこで本研究では，この課題を解決するために，新たな RPL9 の大量発現系の構築を試みた．

2. 方法

従来の発現・精製手法を改良すべき点として，タグ配列の変更と，Sf9 細胞の樹立元であるツマジロクサヨトウ(Spodoptera frugiperda)における Kozak 配列 [6] の付加を検討した．

従来のタグ配列は，6×His (HHHHHH) タグであり RPL9 の N 末端側に付加している．このタグと同様に，コバルトレジンで精製可能なタグ配列として，6×HN (HNHNHNHNHNHN) タグや Histidine Affinity Tag (HAT) (KDHLIHNVHKEEHAHAHNK) が知られている．これらのタグは 6×His タグよりもタンパク質表面に露出されやすく，精製効率を向上させることができる可能性が示唆されている．そこで，6×His タグを 6×HN タグもしくは HAT に入れ替えた転移ベクターを構築し，6×His タグを付加した RPL9 (His-RPL9) との精製効率を比較した．

組換えバキュロウイルスの調製，リコンビナント分子の精製は，過去に報告した方法により行った [4, 5]．

また，リコンビナント分子の細胞への作用は，過去に報告した方法により評価した [4, 5]．

ツマジロクサヨトウにおける Kozak 配列の探索は，次の手順により行った．① ヒトにおけるハウスキーピング遺伝子として報告されている 575 遺伝子 [7] のうち，対応するツマジロクサヨトウの Refseq 配列が報告されていた 32 遺伝子，および ② タンパク質発現量データベース PaxDB [8] を用いて選定したキイロショウジョウバエにおいて発現量の多い上位 200 遺伝子のうち，対応するツマジロクサヨトウの mRNA 配列が Genebank に登録されていた 54 遺伝子の開始コドン周囲の塩基配列を抽出した．配列の抽出には独自に作成した Python プログラムを用いた．ツマジロクサヨトウにおける Kozak 配列は，Cavener’s 50/75 rule [9] に基づいて決定した．

統計解析は R version 3.6.3 The R Foundation for statistical computing) を用い Dunnett の検定により行った．有意水準は 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

6×HN タグおよび HAT を付加した RPL9(HN-RPL9, HAT-RPL9)のバキュロウイルス発現系を構築し，His-RPL9 と同条件の下，Sf9 への感染，リコンビナント RPL9 の精製を行った．その結果，タグの変更によりある程度精製されるリコンビナント RPL9 量が増加する可能性が示唆された (図 1)．

そこで，これらの分子の細胞への作用が His-RPL9 と同等であるか否かを検討した．その結果，等量の分子を作用させたとき，HN-RPL9 と HAT-RPL9 は，His-RPL9 よりも作用が弱いことが示唆された(図 2)．この現象は，6×HN タグと HAT が 6×His タグよりも分子サイズが大きいことが原因となって生じた可能性が考えられる．今後，タグの C 末端側への付け替えや，プロテアーゼを用いたタグ配列領域の切断等を検討する予定である．

このように RPL9 については，タグの変更により精製量が多くなる可能性が示唆されるものの，その程度は，大きくないと考えられた．一方で，他のタンパク質についてはタグの変更により精製量が大幅に増加する事例を見出している(データは示さない)．従って，適切なタグ配列はタンパク質によって異なっており，複数のタグを比較検討することが最終的な精製量の増加につながると考えられた．

さらに本研究では，ツマジロクサヨトウにおける Kozak 配列を検討した．Kozak 配列とは，開始コドン近傍にみられる共通配列であり，翻訳の開始に関わ

り，タンパク質発現量に影響することが示唆されている．ツマジロクサヨトウにおける同様の検討は，過去に報告されているものの，本研究による検討結果とは完全に一致してない［10］（データは示さない）.解析対象とした遺伝子の根拠と解析規模の点から，現時点では本研究による検討結果がより妥当なものであると考えている.

現在，His-RPL9 発現ウイルス作製用の転移ベクターに，本研究により見出したツマジロクサヨトウの Kozak 配列を付加し，発現量の比較検討を行っている．他種では，Kozak 配列の有無によってタンパク質発現量が大幅に変化する事例が報告されており，ツマジロクサヨトウにおける Kozak 配列の同定は，この種由来の細胞を用いたタンパク質の大量発現系の構築に大きく寄与すると考えられる.

以上より，本研究では RPL9 をはじめとする抑制性 DAMPs の性状・機能・作用メカニズムを解析する上で重要となるリコンビナント分子の調製法を改善するための予備検討を行った．現在も検討中の部分も含めて，今後の解析に資する知見が得られたと考えている.

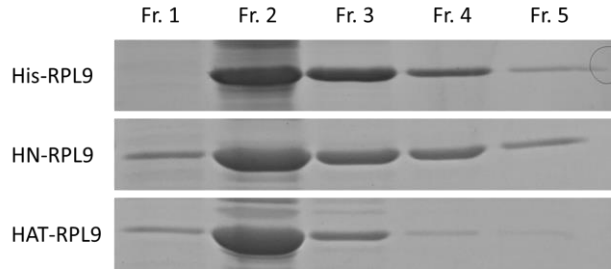


図1　タグの変更によるリコンビナント RPL9 の精製量の変化．それぞれのリコンビナント RPL9 を発現させた細胞を破砕し遠心分離した上清をコバルトレジンと混合・洗浄し，レジンと結合したタンパク質をイミダゾールにより溶出した（フラクション，Fr. 1-5）．各 Fr. より一定量を分取し，SDS-PAGE に供した．ゲルの CBB 染色像を示した.

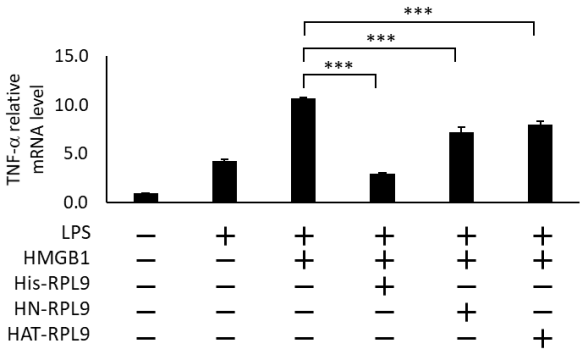


図2　タグの変更によるリコンビナント RPL9 の細胞への作用の比較．過去に報告したように［5］，RPL9 は代表的な DAMPs である High mobility group box-1（HMGB1）と Lipopolysaccharide（LPS）による RAW264.7 細胞における炎症性サイトカイン（tumor necrosis factor-α，TNF-α）の発現誘導を抑制する作用を有する.共存させる RPL9 を His-RPL9 から HN-RPL9 および HAT-RPL9 に変更した場合に生じる変化を検討した．200 pg/mL の LPS，100 ng/mL のリコンビナントタンパク質を使用した．***，$P < 0.001$ *vs* LPS+HMGB1 by Dunnett's test (n = 3).

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] Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. 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, Vol. 66, No. 2, pp. 254-260 (2019)

[2] Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Advanced Glycation End Products Attenuate the Function of Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis to Regulate the Inflammatory Response. Mol Cell Biochem, Vol. 434, No. 1, pp. 153-162 (2017)

[3] 渡邊政博．終末糖化産物によるサイトカイン捕

捉機構の同定と病態生理学的意義の解明.薬学雑誌, Vol. 140, No. 11, pp. 1335-1341 (2020)
[4] Watanabe M, Toyomura T, Tomiyama M, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Advanced glycation end products (AGEs) synergistically potentiated the proinflammatory action of lipopolysaccharide (LPS) and high mobility group box-1 (HMGB1) through their direct interactions. Mol Biol Rep, Vol. 47, No. 9, pp. 7153-7159 (2020)
[5] Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Nishinaka T, Hatipoglu OF, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Identification of ribosomal protein L9 as a novel regulator of proinflammatory damage-associated molecular pattern molecules. Mol Biol Rep, *in press*
[6] Kozak M. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. Nucleic Acids Res, Vol. 9, No. 20, pp. 5233-5252 (1981)
[7] Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes are compact. Trends Genet, Vol. 19, No. 7, pp. 362-365 (2003)
[8] Wang M, Herrmann CJ, Simonovic M, Szklarczyk D, von Mering C. Version 4.0 of PaxDb: Protein abundance data, integrated across model organisms, tissues, and cell-lines. Proteomics, Vol. 15, No. 18,3163-3168 (2015)
[9] Cavener DR, Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in Drosophila and vertebrates. Nucleic Acids Res, Vol. 15, No. 4, 1353-1361 (1987)
[10] Sano K-I, Maeda K, Oki M, Maéda Y. Enhancement of protein expression in insect cells by a lobster tropomyosin cDNA leader sequence. FEBS Lett, Vol. 532, No. 1-2, pp. 143-146 (2002)

米由来ペプチドの神経毒性軽減効果の検討

就実大学　薬学部

守谷　智恵

我々は，これまでに米タンパク質を加水分解酵素であるウマミザイムで処理することで得られたペプチド成分（米由来ペプチド）に，ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞において細胞内グルタチオン（GSH）量上昇作用や抗酸化酵素の発現の誘導作用があることを見いだした．これらの作用により細胞の酸化ストレスに対する防御能を上昇させることで，酸化ストレスが関与する疾患の予防や健康維持につながることが期待される．本研究では，神経モデル細胞株として使用されるラット副腎褐色細胞腫 PC12 細胞を用いて，米由来ペプチドの細胞内 GSH 量上昇作用や神経細胞傷害に対する抑制効果を明らかにすることを目的とした．その結果，米由来ペプチドは濃度依存的に PC12 細胞の GSH 量を上昇させた．更に，H_2O_2 による細胞傷害に対する抑制効果や細胞内活性酸素の産生の抑制効果を示した．神経毒である 6-ヒドロキシドパミンによる細胞傷害に対しても，米由来ペプチドは細胞傷害を抑制した．以上の結果より，米由来ペプチドは細胞内グルタチオン量の上昇を介し，酸化ストレスに対して神経細胞保護効果を示すことが明らかとなった．

1．背景と目的

活性酸素種は，生体内のエネルギー代謝や病原微生物の感染防御過程などにおいて発生する．このように発生した活性酸素種は，抗酸化物質や抗酸化酵素の働きにより除かれるが，生体内の酸化・抗酸化のバランスがくずれ活性酸素種による障害が大きくなると，いわゆる酸化ストレスという状態になる．十分に除くことのできなかった活性酸素種は，脂質，核酸，タンパク質などの生体分子の酸化損傷を引き起こし，老化，がん，動脈硬化，糖尿病などのさまざまな疾患の原因や増悪化に関与すると考えられている．中でも神経細胞は酸化ストレスに対して脆弱で，酸化ストレスが神経変性疾患の発症に関連することが知られている[1,2]．

グルタチオン（GSH）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，活性酸素種や脂質過酸化物を還元し，抗酸化作用を示す．また，異物の解毒（GSH 抱合）や細胞内の酸化還元状態の調節において重要な役割を果たしている[3]．一方で，神経変性疾患をはじめ，種々の病態において細胞内 GSH 量が低下することが知られている[4]．そのため細胞内 GSH 量を上昇させ，細胞の酸化ストレスを軽減することは，種々の疾病の予防や治療に有効である可能性がある．

我々はこれまでに，細胞内 GSH 上昇作用をもつ食品成分の探索を行い，米タンパク質の加水分解物（米由来ペプチド）がヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞において細胞内 GSH 量を上昇させること，GSH 合成の律速酵素であるγ-グルタミルシステイン合成酵素（γ-GCS），抗酸化作用をもつビリベルジンを産生する酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1），解毒代謝酵素である NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 などの発現を誘導することも明らかにしてきた[5]．

本研究では，米由来ペプチドの抗酸化効果を更に検証するために，神経モデル細胞株として使用されるラット副腎褐色細胞腫 PC12 細胞を用いて米由来ペプチドの細胞内 GSH 上昇作用，H_2O_2 や神経毒である 6-ヒドロキシドパミン（6-OHDA）による細胞傷害に対する抑制効果について検討した．

2．方法

米由来ペプチドの調製

オリザプロテイン P-70（オリザ油化）をウマミザイム G（アマノエンザイム）により終夜消化した．

加熱により酵素を失活させた後遠心し，得られた上清を凍結乾燥したものを米由来ペプチドとした．

GSH 定量

PC12 細胞を 5.0×10^5cells/2 ml/well で 6 穴プレートに播種し，48 時間培養した．米由来ペプチドを終濃度 0，2.5，5.0，7.5，10 mg/ml で添加し，24 時間培養後細胞を回収した．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 GSH を定量した [6]．

細胞生存率測定

PC12 細胞を 1.5×10^4cells/0.1 ml/well で 96 穴プレートに播き，24 時間培養した．米由来ペプチドを終濃度 0，2.5，5.0 mg/ml で添加して 24 時間培養後，H_2O_2 または 6-OHDA を含む培地（血清なし）に交換し，24 時間処理した．その後，Cell Counting Kit-8（WAKO）を用いて細胞生存率を測定した．

細胞内活性酸素の測定

PC12 細胞を 5.0×10^4 cells/0.1 ml/well で播種し，24 時間培養後，米由来ペプチドを終濃度 0，1.25，2.5，5 mg/ml で 24 時間処理を行った．PBS で洗浄後，2',7'-dichlorodihydrofluorescin diacetate（DCFH-DA）を細胞内に浸透させた．その後 H_2O_2 を添加した培地（血清なし）に交換し，30 分間処理しフローサイトメーターにより蛍光強度（励起波長 485 nm，蛍光波長 530 nm）を測定した．

3. 結果と考察

米由来ペプチド前処理により，細胞内 GSH 量は濃度依存的に上昇した（図 1）．10 mg/ml 添加では米由来ペプチド未処理と比較して，約 1.7 倍に有意に上昇した（図 1）．細胞内グルタチオン量が上昇したことから，real-time PCR により GSH 合成の律速酵素である γ-GCS の mRNA 発現量を測定したところ，8 時間後に触媒サブユニットにおいては約 2.5 倍の，調節サブユニットにおいては約 2 倍の上昇がみられた．また，抗酸化に働く HO-1 においては約 8 倍の上昇がみられた．これらの酵素はいずれも酸化ストレス防御に関わる Keap1-Nrf2 経路により制御されている [7]．以上のことから，米由来ペプチド

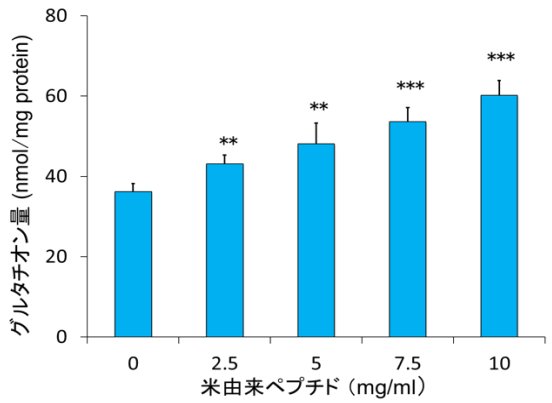


図 1　米由来ペプチドの PC12 細胞内 GSH 量への影響．

平均±S.D.（n=3），$^{**}p<0.01$，$^{***}p<0.001$ vs. 0 mg/ml.

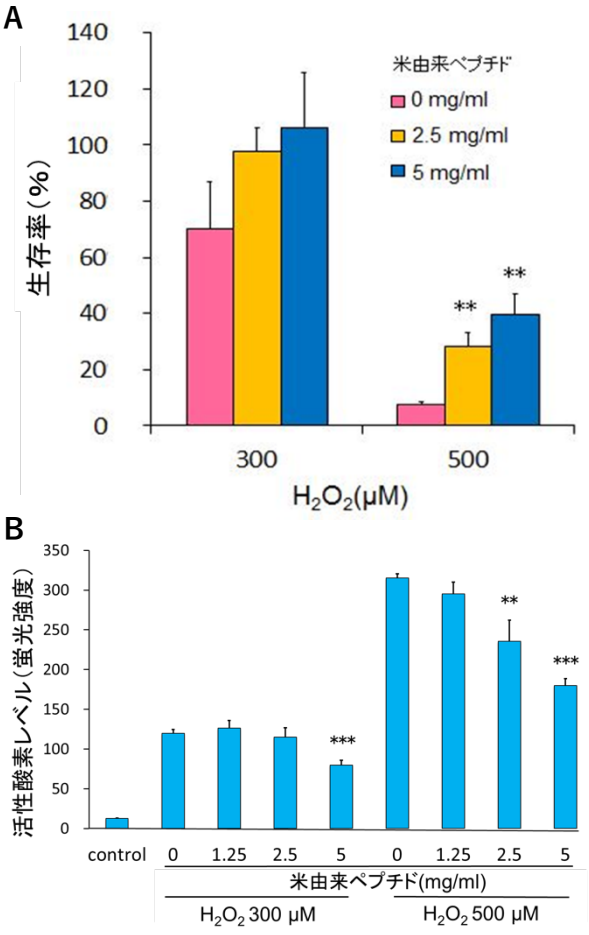


図 2　H_2O_2 による細胞傷害に対する米由来ペプチドの保護効果．

A：細胞生存率に対する影響．平均±S.D.（n=4），$^{**}p<0.01$ vs. H_2O_2 処理群．

B：細胞内活性酸素レベル．平均±S.D.（n=3），$^{**}p<0.01$，$^{***}p<0.001$ vs. H_2O_2 処理群．

が Keap1-Nrf2 経路を誘導し，細胞内 GSH 量を上昇させたことが示唆された．

細胞内 GSH 量上昇作用や HO-1 の発現誘導が見られたことから，細胞の抗酸化作用が高まっていることが期待される．そこで H_2O_2 処理による細胞傷害に対する抑制効果について検討した．H_2O_2 300 µM 処理で細胞生存率が約 70%にまで低下したのに対し，あらかじめ米由来ペプチドで処理することで生存率はほぼ 100%となった．また H_2O_2 500 µM 処理時の生存率は 10%以下であったが，細胞生存率は米由来ペプチド処理濃度依存的に回復し，傷害は有意に抑制された（図 2A）．細胞傷害率の測定においても，米由来ペプチドで前処理することで H_2O_2 による細胞傷害を抑制することが明らかとなった．以上の結果より，米由来ペプチド処理により細胞内の活性酸素の産生が抑制されている可能性があることから，細胞内活性酸素レベルを測定した．米由来ペプチドで前処理することにより濃度依存的に蛍光強度が低下し，細胞内活性酸素の産生が抑制された（図 2B）． 米由来ペプチド処理によって細胞内 GSH 量が上昇したことで，還元型 GSH が GSH peroxidase ともに H_2O_2 を還元し，無毒化したと予測された．HO-1 の発現誘導によっても，細胞の酸化ストレスが低減した可能性が考えられた．

次に神経毒である 6-OHDA による細胞傷害に対する傷害抑制効果について検討した．6-OHDA 処理により 200 µM 以上の添加で生存率が有意に低下した（図 3A）．この条件下で米由来ペプチドの効果を検討したところ，米由来ペプチドを終濃度 2.5，5.0 mg/ml で前処理することにより生存率は約 45%，約 50%となり細胞傷害が有意に抑制された（図 3B）．6-OHDA から様々な活性種が産生されるといわれているが，中でもキノン体と H_2O_2 が神経細胞に傷害を与えることが知られている．また，6-OHDA から産生する物質のうち *p*-キノンは GSH と反応して 2-S-(glutathionyl)-6-OHDA を形成し，細胞内グルタチオン量を減少させることが報告されている [9]．今回の結果から，米由来ペプチド処理によって細胞内 GSH 量が上昇したことで，GSH が *p*-キノンと抱合体を形成することによって，細胞傷害を抑制した

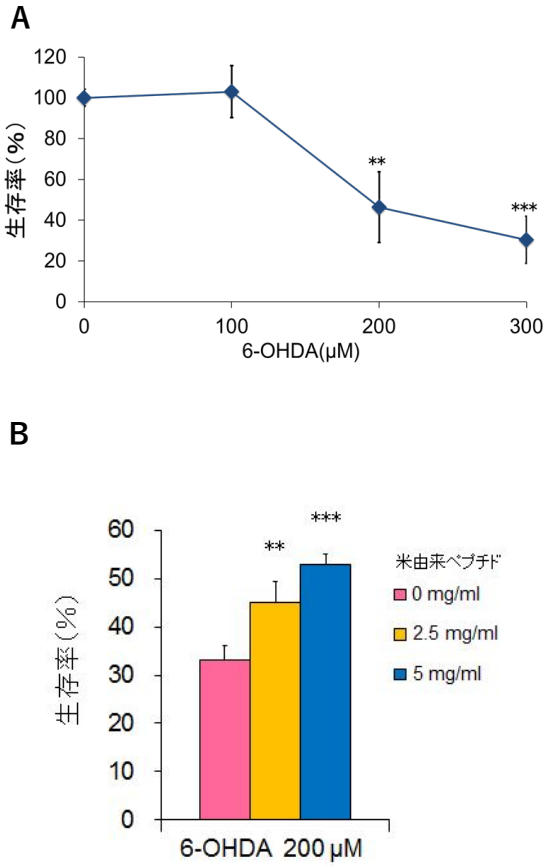


図 3　6-OHDA による細胞傷害に対する米由来ペプチドの保護効果．

A：6-OHDA 処理後の生存率．平均±S.D.（n=3），$^{**}p<0.01$，$^{***}p<0.001$ vs. 6-OHDA 未処理．

B：米由来ペプチドの保護効果．平均±S.D.（n=3），$^{**}p<0.01$，$^{***}p<0.001$ vs. 6-OHDA 処理．

可能性が示唆された．

以上のことから，米由来ペプチドが GSH 量上昇を介し神経細胞保護効果を示すことが明らかとなった．今後，作用メカニズムの解析，活性成分の同定を進める予定である．

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．

5．参考文献

1) Trachootham D, Alexandre J, Huang P: Targeting cancer cells by ROS-mediated

mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579–591 (2009).

2) Shukla V, Mishra SK, Pant HC: Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv. Pharmacol. Sci*. **2011,** 572634 (2011).

3) Lu SC: Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB J.* **13**, 1169–1183 (1999).

4) Nazzareno B, Suzanne MK, Sylvia N, Shujie S, Kim T, Christine LH: Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol. Chem.* **390**, 191-214 (2009).

5) Kawakami K, Moritani C, Uraji M, Fujita A, Kawakami K, Hatanaka T, Suzaki E, Tsuboi S: Hepatoprotective effects of rice-derived peptides against acetaminophen-induced damage in mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **60,** 115–120 (2017).

6) Matsumoto S, Teshigawara M, Tsuboi S, Ohmori S: Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples using acrylonitrile as a thiol-blocking reagent. *Anal. Sci.* **12**, 91–95 (1996).

7) Itoh K, Tong KI, Yamamoto M: Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radical Biol. Med.* **36,** 1208–1213. (2004).

8) Miyama A, Saito Y, Yamanaka K, Hayashi K, Hamakubo T, Noguchi N: Oxidation of DJ-1 Induced by 6-Hydroxydopamine Decreasing Intracellular Glutathione. PLoS One. **6,** e27883 (2011).

体力科学的観点から考える岡山県内「防災保育」ガイドラインの提案

就実大学 教育学部

飯田智行

体力科学的観点からの「防災保育」ガイドライン作成のための基礎資料獲得を目指し，垂直避難時における保育者の身体負担を明らかにすることを目的とした．健常な女子大学生 24 名を対象とした．本研究での避難想定は，避難支援対象を 1 歳児，避難経路は建物の 1 階から 4 階，保育者一人当たり 1 歳児四人の避難支援することとし，子ども二人を両脇に抱え 2 往復する条件とした．子どものモデルとして，1 歳児の平均体重と同じ重さである 10kg のバーベルプレートを用いた．測定項目は，避難行動時間，心拍数，主観的運動強度，疲労感とした．本研究は，就実大学短期大学教育・研究倫理安全委員会の承認を得て実施した．その結果，1 歳児四人を抱えて 4 階まで避難させる際の避難支援者（保育者）の最大心拍数は 140 拍/分程度，%HRmax は 70%程度，RPE は 18 程度であった．また，身体的疲労感は腕と足において高値を示した．これらのことから，子どもを抱えての垂直避難の運動強度は中～高強度であることが明らかになった．

【はじめに】

我が国は，地震災害によるリスクが高く，マグニチュード 6 以上の地震回数が世界の 20%を占めている[1]．また，30 年以内に南海トラフにおけるマグニチュード 8～9 クラスの地震が発生する確率が 70～80%あることも示されている[2]．その南海トラフ巨大地震によって発生する津波によって，10 万人以上の死者が発生すると想定されている[3]．災害が発生した際，自力避難が困難であり，安全な場所に避難するための支援を必要とする高齢者・障害者・乳幼児などは災害時避難行動要支援者（以下，要支援者）と定義されている[4,5]．要支援者の中でも特に乳幼児は，発達段階の途中であり，自己判断力が低く大人への依存度が高い．つまり，発達段階の様々な子どもが共に生活している保育現場では，要支援者が多く，津波のような緊急避難を要する災害が発生した場合，保育者等の大人の力が子どもの安全や命を守る上で非常に重要になる．そのため，保育園に勤務する職員には，防災に関する知識や園における避難マニュアルを把握しておくことが求められる．

しかしながら，災害時の避難経路を把握していない職員が 2 割いる報告もある[6].つまり，災害の際の避難について，具体的なイメージを持っていない保育者が一定数存在することを示している．このことは，乳幼児を災害から守るための「防災保育」の重要な知見である．この知見を基に「防災保育」の観点から，具体的な避難計画や避難方法を可能にする基礎資料獲得を目指す必要があることが考えられる．

災害の発生時には，「水平避難」と「垂直避難」の 2 種類の方法があるが，東日本大震災による津波や西日本豪雨のような水害を経験し，緊急避難を要する水害時の「垂直避難」の重要性が高まっている．そこで我々は，津波リスクの低い岡山県と津波リスクの高い高知県・神奈川県の保育者を対象に防災及び避難行動に関する意識調査を実施した. その結果，「防災への関心」，「災害時に子どもを連れての避難に対する自信」及び「緊急避難場所までの避難訓練回数」において岡山県が有意な低値を示した. また，緊急避難を行う上で保育者自身及び子どもの体力的な不安を感じる保育者がいることも明らかにした．このことから，岡山県の保育者に対して，体力科学的観点からの「防災保育」ガイドラインを提案することによって，子どもの安全や命を守ることにつながるものと考える．垂直避難に関する先行研究において，高齢者の垂直搬送支援で女性被験者 6 名中 4 名が途中で実験中止になったこと[7]が明らかにされており，避難支援者が女性の場合，要支援者を抱えての垂直避難は身体的負担が非常に高いと考えられ

る．しかしながら，乳幼児を対象にした避難支援行動の身体負担に関する科学的根拠は示されていない．

そこで本研究では，「垂直避難」をする際の身体負担に着目し，①垂直避難時における保育者の身体負担，②幼児における垂直避難行動と体力の関係を明らかにすることを目的とした．しかしながら，新型コロナウィルス感染症の影響により，多数の対象者の募集が難しかったこと，対外的な実験実施が不可能となった．そのため，まず「①垂直避難時における保育者の身体負担」に関する実験を行っており，その途中経過を報告する．

【方法】

（１）対象

教育・保育職を目指し，現在運動習慣を持たない健常な女子大学生 24 名（年齢：21 ± 1 歳，身長：157.9±5.5cm，体重：49.9±5.4kg）を対象とした．対象者（以下，避難支援者）には，研究の目的，方法，実験に参加しないことによって不利益を生じないこと，体調異変の際には調査協力を中断できることを予め説明し，研究参加の同意を得た．尚，本研究は，就実大学短期大学教育・研究倫理安全委員会の承認（No.2020-5）を得て実施した．

（２）避難支援行動シミュレーション

①避難支援対象モデル

多くの幼児が1歳3ヶ月でひとり歩きを始めていること[8]，1歳3ヶ月から2歳未満児はつかまらずに歩けるようになること[9]，18ヶ月から24ヶ月で走動作を獲得すること[10,11]などが報告されている．一方で，2歳未満児は自力での階段移動が困難な場合が多く，2011年東北地方太平洋沖地震の際には，2歳児以上は自分で階段を上がり，0〜1歳児は保育者が抱えて避難を行ったことが報告されている[12]．以上のことから，本研究では歩行が自立しておらず，保育者の支援を要する1歳児を避難支援対象として設定した．また，本実験では子どものモデルとして，1歳児の平均体重と同じ重さである10kg[13]のバーベルプレートを用いた．

②避難経路

南海トラフ巨大地震により岡山県内でも 3.2m の最大津波高が想定されている地域がある[14]．また，浸水深が 3m 以上の場合，津波避難ビルは 4 階以上に設定されている[15]．そのため，本実験は南海トラフ巨大地震の発生を想定し，建物の１階から４階までの避難経路を設定した（図１）．

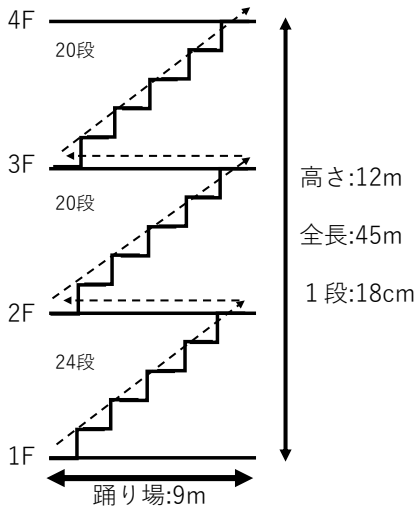


図１．避難経路図

（３）測定条件

児童福祉法の児童福祉施設の設備及び運営に関する基準第 33 条において，保育士一人当たり 1 歳児は六人までと定められている．災害時には，他の保育士などの援助を得ることができると考えられるため，本研究では，保育者一人当たり１歳児四人の避難支援を行うことを想定とした．また，非常時には，乳幼児を両脇に抱えて避難をしていた報告[12]もあることから，子ども二人を両脇に抱え 2 往復する条件とした．対象者には，自分自身及び子どもを速やかに且つ安全に避難することのできる速さで行動するように指示した．

（４）測定項目

①垂直避難時間

避難補助者（測定者）の開始指示から避難行動を開始し，全ての乳児の避難が完了するまでの時間を垂直避難時間として，それぞれストップウォッチを用いて測定した．

②心拍数

避難支援者に光学式心拍センサーOH1（Polar OH1:Polar 社，Finland）とスポーツ心拍計（Polar M400: Polar 社，Finland）を装着させ，実験開始から実験終了までの 1 秒毎の心拍数を測定した．得られた心拍数のデータから，垂直避難時の平均心拍数，実験開始から終了までの最大心拍数を算出した．また，垂直避難前及び垂直避難後に 5 分間の座位安静を設け，それぞれの平均心拍数も算出し，前座位安静時心拍数，後座位安静時心拍数とした．また，垂直避難時の心拍数及び最大心拍数が予測最大心拍数の何%に当たるかを%HR max =（最大心拍数 /（220−年齢））×100 とし算出した．

③主観的運動強度（RPE）

垂直避難終了直後に Borg scale[16]を用いて，6〜20 の 15 段階で評価した．

④身体的疲労感

Visual Analogue Scale（VAS）法を用いた疲労の評価が有用である可能性が示されていること [17]から，各垂直避難終了直後に 100mm スケールの VAS 法により，肩・腕・腰・足の 4 ヶ所の疲労感を評価した．0 を「全く疲労感がない」，100 を「とても疲労感がある」として，1mm 単位で計測したものを VAS 値（以下，疲労感）とした．

（５）統計処理

得られた測定値は，全て平均値 ± 標準偏差で示した．身体的疲労感の部位比較は，繰り返しのある一元配置分散分析を行い，その後の検定として Bonferroni 法による多重比較検定を実施した．統計処理は，IBM 社製の SPSS Statistics ver.23 を用いて行い，有意確率は 5%未満とした．

【結果及び考察】

対象者 24 名の内 1 名が途中で疲労困憊による実験中止を申し出たため，対象データは 23 名分とした．対象者一例の心拍数の時系列変化を図 2，垂直避難時間，心拍数及び RPE の結果を表 1 に示す．

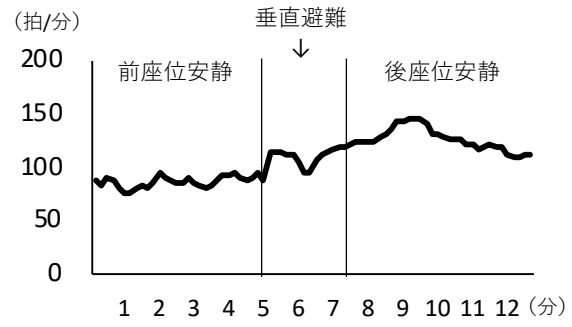


図２．心拍数の時系列変化（対象者１例）

表１．垂直避難時間及び心拍数

垂直避難時間（sec）		158.0 ± 29.9
心拍数（bpm）	前座位安静	81.5 ± 11.9
	垂直避難時	112.9 ± 17.3
	後座位安静	118.4 ± 13.5
	最大	142.9 ± 13.2
%HR max（%）	垂直避難時	56.7 ± 8.6
	最大値	71.8 ± 6.6
RPE		18.0 ± 1.4

（１）避難行動時間

垂直避難時間は 158.0±29.9 秒であり，4F まで 4 人の 1 歳児を抱えた垂直避難が求められる場合，約 2 分 40 秒かかることが明らかになった．しかし，実際の災害時では，避難場所までの水平避難もあることや建物の損壊，浸水による足場の悪さなどから，避難完了までにはさらに時間がかかることが予想される．そのため，水平避難などにかかる時間も考慮して，避難計画等を作成する必要がある．

（２）心拍数及び RPE

垂直避難時の心拍数は 112.9±17.3 拍/分，最大心拍数は 142.9±13.2 拍/分であった．最大心拍数は全ての対象者で後座位安静時に最大値を示した．本実験は 2 分半程度の短時間の垂直避難のため，後座位安静時に心拍数が最大を示したことが考えられる．また，%HRmax は垂直避難時では 56.7±8.6 %，最

大値では 71.8±6.6 %であり，RPE は 18.0±1.4 であった（表１）．

およそ2分半程度の避難行動において，20歳前後の大学生でさえ，最大心拍数の%HRmaxが70%を超えていたこと，RPEが18を示していることから，子どもを抱えての垂直避難は「かなりきつい」に相当する行動であることが推察される．階段を早く上がる活動は8.8メッツに相当する[18]．今回の避難行動は，10kgのバーベル2つを抱え走っての階段昇降であることから，乳児二人を抱えての避難行動は8.8メッツ以上であると考えられ，この活動はサッカーやバスケットボールの試合を行うと同等の運動強度であることが推察される．田中ら[7]は，10.7mの垂直搬送支援実験において，女性の被験者6人中4人が途中で実験中止となっていることを明らかにしている．そのため，避難支援者が女性の場合，10m以上の高さに搬送支援を行うことは，「非常に強い」運動強度である．実際の保育現場には20代～70代の保育士がおり，保育士の9割以上が女性であるため[19]，10m以上の高さに垂直避難支援を行うことが困難になる保育者がいることが予想される．

（３）身体的疲労感

VAS 法を用いた身体の各部位における疲労感は，足の疲労感が 80.6±22.2mm，腕の疲労感が 79.7±18.9mm と高い数値を示し，首・肩や腰と比較して有意な高値を示した（図３）．自力歩行が可能な人において下肢筋力の高い人が早い避難行動が可能であること[20]からも，避難支援者である保育者には乳幼児を抱えて速やかな垂直避難をするために下肢筋力及び腕力が必要であることが示唆された．しかしながら，現在は成人女性の体力が低下していること[21]，運動不足を感じる 20～30 代の女性が８割以上いること[22]などが報告されている．つまり，現在保育園などに勤務する保育者や保育者を目指す女子大学生の筋力や持久力等が低下していることが推察される．乳幼児が園で安全な生活を送るためには，保育者は専門的な知識・技能の習得だけではなく，日常的に運動を行い，基礎体力の維持向上を目指す必要もある．

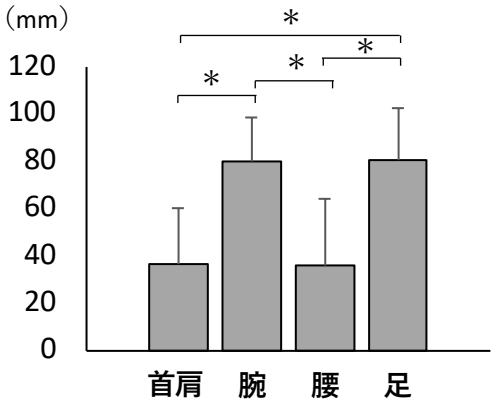


図３．身体的疲労感の部位比較

＊：p<0.05

【本研究の限界】

新型コロナウイルス感染症拡大に伴い，対象者が大学生 24 名のみであった．そのため，保育現場の実情に即して幅広い年齢層を対象者としてデータの信頼性を高め，その中で年齢層による比較や運動習慣・運動歴による比較検討を行う必要がある．当初の計画にもあった幼児を対象とした垂直避難行動と体力の関係も合わせて，今後も研究を継続していく予定である．

【まとめ】

本研究は，防災意識が低いことが考えられる岡山県の「防災保育」ガイドライン作成の基礎資料獲得を目指し，垂直避難時における保育者の身体負担を明らかにすることを目的とした．その結果，１歳児四人を抱えて４階まで避難させる際の最大心拍数は 140 拍/分程度，%HRmax は 70%程度，RPE は 18 程度であった．また，身体的疲労感は腕と足の疲れにおいて高値を示した．これらのことから，子どもを抱えての垂直避難の運動強度は中～高強度であることが明らかになった．

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，本研究にご参加いただいた対象者の方々にも感謝申し上げます．

【参考文献】

1） 内閣府：平成 22 年版防災白書；
http://www.bousai.go.jp/kaigirep/hakusho/h22/bousai2010/html/honbun/2b_1s_1_01.htm

2） 地震調査研究推進本部：南海トラフで発生する地震；
https://www.jishin.go.jp/regional_seismicity/rs_kaiko/k_nankai/

3） 内閣府：南海トラフ巨大地震の被害想定について(第二次報告)；
http://www.bousai.go.jp/jishin/nankai/taisaku_wg/pdf/20130318_shiryo2_1.pdf

4） 日本赤十字社：災害時要援護者の避難支援ガイドライン(2006)；
http://www.jrc.or.jp/activity/saigai/pdf/saigaikyugo-3_document.pdf

5） 内閣府(2013)：避難行動要支援者の避難行動支援に関する取組指針；
http://www.bousai.go.jp/taisaku/hisaisyagyousei/youengosya/h25/pdf/hinansien-honbun.pdf

6） 黒田慎太郎，吉田満穂，高木亮，森村和浩，飯田智行（2019）：幼児教育現場における防災教育の意識についての実態：第 20 回日本安全教育学会

7） 田中宏幸，北後明彦，ピニェイロ アベウ タイチ コンノ，大津暢人，李知香（2019）：津波避難タワーにおける避難行動要支援者の垂直避難支援及び避難誘導に関する研究：日本建築学会計画系論文集，84（756）：415−424.

8） 矢倉巻尚子（2002）：1 歳児歩行の運動力学：バイオメカニズム学会誌，26（1）：16-21.

9） 藤江康彦，無藤隆，野口隆子，清水由紀，宗我部義則，内田伸子他（2004）：幼児教育ハンドブック，お茶の水女子大学子ども発達教育研究センター，東京，34-37.

10） 宮丸凱史（1978）：走る動作の発達：体育科学，28（5）：306-313.

11） 斎藤昌久，宮丸凱史，湯浅景元，三宅一郎，浅川正一（1981）：2〜11 歳児の走運動における足の動作様式：体育の科学，31（5）：357-361.

12） ピニェイロ アベウ タイチ コンノ，北後明彦（2013）：保育施設における市街地避難対応力に関する事例研究−2011 年東北地方太平洋沖地震に伴う津波からの気仙沼市における避難を例として−：神戸大学大学院工学研究科・システム情報学研究科紀要，（5）：25-32.

13） 厚生労働省：平成 22 年 乳幼児発育発達調査調査の概要；https://cutt.ly/Sjqg3gI

14） 岡山県：岡山県津波浸水想定について；
https://www.pref.okayama.jp/uploaded/life/329011_1510999_misc.pdf

15） 岡山県：岡山県津波避難誘導計画策定指針；
https://www.pref.okayama.jp/uploaded/life/445397_3000185_misc.pdf

16） Borg GA：Perceived exertion：a note on “history” and methods：Med Sci Sports Exerc,5:90-93,1973

17） 小林実夏,星七海,堀口美恵子:青年女性を対象にした自己診断疲労度チェックリストの妥当性の検討:人間生活文化研究,29:526-536,2019

18） 国立健康・栄養研究所（2012）改訂版「身体活動のメッツ（METs）表」

19） 厚生労働省：保育士の現状と主な取り組み；
https://cutt.ly/1jqg52S

20） 渡辺一志，生田英輔（2014）：都市防災研究論文集，1：95-98

21） スポーツ庁：令和元年度体力・運動能力調査報告書；
https://www.mext.go.jp/sports/content/20201015-spt_kensport01-000010432_5.pdf.

22） スポーツ庁：令和 2 年度「スポーツの実施状況等に関する世論調査」；
https://www.mext.go.jp/sports/content/20200507-spt_kensport01-000007034_5.pdf

中高齢者のフレイル予防に資する身体活動条件の解明
～心疾患患者を対象とした縦断調査～

就実大学　教育学部

森村　和浩

（概要）

心疾患患者を対象として有酸素性作業能と四肢骨格筋の量および質，運動機能との関連性について検討することを目的とした。その結果，本研究では心疾患者の有酸素性作業能力と骨格筋の質との間に有意な正相関を認めた。その一方で，有酸素性作業能力は心疾患患者の筋量や四肢骨格筋指標との間に関連性を認めなかった。　これらの結果は，心疾患者においてATやPeakVO2などの有酸素性作業能が低いことは，単純な骨格筋量や筋力ではなく骨格筋の質的，機能的な低下と関連する可能性を示唆する。

今後，調査対象者を集積するとともに有酸素性作業能力と骨格筋の量や骨格筋の質について横断的・縦断的に検証を進めていく予定である。

（本文）

【背景】

我が国における65歳以上の高齢者数は3617万人で総人口に占める割合は 28.7%となり過去最高の更新が続いている。未曾有の超高齢者会へ突入したわが国では，老年期の健康寿命延伸対策，さらには壮年期世代の健康寿命の延伸を視野とした早期の予防対策が重要視されるようになってきた。

心疾患患者に対するリハビリテーションでは日常生活での生活活動を含めた身体活動全体を増やすこと，座位行動を減らすことが重要視されるようになってきた。心疾患患者の身体活動と有酸素能力について，中強度以上の身体活動時間と換気性作業閾値強度との間に関係が認められており，運動だけではなく日常の身体活動における中強度以上の身体活動時間を増すことが必要である。また，近年では，心疾患患者の高齢化が深刻化しつつあり，心疾患の二次予防と共にフレイルやサルコペニア対策が喫緊の課題となってきている(筒井裕之. ,2019, Okura, Yuji, et al, 2008)。

サルコペニアの発症メカニズムには，加齢以外に二次性のサルコペニアとして廃用や不活動，内分泌疾患，循環器疾患，神経系疾患，栄養不良，悪液質等が直接的,間接的に関連し,蛋白質の合成や分解,神経・筋の統合性へ様々な機序に影響を与えることで筋量や筋力の低下が生じる可能性がある。よって，心疾患を有する患者においては，有酸素性作業能と筋量および筋力，筋機能の維持・向上の二つが体力科学的な標的となる。有酸素性作業能は，骨格筋のエネルギー代謝を反映し，糖代謝能に強く関連していることが示されている（Ritov, Vladimir B., et al. 2005)。また，筋の質的変化，とりわけ筋内脂肪の蓄積といった骨格筋内の組成の変化には，運動機能の低下やインスリン抵抗性と関連することも指摘されている（Addison et al. 2014)。

特に心疾患患者の骨格筋異常の特殊性として「慢性炎症，酸化ストレス，低栄養など」を有するケースが多く，他の健常中高齢者と比しても廃用性萎縮を招きやすい状態にある。

そこで本研究では，心疾患患者を対象として有酸素性作業能と四肢骨格筋の量および質，運動機能との関連性について横断的・縦断的に検討することを目的とした。

【方法】

対象は，A 病院に通院する心筋梗塞，狭心症，心房細動,心不全など心疾患を有する中高齢者とした。

本研究の対象者は，加療やリハビリテーションが必要な心疾患患者を対象としているため本研究では,対象者の安全を確保するために新型コロナウイルス感染拡大中，当該病院での研究実施を延期した。その後，対象者の感染リスクを回避するために感染症の拡大状況が緩解していることや一部調査項目を限定し対象者の測定時間の短縮や，少人数体制で実施などの対応を施し調査に着手した。

現時点までの対象は，心疾患者男性 6 名，女性 1 名 7 名（年齢 77.4±6.0 歳，67-86 歳）であった。

基本的属性

対象者の基本的属性として，年齢，身長，体重，body mass index（BMI）に加え，疾患について調査した。

体力評価

対象者の体力評価として，本研究では体組成（脂肪量，除脂肪量，骨格筋四肢筋量），有酸素性作業能力，立ち上がりパワー，動的平衡性を測定した。四肢骨格筋量をはじめとする身体組成は，BIA 法により体重，BMI，総筋肉量，筋質，体脂肪率，四肢骨格筋量（kg）/身長（m2）から算出される四肢骨格筋量指数（Skeletal muscle mass index：以下 SMI と略す）を測定した。本研究で用いた体組成計（MC780,TANITA 社製）は，多周波数（5kHz，50kHz，250kHz）インピーダンス法により得られるインピーダンス値から脂肪量と骨格筋四肢筋量を測定した。製品仕様における誤差範囲は 0.1 kg であり，先行研究においてその妥当性が確認されている(Talma, H., et al,2013)。なお，筋質は，低周波数電流と高周波数電流の電気抵抗から，全筋組織の断面積に対する筋組織断面積を算出し，0-100 点で点数化した数値 MQP とした。尚，低周波電流は細胞外液を通過，高周波電流は細胞外液に加え細胞膜と細胞内液を通過する周波数特性を利用して２種類の周波数から得られる生体電気インピーダンスの比を用いて骨格筋の密度，いわゆる骨格筋の質を評価している。

有酸素性作業能の評価には，最大下漸増式運動負荷試験を用いた。負荷試験は，自転車エルゴメーターを用いてウォーミングを行った後.7～10watts/分漸増させた。評価項目は,嫌気性代謝閾値(anaerobic threshold；AT）および最高酸素摂取量（peak$\dot{V}$O2）とした。AT は V-slope 法を用いて決定した。試験の終了基準は，年齢から推定される推定最高心拍数の 85%、主観的尺度（RPE）が 17 以上，60 回転/分でのペダリングが維持できないと判断された時点までとして定義し,その他,主治医による中断や実施不可の指示や対象者自身による中止要求があった際に試験を中止させた。

筋力及びその機能の評価には，脚伸展力，立ち上がりパワーおよび，動的平衡性の測定を行った。本測定には,床反力計として使用されている測定器(運動機能分析装置 zaRitz（ザリッツ）BM-220，株式会社タニタ社製）を用い，椅子立ち上がり動作中における鉛直方向の床反力（kgf）をコンピュータに記録した。対象者は椅子（床から座面まで約 40 cm）に着座した状態から両足をプラットフォーム上に配置させ，膝関節が約 90°に保持させた。その後，測定開始の合図のあとに最大努力にて素早く立ち上がり，直立姿勢を 2 秒間保持したのちに着座し，座位姿勢を 2 秒間保持させた。これを一試行とし，連続して 2 回試行し，パワー（F/w），立ち上がりスピード（RFD/w），立位安定時間（stable Time(sec)）の最良値を採用した。

【結果】

対象は，身長が 161.0±9.6cm，体重 60.36±11．99kg，BMI23．1±2．2kg/m^{2}であり，疾患及び既往は表 1，身体組成および体力評価の結果は表 2 へ示した。有酸素性作業能である AT と peak$\dot{V}$o2 は，それぞれ，0.65±0.19watts/kg,15.0±3.8ml/kg/min であった。

有酸素能力指標と骨格筋指標，筋機能との関係では，骨格筋指標では，MQP と正の相関関係，筋の機能においては，パワーとの間に正相関，立位安定時

間との間に負の相関関係が認められた（それぞれ，$p<0.05$）。なお，SMI には有意な関係は認められなかった。なお，本解析には有酸素性作業能力が評価できていない心不全患者 2 名を除いている。

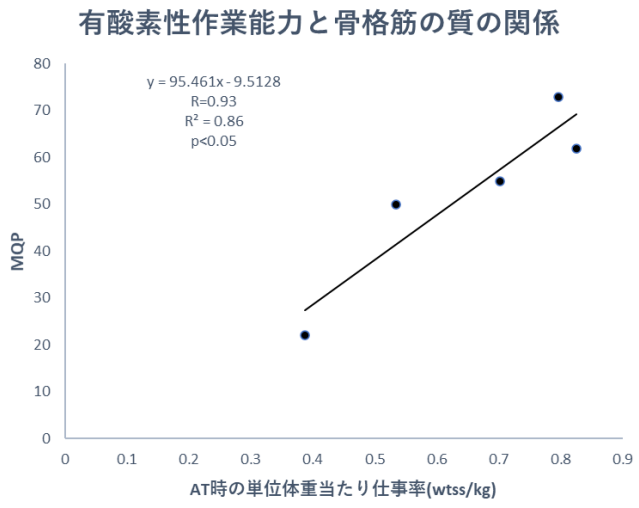
表1.対象者の身体的特徴と疾患

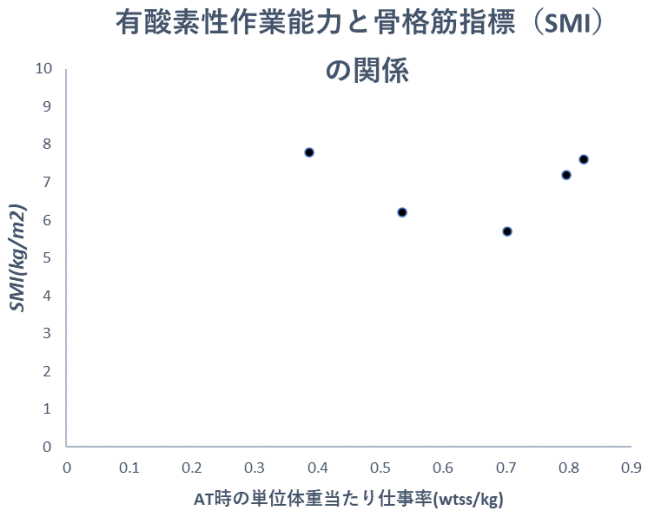
	sex (0=men, 1=women)	Age	Height (cm)	Weight (kg)	BMI (kg/m^2)	疾患及び既往
A	0	67	175	68.50	22.4	心筋梗塞後(ステント治療)→急性期合併症により心不全増悪、心室中隔穿孔、心房細動発症→他院にて心室中隔穿孔パッチ閉鎖術、PVI、左心耳閉鎖術後
B	0	80	152	47.00	20.3	狭心症(ステント治療)、閉塞性動脈硬化症
C	0	77	156	58.20	23.9	狭心症（ステント治療）
D	0	86	160	60.70	23.7	慢性心房細動、慢性心不全
E	0	81	174	82.60	27.3	急性心筋梗塞（ステント治療）
F	0	74	157	53.90	21.9	狭心症(ステント治療)
G	1	77	153	51.60	22	狭心症(ステント治療)
	AV	77	161.0	60.36	23.1	
	±SD	6	9.6	11.99	2.2	

表2.対象者の身体組成および有酸素能，筋機能

	Fat %	Muscle mass	MQP	TBW %	SMI	AT (watts/kg)	peak VO2 (ml/kg/min)	F/w	RFD/w	Stable Time
A	25.6	48.3	2	55.3	8.8	-		1.06	6.42	2.5
B	19.8	35.7	50	55.3	6.2	0.53	14.4	1.37	12.37	0.9
C	22.2	42.9	73	52.4	7.2	0.80	17.3	1.41	11.91	0.9
D	28.3	41.2	6	50.7	8	-		1.13	6.21	1.6
E	39.2	47.6	22	38	7.8	0.39	9.4	1.09	6.73	1.5
F	12.5	44.7	62	65.1	7.6	0.82	19.5	1.48	9.47	0.9
G	30.6	33.8	55	50.4	5.7	0.70	14.2	1.16	5.65	1.2
AV	25.5	42.0	38.6	52.5	7.3	0.65	15.0	1.24	8.39	1.4
±SD	8.5	5.6	28.3	8.1	1.1	0.19	3.8	0	2.84	0.6

＊subA,Dの有酸素評価は実施不可





【考察】

本研究は，心疾患患者の有酸素性作業能と四肢骨格筋の量および質，運動機能との関連を横断的・縦断的に検討することを目的として行われた。その結果，本研究は，心疾患患者の有酸素性作業能（AT，peakVo2）と筋肉の質や機能との関連性を認めた。一方，有酸素性作業能と骨格筋量，下肢筋力との間には関連性を認めなかった。これらの結果の解釈には，サンプルサイズの限界点が内包されるものの心疾患者において AT や PeakVO2 などの有酸素性作業能が低いことは，単純な骨格筋量や筋力ではなく骨格筋の質的，機能的な低下と関連する可能性を示唆する。

筋輝度法を用いた骨格筋の質的評価では，加齢や疾患により筋厚だけでなく筋輝度にも変化が生じることが明らかとなっている。特に加齢や疾患による筋の質的変化は，筋厚の減少よりも早い段階で生じていることが示されている。すなわち，後期高齢者の活動量と大腿前部との比較では，骨格筋量ではなく骨格筋の質的な要素が中等度以上の身体活動と有意に関連することが示されている（Osawaet al.，2017）。同様に，地域在住高齢者 204 人を対象とした研究では，骨格筋の質の低い群では中，高群よりも持久的な運動機能が低いことや歩数が少ないこと，中程度(3.0～6.0METs)の身体活動量が少ないことも明らかにされている（Yoshiko，et al.，2019）。本研究で得た結果は，日常の中等度以上の身体活動や持久的な運動機能と骨格筋の質とが関連することを示す先行研究を支持していると考えられる。

特に相対的に強度指標である中高強度の身体活動強度ではなく，有酸素性作業能の生理的な指標であり，個別の絶対強度である AT との間にその関連性が認められたことは，本研究の重要な知見である。

乳酸性作業閾値の間接的指標である AT をはじめ，乳酸性作業閾値，換気性作業閾値や心音二重積屈曲点は運動強度に対してカテコールアミンが急増する生理的，代謝レベルでの臨界点であり，有酸素性作業能の向上を期待できる下限の運動強度でもある。これに相当する運動強度は，高い安全性のほかに骨格筋のミトコンドリア量増加や筋線維タイプ変化，毛細血管新生などをもたらし，結果的に最大酸素摂

取量やインスリン感受性の改善などの代謝適応を導出させ生活習慣病予防効果を発揮する点にある。これらの運動による代謝適応は，ミトコンドリアタンパク質 mRNA の PGC1-αにより誘導され，ミトコンドリアの生合成が活性化されることによる。また PGC1αの発現は，ミトコンドリアの機能等の代謝適応だけではなく，I 型ミオシン heavy chain や Type I 筋形成の誘導や神経・筋接合部の成長・筋萎縮等を抑制することが明らかにされている。なお，慢性心臓病，糖尿病，悪液質などの萎縮モデルでは PGC1α発現量の著しい低下が確認されている。

以上のことから，心疾患患者は急性増悪やその敬遠による不活動を繰り返すたびに心機能や有酸素性作業能，筋力が低下するリスクを抱え，健常高齢者と比較してもサルコペニア・フレイルの有病率も高くその移行が早い特徴を有する。しかし，本研究では，心疾患患者において有酸素性作業能が低値であるほど骨格筋の質が低く，有酸素作業能力の低下とともに骨格筋の質的な変化が生じている可能性が考えられた。特に本研究の対象者のうち，心不全を有する者が 2 名含まれるが，2 名の SMI は他の患者との差が小さいものの MQP や筋バランス等は顕著に低値を示していた。本件についても今後の検討課題としたい。

【今後の予定と課題】

本研究は，基礎疾患並びに中高齢者を対象としており，対象者のリスク回避の観点から新型コロナウイルス感染症の拡大中の調査研究の実施を中止したため，大幅な遅れが生じる結果となった。　報告書作成時点で本研究の対象者は，　7　名と限定的な報告であり，男女差や疾患毎，縦断的な検証に至っていない。今後，調査対象者を集積するとともに本研究目的を達成すべく継続して検討していく予定である。

謝辞

本研究は，公益財団法人ウエスコ学術振興財団の研究活動助成事業を受けて実施されました。心より感謝申し上げます。また，本研究を通じて多大なるご協力とご支援を頂きました A 病院リハビリテーション室の田中亮氏，山下大貴氏をはじめスタッフの皆様，ご協力頂きました患者の皆様，また，研究遂行においてご支援頂きました岡山県立大学綾部誠也教授に感謝申し上げます。

サルコペニアを対象とする健康寿命延伸薬の開発

学校法人川崎学園 川崎医科大学 神経内科学

砂田　芳秀

（概要）健康寿命を短縮する加齢に伴う骨格筋減少症（サルコペニア）対策は、超高齢化社会を迎えたわが国の国民的課題である。ところが、世界的にサルコペニアを対象に保険適応を獲得している医薬品は皆無である。我々はα-Klotho 欠損マウスの骨格筋において、筋線維萎縮と間質増成によるサルコペニア表現型が認められることを見出した。本研究では、α-Klotho 欠損マウスと超高齢マウスを対象にリコンビナント Klotho 蛋白質を投与し、そのサルコペニアへの有効性を検証、併せて、α-Klotho を介するサルコペニア抑制の分子機構の解明に取り組んだ。

（本文）

緒言

高齢化社会を迎えた本邦では、診断基準 (Cruz-Jentoft, *Age Aging* 39, 2010)によれば、60-70 歳代の 15%、 80 歳以降の 50%、推定 1,000 万人のサルコペニア及びその予備群が存在し、健康寿命の短縮（Matthews, *Ann N Y Acad Sci*, 1237, 2011）により介護負担の増大をきたすことが問題となっている。ところが、サルコペニアを対象に保険適用を獲得している医薬品は世界的に皆無である。

α-Klotho は、腎尿細管上皮から分泌される長寿蛋白質で、その欠損マウスは、高リン血症、骨粗鬆症など老化表現型を示す(Nabeshima et al. *Nature* 390, 1997)。

われわれはα-Klotho 欠損マウスの骨格筋を解析し、筋線維単一断面積が減少、間質が増成して著明な筋萎縮を呈することを見出した。さらに、超高齢野生型マウスでは、血中α-Klotho 濃度が年齢依存的に減少することも確認した。本研究は、α-Klotho 欠損及び超高齢マウスにリコンビナント Klotho 蛋白質を投与しサルコペニアへの有効性を検証し、その修復の分子機構の解明に挑んだ。

方法

1)α-Klotho の哺乳類細胞安定発現株を樹立した。大量培養による細胞破砕液から、カラム抽出により、リコンビナントα-Klotho 蛋白質を単離した。

2)このリコンビナントα-Klotho 蛋白質を、α-Klotho 欠損マウスにワンショット投与し、サルコペニア抑制効果について最適条件を設定した。次いで長期投与により、その有効性及び安全性を検討した。血中動態、筋肥大効果について条件検討し、適応範囲を導出した。

この適応範囲を基盤としてリコンビナントα-Klotho 蛋白質を、α-Klotho 欠損マウス、並びに超高齢マウスに、それぞれ投与して、筋萎縮を改善する投与量を設定した。さらに、投与群と非投与群骨格筋の網羅的遺伝子解析により、Klotho 蛋白質によるサルコペニア改善の標的遺伝子をスクリーニング、その分子機構の解明に取り組んだ。

結果

1)α-Klotho-Fc ペプチボディーの単離・精製.

pcDNA3-hFc 発現ベクター (Aruffo A, *Cell* 61, 1990)により、α-Klotho の C 末端にヒト免疫グロブリン IgG Fc を融合させたα-Klotho-Fc ペプチボディーを安定発現する HEK293 細胞株を作成した（図 1)。次いで、細胞破砕液を Fc カラムにかけて、ペプチボディーを単離・精製した。

2)α-Klotho 欠損マウスへの投与.

α-Klotho-Fc ペプチボディーの投与により、α-Klotho 欠損マウスの筋萎縮は軽減し、筋量・握力の有意な増加も認められた（図 2)。免疫組織解析では、単一筋繊維断面積が有意に増加し、筋繊維萎縮が有意に軽減した。

また、投与により、腎硬化症、骨粗鬆症も改善し、短縮していた寿命が延長した。

3)超高齢マウスへのα-Klotho-Fc ペプチボディー

投与.

2 種類の超高齢マウス（BL/6, DBA/2）に、それぞれ、α-Klotho-Fc ペプチボディーを投与した.

体重・握力は、いずれも改善し、筋量も増大、単一筋線維断面積も増大した。

4)α-Klotho-Fc ペプチボディーによるサルコペニア・腎硬化症・骨粗鬆症修復の分子機構解析.

まず、野生型マウスと比較して、α-Klotho 欠損マウスの骨格筋・腎臓・骨で上昇ないし低下する遺伝子群をスクリーニングした。次いで、α-Klotho-Fc ペプチボディー投与により、反対に、低下ないし上昇を示す遺伝子を絞り込み、これを老化抑制遺伝子群と考えた（図 2)。GeneChip で網羅的に発現解析した結果、3 臓器で共通に挙動する遺伝子が 5 つ同定された。現在、その機能について、培養筋芽細胞を用いて解析を進めている。

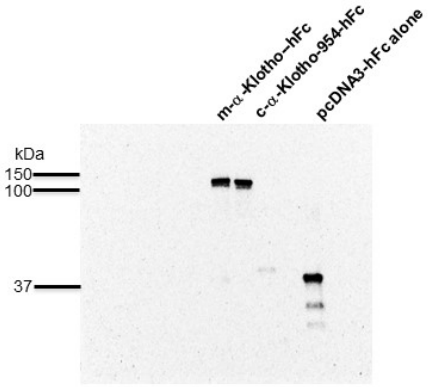


図1. **a-Klotho-Fcペプチボディーの精製.**
発現プラスミドベクター pcDNA3-hFcに、α-Klotho腎尿細管上皮膜型（m-α-Klotho—hFc:）と、α-Klotho血中型（m-α-Klotho—hFc）を、それぞれ組み込んだ。HEK293細胞にベクターをトランスフェクションして安定発現細胞株を樹立した.

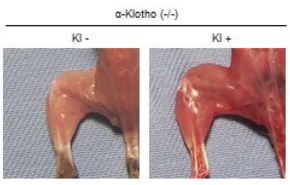


図2. **α-Klotho-Fcペプチボディーのサルコペニアの改善.**
長期投与により筋萎縮は改善、筋量は増加.

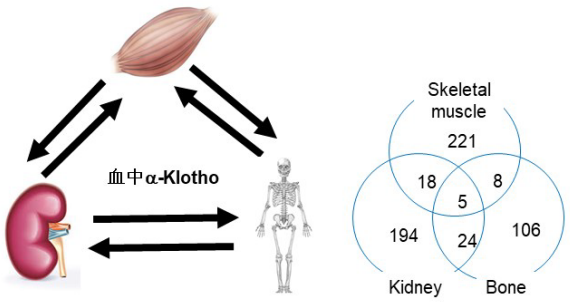


図3. α-Klothoによる老化抑制候補遺伝子群.
Gene Chipを用いた網羅的遺伝子解析で各臓器（骨格筋・腎臓・骨）で共通に変動し、α-Klotho蛋白質投与で逆変動する遺伝子群をスクリーニングした.

考察

α-Klotho は主に腎尿細管から血中に分泌される生理的な可溶性血中蛋白質で、欠損マウスが老化表現型を呈することから（Nabeshima, *Nature* 390, 1997)長寿蛋白質と考えられている。国内外で、これまで精力的な研究が実施されてきたが、FGF-23 との協同作用であるリン利尿作用（Urakawa, *Nature* 444, 2006)を除いては、その詳細な老化抑制の分子機構は解明されていない(Kuro-o, *Vitam Horm* 115, 2021)。本研究は、独自に作出したα-Klotho-Fc ペプチボディーは、この分子による治療介入を目指す、従来の研究と一線を画する、基礎研究と考えられる。将来ヒトでα-Klotho-Fc ペプチボディーないしその類縁体による治療介入が成功すれば、サルコペニアを起点としたロコモティブシンドロームやフレイル対策に画期的な進歩をもたらす。我が国の国民的課題である健康寿命延伸・介護医療費削減対策への展望が拓けるものと期待できる。

結論

リコンビナントα-Klotho 蛋白質のマウスへの投与によりサルコペニアへの有効性を証明した。現在、網羅的遺伝子解析からα-Klotho を起点とするサルコペニア抑制候補遺伝子を同定、その老化抑制の分子機構の解明に取り組んでいる。

参考文献

1. Munekane A, Ohsawa Y, Fukuda T, Nishimura

H, Nishimatsu SI, Sugie H, Saito Y, Nishino I, Sunada Y. Maximal Multistage Shuttle Run Test-induced Myalgia in a Patient with Muscle Phosphorylase B Kinase Deficiency, Intern Med, in press, Oct, 2021

2. Takayama K, Noguchi Y, Aoki S, Takayama S, Yoshida M, Asari T, Yakushiji F, Nishimatsu S, Ohsawa Y, Itoh F, Negishi Y, Sunada Y, Hayashi Y. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. J Med Chem, 58(3):1544-1549, Feb, 2015
3. Ohsawa Y, Takayama K, Nishimatsu S, Okada T, Fujino M, Fukai Y, Murakami T, Hagiwara H, Itoh F, Tsuchida K, Hayashi Y, Sunada Y. The Inhibitory Core of the Myostatin Prodomain: Its Interaction with Both Type I and II Membrane Receptors, and Potential to Treat Muscle Atrophy. PLoS One, 10(7): e0133713, Jul, 2015
4. Fukai Y, Ohsawa Y, Ohtsubo H, Nishimatsu SI, Hagiwara H, Noda M, Sasaoka T, Murakami T, Sunada Y. Cleavage of β-dystroglycan occurs in sarcoglycan-deficient skeletal muscle without MMP-2 and MMP-9. Biochem Biophys Res Commun, 492(2):199-205, Oct, 2017

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
（現　久留米大学医学部　解剖学講座　顕微解剖・生体形成部門）

嶋　雄一

脾臓は、赤脾髄と白脾髄という機能の異なる二つの領域、及び両者の間に存在する辺縁帯により構成される。赤脾髄に存在する洞様毛細血管の内皮細胞には間隙があるため、赤血球のフィルターとして機能する。一方、白碑髄ではB リンパ球とT リンパ球がそれぞれの領域を形成し、免疫機能を担っている。また、白脾髄を取り囲むように特殊な静脈洞（辺縁洞）が存在し、その外側には、赤脾髄と白脾髄を隔てる辺縁帯と呼ばれる領域が存在する。辺縁帯には特殊なマクロファージやB リンパ球が存在し、免疫細胞が抗原を認識する場として重要な機能を果たすことが明らかにされている。

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、脾臓の静脈洞内皮細胞にも発現している。我々は *Nr5a1* 遺伝子の第 4 イントロンに脾臓特異的エンハンサー領域を発見し、ゲノム編集により、この領域を欠失するマウスを作出した。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。赤脾髄では、脾洞内皮細胞の形態異常に伴って血液のフィルター機能が低下していた。一方、辺縁帯では辺縁帯特異的マクロファージが消失し、さらに白脾髄におけるリンパ球の領域化が著しく乱れていた。これらの結果から、NR5A1 は脾臓静脈洞内皮細胞の機能分化制御を通じて、脾臓全体の機能的な組織構築に重要な役割を果たしていることが示唆された。

【材料と方法】

1.　実験動物（マウス）

既に、ゲノム編集によって *Nr5a1* 遺伝子の脾臓エンハンサー欠失マウスを作成しており、このマウスを解析に用いた。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、電気穿孔法（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。コントロール群として、正常C57BL/6J マウスを用い、エンハンサーホモ欠失マウスと比較した。各種解析には生後 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.　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、脾臓を摘出した後、さらに浸漬固定を行った。常法に従いパラフィンに包埋し、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。

3.　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、ヤギ MARCO 抗体（R&D systems, AF2956）、ハムスターCD3- ε 抗体（SantaCruz, sc-18871）、ラット CD45R(B220) 抗体（Invitrogen, 14-0460-82）、ウサギ Laminin 抗体（Sigma-Aldroch, L9393）、二次抗体として AlexaFluor647 抗ウサギ IgG 抗体（Thermo, A32733）、AlexaFluor488 抗ラット IgG 抗体（Thermo, A48262）、Cy3 抗ハムスターIgG 抗体（Jackson ImmunoResearch, 127-165-160）、AlexaFluor647 抗ヤギ IgG 抗体（Thermo, A32849）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。

【結果】

1. 辺縁帯の消失

HE 染色の結果、コントロールマウスの脾臓では、赤脾髄（Red Pulp, RP）と白脾髄（White Pulp WP）の間に、辺縁帯（Marginal Zone, MZ）が観察された。また、白脾髄の外側縁を取り囲むように、静脈洞（辺縁洞、Marginal Sinus, MS）が明瞭に観察された。エンハンサー欠失マウス（SpE (-/-)マウス）においては、赤脾髄と白脾髄の間に辺縁帯（MZ）が存在せず、また辺縁洞（MS）も観察されなかった（図-1）。この結果から、内皮細胞における NR5A1 の発現は、辺縁帯および辺縁洞の組織構築に必須であることが示唆された。

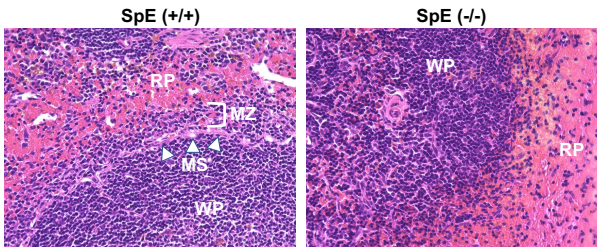


図-1：正常マウス（SpE (+/+)）の脾臓では、白脾髄（WP）と赤脾髄（RP）の境界に特徴的な辺縁帯（MZ）が存在し、また白脾髄の最外側には辺縁洞（MS）が観察される。一方、エンハンサー欠失マウス（SpE(-/-)）の脾臓では、MZ も MS も存在しない。

2. 辺縁帯特異的マクロファージの消失

辺縁帯特異的に存在するマクロファージのマーカーとして、Macrophage receptor with a collagenous structure (MARCO) が知られている。抗 MARCO 抗体を用いて免疫染色を行った結果、正常マウスでは辺縁帯に存在する MARCO 陽性マクロファージ（辺縁帯マクロファージ）が、エンハンサー欠失マウス（SpE (-/-)マウス）では観察さず、少数のマクロファージが白脾髄内部などに散在性に観察された（図-2）。この結果から、NR5A1 は辺縁帯の形成に必須であるのみならず、辺縁帯特異的に存在するマクロファージの分化や遊走に重要であることが示唆された。

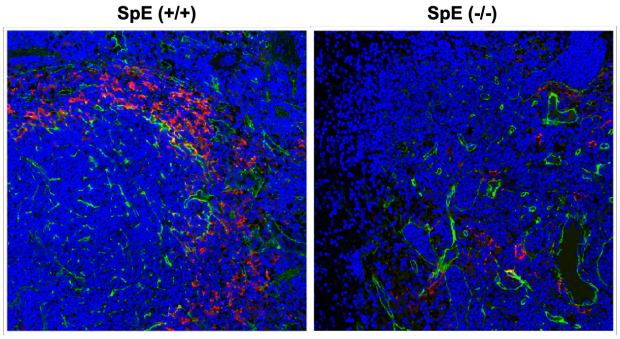


図-2：正常マウス（SpE (+/+)）では、白脾髄の周囲（辺縁帯）に MARCO 陽性マクロファージ（辺縁帯マクロファージ、赤色）が存在するが、エンハンサー欠失マウス（SpE(-/-)）では白脾髄内部などに少数存在するのみである。緑色は Laminin の免疫反応を示す。

3. リンパ球領域化の消失

白脾髄では、中心動脈の周囲に T リンパ球の領域があり、その周囲では B リンパ球がリンパ濾胞を形成している。T リンパ球のマーカーである CD3- ε、および B リンパ球のマーカーである CD45R(B220)に対する抗体を用いた免疫染色の結果、正常マウスでは、明瞭なリンパ球の領域化が確認された。一方で、エンハンサーホモ欠失マウス（SpE (-/-)マウス）では、リンパ球の領域化が大きく乱れていた（図-3）。以上の結果から、内皮細胞における NR5A1 の発現は、リンパ球の遊走および白脾髄での領域形成に必須であることが示唆された。

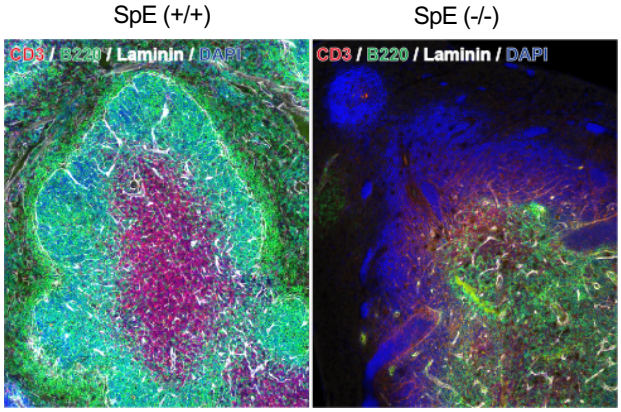


図-3：正常マウス（SpE (+/+)）では、白脾髄の中心部分に CD3- ε 陽性 T 細胞が存在し、それを取り囲むように CD45R (B220) 陽性 B 細胞が存在していた。

（白色はLaminin の免疫反応を示す）。一方、エンハンサーホモ欠失マウス（SpE(-/-)マウス）では、明らかなリンパ球の領域が存在せず、T リンパ球と B リンパ球が入り乱れて存在していた。

【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、*Nr5a1* 遺伝子ノックアウトマウスの解析から、本因子は脾洞内皮細胞の分化にも重要であることが報告されている [2]。我々はこれまで *Nr5a1* 遺伝子の組織特異的エンハンサーの探索を行い、胎仔副腎 [3]、視床下部腹内側核 [4]、下垂体ゴナドトロピン産生細胞 [5]、胎仔ライディッヒ細胞 [6]のエンハンサーをそれぞれ同定してきた。今回、*Nr5a1* 遺伝子の脾臓特異的エンハンサーを欠失させることで、脾臓特異的にNR5A1 の発現を消失するマウスの作成に成功し、これにより、脾臓における NR5A1 の機能解析が初めて可能となった。

今年度に行った HE 染色および免疫染色の結果、エンハンサー欠失マウスにおいて、脾洞内皮細胞の形態異常に加えて、辺縁帯が消失し、また、辺縁帯特異的マクロファージも消失していることが明らかになった。さらに、白脾髄内部におけるリンパ球の領域化も大きく損なわれており、内皮細胞の機能異常が、リンパ球の分化や遊走に結びついた可能性が強く推測された。今後明らかにすべき問題点として、内皮細胞において NR5A1 がどのような標的遺伝子を制御するか、という点が挙げられる。最近、全身の血管内皮細胞を対象とした単一細胞解析の結果が報告され、脾臓の血管内皮では、ステロイド代謝酵素の発現が特異的に高いことが明らかとなった [7]。これまで脾臓は非ステロイド産生組織と考えられてきたが、NR5A1 が副腎や生殖腺でステロイドホルモンの産生を制御していることを考慮すれば、脾臓の血管内皮細胞でも、ステロイド関連物質の代謝に関与している可能性が考えられる。今後は、エンハンサー欠失マウスの脾臓を用いた遺伝子発現解析や、NR5A1 抗体を用いた CUT&RUN 解析により、NR5A1 の標的遺伝子の探索を進めていく予定である。

【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. Zubari M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K: ***Mol Cell Biol*** 26:4111-21 (2006)
5. 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)
6. Shima Y, Miyabayashi K, Baba T, Otake H, Oka S, Zubair M, Morohashi K: ***Endocrinology*** 153:417-25 (2012)
7. Kalucka J, *et al*., ***Cell*** 180:764-779 (2020)

抗肺線維化分子としての脂質メディエーター分解酵素の発生工学的研究

川崎医科大学薬理学教室

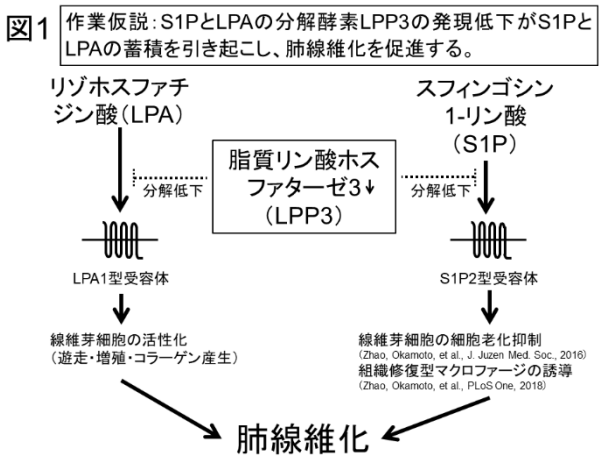
岡本安雄

（概要）

特発性肺線維症は不可逆的に肺の線維化が進行し、予測できない多様な臨床経過をたどる予後不良の疾患で、新たな治療法の開発は急務である。脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）とリゾホスファチジン酸（LPA）が肺線維化において重要な機能を有していることが明らかになってきた。私たちは抗がん薬ブレオマイシン反復投与肺線維症モデルマウスの肺を用いた網羅的解析から、ブレオマイシン投与群で S1P と LPA の分解活性を持つ脂質リン酸ホスファターゼ 3（LPP3）の遺伝子発現の低下を見出した。また、LPP3 タンパク質発現も低下していた。以上の結果から、「線維化肺では、S1P と LPA の分解酵素 LPP3 の発現低下が S1P と LPA の蓄積を引き起こし、線維化を促進する。」と考えた。単離細胞実験から、肺胞上皮細胞で LPP3 の発現が低下していた。LPP3 発現低下に関与する miR-184 と LPP3 発現増加に関与する転写因子 KLF2 を検討したところ、ブレオマイシン投与群の肺において miR-184 発現の増加および KLF2 遺伝子発現の低下が観察された。今後、LPP3 遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにし、LPP3 遺伝子発現を促進する方法が肺線維症に有効な治療法となるか否かを明らかにする予定である。

【背景・目的】

線維化（症）はアンメット・メディカル・ニーズの臨床経過をたどる予後不良の疾患で、新たな治療法の開発は急務である。スフィンゴシン 1-リン酸（S1P）とリゾホスファチジン酸（LPA）は特異的 G タンパク質共役型受容体を介して多彩な生理作用を発揮する重要な脂質メディエーターである（1）。哺乳類では、細胞内外の複数の代謝経路で常時 S1P と LPA が産生・分解されており、その代謝異常ががん悪性化、動脈硬化や線維症などの病態の誘因と考えられている。最近、肺線維症において S1P および LPA が重要な機能を有していることが明らかになってきた（1）。私たちは、S1P 2 型受容体のノックアウトマウスが野生型マウスより肺線維化が軽度であることを見出した（2）。また、LPA 1 型受容体のノックアウトマウスにおいてもマウスモデルで肺線維化が顕著に抑制されることが Tager らにより示された(3)。また、特発性肺線維症（IPF）および肺線維症モデルマウスの肺や気管支肺胞洗浄液中の S1P および LPA の濃度や産生酵素の発現が高いことから、S1P および LPA の受容体や産生酵素を標的とした治療薬の開発や臨床研究が活発に行われている（1）。しかしながら、S1P および LPA の分解にかかわる分子の肺線維化における役割については不明である。私たちは抗がん薬ブレオマイシン反復投与肺線維症モデルマウスの肺を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った（4）。S1P および LPA の受容体や代謝酵素の遺伝子変動を検討したところ、S1P および LPA の分解活性を持つ脂質リン酸ホスファターゼ 3（LPP3）の遺伝子発現が生理食塩水投与群と比較して、ブレオマイシン投与群の肺で 2 分の 1 以下に低下していた。LPP3 は 6 回膜貫通型のエクト型脂質リン酸ホスファターゼで、触媒部位は細胞膜外表面に露出し、細胞



外 S1P および LPA を分解し、S1P および LPA による情報伝達を減衰させる機能を持つと考えられている（1）。以上の結果から、「線維化肺では、S1P と LPA の分解酵素 LPP3 の発現低下が S1P と LPA の蓄積を引き起こし、線維化を促進する。」という作業仮説を立てた(図 1)。しかしながら、肺線維化における LPP3 の発現制御機構や役割は不明のままである。本研究の目的は、上記の作業仮説を検証することである。

【方法】

（1）ブレオマイシン誘発急性肺損傷モデル

ブレオマイシン誘発急性肺損傷モデルの肺を用いて、肺線維化を誘導するために、マウスにブレオマイシンを 0.035 U/g 体重で週 2 回、4 週間にわたって腹腔内投与した。投与 28 日後にマウスより肺を摘出し、実験に使用した。実験動物は川崎医科大学動物実験委員会の承認（17-111, 18-038, 18-058, 19-088, 20-118）を受け，川崎医科大学動物実験指針に基づいて研究を実施した。

（2）肺の各構成細胞の単離

マウスから磁気ビーズ細胞分離法により各構成細胞を分離した。1 mm^3 片に細かく切った肺を細胞分散溶液（コラゲナーゼ、リベレース、ディスパーゼ、DNaseI 含有）に加え、インキュベーション後、ナイロンメッシュに通し、シングルセルを得た。得られた細胞を CD16/CD32 に対する抗体で処理後、肺胞上皮細胞は、CD45、CD146、F4/80 に対する抗体に結合する血球系細胞・マクロファージ・内皮細胞・線維芽細胞を除去（ネガティブセレクション）し、肺胞上皮細胞画分を得た。マクロファージは F4/80 に対する抗体を用いて、ポジティブセレクションにより単離した。内皮細胞は CD31 に対する抗体を用いて、ポジティブセレクションにより単離した。線維芽細胞は，得られたシングルセルをディシュに播種し，3 回継代後に実験に使用した。

（3）遺伝子・タンパク質発現解析

肺および各単離細胞を用いて、qPCR を用いた遺伝子発現、ウエスタンブロット法を用いたタンパク質発現解析を行った。

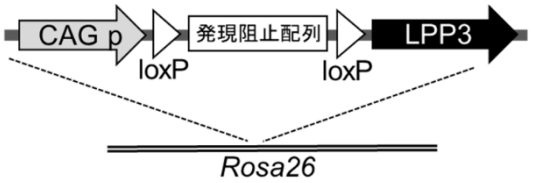


図2 LPP3ノックインマウス

（4）LPP3 ノックインマウスの作出

ROSA26 遺伝子座に CAG プロモーター制御下で、Cre 組換え酵素により loxP 配列を除去すると LPP3 を過剰発現するように遺伝子操作した LPP3 ノックインマウスを CRISPR/Cas9 を用いたノックイン技術で条件付き LPP3 発現フラグメントを導入し、作出した（図 2）(2020-2021 年度文部科学省新学術領域先端モデル動物支援プラットフォーム・モデル動物作製支援)。LPP3 ノックインマウスの作出は川崎医科大学動物実験委員会（20-118）および川崎医科大学組換え DNA 実験安全委員会（20-37, 20-38）の承認を受け，川崎医科大学動物実験指針、川崎医科大学組換え DNA 安全管理規定に基づいて研究を実施した。

【結果】

（1）線維化肺における Lpp3 の遺伝子およびタンパク発現の低下

肺線維症モデルマウスの肺を用いた網羅的解析から、ブレオマイシン投与群の肺で S1P と LPA の分解活性を持つ LPP3 の遺伝子発現の低下を見出した。コントロール群の肺と比較して、LPP3 タンパク質発

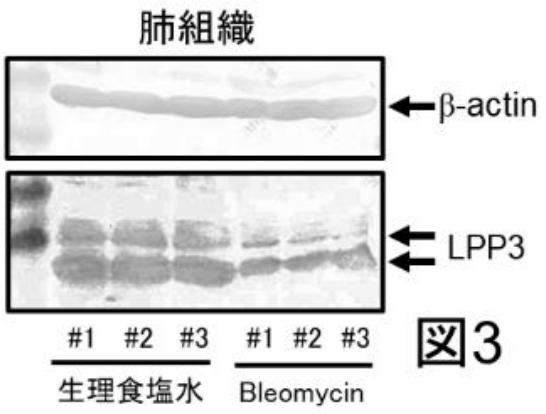


図3

現もブレオマイシン投与群の肺で低下していた（図3)。他の脂質リン酸ホスファターゼ LPP1 や LPP2 の肺組織における mRNA 発現は LPP3 と比べて低く、ブレオマイシン投与群の肺とコントロール群の肺で変化は見られなかった。

(2) 線維化肺における mir-184 の発現増加および転写因子 KLF2 の発現低下

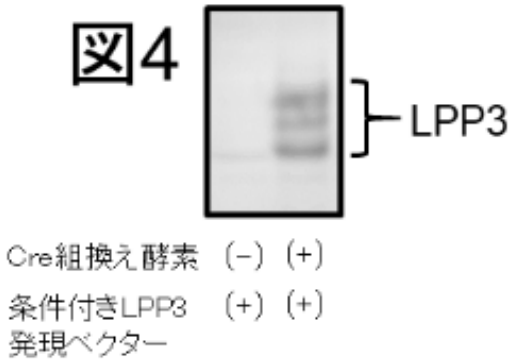
LPP3 の発現低下に関与する miR-184 と LPP3 発現増加に関与する転写因子 KLF2 を検討したところ、ブレオマイシン投与群の肺において miR-184 発現の増加および KLF2 遺伝子発現の低下が観察された。

(3) 線維化肺から単離した肺胞上皮細胞における LPP3 の遺伝子発現の低下

肺の各構成細胞を単離し、LPP3 の mRNA 発現を検討したところ、コントロール群の肺由来の単離肺胞上皮細胞と比較して、ブレオマイシン投与群の肺由来の単離肺胞上皮細胞で LPP3 の mRNA 発現が低下していた。

(4) LPP3 ノックインマウスの作出

ROSA26 遺伝子座に導入する条件付き LPP3 発現フラグメントが Cre-loxP システムにより働くかどうか検討した。HEK293 細胞に条件付き LPP3 発現ベクターと Cre 組み換え酵素を導入し、LPP3 タンパク発現と LPA 分解活性を確認した（図 4)。また、作出された LPP3 ノックインマウスからマウス胎児線維芽細胞を単離し、Cre 組み換え酵素を導入することにより LPP3 タンパク発現を確認した。



【考察】

今回得られた結果から、今後、mir-184 および KLF2 による LPP3 遺伝子の発現制御メカニズム、肺胞上皮細胞特異的に LPP3 を発現するように遺伝子操作した LPP3 コンディショナルノックインマウスあるいはアデノ随伴ウイルスを用いた LPP3 遺伝子発現を促進する方法が肺線維症に有効な治療法となるか否かを明らかにする予定である。

【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. Lysophospholipid mediators in health and disease. Kano K, Aoki J, Hla T. Annu. Rev. Pathol. 17: 459-483 (2022)
2. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 facilitates pulmonary fibrosis through potentiating IL-13 pathway in macrophages. Zhao JJ, Okamoto Y, Asano Y, Ishimaru K, Aki S, Yoshioka Y, Takuwa N, Wada T, Inagaki Y, Takahashi C, Nishiuchi T, Takuwa Y. PLoS One. 13: e0197604 (2018)
3. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD. Nat. Med. 14: 45-54 (2008)
4. Growth differentiation factor 15 facilitates lung fibrosis by activating macrophages and fibroblasts. Takenouchi Y, Kitakaze K, Tsuboi K, Okamoto Y. Exp. Cell Res. 391: 112020 (2020)

慢性炎症と骨細胞様細胞が血管石灰化を誘導する機序の解明、及びその進展抑制法の開発

（所　属）川崎医科大学　リウマチ・膠原病学

（氏　名）浅野　澄恵

（概要）

慢性炎症性疾患である乾癬の患者は冠動脈石灰化をきたし心血管イベントのリスクが高い。一方、TNF 等の炎症性サイトカインを阻害する治療(生物学的製剤)により、そのリスクを低減できる。しかし、炎症が石灰化を促進する機序は明らかでない。近年の研究で、血管石灰化は血管平滑筋細胞から骨芽細胞への形質変換が起こり（Durham AL. Cardiovasc Res 2018, Osako MK. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2013)、その血管石灰化組織中に骨細胞様細胞が存在することが報告された（Vasuri F. World J Stem Cells 2014)。

そこで本研究では、血管石灰化部位に存在する骨細胞様細胞および炎症性サイトカインに着目し、「血管石灰化形成・進展における骨細胞様細胞および炎症性サイトカイン（IL-1β、TNF、IL-6、IL-17A）の役割の解明」を行うこととした。

まず骨細胞様細胞の存在の有無について、血管石灰化モデルを作成し血管石灰化組織内の細胞に対し骨細胞マーカー(DMP1、Sclerostin、MEPE, Osteocalcin)で免疫染色を行ったが、染色される細胞は認められなかった。しかし、炎症性サイトカインを添加し、血管石灰化を誘導する実験にて、他のサイトカインに比較し、IL-17A 添加時、有意に石灰化が誘導されることを、マイクロ CT および von Kossa 染色にて確認した。

本研究から得られる知見は、IL-17A 阻害薬を既に治療薬として使用されている乾癬患者の血管石灰化を抑制する可能性があることのみならず、広く動脈硬化性疾患の病態解明と生命予後改善に寄与できると考える。

（本文）

1. 研究の背景と目的

慢性炎症性疾患である乾癬の患者は冠動脈石灰化をきたし心血管イベントのリスクが高い（McDonald CJ. N Engl J Med. 1973, Ludwig RJ. Br J Dermatol. 2007)。一方、TNF 等の炎症性サイトカインを阻害する治療(生物学的製剤)により、そのリスクを低減できる(Masson W. Adv Ther. 2020; Rungapiromnan W. Br J Dermatol. 2017)。しかし、炎症が石灰化を促進する機序は明らかでない。

血管石灰化は心血管イベントの誘因となり臨床上重要な問題であるが、「老化に伴う受動的な変性プロセス」と認識され、病態解析や治療の標的としてみなされていなかった。しかし、近年の研究で、血管石灰化は血管平滑筋細胞から骨芽細胞への形質変換が起こり、骨類似マトリックスが異所性に蓄積するという「能動的プロセス」であることが明らかにされた(Durham AL. Cardiovasc Res 2018, Osako MK. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2013)。更に、その血管石灰化組織中に骨細胞様細胞が存在し（Vasuri F. World J Stem Cells 2014)、骨細胞マーカーDMP1（Dentin Matrix Protein 1）を発現していることが報告された（Sarah-Kim B. JBMM 2019）. また、近年の骨研究により骨基質中に存在する骨細胞は、メカニカルストレスを感知し、骨芽細胞・破骨細胞の機能を調節することで骨の石灰化を誘導すること、また骨細胞自体に溶骨機能があること（Jahn K, et al.J Bone Miner Res 2017）が明らかとなった。しかし、骨細胞様細胞の機能解析を行った研究報告はなく、更にその骨細胞様細胞の機能を調節することで石灰化抑制の可能性、また石灰化退縮の可能性について検討した報告もない。もし血管石灰化部位の骨細胞様細胞が骨組織中の骨細胞と同様の機能を持つのであれば、その骨細胞様細胞の機能調節は血管石灰化抑制･退縮につながる可能性があると考えた。

そこで本研究では、血管石灰化部位に存在する骨

細胞様細胞および炎症性サイトカインに着目し、「血管石灰化形成・進展における骨細胞様細胞および炎症性サイトカイン（IL-1β、TNF、IL-6、IL-17A）の役割の解明」を行うこととした。

2. 結果

1）マウス血管石灰化モデルでの血管石灰化評価

マウス摘出大動脈組織を高濃度リン(P)存在下で培養することで石灰化を誘導できる ex vivo 血管石灰化モデル(Akiyoshi T. Atherosclerosis. 2016)と Adenine+P 負荷食により大動脈の中膜に石灰化と腎不全をきたす in vivo 血管石灰化モデルマウス(Tani T. Sci Rep. 2017）を使用し、血管石灰化の評価を行った。血管石灰化の評価は、マイクロ CT にて大動脈への石灰沈着の容積及びミネラル密度を経時的に測定しながら、併せて Ca 沈着を von Kossa 染色で組織学的解析を行った。

Ex vivo モデルでは、既報どおり経時的に血管石灰化が Day15 まで進行し、以後はプラトーになることを確認した。一方で、In vivo モデルでは検討した同胞 5 匹中 1 匹でのみマイクロ CT にて大動脈石灰化を確認できたが、体重減少と衰弱が著しく、観察期間中に死亡した。なお、他 4 匹では体重減少も大動脈石灰化も観察されず、個体差が著しい結果であったため、In vivo モデルとしての使用は難しいと判断した。

2）骨細胞様細胞の形態解析

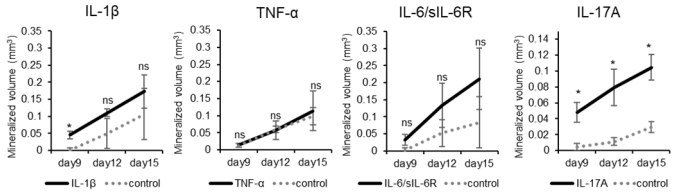
1)で作成した ex vivo モデルの血管石灰化組織内の細胞種の同定を行うため、骨細胞マーカー(DMP1, Sclerostin、MEPE, Osteocalcin)で免疫染色を行ったが、間質に染色されるものの、細胞自体の染色は認められなかった。このため、当初予定していた金コロイドを用いた TEM 観察や二光子励起顕微鏡および電子顕微鏡で細胞性ネットワークの解析に進むことができなかった。

3）炎症性サイトカイン(IL-1β、TNF、IL-6、IL-17A)の血管石灰化に及ぼす影響の解析

1)の ex vivo モデルの培養中に各炎症性サイトカイン（IL-1β、TNF、IL-6+sIL-6R、IL-17A）を添加し、血管石灰化に及ぼす影響を解析した。

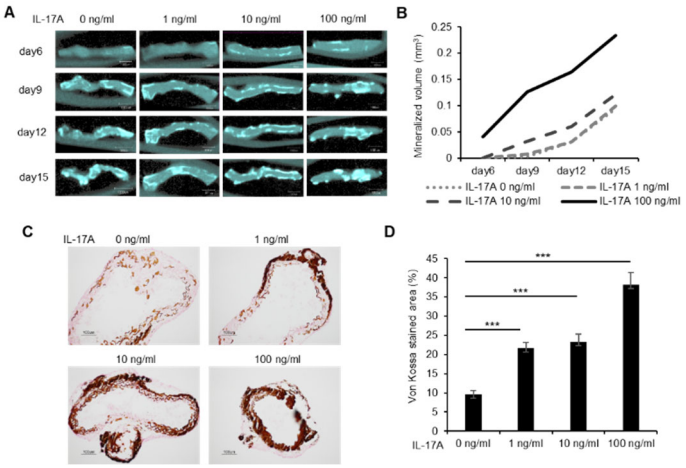
その結果、Fig. 1 に示すように他のサイトカインに比較し、IL-17A 添加群のみ非添加群と比較して有意に血管石灰化を認めた。

Fig. 1



さらに Fig.2 に示すように添加する IL-17A の濃度依存的に石灰化は有意に促進することをマイクロ CT および von Kossa 染色で確認した。

Fig. 2



3. 考察

本研究において、当初想定していた骨細胞様細胞の存在を血管石灰化組織中に見いだすことはできなかったが、IL-17A 濃度依存的に血管石灰化が促進することを ex vivo モデルで確認した。IL-17A が血管石灰化を促進する機序に関しては、血漿 IL-17A の上昇と冠動脈石灰化が生じる（Guo,M. M. Allergy. 2015） ことで知られる川崎病患者において、BMP6 autocrine 効果により， smad1/5-runx2 シグナル活性化がupregulate され，osteopontin，osteocalcin，ALP など骨マトリクス関連蛋白の発現の増加をきたし、血管石灰化が促進されることが報告されている(Chang，S. F. Cell Biosci. 2020)。

本研究から得られた知見は、IL-17A 阻害薬を既に治療薬として使用されている乾癬患者の血管石灰化

を抑制する可能性があることのみならず、このシグナル伝達機構が、広く動脈硬化性疾患の病態解明と生命予後改善に寄与できる可能性が示唆される。

謝辞

この研究成果“IL-17A promotes vascular calcification in an ex vivo murine aorta culture”はBiochemical and Biophysical Research Communicationsに採択されました(in press, 2022)。

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

海馬神経回路のシナプス形成を制御する分子機構の解明

川崎医科大学　解剖学教室

林　周一

海馬は記憶の形成や空間学習に重要である。海馬の神経回路の形成制御、特にシナプス形成制御の分子機構を理解することは、正常な記憶の形成や消失の仕組みを分子レベルで理解するだけでなく、アルツハイマー病などの神経変性疾患や統合失調症などの精神疾患の病態を分子レベルで理解するために重要である。海馬の歯状回は大脳皮質の嗅内野からの入力を受け、アンモン角 CA3 へ苔状線維を通して強力な出力をする。この苔状線維は特徴的な巨大シナプス終末を形成し、強力な出力を CA3 に伝える。苔状線維の CA3 への投射は記憶形成に重要であることが示唆されているが、そのシナプス終末形成の制御機構については未解明である。そこで本研究は、マウスを用いて海馬の苔状線維のシナプス終末形成機構を明らかにし、記憶形成の形態的・分子的基盤を解明することを目指した。

【背景】

自閉症や若年で発症する統合失調症患者では、前頭葉や海馬などで神経回路の接続に異常が疑われており、このことは、神経回路の発生の異常が青年期以降の脳機能に大きく影響することを示唆する[1,2]。したがって、海馬の神経回路の形成制御、特にシナプス形成制御の分子機構を解明することは、正常な記憶の形成や消失の仕組みだけでなく、統合失調症などの精神疾患の発症機序を解明するためにも重要である。

申請者はこれまでの研究で、大脳皮質から視床への投射回路における特徴的な巨大シナプス終末の３次元微細形態を明らかにし、この構造の形成にはシナプス小胞放出を制御する Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25)が必要であることを発見している[3]。海馬の苔状線維の巨大シナプス終末も視床の巨大シナプス終末と類似の構造をもつことから、申請者のこれまでの研究で得た知見を活かして海馬の記憶形成の回路基盤の解明ができるのではないかと考えた。

【材料と方法】

本研究は、川崎医科大学組換え DNA 実験安全委員会(承認番号：川換 19-19)および動物実験委員会(承認番号：19-065,19-066, 21-047, 21-048)の承認を得て実施した。

マウス

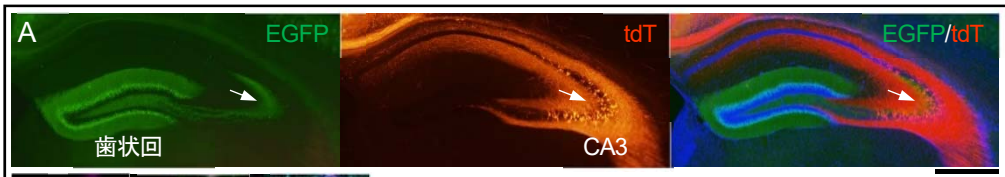
C57BL/6 と Rbp4-Cre マウス(GENSAT)、flox-Snap25 マウス(New Mexico 大学 Michael Wilson 研究室作製)、Cre 依存的に蛍光タンパク質 tdTomato を発現するレポーターマウス(Ai14, Jackson 研究所)をかけ合わせた Rbp4-Cre;Ai14;Snap25-cKO[4]を使用した。プラグを確認した日を妊娠 0.5 日(E0.5)とした。

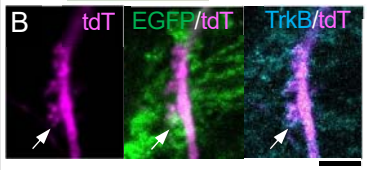
子宮内穿孔法

吸入麻酔下の妊娠 15.5 日目のマウスから子宮を取りだし、胎仔の片側の脳室に pCAG-YFP または pCAG-tdTomato と 0.1%Fast green の混合液を～1 μL 注入し、ピンセット型 5mm 径電極(NEPA GENE,CUY650P5)と遺伝子導入装置（Super Electroporator NEPA21 TypeⅡ, NEPA GENE）を用いて電圧 35V、パルスオン 50msec、パルスオフ 950msec、回数 5 回の条件で電気パルスを与えた。ゲノム編集には、pX330（Addgene より入手）に標的遺伝子配列（PAM 配列より前の 20 bp）を挿入し、大腸菌に発現させてプラスミドを精製した。

脳標本の作製と観察

生後 3 週のマウスに対して、深麻酔下で 4%パラホルムアルデヒド液による灌流固定を行い、取りだ





（図１）海馬の苔状線維-CA3 シナプス終末の標識
A, 歯状回のニューロンの一部を Cre 誘導の EGFP で、CA3 ニューロンを子宮内穿孔法による tdTomato（tdT）導入で標識した。矢印は歯状回からの軸索（苔状線維）と CA3 ニューロンの樹状突起のシナプス形成部位を示す。
B, CA3 樹状突起から伸びる棘状瘤（tdT）と苔状線維のシナプス前終末（EGFP）、シナプス終末における神経栄養因子受容体の局在（TrkB）を示す。スケールバー，A，1 mm；B，5 μm。

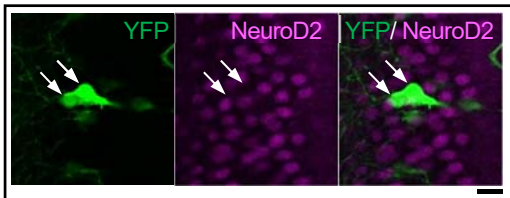
した脳を同固定液の中で 4° C、一晩固定した。固定した脳をスライサー（VT1200S, Leica）で 80 μm の厚さにスライスし、CA3 に YFP または tdTomato が発現しているスライスを選択して免疫染色を行った。核は Hoechst(1:1000, Invitrogen)で染色した。共焦点レーザー顕微鏡（LSM-700,CarlZeiss)を用いて画像を取得し、ImageJ software (https://imagej.nih.gov/ij/index.html)を用いて画像の解析を行った。

【結果と考察】

まず、海馬の苔状線維と CA3 ニューロンとの間の巨大シナプス終末（苔状線維－CA3 巨大シナプス終末）の形成において、SNAP25 が果たす役割を検討した。この巨大シナプス終末では、CA3 ニューロンの樹状突起から多数の棘状瘤と呼ばれるスパイン様構造が伸びて、それを苔状線維のシナプス前終末が包み込む形態をとる。Snap25 ヘテロ接合型では、棘状瘤が正常に形成されるのに対し、ホモ接合型では棘状瘤がシナプス前終末の中に伸長せず、その周囲のみに存在する様子が観察された。この結果は、大脳皮質－視床後核 [3] と同様に苔状線維－CA3 巨大シナプス終末の正常な形成には、シナプス前終末からの SNAP25 を介した小胞放出が重要であることを示唆する。

SNAP25 によって、どのように CA3 ニューロンの棘状瘤形成が制御されているのだろうか？この制御には、シナプス小胞から放出される神経伝達物質が後シナプス側に作用する可能性と、SNAP25 を介して放出される神経栄養因子が後シナプス側の受容体に作用する主に２つの可能性が考えられる。そこで、まず後者の可能性を検証するために、子宮内穿孔法により CA3 領域にプラスミドを導入する方法の確立を試みた。胎生 15.5 日の胎仔の脳に蛍光タンパク質（YFP または tdTomato）をコードするプラスミド液を注入し、電場をかけることによって海馬の神経前駆細胞にプラスミドを導入した。その結果、高い効率で CA1-3 領域に遺伝子導入することが可能となった(図１)。

さらにこの方法を CRISPR-Cas9 によるゲノム編集と組み合わせることにより、CA3 ニューロンの遺伝子欠損を試みた。まず、予備実験として海馬の CA3 に発現する NeuroD2 遺伝子を欠損させた。その結果、子宮内穿孔法によりプラスミドが導入された CA3 ニューロンにおいて、NeuroD2 の発現が消失することが確認できた（図 2)。今後、この系を用いて、神経栄養因子とその下流の因子の関与を検討し、シナプス終末形成の分子制御機構を解明していきたい。



(図 2) CA3 ニューロンにおける NeuroD2 遺伝子欠損
子宮内穿孔法を用いて、NeuroD2 に対するガイド RNA と Cas9 を CA3 に導入した。矢印は NeuroD2 欠損細胞の例を示す。スケールバー，20 μm。

【まとめ】

海馬の歯状回で Snap25 遺伝子を欠損させると、苔状線維－CA3 巨大シナプス終末の形態が異常にな

ることを発見した。これにより、長年不明であった記憶形成の入口となる投射回路の発生機構を解明する突破口が開かれた。さらに子宮内穿孔法とCRISPR-Cas9 によるゲノム編集を組み合わせることにより、海馬のCA3ニューロンの遺伝子を欠損させる系を確立した。今後、この系を用いてCA3ニューロンの遺伝子欠損を行うことにより、苔状線維－CA3巨大シナプス終末形成の分子制御機構を明らかにしていきたい。

【謝辞】

本研究をご支援頂きました公益財団法人ウエスコ学術振興財団に御礼申し上げます。

【文献】

1. Weinberger, D. R. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. Arch. Gen. Psychiatry, 1987;44(7):660-669
2. Birnbaum, R. and Weinberger, D. R. Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. Nat. Rev. Neurosci., 2017;18(12):727-740
3. Hayashi, S., Hoerder-Suabedissen, A., Kiyokage, E., Maclachlan, C., Toida, K., Knott, G., Molnár, Z. Maturation of complex synaptic connections of layer 5 cortical axons in the posterior thalamic nucleus requires SNAP25. Cerebral Cortex, 2021;31(5): 2625-2638
4. Hoerder-Suabedissen, A., Korrell, K., Hayashi, S., Jeans, A., Ramirez, D., Grant, E., Kavalali, E., Weick, J., Wilson, M. and Molnár, Z. Cell-specific loss of SNAP25 from cortical projection neurons allows normal development but causes subsequent neurodegeneration.
Cerebral Cortex 2019; 29(5):2148-2159

嗅覚障害の観点から考察する嗅覚調整機能

川崎医療福祉大学医療技術学部臨床検査学科

清 蔭 恵 美

嗅球の糸球体は、嗅神経によって運ばれてきた匂い入力情報を統合調整する最初の領域である。糸球体は gamma amino butyric acid （GABA）作動性の傍糸球体細胞で形成されているが、それらは含有する化学神経物質によってサブグループに分類される。なかでも tyrosine hydroxylase（TH)ニューロンは、鼻閉による入力遮断によって TH の発現量が低下することから、匂い識別機能に関わると考えられている。しかし、異なる化学物質を含有するサブグループの細胞が嗅覚機能にどの様に関わるか未だ明らかにされていない。そこで、嗅覚障害モデルマウスを作製し、TH と calbindin（CB)ニューロンの嗅球糸球体層における樹状突起支配率と単位体積当たりの小胞 GABA トランスポーターvesicular GABA transporter（VGAT）の発現について解析を行った。その結果、TH ニューロンでは、樹状突起支配率と VGAT の発現が優位に低下していたのに対し、CB ニューロンでは VGAT の発現や樹状突起の支配率には鼻閉による嗅入力遮断の影響は見られなかった。今後は、入力遮断後の TH ニューロンのシナプス形成に対してどのような影響を及ぼすか解析を行う。

はじめに

嗅覚の一次中枢である嗅球は、明瞭な層構造と、比較的少数のニューロン種から構成され、豊富な神経化学物質を含む脳領域である。嗅球表層にある糸球体は様々な化学神経物質を含有したニューロンによって構成されている。匂い情報を受けた嗅細胞の軸索は嗅球糸球体内の投射ニューロンに収束し、糸球体を構成する傍糸球体細胞によって調節され、さらに投射ニューロンの軸索を介して高次中枢へと伝達される。匂い情報を最初に調整する傍糸球体細胞は、GABA 作動性ニューロンであるが、さらに含有する化学物質によって少なくとも calbindin（CB)、calretinin（CR）と tyrosine hydroxylase （TH、ドーパミン合成酵素）の 3 つのサブグループが存在する[1]。 なかでも TH ニューロンは、嗅神経から直接入力を受け[2]、鼻閉による入力遮断によって TH の mRNA、タンパク発現量が低下することが知られている[3, 4]。また、TH ニューロンは異なる投射ニューロン間、嗅神経と投射ニューロン間に連続性シナプスを形成し、側方抑制やフィードフォワード抑制を行っている[5]、一方、CB ニューロンは嗅神経から直接入力を受けず、投射ニューロンから興奮を受けると直ぐに投射ニューロンを抑制する相反性シナプスを形成している[6]。

当該研究課題の R2 年度の助成期間中に、正常マウスの嗅球糸球体 GABA 系介在ニューロンが単位体積当たりに形成するシナプス数について解析したところ、TH ニューロンは CB ニューロンに比べ約 3 倍多くシナプスを形成するという結果が得られた。このことから、TH ニューロンは CB ニューロンよりも糸球体内抑制を惹起しやすいことが示唆された。さらにこの解析結果の理解を深めるために、嗅入力遮断を行う事で、TH ニューロンの形態と機能にどのような影響が及ぶのか CB ニューロンと共に解析を行った。

材料と方法

【動物】　本実験は、生後 7 週の雄、C57BL/6J マウス （日本 SLC、川崎医科大学動物実験委員会承認番号：21－008）4 匹を用い以下の実験を行った。

【鼻閉マウスの作製】　マウスを麻酔下の状態で、左外鼻孔の皮膚を切除し、傷口をナイロン糸（6-0）で縫合した。1 週間後に鼻閉状態を確認し、完全な鼻閉状態から 4 週間嗅入力遮断し、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液 （PB、pH7.4）で灌流固定を行った。頭蓋から取り出した嗅球は浸漬

固定後、ビブラトーム （VT 1200s, Leica）を用いて 50μm 厚の冠状断面連続スライスを作製した。

【多重免疫染色法】 嗅球スライスを 1%牛血清アルブミンリン酸ナトリウム緩衝液（BSA-PBS)に入れ、20℃で 1 時間ブロッキング反応を行った。その後、以下の一次抗体を組み合わせて、20℃で 4 日間反応させた：(1) ニワトリ抗 TH 抗体 （Abnova、cat#PAB29094、1:1000 希釈）(2) ウサギ抗 Vesicular Gamma Amino Butyric Acid Transporter (VGAT)抗体（MILLIPORE、cat#AB5062P、1：5000 希釈）(4) ヤギ抗 calcium-binding (CB) 抗体 (Calbindin D28K (C-20)、 Santa Cruz Biotechnology, INC、Ccat#sc-7691、1：5000 希釈)。一次抗体反応後、0.1 M PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行い、以下の蛍光標識二次抗体を組み合わせ 20℃で 2 時間反応させた：(1) cy™3 標識ロバ抗ウサギ IgG (Jackson ImmunoResearch、cat#711-165-152、1：200 希釈) (2) Fluorescein (FITC)標識ロバ抗ニワトリ IgY (Jackson ImmunoResearch、cat#703-095-155、1：200 希釈) (3) cy™3 標識ロバ抗ヤギ IgG (Jackson ImmunoResearch、cat#713-165-147、1:200 希釈)。封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-700, Zeiss: x40/NA 1.4 oil plan-apochromat objective lens, zoom = 2) で標本を観察し、嗅球内側と外側の糸球体層をから 1 カ所ずつ選び 3 次元撮影した。光学ステップ 0.38μm で 9 枚の連続断面画像 (X = 79.94 μm, Y = 79.94 μm, Z = 3.42 μm の画像サイズ) を取得し、ニューロントレースとシナプスマーカー分布の解析に用いた。

【ニューロントレース】 嗅入力遮断による TH および CB ニューロンの形態に及ぼす影響を調べるため、未処置マウス (Intact) と、鼻閉対側嗅球 (Open) と鼻閉同側嗅球 (Close) からそれぞれ得られた連続断面画像を用い、Neurolucida (ver. 11, Micro Bright Field) で各ニューロンの樹状突起のトレースを行った。撮影した画像にグリッド (5μm×5μm) を重ね、25μm×25μm のサンプリング領域を糸球体内に 3 箇所任意に設定した。各サンプリング領域から 5μm 毎にトレース個所 (5μm×5μm) を 9 個選び、樹状突起が認識できるそれぞれの深さ (Z 方向) で、樹状突起の内接をトレースした。トレースをした樹状突起の形態解析を行うため Neurolucida Explorer (ver. 11, MBF) を用いて、単位体積当たり (5μm×5μm×3.42μm^3) の樹状突起の総体積(μ m^3)から支配率(%)を求めた。

【VGAT の局在解析】 鼻閉による TH、CB ニューロンの神経伝達物質に対する影響を確認するため、抗 TH、CB 抗体と GABA 作動性ニューロンのシナプス前部のマーカーである抗 VGAT 抗体を用いた多重蛍光染色を行った。ニューロントレースで用いた共焦点レーザー顕微鏡による連続断面画像を用い、またサンプリングエリアもニューロントレースと同じ領域を選び Neurolucida を用いて TH、CB 免疫陽性(+)と VGAT+の共存斑点数をカウントした。

サンプリングバイアスを排除するため、撮影した画像にグリッド（＝カウンティングフレーム；5μm×5μm) を重ね、5μm 間隔毎にカウンティングフレームを設定するシステマチック・ランダムサンプリング法により 27 箇所を選び計測した。カウント対象は、TH+/VGAT+、CB+/VGAT+、TH 免疫陰性(-)/VGAT+、CB-/VGAT+とした。また、カウンティングフレームの左と上の inclusion line に被った免疫陽性斑点 (IR-puncta) はカウントし、右と下の exclusion line に被ったものはカウントしないというルールを設定した。さらに、1 枚目は look-up section としてカウントせず、一度カウントしたものはカウントしないという optical disector 法[7]を用いて計測を行った。

【統計解析】 得られたデータは、それぞれ統計解析ソフト (GraphPad Prism9) 用い、各ニューロン間、および Intact、Open、Close マウス間で平均値の比較を行った (One-way ANOVA, Tukey’s multiple comparison test)。なお、図のすべての数値は、平均±標準誤差 (Mean ± SEM) で表し、$P<0.05$ を統計的有意差有りとした。

結果

【鼻閉による嗅球への影響】

嗅入力遮断の効果を確認するため､抗 TH 抗体を用いて鼻閉マウス嗅球スライスの免疫染色を行った（図１）。鼻閉同側嗅球(Close)の TH＋細胞数が対側嗅球(Open)に比べて顕著に減少しており、入力遮断の効果が組織レベルで確認できた。この結果を基に移行の解析を行った。

【鼻閉による TH、CB ニューロンの形態への影響】

嗅球糸球体内における単位体積当たりにしめる TH、CB ニューロンの樹状突起の支配率について解析を行った。Intact マウス嗅球で、TH と CB ニューロン間の比較を行ったところ、TH ニューロンの支配率が CB ニューロンよりも高かった(TH;12.37±0.82μm, CB;1.91±0.54μm, TH vs CB,$p<0.0001$)。さらに鼻閉マウスの Open、Close 側の嗅球でそれぞれ比較を行った（図２）。TH ニューロンでは、Close 側だけでなく Open 側嗅球においても樹状突起の支配率が有意に減少していた（図２左)。これに対し CB ニューロンは Intact、Open、Close 間で明らかな差は見られなかった（図２右)。

【神経伝達物質に対する影響】

鼻閉による除入力が、傍糸球体細胞の機能に対してどのような影響を及ぼすかを確認するため、GABA をシナプス小胞内に取り込むトランスポーターのマーカーである VGAT と、抗 TH、CB 抗体のそれぞれと多重蛍光染色を行った (図３A)。TH ニューロンと CB ニューロンの樹状突起 (緑) に局在する VGAT+ (黄) を TH+/VGAT+、CB+/VGAT+とし、それ以外に局在する VGAT+ (赤) を TH-/VGAT+、CB-/VGAT+とし、単位体積当たり(5×5×3.42μm^3) における VGAT＋斑点数について TH、CB ニューロンで解析を行った（図３B)。

Intact マウスで VGAT の発現を各ニューロン間で比較すると、TH ニューロンが CB ニューロンよりも VGAT の発現が多かった（TH+/VGAT+;11.83±0.78, CB+/VGAT+;1.26±0.29, $p<0.0001$)。さらに、鼻閉による VGAT 発現への影響をみたところ、TH ニューロンの TH+/VGAT+ 数はClose 側嗅球で著しく減少していた（Intact; 11.83±0.78, Open; 11.66±0.59, Close; 2.51 ± 0.28, Intact and Open vs Close, $p<0.0001$、図３B 左)。TH-/VGAT+数には鼻閉による変化が見られなかったが（図３B 中)、総 VGAT+数が Close 側で減少していたことから（Intact; 34.67 ± 1.39, Open; 36.46 ± 1.33, Close; 27.21 ± 0.73, Intact and Open vs Close, $p<0.0001$、図３B 右)、TH ニューロン樹状突起支配率減少に伴う変化が考えられた。一方、CB ニューロンが発現する VGAT 数には変化が見られず、入力遮断による形態と伝達物質への影響は低いことが示唆された。

考察

嗅球糸球体は、嗅神経を介して送られてきた匂い情報を最初に処理する部位である。その情報を調整するのが傍糸球体細胞で、それらは様々な神経化学物質を含有する GABA のサブグループから構成されている。しかし、異なる化学物質を含有するニューロンの機能については未だ明らかになっていない。そこで本研究では、鼻閉による各傍糸球体細胞の形態と神経伝達物質への影響について解析を行った。その結果、TH ニューロンは嗅入力遮断によって、嗅球糸球体内での樹状突起の支配率と、VGAT の発現に著しい低下がみられたのに対し、CB ニューロンには殆ど影響がみられなかった。

これまでの先行研究では、鼻閉によって嗅球内の GABA の発現は mRNA およびタンパクレベルでも変化が見られないと報告されていた [8]。しかし、細胞レベルでの VGAT+数の定量解析を行ったところ、初めて GABA の発現に変化が認められた。

TH ニューロンは、嗅神経から多数のシナプスを受けているため [9]惹起されやすく、糸球体内抑制に大きく関わっていることが考えられている [10]。糸球体内抑制を促進させることで、糸球体間の活動性のコントラストを際立たせ、におい識別機能に関わることが示唆された。つまり、TH ニューロンの発現調節を行うことで、匂いの検出や識別など嗅覚調整機能の調整も可能となり、嗅覚障害メカニズムの解明や治療などの臨床分野にも貢献できると考える。

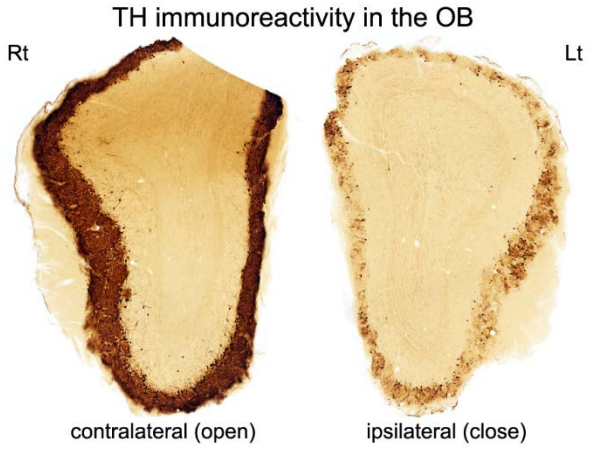
謝辞

川崎医科大学 解剖学教室 樋田一徳主任教授からの助言に感謝申し上げます。

参考文献

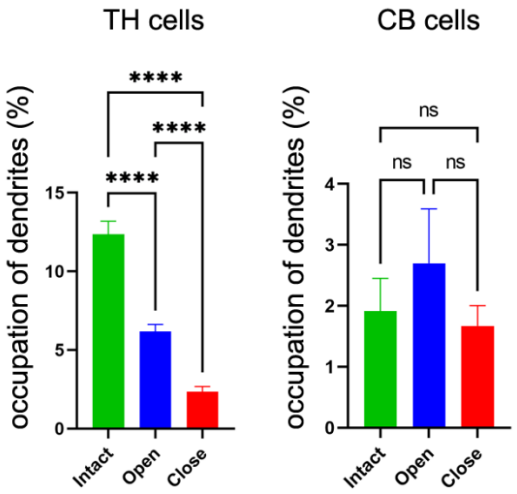
1. Kosaka K et al, Neurosci Res, 23(1), 73-88, 1995.
2. Kosaka K et al, Neuroscience, 76(3), 775-786, 1997.
3. Stone DM et al, J Comp Neurol, 311, 223-233, 1991.
4. Baker H et al, Brain Res, 614, 109-116, 1993.
5. Toida k et al, Neuroscience, 101(1), 11-17, 2000.
6. Toida K et al, J Comp Neurol, 392(2), 179-198, 1998.
7. Sterio DC, J Microscopy, 134(Pt 2), 127-136, 1984.
8. Baker H et al, Brain Res, 450, 69-80, 1988.
9. Kiyokage E et al, J Comp Neurol, 525(5), 1059-1074, 2017. Cover
10. Najac M et al, J Neurosci, 35(10), 4319-4331, 2015.

【図１】鼻閉マウス嗅球の TH 免疫反応性



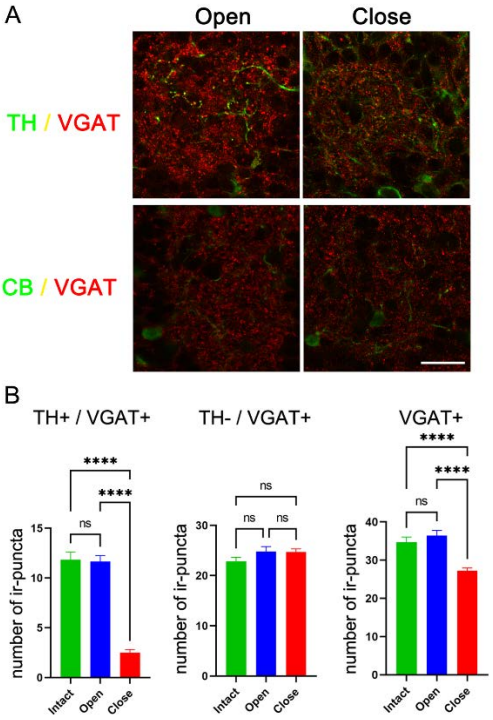
右嗅球（鼻閉対側）に比べ、左嗅球（鼻閉同側）糸球体層での TH 免疫反応性が低下している。

【図２】鼻閉による樹状突起支配率への影響



体積当たりの（5×5×3.42μm^3）に占める各ニューロンの樹状突起の総体積の割合。****p<0.0001
Intact：未処置マウス嗅球、Open:鼻閉対側嗅球、Close：鼻閉同側嗅球

【図 3】鼻閉による VGAT 発現への影響



A. 蛍光多重染色画像。VGAT（赤）、TH および CB（緑）
B. 体積当たりの（5×5×3.42μm^3）に占める TH+/VGAT+:TH に発現する VGAT 免疫斑点数、TH-/VGAT+：TH 以外の細胞に発現する VGAT 免疫斑点数、VGAT+：総 VGAT 免疫斑点数。

Tリンパ球由来アセチルコリンと運動による降圧に関する基礎的研究ー乳酸に着目してー

川崎医療福祉大学 医療技術学部 健康体育学科

山形　高司、小柳　えり

近年、降圧を目的とした新たな運動方法として、等尺性筋力トレーニングによる顕著な降圧効果に注目が集まっている。しかし、この降圧機序に関しては十分に明らかにされていない。本研究は、これまでの検討とは全く異なる神経免疫学的な新たなアプローチから運動による降圧機序について検討することを目的とした。T リンパ球からのアセチルコリン分泌による降圧作用ならびに等尺性筋力トレーニング時の乳酸が降圧に有効に作用したとする先行研究の知見から、アセチルコリン分泌を促すノルアドレナリン刺激に乳酸が付加されることで T リンパ球を介したアセチルコリン分泌を促進させると仮説立てた。そこで、基礎的研究としてヒト由来 T 細胞（Jurkat 細胞）を用いて、ノルアドレナリン刺激ならびにノルアドレナリン＋乳酸刺激に伴うアセチルコリン分泌の違いについて検討した。結果、ノルアドレナリン刺激およびノルアドレナリンに乳酸を加えた刺激条件におけるアセチルコリン分泌の差はみられなかった。今後、細胞内でのアセチルコリン合成および細胞外への分泌、ならびに運動トレーニングを想定した繰り返し刺激など、詳細な検討が求められる。

【背景】

等尺性筋力トレーニングは、降圧薬と同程度もしくはそれ以上の降圧効果を認める可能性が示されるなど、近年注目を集めている[1)]。これらの運動は、これまでに高血圧の運動処方の中心を担ってきた中等度強度の有酸素性運動とは異なる降圧機序が考えられるが、そのメカニズムは十分に明らかにされていない。

神経免疫学領域において、T リンパ球へのノルアドレナリン刺激がアセチルコリンを分泌し、抗炎症作用を呈することが報告された[2)]。さらに、このTリンパ球をマウスに投与した際、アセチルコリンが一酸化窒素合成を促進させることで血管拡張作用を高め、血圧が低下することが示された[3)]。そこで、我々は運動時の交感神経活動の顕著な亢進がみられる等尺性筋力トレーニングによる降圧機序には、ノルアドレナリン分泌の促進に伴うTリンパ球由来のアセチルコリン分泌の増大が関わるとした仮説を設定した。

さらにヒトを対象とした先行研究では、等尺性筋力トレーニング時の血中乳酸値が高い者ほど強い降圧効果を認めるとした報告がある[4)]。乳酸はTリンパ球の分化に働くなど[5)]、乳酸が免疫細胞の機能的変化を誘導する可能性があることから、T リンパ球へのノルアドレナリン刺激に乳酸刺激を加えることで更なるアセチルコリン分泌の増大が認められるとの仮説を設定した。

そこで、本研究は基礎的な研究として、T リンパ球へのノルアドレナリン刺激および乳酸刺激によるアセチルコリン分泌への影響を in vitro でヒト由来T細胞から検討することを目的とした。

【方法】

1. 細胞培養

細胞は、ヒト白血病由来のT細胞（JurkatE6.1細胞）を用いた。細胞培養は、10%FBS-RPMI1640 培地を用い、37℃、5.0% CO_2、95% Air 環境下で実施した。

2. 実験条件

FBS 無添加の RPMI1640 培地に交換し、96 ウェルプレートに細胞を播種し（1×10^5cells/well）、37℃、5.0% CO_2環境下で 30 分以上安定させた後、超純水（MQ）を添加するコントロール条件（以下、CON 条件）、ノルアドレナリン（1 mM/well）で刺激する NA 条件、ノルアドレナリン（1 mM/well）と乳酸（10 mM/well）で刺激する NA+La 条件の 3 条件、各 30 分および 60 分の刺激を実施した後、遠心分離(4000rpm、

4℃、5 分）後の上清を回収し、-30℃で保存した。アセチルコリンの分析には、アセチルコリン分析キット(Abcam)を用いた。

3. 統計

統計処理には、GraphPad Prism version 8 を用いた。30 分および 60 分における CON 条件、NA 条件、NA+La 条件のアセチルコリン分泌量を Kruskal-Wallis 検定にて比較した。有意水準は、5%未満とした。

【結果】

結果を表 1 に示す。いずれの刺激時間においても統計的な差は認められなかった。統計的な差は認められなかったものの NA 条件および NA+La 条件では、CON 条件よりもアセチルコリン分泌量が低値を示す可能性を示唆する結果を認めた。

表 1. T 細胞からのアセチルコリン分泌量の比較

	30 min	60 min
CON	2.1(0.1)[a]	2.3(0.2)[a]
NA	0.8(0.5)[b]	0.6(0.1)[a]
NA+La	1.0(0.6)[b]	0.5(0.1)[a]

平均値（標準偏差）、[a] n = 2、[b] n = 4　　(nmol/l)

CON：コントロール条件

NA：ノルアドレナリン条件

NA+La：ノルアドレナリン+乳酸条件

【考察】

本研究は、等尺性筋力トレーニングによる降圧機序の解明を目的とする基礎的研究として、in vitro でヒト由来 T 細胞を用い、ノルアドレナリン刺激による T リンパ球からのアセチルコリン分泌が乳酸刺激により相乗効果を認めると仮説立てして検討を行った。その結果、両刺激条件で明らかな差は認められなかった。一方、両刺激条件において、CON 条件よりもアセチルコリン分泌量が低値を示す結果を得た。

本研究で得られた CON 条件におけるアセチルコリン濃度は、Jurkat 細胞（刺激なし）を用いた先行研究と同程度であり [6]、測定結果は妥当であったと考えられる。Jurkat 細胞を用いたノルアドレナリン刺激に対するアセチルコリン分泌量の変化を見た報告は知る限り見られず、本研究が初めての検討である。マウスの脾臓から採取した T 細胞を用いた先行研究の検討では、ノルアドレナリン刺激が濃度依存的にアセチルコリン分泌量を増大させることが報告されている [2]。そこで本研究もノルアドレナリン刺激に伴うアセチルコリン分泌量の増加を期待したが、予想に反して減少する結果を得た。これらの要因は、T 細胞内におけるアセチルコリン合成の抑制、もしくはアセチルコリン分泌が抑制されたかのいずれかが考えられる。アセチルコリンの分泌に関しては、Vesicular Acetylcholine Transporter(VAChT)が調整役を担っており、神経細胞では細胞質内で合成されたアセチルコリンは VAChT によって小胞に取り込まれて貯蔵され、分泌の機会を待つことが報告されている [7]。一方、T リンパ球における VAChT の存在および他のアセチルコリン貯蔵メカニズムについては不明であり [8]、今後の検討が必要である。

本研究のアセチルコリン分析過程で算出するコリン濃度において、NA 条件と NA+La 条件が CON 条件よりも低い傾向を認めた。すなわち、細胞外のコリンを T 細胞が積極的に取り込みアセチルコリン合成に利用した可能性が示唆される。神経細胞では、コリントランスポーターである High affinity choline transporter（CHT1）を介して細胞外より取り込んだコリンをアセチルコリン合成に利用することが示されている [9]。T リンパ球においても CHT1 の発現が認められている [10]。今後、T リンパ球における細胞外からのコリン取り込みならびに細胞内におけるアセチルコリン合成および分泌に関連するメカニズムに着目した詳細な検討が必要である。

本研究は、等尺性筋力トレーニングに伴う降圧機序に対する T リンパ球由来のアセチルコリン分泌の作用を検討するにあたり、初期アプローチとして一過性の運動を想定した in vitro の細胞実験を実施した。運動による降圧は、運動の繰り返しによって効果が認められることから、今後は繰り返し刺激による T リンパ球由来のアセチルコリン分泌能の変化について詳細な検討を進めていきたい。これらの免

疫細胞を介した運動による降圧効果が明らかになることは、これまでに無い個人個人の免疫細胞の特徴から降圧を目的とした適切な運動を処方する新しい運動処方への展開、牽いては本邦で最も患者数の多い生活習慣病である高血圧患者の減少ならびに付随する心血管系障害のリスク軽減に繋がるものと期待される。

【謝辞】

本研究に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感謝いたします。また、研究遂行にあたり、川崎医療福祉大学矢野博己教授ならびに運動生理・免疫学研究室（LEPI）の皆様に多大なるご協力を賜りました。ここに記して、謝意を表します。

【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ありません。

【参考文献】

1) Edwards J, De Caux A, Donaldson J, Wiles J, O'Driscoll J. Isometric exercise versus high-intensity interval training for the management of blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Sports Medicine*. 2021;56(9):506-514.
2) Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science.* 2011;334(6052):98-101.
3) Olofsson PS, Steinberg BE, Sobbi R, et al. Blood pressure regulation by CD4(+) lymphocytes expressing choline acetyltransferase. *Nature Biotechnology*.2016;34(10):1066-1071.
4) Devereux GR, Coleman D, Wiles JD, Swaine I. Lactate accumulation following isometric exercise training and its relationship with reduced resting blood pressure. *Journal of Sports Sciences*. 2012;30(11):1141-1148.
5) Bröer S. Lactate transportation is required for lymphocyte activation. *Nature Chemical Biology*.2005;1(7):356-7.
6) Chester AH, McCormack A, Miller EJ, Ahmed MN, Yacoub MH. Coronary vasodilation mediated by T cells expressing choline acetyltransferase. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2021;321(5):H933-H939.
7) Usdin TB, Eiden LE, Bonner TI, Erickson JD. Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends in Neurosciences*. 1995; 18(5):218-24.
8) Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2008;106(2):186-192.
9) Okuda T, Haga T. High-affinity choline transporter. *Neurochemical Research*. 2003; 28(3):483-488.
10) Fujii T, Okuda T, Haga T, Kawashima K. Detection of the high-affinity choline transporter in the MOLT-3 human leukemic T-cell line. *Life Sciences*. 2003;72(18-19):2131-2134.

岡山県の医療機関におけるDPCデータを用いたICDコーディングの精度検証
- 肺炎の詳細不明コードの場合 -

川崎医療福祉大学　医療情報学科

樫村菜穂　本野勝己　三田岳彦

我が国の急性期医療機関では、包括医療費支払制度（DPC/PDPS）を採用している場合が多い。DPCコードの決定には最も医療資源を投じた傷病名に対し適正なICD-10コードを付与することが必要となる。ICD-10コードとDPCコードの関係については、しばしば診療内容と不合致なICD-10コードの選択が議論となっており、とくにICD-10コードにおいては、「詳細不明コード」（いわゆる .9 ）の選択が多い施設においては、診療報酬上の条件としてペナルティーが科せられている3)。また、DPC/PDPSの対象施設になるにはこの「詳細不明コード」の付与割合が全退院患者数割合で10%以下が条件となっている3)。したがって、この「詳細不明コード」を多用している医療施設におけるDPCコーディングにおいては精査が必要である。そこで、本研究では岡山県の医療機関のDPCデータのうち、「肺炎」の症例を対象に、ICD-10コードの付与状況を客観的にとらえ、そのコーディングの傾向について様式1データ（患者属性や病態等の情報）を基に検証を行った。

背景・目的

我が国の急性期医療機関では、包括医療費支払制度（DPC/PDPS）を採用している場合が多い。このような医療機関においては、入院患者の治療エピソードのうち、最も医療資源を投じた傷病名を選択し、そのICD-10コード（国際疾病分類第10版/傷病名をコード化したもの）に基づきDPCコード（入院診療支払点数）を決定することになる。したがって、適正なICDコードを付与する事が重要であり、それにより入院診療費はもとより、死因や疾病のデータの分析、解釈が正確なものとなる[1)2)]。

ICD-10コードとDPCコードの関係については、しばしば診療内容と不合致なICD-10コードの選択が議論となっており、とくにICD-10コードにおいては、「詳細不明コード」（いわゆる .9 ）の選択が多い施設においては、診療報酬上の条件としてペナルティーが科せられている3)。また、DPC/PDPSの対象施設になるにはこの「詳細不明コード」の付与割合が全退院患者数割合で10%以下が条件となっている[3)]。したがって、この「詳細不明コード」を多用している医療施設におけるDPCコーディングにおいては精査が必要である。

平成19年度 第7回 診療報酬調査専門組織・DPC評価分科会」における「ICDコーディングにおける.9（詳細不明コード）発生頻度の検証」[4)]では、平成15年度参加病院（現在のⅠ群病院）の発生頻度が31.1%となっており、とくに肺炎（J189）及び肺がん（C349）、乳がん（C509）で多数を占めていた。しかしながら、本野らの研究[1)]では平成26年度のDPC病院Ⅰ群の「部位不明・詳細不明コード」使用割合は 7.4%と格段に使用割合は低くなっており、「詳細不明コード」の発生疾患も、心停止（I469）が一番となっていた。肺がん（C349）及び乳がん（C509）は上位にランクされていたが、肺炎（J189）は上位10には入っておらず、「詳細不明コード」の発生頻度が著しく減少している。

そこで本研究では、岡山県の医療機関のDPCデータのうち、「肺炎」の症例を対象に、ICD-10コードの付与状況を客観的にとらえ、そのコーディングの傾向について様式1データ（患者属性や病態等の情報）を基に検証を行う。

対象・方法

研究対象は、岡山県の医療機関から収集した 2020 年度の DPC データである様式 1（患者属性や病態等の情報）から、「医療資源を最も投入した傷病名」（以下、最投入傷病名）の ICD10 コードが J09-J18（肺炎）に分類される 20 歳以上の症例。

集計方法及び集計項目は、ICD10 コード別施設別出現数、ICD10 コード別詳細（性別、年齢、在院日数、肺炎重症度評価（A-DROP）[5]、Hugh-Jones（表１）[6]、院内・市中肺炎別）、「J189：肺炎，詳細不明」症例の肺炎重症度評価（A-DROP）別詳細項目数（1.Age：70 歳以上(男性)･75 歳以上(女性)、2. Dehydration: BUN21 mg/dℓ以上または脱水あり、3.SpO2>90%を維持するのにFiO2 35%は要さない･FiO2>=35%を要する、3.Respiratory failure:SpO2 90%以下(PaO2 60 Torr 以下)、4.Orientation Disturbance：意識障害あり、5. Blood Pressure：血圧（収縮期）90mmHg 以下)、悪性腫瘍あり又は免疫不全状態あり、CRP>=20 mg/dℓ又は胸部X線写真陰影の広がりが一側肺の2/3以上、Hugh-Jones、院内・市中肺炎別、入院時培養検査あり及び放射線検査あり、とした。なお肺炎重症度（A-DROP）評価は、合致項目数０項＝軽症、1 又は 2 項目＝中等症、3 項目=重症、4-5 項目＝超重症とした（図１）[5]。また、入院時の培養検査及び放射線検査については、DPC データにおける F ファイルデータ（行為明細情報）から検査項目の抽出を行った（培養検査については【D018 細菌培養同定検査】実施症例、放射線検査については【Ｅ001 写真診断】又は【Ｅ200 コンピューター断層撮影（ＣＴ撮影)】のうちどれか一つでも実施している症例を１とした)。

なお、本研究の実施にあたっては、川崎医療福祉大学倫理委員会の許可を得た。

結　果

表２は ICD10 コード別施設別出現数を示す。2020 年度の DPC データ収集に協力を得た施設は 10 施設であり、対象症例総数は 852 例であった。ICD10 コード別では「J159：細菌性肺炎，詳細不明」が 376 例（44.1%）と最も多く、そのうち最も発生率が高かった施設は 74.3%、最も発生率が低かった施設は 0%だった。次に多かったのは、「J189：肺炎,詳細不明」は 253 例（29.7%）で、そのうち最も発生率が高かった施設は 66.8%、最も発生率が低かった施設は 2.6%だった。

表３は ICD10 コード別の症例詳細数を示す。対象症例の性別では男性が 560 例（65.7%）、女性 292 例（34.3%）であった。対象症例の年齢平均は 78.1 歳（標準偏差 13.12）、在院日数平均は 19.37 日であった。肺炎重症度評価（A-DROP）では軽症が 82 例（9.6%）、中等症が 569 例（66.8%）、重症が 136 例（16.0%）、超重症が 7.6%であった。Hugh-Jones ではⅠが 151 例（17.7%）、Ⅱが 92 例（10.8%）、Ⅲが 96 例（11.3%）、Ⅳが 155 例（18.2%）、Ⅴが 117 例（13.7%）、分類不能が 241 例（28.3%）であった。院内・市中肺炎別では、院内肺炎が 44 例（5.2%）、市中肺炎が 787 例(92.4%)、その他が 21 例(2.5%)であった。

表４に「J189：肺炎，詳細不明」症例の肺炎重症度評価（A-DROP）別の詳細項目を示す。詳細項目「1.70 歳以上（男性）・75 歳以上（女性）」に該当する症例が 209 例（82.6%）と最も多く、次いで「2.BUN21 mg/dℓ以上又は脱水あり」が 106 例（41.9%）、次いで「3.SpO2>90%を維持するのに FiO2 35%は要さない」が 62 例（24.5%）であった。また、「悪性腫瘍あり又は免疫不全状態あり」が 58 例(22.9%)、「CRP>=20 mg/dℓ又は胸部Ｘ線写真陰影の広がりが一側肺の 2/3 以上」が 56 例（22.1%）であった。「入院時に培養検査」を実施していた症例が 12 例（4.7%）、「放射線検査」を実施していた症例が 192 例（75.9%）であった。

図２は各施設別の肺炎総症例数における「J189：肺炎，詳細不明」発生症例数の散布図である。

診療録管理体制加算算定施設別の退院患者総件数と「J189:肺炎，詳細不明」使用件数の散布図である。退院患者総件数と「J189：肺炎，詳細不明」使用件数には直線関係が認められなかった。

考　察

岡山県の医療機関から収集した肺炎症例の ICD10 コード別の詳細について検証を行った。

肺炎は大きく分けて３つのタイプがある[7]。一つは細菌（細菌性肺炎）、二つ目はウイルス（ウイルス性肺炎）、その２つの中間的な性質をもつ微生物（非定型肺炎）である。いずれも、感染の経路としては、発症している人の咳に含まれる病原微生物が、口や鼻から入り込んで感染する「飛沫感染」と、ドアノブなどに付着した病原微生物が自分の手の指を経由して口や鼻から体の中に入り込んで感染する「接触感染」である。一般的には、肺炎や風邪などの感染は、飛沫感染であることが多いのが特徴である。また、感染機序としては、一般的には自宅で日常生活を送る中で、病原微生物に感染し、肺炎を発症する「市中感染」と、入院などした時に病院などの施設内で肺炎に感染する「院内肺炎」であり一般に入院して約２日以上経過した患者に発生する肺炎である[7]。

ICD10 コード別施設別肺炎出現数に見る「J18.9：肺炎，詳細不明」のコード割合に注目すると、最低施設で 2.6%、最高施設で 66.8%とそのコーディング割合には大きなバラツキがあった（表２）。これは図２に示した通り、各施設の肺炎症例数と「J18.9：肺炎，詳細不明」のコーディングには正の相関が認められないことから、各施設固有の特徴と考えられる。また、ICD10 コード別発生数では「J15.9：細菌性肺炎， 詳細不明」が 376 件で全体の 44.1%を占めており、「J18.9:肺炎，詳細不明」の 29.7%を上回っていた。本研究で対象とした肺炎の ICD10 コードで「詳細不明」とコーディングされていたのは、「J129：ウイルス肺炎，詳細不明」「J159：細菌性肺炎，詳細不明」「J180：気管支肺炎，詳細不明」「J181：大葉性肺炎，詳細不明」「J188：その他の肺炎，病原体不詳」「J189：肺炎，詳細不明」であり、これらの総割合は 85.4%に上っている。したがって、本野ら[1]の研究では「J189：肺炎，詳細不明」の発生率が「ICD コーディングにおける.9（詳細不明コード）発生頻度の検証」[4]時より減少しているとの報告であったが、本研究では他の「詳細不明」コードに分散されている可能性が示唆された。

次に対象症例の詳細であるが、男性が 65.7%と女性の 1.9 倍であり、平均年齢は 78.1（SD13.12）歳と高齢者であった。平均在院日数は 19.37 日であり、中央値も 19.86 と３週間以内の入院となっていた（表３）。また、肺炎重症度評価（A-DROP）は、中等症が 569 件（66.8%）と最も多く、次いで重症の 136 件（16.0%）と中等症以上の評価で 90%以上を占める結果となっており、Hugh-Jones 分類でも「Ⅳ：休み休みでなければ50m以上歩けない。」が155件(18.2%)、「Ⅴ：会話・着替えにも息切れがする。息切れの為外出できない。」が 117 件（13.7%）となっており、どちらも重篤な評価症例が多いことが示された。感染機序としては市中肺炎が 787 件で全体の 92.4%を占めているが、「J159：細菌性肺炎，詳細不明」で 25 件、「J13：肺炎レンサ球菌による肺炎」で３件など、院内肺炎と特定しているケースもみられた。

次に「J18.9:肺炎，詳細不明」症例の内訳であるが、肺炎重症度評価（A-DROP）の詳細うち、「1.70 歳以上（男性）75 歳以上（女性）」が 209 件（82.6%）と最も多く、次いで「2.BUN21 mg/dℓ以上、又は脱水あり」が 106 件（41.9%）であった（表４）。肺炎重症度評価（A-DROP）詳細項目のうち１～２に該当する場合は中等症と評価するため、中等症以上の評価が多い要因は表３の平均年齢でも示された通り、「1.70 歳以上（男性）75 歳以上（女性）」に該当する症例が多いことがその要因の一つであると推察された。また、Hugh-Jones 分類でも「分類不能」となっているのは 54 件（21.3%）であり、残りの約 79%の症例は詳細な評価を行っていることになる。このように、DPC データにおける様式１には、肺炎患者の詳細な症状評価のデータは収載されている。一方で、「J18.9：肺炎，詳細不明」とコーディングされている症例のうち、「悪性腫瘍あり又は免疫不全状態あり」が 58 件（22.9%）あることから、これらの疾病に起因する肺炎が疑われる可能性がある。また、入院時検査では放射線検査の実施が 192 件（75.9%）であるのに対し、培養検査の実施が 12 件（4.7%）と少ない結果となった。肺炎の診断には、代表的なものとして画像検査、血液検査などがあるが、原因となった細菌や真菌、微生物などを口腔、気道又は呼吸器から採取する培養検査などが必要となるため、病原微生物を特定した詳細なコーディングを行うため

にはこれらの検査が必要である。したがって、これらの検査が実施されていないことが「J18.9:肺炎，詳細不明」や「J15.9:細菌性肺炎，詳細不明」などの詳細不明コードとしてコーディングされている要因の一つと推察される。

本研究の限界は、サンプルデータの提供施設が 10 施設と少なく、図 2 に示した通り各施設でのコーディング傾向に偏りが発生している可能性がある。また、各症例の基礎疾患や入院時の状態、入院後の治療経緯など診療内容や診療記録の精査が行われていないことである。実際の臨床場面では的確に診断がされ、その判断に基づいて治療が行われていると考えられるので、その診断内容がそのまま ICD10 コードとしてコーディングされていないとの懸念は払拭できない。

一方で本研究の意義であるが、提供施設や症例数は少ないが、肺炎患者の状態が DPC データでもある程度把握できることが示唆された。また、「J18.9:肺炎，詳細不明」は先行研究からは減少傾向であったが、実態は他の「詳細不明コード」が 85.4%を占めていることを考えると、今後も継続して調査を実施したいと考える。

結語

岡山県の医療機関から収集した肺炎症例の ICD10 コード別の詳細について検証を行った。

先行研究においては「J18.9：肺炎，詳細不明」コードの使用が減少していることが報告されていたが、本研究の検証では「J15.9：細菌性肺炎，詳細不明」など、他の詳細不明コードに分散されている可能性が示唆された。

DPC データにおける様式 1（患者属性や病態等の情報）には、肺炎患者の詳細な症状評価のデータは収載されているが、詳細不明コードを解消するための評価データの収載は無かった。また、F ファイルデータ（行為明細情報）から入院時の検査実施項目の抽出は可能であるが、その検査所見については DPC データのみでは不明である。今後はこれらのデータセットにも、ある程度の臨床的な所見情報の収載の検討が必要である。

謝辞

本研究はウエスコ学術振興財団、令和 3 年度川崎医療福祉研究費の補助により実施した。

Hugh-Jones とは、呼吸器疾患患者の運動機能と呼吸困難からみた重症度（I～V 段階）評価基準である。慢性閉塞性肺疾患患者の呼吸困難について Fletcher CM が提唱（Proc R Soc Med 1952; 45: 577－84）したため，Fletcher-Hugh-Jones 分類とも呼ばれる。

日本救急医学会，医学用語 解説集:
https://www.jaam.jp/dictionary/dictionary/word/0603.html#:~:text=%E5%91%BC%E5%90%B8%E5%99%A8%E7%96%BE%E6%82%A3%E6%82%A3%E8%80%85%E3%81%AE,Hugh%2DJones%E5%88%86%E9%A1%9E%E3%81%A8%E3%82%82%E5%91%BC%E3%81%B0%E3%82%8C%E3%82%8B%E3%80%82

1）本野 勝己， 谷川 智宏， 阿南 誠， 村松 圭司，松田 晋哉， 伏見 清秀：DPC 病院群別「部位不明・詳細不明コード」の使用件数と使用率の分析―ICD コーディングにおける.9 の発生率の検証， 診療情報管理（日本診療情報管理学会誌）,32(3)，57-61，2020

2）西岡 綾，本野 勝己，愛甲 亜希子，村上 玄樹，林田 賢史：当院の傷病名登録における「部位不明・詳細不明コード」(.9 コード)の状況に関する考察，診療情報管理（日本診療情報管理学会誌），31(3)，85-88，2020

3）谷川 智宏， 本野 勝己， 阿南 誠， 松田 晋哉：診療録管理体制加算算定施設別「部位不明・詳細不明コード」の使用件数と使用割合の分析，川崎医療福祉学会誌 31(1) 261-268 2021 年

4)「平成 19 年度 第 7 回 診療報酬調査専門組織・DPC 評価分科会」における「ICD コーディングにおける.9 発生頻度の検証」
https://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/11/dl/s1102-4a.pdf

5）糖尿病患者の「水晶体再建術等(K282 $)」実施症

例における医療資源を最も投入した傷病名の選択について：「DPC/PDPS 傷病名コーディングテキスト」の検証. 樫村 菜穂，本野 勝己，阿南 誠，村松 圭司，松田 晋哉，伏見 清秀. 診療情報管理：日本診療情報管理学会誌 32(4)，47-51，2021.(査読あり)
6）厚生労働省保険局医療課：平成 30 年度データ提出加算説明会資料（平成 30 年 5 月 16 日説明会資料,）
https://www.mhlw.go.jp/topics/2018/04/dl/tp20180419-2.pdf，2018.8.19
7）ＭＳＤマニュアルプロフェッショナル版
https://www.msdmanuals.com/ja-jp/%E3%83%97%E3%83%AD%E3%83%95%E3%82%A7%E3%83%83%E3%82%B7%E3%83%A7%E3%83%8A%E3%83%AB/05-%E8%82%BA%E7%96%BE%E6%82%A3/%E8%82%BA%E7%82%8E/%E9%99%A2%E5%86%85%E8%82%BA%E7%82%8E
8)「060060 胆嚢、肝外胆管の悪性腫瘍」における ICD コーディングについて ： 癌による胆管閉塞で閉塞解除や減黄術を施行した場合の医療資源を最も投入した傷病名の選択について，本野 勝己，村松 圭司，得津 慶，大谷 誠，松田 晋哉，伏見 清秀. 診療情報管理： 日本診療情報管理学会誌 31(1)， 49-52，2019.（査読あり）

図 1

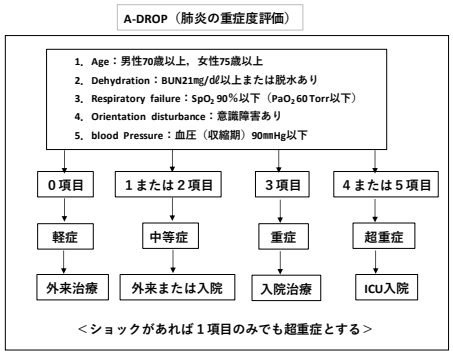


図 2

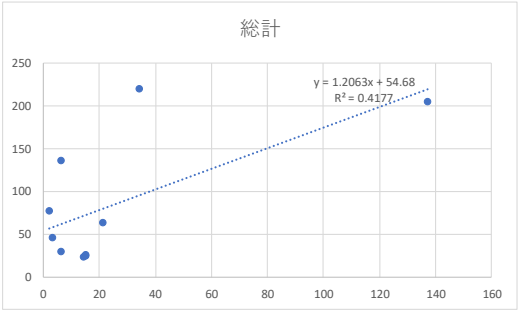


表 1

Hugh-Jones分類表

分類	所見
Ⅰ	同年齢の健康者と同様の労作ができ、歩行、階段昇降も健康者並みにできる。
Ⅱ	同年齢の健康者と同様に歩行できるが、坂道・階段は健康者並みにはできない。
Ⅲ	平地でも健康者並みに歩けないが、自分のペースなら1マイル(1.6km)以上歩ける。
Ⅳ	休み休みでなければ50m以上歩けない。
Ⅴ	会話・着替えにも息切れがする。息切れの為外出できない。

Hugh-Jonesとは、呼吸器疾患患者の運動機能と呼吸困難からみた重症度（Ⅰ～Ⅴ段階）評価基準である。慢性閉塞性肺疾患患者の呼吸困難についてFletcher CMが提唱（Proc R Soc Med 1952; 45: 577 - 84）したため，Fletcher-Hugh-Jones分類とも呼ばれる。

表 2

ICD10 / 施設	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	総計	
J129 ウイルス肺炎，詳細不明		7	1	1							9	
J13 肺炎レンサ球菌による肺炎	6	17		4		1		7	6	18	59	
J14 インフルエンザ菌による肺炎		3								1	4	
J150 肺炎桿菌による肺炎	1	5					1	1	2		10	
J151 緑膿菌による肺炎		6		2		1		1	1		11	
J152 ブドウ球菌による肺炎	1	3			1			6	1	1	13	
J154 その他のレンサ球菌による肺炎		3									3	
J155 大腸菌による肺炎		3									3	
J156 その他の好気性グラム陰性菌による肺炎	1	2						2			5	
J157 マイコプラズマ肺炎	1	1							7		9	
J159 細菌性肺炎，詳細不明	49	120	6	20	10	5	23	42		101	376	
	63.6%	54.5%	26.1%	31.3%	38.5%	20.0%	76.7%	20.5%	0.0%	74.3%	44.1%	
J160 クラミジア肺炎									4		4	
J171 他に分類されるウイルス性疾患における肺炎				1							1	
J173 寄生虫症における肺炎										1	1	
J178 他に分類されその他の疾患における肺炎		1									1	
J180 気管支肺炎，詳細不明	12	13	1	15		2		6	7	6	62	
J181 大葉性肺炎，詳細不明		1							15	1	17	
J188 その他の肺炎，病原体不詳	4	1	1			1		3		1	11	
J189 肺炎，詳細不明	2	34	14	21	15	15	6	137	3	6	253	
	2.6%	15.5%	60.9%	32.8%	57.7%	60.0%	20.0%	66.8%	6.5%	4.4%	29.7%	
総計	77	220	23	64	26	25	30	205	46	136	852	

表3

ICD10		n	性別		年齢		在院日数	肺炎重症度評価（A-DROP）				Hugh-Jones					
			M	F	平均	標準偏差		軽症	中等症	重症	超重症	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	分類不能
J129	ウイルス肺炎，詳細不明	9	6	3	64.2	13.80	7.67	5	4		0	2	0	4	2	0	1
J13	肺炎レンサ球菌による肺炎	59	31	28	80.2	11.54	27.22	5	39	8	7	8	6	5	11	12	17
J14	インフルエンザ菌による肺炎	4	3	1	82.8	12.32	11.25	0	4		0	1	0	1	2	0	0
J150	肺炎桿菌による肺炎	10	9	1	85.8	6.77	15.50	0	7	1	2	1	0	0	2	3	4
J151	緑膿菌による肺炎	11	9	2	67.9	16.11	21.73	0	10		1	0	0	2	2	3	4
J152	ブドウ球菌による肺炎	13	9	4	81.4	8.19	33.08	0	4	6	3	0	2	3	3	1	4
J154	その他のレンサ球菌による肺炎	3	3		72.8	2.37	9.67	0	3		0	0	1	0	0	1	1
J155	大腸菌による肺炎	3	1	2	77.4	3.11	15.00	0	2		1	0	0	0	1	0	2
J156	その他の好気性グラム陰性菌による肺炎	5	2	3	70.9	9.53	16.00	0	4	1	0	2	0	0	1	1	1
J157	マイコプラズマ肺炎	9	4	5	77.7	21.01	21.22	1	6	2	0	0	2	0	4	0	3
J159	細菌性肺炎，詳細不明	376	250	126	78.3	12.48	19.87	35	255	61	25	56	40	37	74	52	117
J160	クラミジア肺炎	4	2	2	78.7	9.98	24.00	1	3		0	1	0	0	3	0	0
J171	他に分類されるウイルス性疾患における肺炎	1	0	1	80.0	0.00	61.00	0	1		0	0	0	1	0	0	0
J173	寄生虫症における肺炎	1	0	1	75.4	0.00	31.00	0	1		0	0	1	0	0	0	0
J178	他に分類されるその他の疾患における肺炎	1	1	0	76.0	0.00	30.00	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
J180	気管支肺炎，詳細不明	62	39	23	73.8	17.46	16.23	8	43	9	2	18	7	1	8	8	20
J181	大葉性肺炎，詳細不明	17	7	10	84.4	16.76	16.76	1	12	2	2	1	2	0	5	1	8
J188	その他の肺炎，病原体不詳	11	7	4	73.7	9.37	28.09	4	5	2	0	2	1	1	2	0	5
J189	肺炎，詳細不明	253	177	76	78.7	12.21	17.09	22	166	43	22	59	30	41	34	35	54
	総計 / 平均	852	560	292	78.1	13.12	19.37	82	569	136	65	151	92	96	155	117	241
			65.7%	34.3%				9.6%	66.8%	16.0%	7.6%	17.7%	10.8%	11.3%	18.2%	13.7%	28.3%

表4

重症度	該当項目数	n	肺炎重症度評価詳細						悪性腫瘍あり 又は 免疫不全状態あり	CRP>=20mg/dℓ 又は 胸部X線写真陰影の広がりが一側肺の2/3以上	院内肺炎	市中肺炎	その他	入院時検査		Hugh-Jones					
			1.70歳以上（男性）75歳以上（女性）	2.BUN21mg/dℓ以上 又は 脱水あり	3.SpO_2>90%を維持するのに FiO_2 35%は要さない	FiO_2>=35%を要する	4. 意識障害あり	5. 血圧（収縮期）90 mmHg以下						培養検査	放射線検査	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	分類不能
軽症	0	22	0		0	0	0	0	9	5	1	21		1	19	11	4	2	3	1	1
中等症	1-2	166	148	52	29	7	4	7	38	25	2	159	5	7	126	40	21	32	30	15	28
重症	3	43	41	34	24	17	6	7	6	13	2	41		3	32	7	4	7	1	13	11
超重症	4-5	22	20	20	9	11	21	17	5	13	1	21	0	1	15	1	1	0	0	6	14
総計		253	209	106	62	35	31	31	58	56	6	242	5	12	192	59	30	41	34	35	54
			82.6%	41.9%	24.5%	13.8%	12.3%	12.3%	22.9%	22.1%	2.4%	95.7%	2.0%	4.7%	75.9%	#	#	#	#	#	21.3%

岡山県の MDC 別患者の要介護度分析

川崎医療福祉大学　医療福祉マネジメント学部　医療情報学科

大井　悠成

団塊の世代が 75 歳を迎える 2025 年問題がせまっている今，効果的で効率的な医療や介護の提供体制を整えるため，医療と介護のデータ分析は必要不可欠と言える．そこで本研究班では，岡山県内の医療施設を対象に医科及び介護レセプト，DPC データを収集し，これらのデータを使用して医療から介護へのサービス内容について分析を行い，地域医療の推進に寄与することを目的とした．そのうち今回の研究では，DPC データを使用した疾病別要介護別の要介護状態，退院後の在宅医療の有無，退院先について分析を行った．分析の結果，MDC01 は医療ニーズが高い疾患グループであることが示唆された．MDC04 は医療ニーズが高い疾患グループだが在宅での療養が比較的可能であることが示唆された．MDC05 は「低栄養状態」での「在宅医療が必要」な率が高いことが示された．MDC16 は医療ニーズが高く，在宅療養が比較的難しい疾患グループであることが示唆された．この研究で主要診断群という大きな疾患グループではあるが，それぞれの臓器疾患や身体状態の患者の退院時の状態による退院先やその属性などが介護サービスという視点から明らかにすることができた．

1. 背景･目的

団塊の世代が 75 歳を迎える 2025 年問題がせまっている今，効果的で効率的な医療や介護の提供体制を整えるため，医療と介護のデータ分析は必要不可欠と言える．しかし，医科レセプト及び介護レセプトのシームレスな分析は制度上の問題として簡単な作業とは言えない [1)]．したがって，これまでは NDB などの公的な機構からデータを借りて分析するなどの手段を用いていた [2)]．しかしながらこの方法も，借用時の手続きなどの煩雑さや保管管理規程上の制約から，なかなか普及するに至っておらず，以て DPC の公開データや病床機能報告などが専らの分析データとなっている．

岡山県の医療計画において，目指すべき医療提供体制を実現するための施策として，医療施設の役割分担と連携の促進が掲げられているが，実際の患者動向については断片的な情報しか入手できていない．特に後期高齢者の場合，医療ニーズは複合的であるので，医療と介護の両面から総合的にアプローチする必要があるにもかかわらず，具体的な情報を示すことが出来ないため，その対策は進んでいない．介護サービスを受ける人口が増えていくなか，質の高い医療サ及び介護サービスを提供していくためにこれらの情報を連結しての分析が望まれる．

そこで本研究班では，岡山県内の医療施設を対象に医科レセプト及び介護レセプト，DPC データの提供協力を募集し，これらのデータを使用して医療から介護へのサービス内容について分析を行い，地域医療の推進に寄与することを目的とする．そのうち今回の研究では，DPC データを使用した疾病別要介護別の要介護状態，退院後の在宅医療の有無，退院先について分析を行う．

2. 対象･方法

研究対象は，岡山県の医療機関から収集した 2020 年度の DPC データである様式1(患者属性や病態等の情報)から「患者属性」「退院情報」「要介護度」「要介護情報」，D ファイル(包括診療明細情報)から「分類番号」である．

分析項目は，介護保険利用の多い 65 歳以上の脳血管障害，誤嚥性肺炎，狭心症，骨折患者[3)]が分類さ

れている主要診断群 MDC01, MDC04, MDC05, MDC16 に属している患者の要介護度別, 性別, 年齢, 退院先と退院時の要介護情報, 退院後の在宅医療の有無についての記述統計である. 要介護度は「要支援1～要介護5」「申請なし」「申請中」「不明」の 10 項に分類されており, 以下に「要支援1～要介護5」+「申請中」の8項目を包含して「サービス利用者」とする.

なお, 医療機関からの各データ収集の際には, 個別に「データの取扱に関する覚書」及び「承諾書」をもって使用契約を結んだ.

3. 結果

表1に対象となった 65 歳以上の施設別要介護度別患者数を示す. 対象症例は, 岡山県内の7つの医療施設から収集した 34,040 件で, サービス利用者は 9,389 件(27.6%), 「申請なし」もしくは「不明」件数が 24,651(72.4%)であった. サービス利用者のうち最も多かったのは, 「要介護2」が 1,827 件(19.5%), 次いで「要介護1」の 1,708 件(18.2%)であった.

表2に MDC 別要介護度別患者数を示す. MDC 別対象症例総数及びサービス利用者数で「MDC06」が 8,598 件(25.3%), 1,846 件(19.7%)と最も多かった. 本研究で対象とした「MDC01」は 2,184 件(6.4%), 「MDC04」は 3,937 件(11.6%), 「MDC05」が 5,712 件(16.8%), 「MDC16」は 2,977 件(8.7%)であった. サービス利用者数では「MDC01」で 834 件(8.9%), 「MDC04」で 1,260 件(13.4%), 「MDC05」で 1,636 件(17.4%), 「MDC16」で 1,279 件(13.6%)であった.

表3に対象 MDC 別要介護度別患者属性及び退院先患者数を示す. MDC 別患者数に占めるサービス利用者割合では, 「MDC01」が 38.2%, 「MDC04」が 32.0%, 「MDC05」が 28.6%, 「MDC16」が 43.0%であった. また, MDC 別退院先における家庭の症例総数割合では, 「MDC05」が 84.2%と最も高く, 「MDC01」が 48.9%と最も低かった. サービス利用者数の男女比は, 「MDC01」が男性 45.1%, 女性 54.9%, 「MDC04」が男性 59.5%, 女性 40.5%, 「MDC05」が男性44.0%, 女性56.0%, 「MDC16」が男性 29.3%, 女性 70.7%であった. また, 男女別サービス利用者の平均年齢は, 「MDC01」が男性 80.9 歳, 女性 85.1 歳, 「MDC04」が男性 82.3 歳, 女性85.2歳, 「MDC05」が男性83.1歳, 女性86.3歳, 「MDC16」が男性 84.2 歳, 女性 86.4 歳であった.

表4に対象 MDC 別退院先別要介護状態及び在宅医療が必要な患者数を示す. MDC 別患者数に占める「低栄養状態」割合では, 「MDC01」が 5.5%, 「MDC04」が 13.2%, 「MDC05」が 14.0%, 「MDC16」が 2.3%であった. また, 「摂食・嚥下機能障害」割合では, 「MDC01」が 11.4%, 「MDC04」が 3.2%, 「MDC05」が1.5%, 「MDC16」が1.4%であった. 「在宅医療が必要な患者」割合では, 「MDC01」が 7.6%, 「MDC04」が 6.7%, 「MDC05」が 3.7%, 「MDC16」が 6.6%であった.

4. 考察

岡山県内の7つの医療施設から収集した DPC データを用いて 65 歳以上の主要診断群 MDC01, MDC04, MDC05, MDC16 に属している患者の退院時の状況について, 要介護度を中心に記述統計を行った.

本研究で収集したデータのサービス利用者割合は, 全退院患者の 27.6%であり, その内「要支援1」～「要介護2」までの症例がサービス利用者の全体の 67.0%を占めていた(表1). これは全対象症例の 18.5%であり, サービス利用者数としては比較的少ないと思われる.

次に MDC 別要介護度の状況であるが, 全対象症例における MDC 分類では「MDC06」の消化器系疾

患，肝臓・胆道・膵臓疾患が 25.3%と最も多かった（表2）．これらの結果については，先行研究[4]でも同様の報告があり，消化器系，肝臓・胆道・膵臓系のがんが占める割合が高いことが挙げられている．サービス利用者の割合においても，「MDC06」が 19.7%と最も高く，がん患者のサービス利用率の高さが示唆された．これは高齢化の進展により医療ニーズと介護ニーズの複合化が進む中，かつては脳梗塞などの脳血管障害や認知症（MDC01），誤嚥性肺炎などの呼吸器疾患（MDC04），そして転倒などによる骨折（MDC16）などの疾患が，要介護状態に至る主要な疾患となっていた[3]．しかしながら，これらの医療ニーズと介護ニーズの狭間を埋めるべくスタートした介護保険制度も，制度の成熟化に伴い多様な疾患を原因とした介護サービスの利用者が増加していることの表れと思われる．また，近年では高齢者における慢性疾患の狭心症や心不全，高血圧などの循環器疾患（MDC05）も増加しており，これらの疾患の管理には医療と介護のどちらも必要となる．本研究ではこのような理由から「MDC01」「MDC04」「MDC05」「MDC16」の4つの分類を対象とした．

「MDC01」の特徴としては，全対象症例の 38.2%がサービス利用者であり，若干ではあるが女性が54.9%と男性を上回っている（表3）．また，男性女性共に「要介護2」の割合が最も高く，要介護度が高くになるに従い「介護老人保健施設」「介護老人福祉施設」「社会福祉施設，有料老人ホーム等」「介護医療院」への退院率が高くなっている．次に「MDC04」の特徴としては，男性が 59.5%と男性患者の比率が高くなっている．また，サービス利用者の家庭への退院率が19.4%と対象とした MDC の中では最も低かったが，他の病院・診療所への退院率は 66.6%と最も高く，これは医療ニーズの高さを示唆したものと思われる．次に「MDC05」の特徴としては，全対象症例の 28.6%がサービス利用者であり，これは対象とした MDC の中では最も低い率である．また，退院先としては「終了（死亡）」が 67.0%とこちらは対象とした MDC の中では最も高い率となった．最後に「MDC16」の特徴としては，全対象症例の 43.0%がサービス利用者であり，対象とした MDC の中では最も高い率であった．また，女性が 70.7%，平均年齢も 86.4 歳とこちらも対象とした MDC の中では最も高い率であった．対象症例全体では「他の病院・診療所」への退院率が 41.6%（MDC01 と同率）と最も高く，全体的に医療ニーズの高さが示唆された．松田ら[3]によると，筋骨格系の移動障害を持った高齢者は概ね「要支援1」～「要介護1」程度に分布し，疼痛治療やリハビリテーションなどのサービスを受けながら比較的安定した状態にあると報告しているが，本研究の結果では，「要支援1」～「要介護3」までがそれぞれ 10%～20%で分布しており，医療ニーズの高い症例も多く含まれていると推察される．

最後に要介護状態であるが，各 MDC において「低栄養状態」「摂食・嚥下機能障害」「経管・経静脈栄養」ともに有りの症例は「他の病院・診療所」への退院率が高くなっている（表4）．「MDC01」の特徴としては，「摂食・嚥下機能障害」が 11.4%，「経管・経静脈栄養」が15.5%と，各 MDC の中では最も高い率となっている．これは脳血管障害などによる摂食障害が要因と推察されるが，嚥下の機能障害が明らかな分，「経管・経静脈栄養」などの処置により「低栄養状態」の率は低く抑えられていると推察される．また，「在宅医療が必要」な率も各 MDC の中では最も高く，医療ニーズが高い疾患グループであることが示された．次に「MDC04」の特徴であるが，「低栄養状態」が 7.2%と各 MDC の中では最も高く，「経管・経静脈栄養」も 5.5%と「MDC01」についで高い率となっている．しかしながら退院先の全症例数割合では「家庭」への退院率が 73.0%と「MDC05」の 84.2%についで高いこと，「在宅医療が必要」な率も 6.7%と「MDC01」についで高いことから，医療ニーズは高いが在宅での療養が比較的可

能な疾患グループであることが推察される．次の「MDC05」は比較的特徴が薄いが，「低栄養状態」での「在宅医療が必要」な率が高いことが挙げられる．慢性心不全や高血圧であれば減塩食や水分摂取などの食事管理が必要であることから，その延長上としての「低栄養状態」の発生が考えられる．したがって，在宅での栄養管理指導などの介入も必要である．最後に「MDC16」の特徴であるが，「低栄養状態」「摂食・嚥下機能障害」「経管・経静脈栄養」の全てにおいて，退院先が「他の病院・診療所」への率が最も高くなっている．これは全症例数割合でも 41.6%となっており，在宅療養が比較的難しい疾患グループであることが示唆された．

本研究の限界は，サンプルデータの提供施設が7施設と少なく，傷病分類も主要診断群という大きな疾病グループで行ったことである．本来であればもう少し傷病名を絞って行うことが望ましいと考える．また，各症例の基礎疾患や診療内容，退院時の家庭的背景など診療記録の精査が行われていないことである．退院先の調整は，病状や身体状態にもよるが，家庭的・経済的要因に左右されるところが大きいと思われる．

一方で本研究の意義であるが，主要診断群という大きな疾患グループではあるが，それぞれの臓器疾患や身体状態の患者の退院時の状態による退院先やその属性などが介護サービスという視点から明らかにしたことである．今後は高齢者に多い疾患に絞った分析を実施したいと考えている．

5. 結語

岡山県内の7つの医療施設から収集したDPCデータを用いて 65 歳以上の主要診断群 MDC01，MDC04，MDC05，MDC16 に属している患者の退院時の状況について，要介護度を中心に記述統計を行った．

本研究の分析から，疾患グループにおける退院後の医療及び介護ニーズについての考察を行った．

謝辞

本研究はウエスコ学術振興財団及び令和 3 年度川崎医療福祉研究費の補助により実施した．

参考文献

1） 厚生労働省：第1回医療・介護データ等の解析基盤に関する有識者会議．https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000206551.html,2018.（2022.4.29 確認）
2） 松田 晋哉，村松 圭司，得津 慶，藤本 賢治，大谷 誠，藤野 善久 ．医療・介護のビッグデータ分析 NDB オープンデータをいかに活用するか ．社会保険旬報 （2720）.2018. p. 18-23
3） 松田晋哉，藤本 賢治，大谷 誠，藤野 善久 ．医療・介護のビッグデータ分析(2)要介護度別にみた傷病構造の分析 ．社会保険旬報(2704）．2018 ． p.22-27 .
4） 松田 晋哉，藤野 善久．医療保険・介護保険レセプトと特定健診データの連結分析システムの開発 ．フィナンシャルレビュー ．2015 , p. 69-91 .

表1 施設別要介護度別患者数(65 歳以上)

	サービス利用者数										申請なし	不明	総計
	要支援 1	要支援 2	要介護 1	要介護 2	要介護 3	要介護 4	要介護 5	申請中	小計				
A	88	98	172	256	191	166	189	53	1,213	61.5%	700	59	1,972
B	579	860	654	739	461	303	183	163	3,942	24.7%	11,748	268	15,958
C	13	45	49	54	46	29	18	3	257	22.9%	867		1,124
D	46	91	76	63	64	39	21	23	423	51.5%	397	2	822
E	281	199	352	330	224	175	112	54	1,727	28.3%	4,351	25	6,103
F	33	35	51	44	39	44	19	3	268	45.7%	316	2	586
G	201	187	354	341	204	128	81	63	1,559	20.9%	5,740	176	7,475
総計	1,241	1,515	1,708	1,827	1,229	884	623	362	9,389	27.6%	24,119	532	34,040
	13.2%	16.1%	18.2%	19.5%	13.1%	9.4%	6.6%	3.9%	100.0%			72.4%	

表2 MDC 別要介護度別患者数(65 歳以上)

	サービス利用者数																							
	要支援 1		要支援 2		要介護 1		要介護 2		要介護 3		要介護 4		要介護 5		申請中		小計		申請なし	不明	総計	
＊MDC01 神経系疾患	91	10.9%	91	10.9%	154	18.5%	174	20.9%	105	12.6%	93	11.2%	80	9.6%	46	5.5%	834	8.9%	1,327	23	2,184	6.4%
MDC02 眼科系疾患	50	21.6%	64	27.7%	35	15.2%	46	19.9%	23	10.0%	11	4.8%	1	0.4%	1	0.4%	231	2.5%	1,158	12	1,401	4.1%
MDC03 耳鼻咽喉科系疾患	14	23.0%	15	24.6%	17	27.9%	5	8.2%	4	6.6%	3	4.9%	2	3.3%	1	1.6%	61	0.6%	444	4	509	1.5%
＊MDC04 呼吸器系疾患	134	10.6%	155	12.3%	173	13.7%	222	17.6%	195	15.5%	176	14.0%	157	12.5%	48	3.8%	1,260	13.4%	2,598	79	3,937	11.6%
＊MDC05 循環器系疾患	240	14.7%	322	19.7%	304	18.6%	340	20.8%	191	11.7%	139	8.5%	55	3.4%	45	2.8%	1,636	17.4%	3,971	105	5,712	16.8%
MDC06 消化器系疾患、肝臓・胆道・膵臓疾患	295	16.0%	282	15.3%	365	19.8%	368	19.9%	220	11.9%	144	7.8%	94	5.1%	78	4.2%	1,846	19.7%	6,649	103	8,598	25.3%
MDC07 筋骨格系疾患	63	14.8%	106	24.8%	72	16.9%	79	18.5%	48	11.2%	22	5.2%	14	3.3%	23	5.4%	427	4.5%	1,667	28	2,122	6.2%
MDC08 皮膚・皮下組織の疾患	9	5.9%	28	18.3%	23	15.0%	32	20.9%	29	19.0%	12	7.8%	18	11.8%	2	1.3%	153	1.6%	224	6	383	1.1%
MDC09 乳房の疾患	7	18.4%	13	34.2%		0.0%	12	31.6%	2	5.3%	1	2.6%		0.0%	3	7.9%	38	0.4%	175	5	218	0.6%
MDC10 内分泌・栄養・代謝に関する疾患	44	14.2%	46	14.8%	77	24.8%	58	18.7%	33	10.6%	23	7.4%	22	7.1%	7	2.3%	310	3.3%	555	15	880	2.6%
MDC11 腎・尿路系疾患及び男性生殖器系疾患	72	8.6%	111	13.2%	136	16.2%	163	19.4%	115	13.7%	108	12.8%	110	13.1%	27	3.2%	842	9.0%	2,048	61	2,951	8.7%
MDC12 女性生殖器系疾患及び産褥期疾患・異常妊娠分娩	3	8.1%	12	32.4%	9	24.3%	4	10.8%	3	8.1%	3	8.1%	1	2.7%	2	5.4%	37	0.4%	192	2	231	0.7%
MDC13 血液・造血器・免疫臓器の疾患	48	15.3%	59	18.8%	53	16.9%	51	16.2%	37	11.8%	25	8.0%	16	5.1%	25	8.0%	314	3.3%	1,255	12	1,581	4.6%
MDC14 新生児疾患、先天性奇形	2	40.0%	1	20.0%		0.0%	1	20.0%		0.0%		0.0%		0.0%	1	20.0%	5	0.1%	10		15	0.0%
MDC15 小児疾患																						
＊MDC16 外傷・熱傷・中毒	156	12.2%	203	15.9%	267	20.9%	253	19.8%	211	16.5%	100	7.8%	41	3.2%	48	3.8%	1,279	13.6%	1,633	65	2,977	8.7%
MDC17 精神疾患	2	25.0%	1	12.5%	1	12.5%	1	12.5%	1	12.5%	2	25.0%		0.0%		0.0%	8	0.1%	7	1	16	0.0%
MDC18 その他の疾患	11	10.2%	6	5.6%	22	20.4%	18	16.7%	12	11.1%	22	20.4%	12	11.1%	5	4.6%	108	1.2%	206	11	325	1.0%
総計	1,241	13.2%	1,515	16.1%	1,708	18.2%	1,827	19.5%	1,229	13.1%	884	9.4%	623	6.6%	362	3.9%	9,389	100.0%	24,119	532	34,040	100%
		3.6%		4.5%		5.0%		5.4%		3.6%		2.6%		1.8%		1.1%		27.6%	70.9%	1.6%	100%	

表3 対象 MDC 別要介護度別患者属性及び退院先患者数(65 歳以上)

	要介護度	人数		男性				女性				退院先													
				人数		年齢（SD）		人数		年齢（SD）		家庭		他の病院・診療所		介護老人保健施設		介護老人福祉施設		社会福祉施設、有料老人ホーム等		介護医療院		終了（死亡）	
	MDC01	神経系疾患																							
サービス利用者	要支援 1	91	10.9%	44	11.7%	80.0	6.2	47	10.3%	84.5	6.3	38	12.5%	47	12.1%									6	12.2%
	要支援 2	91	10.9%	34	9.0%	79.2	7.6	57	12.4%	84.9	6.9	40	13.2%	43	11.1%	1	5.3%			1	2.8%			6	12.2%
	要介護 1	154	18.5%	85	22.6%	81.1	6.8	69	15.1%	85.4	6.9	65	21.4%	76	19.6%	1	5.3%			5	13.9%	1	100%	6	12.2%
	要介護 2	174	20.9%	79	21.0%	81.4	7.5	95	20.7%	85.9	7.5	68	22.4%	84	21.6%	4	21.1%	3	8.1%	9	25.0%			6	12.2%
	要介護 3	105	12.6%	46	12.2%	82.6	6.9	59	12.9%	86.0	7.6	33	10.9%	47	12.1%	5	26.3%	6	16.2%	7	19.4%			7	14.3%
	要介護 4	93	11.2%	35	9.3%	80.5	7.8	58	12.7%	87.1	7.2	19	6.3%	38	9.8%	5	26.3%	18	48.6%	7	19.4%			6	12.2%
	要介護 5	80	9.6%	27	7.2%	80.3	6.5	53	11.6%	87.0	8.3	24	7.9%	31	8.0%	3	15.8%	9	24.3%	6	16.7%			7	14.3%
	申請中	46	5.5%	26	6.9%	81.9	7.4	20	4.4%	79.8	8.3	17	5.6%	22	5.7%			1	2.7%	1	2.8%			5	10.2%
小計		834	38.2%	376	45.1%	80.9	7.1	458	54.9%	85.1	7.4	304	28.5%	388	42.7%	19	90.5%	37	88.1%	36	90.0%	1	100%	49	47.1%
申請なし		1,327	60.8%	804	67.3%	75.6	6.3	523	52.9%	77.1	7.0	756	70.9%	508	55.9%	2	9.5%	4	9.5%	4	10.0%			53	51.0%
不明		23	1.1%	15	1.3%	80.6	8.0	8	0.8%	85.9	7.1	7	0.7%	13	1.4%			1	2.4%					2	1.9%
	総計	2,184	100%	1,195	54.7%	77.4	7.1	989	45.3%	81.1	8.4	1,067	48.9%	909	41.6%	21	1.0%	42	1.9%	40	1.8%	1	0.0%	104	4.8%
	MDC04	呼吸器系疾患																							
サービス利用者	要支援 1	134	10.6%	80	10.7%	81.7	7.8	54	10.6%	78.3	7.9	92	16.5%	23	7.1%					5	6.0%			14	7.0%
	要支援 2	155	12.3%	96	12.8%	82.1	6.9	59	11.6%	83.1	6.2	101	18.1%	33	10.2%	1	3.7%			4	4.8%			16	8.0%
	要介護 1	173	13.7%	110	14.7%	83.5	7.6	63	12.4%	86.7	7.6	86	15.4%	41	12.7%	4	14.8%	3	4.3%	10	11.9%			29	14.6%
	要介護 2	222	17.6%	137	18.3%	82.2	8.0	85	16.7%	86.0	6.8	116	20.8%	55	17.0%	2	7.4%	3	4.3%	10	11.9%			36	18.1%
	要介護 3	195	15.5%	102	13.6%	84.2	7.8	93	18.2%	87.7	7.3	62	11.1%	56	17.3%	7	25.9%	14	20.3%	25	29.8%			31	15.6%
	要介護 4	176	14.0%	107	14.3%	83.0	7.5	69	13.5%	88.4	6.6	40	7.2%	56	17.3%	8	29.6%	33	47.8%	15	17.9%			24	12.1%
	要介護 5	157	12.5%	80	10.7%	83.0	7.3	77	15.1%	88.3	7.7	37	6.6%	44	13.6%	5	18.5%	16	23.2%	15	17.9%			40	20.1%
	申請中	48	3.8%	38	5.1%	78.7	7.2	10	2.0%	82.8	4.7	24	4.3%	15	4.6%									9	4.5%
小計		1,260	32.0%	750	59.5%	82.3	7.5	510	40.5%	85.2	6.8	558	19.4%	323	66.6%	27	93.1%	69	94.5%	84	89.4%			199	52.1%
申請なし		2,598	66.0%	1,750	68.7%	76.0	6.2	848	61.0%	75.7	6.4	2,278	79.3%	142	29.3%	1	3.4%	3	4.1%	4	4.3%			170	44.5%
不明		79	2.0%	46	1.8%	79.9	7.2	33	2.4%	81.3	6.9	38	1.3%	20	4.1%	1	3.4%	1	1.4%	6	6.4%			13	3.4%
	総計	3,937	100%	2,546	64.7%	78.0	7.3	1,391	35.3%	79.5	8.5	2,874	73.0%	485	12.3%	29	0.7%	73	1.9%	94	2.4%			382	9.7%
	MDC05	循環器系疾患																							
サービス利用者	要支援 1	240	14.7%	116	16.1%	84.8	6.9	124	13.5%	84.1	6.7	190	18.5%	36	10.3%	2	6.5%	1	2.7%	2	2.9%			9	7.4%
	要支援 2	322	19.7%	122	16.9%	82.1	6.9	200	21.8%	85.1	6.7	239	23.3%	54	15.4%	3	9.7%	1	2.7%	11	15.9%			14	11.5%
	要介護 1	304	18.6%	132	18.3%	83.7	7.2	172	18.8%	85.7	6.8	206	20.1%	66	18.9%	4	12.9%			14	20.3%			14	11.5%
	要介護 2	340	20.8%	170	23.6%	83.5	7.2	170	18.6%	87.0	6.2	205	20.0%	79	22.6%	6	19.4%	3	8.1%	15	21.7%			32	26.2%
	要介護 3	191	11.7%	86	11.9%	84.6	7.8	105	11.5%	88.2	6.8	85	8.3%	54	15.4%	5	16.1%	15	40.5%	13	18.8%			19	15.6%
	要介護 4	139	8.5%	42	5.8%	80.6	8.4	97	10.6%	88.3	8.0	59	5.7%	32	9.1%	8	25.8%	14	37.8%	8	11.6%			18	14.8%
	要介護 5	55	3.4%	24	3.3%	83.8	7.9	31	3.4%	87.5	6.7	15	1.5%	17	4.9%	2	6.5%	3	8.1%	6	8.7%			12	9.8%
	申請中	45	2.8%	28	3.9%	81.5	7.1	17	1.9%	84.7	5.3	28	2.7%	12	3.4%	1	3.2%							4	3.3%
小計		1,636	28.6%	720	44.0%	83.1	7.4	916	56.0%	86.3	6.7	1,027	21.4%	350	61.8%	31	93.9%	37	88.1%	69	84.1%			122	67.0%
申請なし		3,971	69.5%	2,663	77.4%	76.5	6.7	1,308	57.6%	78.1	7.2	3,695	76.9%	210	37.1%	1	3.0%	2	4.8%	6	7.3%			57	31.3%
不明		105	1.8%	57	1.7%	78.5	6.5	48	2.1%	82.8	9.6	85	1.8%	6	1.1%	1	3.0%	3	7.1%	7	8.5%			3	1.6%
	総計	5,712	100%	3,440	60.2%	78.0	7.4	2,272	39.8%	81.4	8.2	4,807	84.2%	566	9.9%	33	0.6%	42	0.7%	82	1.4%			182	3.2%
	MDC16	外傷・熱傷・中毒																							
サービス利用者	要支援 1	156	12.2%	57	15.2%	83.6	7.7	99	11.0%	85.5	6.2	67	16.9%	73	11.2%	3	4.1%	1	2.2%	7	9.0%			5	14.7%
	要支援 2	203	15.9%	58	15.5%	84.5	6.9	145	16.0%	85.7	6.4	69	17.4%	114	17.5%	8	11.0%	4	8.7%	4	5.1%			4	11.8%
	要介護 1	267	20.9%	74	19.7%	84.9	7.2	193	21.3%	87.0	6.7	80	20.2%	148	22.7%	13	17.8%	2	4.3%	19	24.4%			5	14.7%
	要介護 2	253	19.8%	63	16.8%	84.9	7.6	190	21.0%	87.7	6.4	68	17.2%	137	21.0%	24	32.9%	6	13.0%	14	17.9%			4	11.8%
	要介護 3	211	16.5%	60	16.0%	84.3	7.4	151	16.7%	87.8	7.4	61	15.4%	96	14.7%	12	16.4%	16	34.8%	20	25.6%			6	17.6%
	要介護 4	100	7.8%	33	8.8%	83.2	6.6	67	7.4%	87.0	8.2	18	4.5%	48	7.4%	9	12.3%	9	19.6%	9	11.5%			7	20.6%
	要介護 5	41	3.2%	15	4.0%	83.5	6.5	26	2.9%	86.1	7.4	10	2.5%	15	2.3%	3	4.1%	8	17.4%	3	3.8%			2	5.9%
	申請中	48	3.8%	15	4.0%	84.9	6.7	33	3.7%	84.5	9.1	23	5.8%	21	3.2%	1	1.4%			2	2.6%			1	2.9%
小計		1,279	43.0%	375	29.3%	84.2	7.1	904	70.7%	86.4	7.2	396	26.9%	652	52.7%	73	93.6%	46	92.0%	78	88.6%			34	65.4%
申請なし		1,633	54.9%	722	64.1%	77.1	7.4	911	49.2%	78.0	7.6	1,055	71.7%	546	44.1%	4	5.1%	3	6.0%	9	10.2%			16	30.8%
不明		65	2.2%	30	2.7%	80.7	8.7	35	1.9%	86.9	7.2	20	1.4%	40	3.2%	1	1.3%	1	2.0%	1	1.1%			2	3.8%
	総計	2,977	100%	1,127	37.9%	79.6	8.1	1,850	62.1%	82.5	8.5	1,471	49.4%	1,238	41.6%	78	2.6%	50	1.7%	88	3.0%			52	1.7%

表4　対象 MDC 別退院先別要介護状態及び在宅医療が必要な患者数(65 歳以上)

		総数		低栄養状態		摂食・嚥下機能障害		経管・経静脈栄養	
MDC 神経系疾患									
退院先	家庭	1,067	48.9%	17	32.7%	43	17.3%	38	11.2%
	他の病院・診療所	909	41.6%	21	**40.4%**	182	**73.1%**	278	**82.0%**
	介護老人保健施設	21	1.0%						
	介護老人福祉施設	42	1.9%	2	3.8%	2	0.8%	2	0.6%
	社会福祉施設、有料老人ホーム等	40	1.8%	3	5.8%	4	1.6%	4	1.2%
	終了（死亡）	104	4.8%	9	17.3%	18	7.2%	17	5.0%
	介護医療院	1	0.0%						
	総計	2,184		52	2.4%	249	11.4%	339	15.5%
在宅医療が必要		165	7.6%	9	5.5%	24	14.5%	39	23.6%
MDC 呼吸器系疾患									
退院先	家庭	2,874	73.0%	117	**41.3%**	39	31.2%	44	20.3%
	他の病院・診療所	485	12.3%	88	31.1%	56	**44.8%**	104	**47.9%**
	介護老人保健施設	29	0.7%	6	2.1%	4	3.2%	6	2.8%
	介護老人福祉施設	73	1.9%					2	0.9%
	社会福祉施設、有料老人ホーム等	94	2.4%	3	1.1%	3	2.4%	6	2.8%
	終了（死亡）	382	9.7%	69	24.4%	23	18.4%	55	25.3%
	総計	3,937		283	7.2%	125	3.2%	217	5.5%
在宅医療が必要		265	6.7%	35	13.2%	26	9.8%	39	14.7%
MDC 循環器系疾患									
退院先	家庭	4,807	84.2%	87	40.8%	27	30.7%	23	17.6%
	他の病院・診療所	566	9.9%	88	**41.3%**	37	**42.0%**	67	**51.1%**
	介護老人保健施設	33	0.6%	4	1.9%	5	5.7%	5	3.8%
	介護老人福祉施設	42	0.7%	2	0.9%	3	3.4%	2	1.5%
	社会福祉施設、有料老人ホーム等	82	1.4%	8	3.8%	4	4.5%	4	3.1%
	終了（死亡）	182	3.2%	24	11.3%	12	13.6%	30	22.9%
	総計	5,712		213	3.7%	88	1.5%	131	2.3%
在宅医療が必要		214	3.7%	30	14.0%	14	6.5%	24	11.2%
MDC 外傷・熱傷・中毒									
退院先	家庭	1,471	49.4%	16	23.5%	7	16.7%	7	7.9%
	他の病院・診療所	1,238	41.6%	44	**64.7%**	29	**69.0%**	73	**82.0%**
	介護老人保健施設	78	2.6%	2	2.9%	2	4.8%	2	2.2%
	介護老人福祉施設	50	1.7%	1	1.5%	1	2.4%	1	1.1%
	社会福祉施設、有料老人ホーム等	88	3.0%	3	4.4%	2	4.8%	1	1.1%
	終了（死亡）	52	1.7%	2	2.9%	1	2.4%	5	5.6%
	総計	2,977		68	2.3%	42	1.4%	89	3.0%
在宅医療が必要		197	6.6%	5	2.5%	8	4.1%	19	9.6%

肥満後の食餌変調が腸内環境と骨格筋の炎症状態に及ぼす影響

川崎医療福祉大学　健康体育学科

川島　将人

本研究は、食餌誘導性肥満後に抗生物質投与、ならびに食餌変調を実施することによって、腸内環境や糖代謝、末梢骨格筋の炎症状態が改善されるのかについて明らかにすることを目的とした。実験には、4 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用い、欧米食餌を 12 週間自由摂取させた後、欧米食餌摂取（WD-WD）群、通常食餌摂取（WD-CD）群の 2 群に分け、5 日間にわたる抗生物質投与に続いて、4 週間の飼育を行った。食餌摂取量と体組成の測定、耐糖能試験、盲腸の短鎖脂肪酸および骨格筋の炎症性サイトカイン遺伝子発現の解析を実施した。本研究の結果、肥満後の 4 週間にわたる食餌変調は、体重や体脂肪量の減少、糖代謝能の改善、盲腸短鎖脂肪酸濃度の増加といった効果をもたらすが、末梢骨格筋の炎症状態には変化をもたらさない可能性が示された。

【背景】

今や世界的な現代病である肥満症に伴って生じる慢性炎症は、脂肪組織[1]に加えて、活発な代謝臓器である骨格筋においてもみられる[2]。先行研究では、高脂肪食餌摂取によって肥満したマウスの骨格筋内における炎症性サイトカインの上昇やインスリン抵抗性の亢進が観察されている[3),4)]。骨格筋内で慢性炎症が起こると、代謝性疾患の発症およびその重症化を招いてしまう可能性が高くなってしまう[2]。

肥満症は食習慣と密接な関わりがあり、食餌誘導性肥満の発症には、特徴的な腸内細菌叢の形成に伴う腸内環境の変化が関与することが示されてきた[5]。例えば、高脂肪食餌を摂取したマウスは、通常食餌を摂取したマウスと比較して、*Firmicutes*門 と *Bacteroidetes*門の比率（F/B比）が増加し、腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸の産生が減少する[6), 7)]。短鎖脂肪酸は、体重の増加抑制、脂質代謝調節、免疫調節など宿主に対し有益な作用をもつため[8)]、肥満による産生量減少を改善することが必要である。興味深いことに、高脂肪食餌とともに抗生物質を摂取すると、肥満特有の腸内環境変化が起こらず、インスリン抵抗性の亢進も生じないことが報告されている[9), 10)]。以上のことから、食餌誘導性肥満に対して、抗生物質投与および食餌変調を行えば、肥満に伴う腸内環境の悪化や骨格筋の炎症状態を改善させることができる可能性がある。

本研究は、食餌誘導性肥満後の食餌変調が腸内環境および末梢骨格筋の炎症状態に及ぼす影響を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=15）を用いた。マウスに欧米食餌（WD）を12週間自由摂取させた後、WD摂取を継続する（WD-WD; n = 7）群と通常食餌（CD）へ変える（WD-CD; n = 8）群の2群に分けて個別に飼育し、5日間にわたる抗生物質投与の実施に続いて、4週間の飼育を行った。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：21-008）。

食餌

実験動物の食餌は、実験群によって、肥満および糖代謝異常を誘導する食餌として多くの先行研究[11), 12)]で用いられているWD（D12079B, Research Diets, New Brunswick, NJ）、あるいはCD（MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan）をそれぞれ用いた。

抗生物質投与

12週間にわたるWDの摂取によって形成された腸内細菌叢を除菌するために、先行研究に倣い、アンピシリン（1 mg/ml）とネオマイシン（0.5 mg/ml）を含んだ抗生物質含有水を作製し[13)]、5日間自由に摂取させた。

耐糖能試験（GTT）

GTT は、飼育 12 週目（食餌変調前）および飼育

17 週目（食餌変調後）に実施した。血糖値測定は、マウスの尾静脈を剃刀でカットして得られた微量の血液を用いて、血糖測定器（ACCU-CHEK®, Roche, Basel, Schweiz）で行った。GTT 実施の 5 時間以上前よりマウスを絶食させ、イソフルラン麻酔下にて腹腔より、2g/kg 体重のグルコースを投与した。グルコース投与前、投与後 15 分、30 分、60 分、120 分に血糖測定を実施した。得られた血糖値より、曲線下面積（AUC）を算出した。

試料採取

飼育期間終了後、イソフルラン麻酔下で、血液、体脂肪（内臓脂肪、精巣上体脂肪、皮下脂肪）、盲腸、ヒラメ筋、腓腹筋を採取した。

血液分析

EDTA 処理済みの 1.5mL チューブに採取した血液を 800×g で 30 分間の遠心処理を実施することで、血漿を回収し、解析まで−80℃で保存した。得られた血漿を用いて、外部企業（株式会社 SRL, Tokyo, Japan）への委託により、肥満関連パラメータの解析を実施した。

盲腸内容物有機酸解析

盲腸内容物は、飼育終了後、採取した盲腸を切開し、直接 1.5ml のサンプリングチューブへ取り出し回収した。回収後、直ちに液体窒素で凍結し、解析まで−80℃で保存した。有機酸の解析は、外部企業（株式会社テクノスルガ・ラボ, Shizuoka, Japan）への委託により実施した。

骨格筋の炎症性サイトカイン遺伝子発現解析

採取したヒラメ筋と腓腹筋を用いて、代表的な炎症性サイトカインである TNF-α の mRNA 発現量を測定した。先行研究[14]と同様の方法で、Fast 7500 real-time PCR system（Applied Biosystems, Carlsbad, CA）を使用して real-time RT-PCR 解析を実施した。TNF-α の値は GAPDH に対する相対値として結果に示した。

統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析は、SPSS Statistics 23.0（IBM, Armonk, NY）を用いて実施した。群間の比較には、対応のない Student の t 検定を用い、有意水準は危険率 5%未満（$p<0.05$）とした。

【結果】

肥満の評価

12 週間にわたる WD 摂取後の体重は、WD-WD 群（31.95 ± 1.16 g）と WD-CD 群（31.91 ± 0.76 g）の間に違いはみられなかったが、その後に 4 週間の食餌変調を実施した WD-CD 群では、飼育期間終了時の体重が WD-WD 群と比べて有意に減少した（図 1a,b）。同様に、体脂肪量についても、WD-CD 群が WD-WD 群よりも有意に少なかった（図 1c-e）。また、WD-CD 群では、食餌変調開始から 1 週間の摂取カロリーが WD-WD 群のおよそ半分となったが、その後は飼育期間終了まで WD-WD 群と同様の摂取カロリーを示した（data not shown）。肥満に関連する血液パラメータに関しては、WD-CD 群の総コレステロール値、ならびに肝障害マーカーである AST と ALT が WD-WD 群と比べて有意に低値を示し（いずれも $p<0.05$）、トリグリセリド値は有意に低い傾向（$P=0.074$）が認められた。

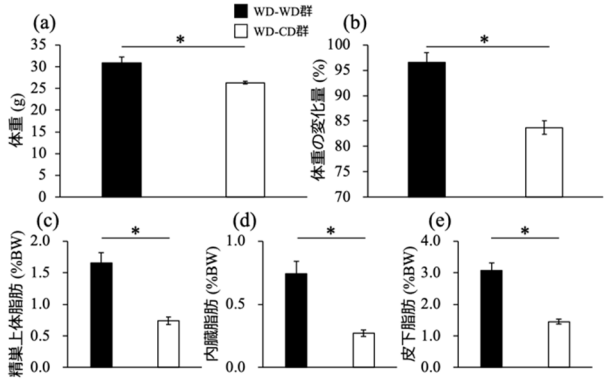


図 1. 飼育期間終了時における体組成の比較.
a：体重，b：食餌変調前のピーク体重から飼育期間終了時までの変化量，c：精巣上体脂肪重量の割合，d：内臓脂肪重量の割合，e：皮下脂肪重量の割合．*$p<0.01$．BW；体重.

糖代謝能の評価

12 週間にわたる WD 摂取後の GTT では、WD-WD 群と WD-CD 群の間に違いはみられなかったが（図 2a,b）、WD-CD 群では、その後 4 週間の食餌変調によって糖代謝能の改善がみられ、AUC が WD-WD 群と比べて有意に減少した（図 2c,d）。

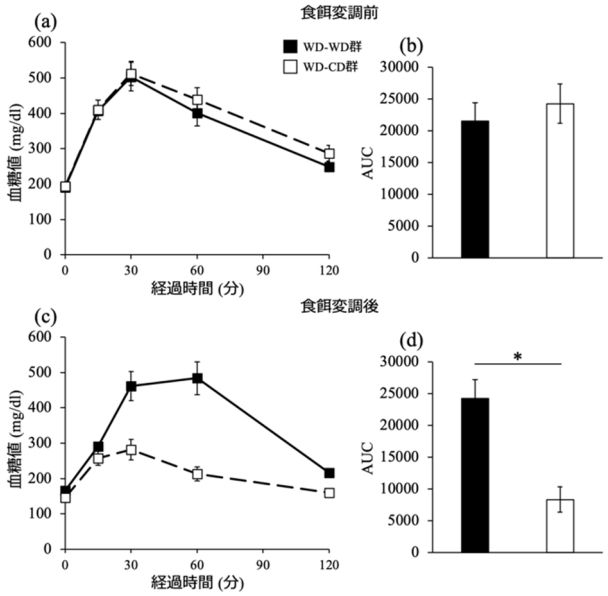


図 2. 糖代謝能の比較.
a,b : 食餌変調前の GTT における血糖値の経時変化 (a)と AUC (b), c,d : 食餌変調後の GTT における血糖値の経時変化 (c)と AUC (d). *p<0.01. AUC ; 曲線下面積.

盲腸短鎖脂肪酸濃度の評価

4 週間の食餌変調を実施した WD-CD 群では、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸の濃度が WD-WD 群と比較して有意に高値を示した（図 3）。

骨格筋の TNF-α 遺伝子発現の評価

ヒラメ筋と腓腹筋における TNF-α の mRNA 発現量については、WD-WD 群と WD-CD 群の間に顕著な違いは認められなかった（図 4）。

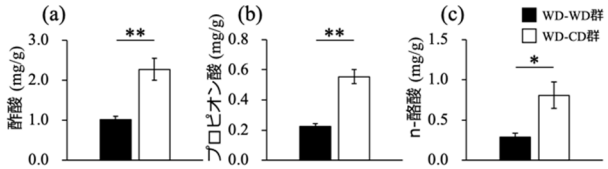


図 3. 盲腸中の短鎖脂肪酸濃度の比較.
a : 酢酸, b : プロピオン酸, c : n-酪酸. *p<0.05. **p<0.01.

【考察】

本研究では、食餌誘導性肥満後の食餌変調が腸内環境および末梢骨格筋の炎症状態に及ぼす影響を検討した。本研究は、肥満後に抗生物質で腸内細菌を除菌した上で食餌変調を実施すると、体重や体脂肪量の減少、糖代謝能の改善、短鎖脂肪酸濃度の増加といった宿主への効果をもたらすが、本研究で用いた条件では末梢骨格筋の炎症性サイトカイン TNF-α の遺伝子発現に変化をもたらさないことを明らかにした。

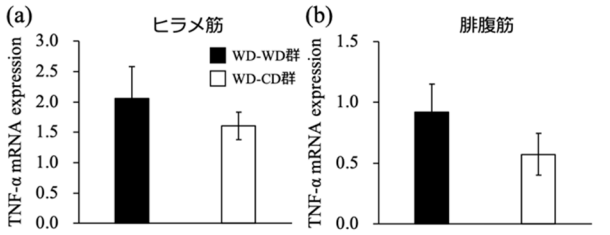


図 4. 末梢骨格筋の TNF-α 遺伝子発現の比較.
a : ヒラメ筋における TNF-α の mRNA 発現, b : 腓腹筋における TNF-α の mRNA 発現.

本研究の WD-CD 群では、飼育期間終了時に体重と体脂肪量の減少が観察された（図 1）。ただ、食餌変調の開始から 1 週間の期間において、食餌摂取量の減少に伴って摂取カロリーが WD-WD 群のおよそ半分となり、この期間に顕著な体重減少がみられた。その後の食餌変調 2 週目以降では、WD-CD 群と WD-WD 群の摂取カロリーが同等であった。近年の先行研究では、カロリー制限が腸内細菌叢を著しく変化させ、この現象が宿主の肥満や代謝異常の改善に寄与することが示されている [15),16)]。したがって、本研究でみられた食餌変調による宿主パラメータの改善には、一過性のカロリー制限に伴う腸内環境変化が関与していた可能性が考えられる。

本研究で実施した 4 週間の食餌変調では、骨格筋における TNF-α の遺伝子発現の改善が認められなかった（図 4）。本研究で用いた WD は、肥満や糖代謝異常を誘発する動物モデルに広く用いられている食餌であるが、本研究で用いた 12 週間にわたる WD 摂取では、予想していた程の体重増加がみられなかった。そのため、本研究の WD 摂取でもたらされた骨格筋の炎症状態がそもそも軽度であったために、食餌変調による改善がみられなかったことが推察される。本研究では、肥満していない条件との比較を実施できなかったため、今後は確実に骨格筋の慢性炎症を惹起できるプロトコルを確立させた上で、肥満していない条件との比較も合わせて検討したい。

【結論】

食餌誘導性肥満後の食餌変調は、体重や体脂肪量

の減少、糖代謝能の改善、短鎖脂肪酸濃度の増加といった宿主への効果をもたらすが、末梢骨格筋の炎症状態には変化をもたらさない可能性が示唆された。

【利益相反開示】

本研究に関し、利益相反関係にある企業等はない。

【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巳教授、小柳えり講師、青木孝文講師、山形高司助教、濱田大幹助教、川崎医療福祉大学大学院渡邉知央氏に深謝する。

本研究は、令和 3 年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団の研究活動助成を受けて実施された。

【参考文献】

1) Lumeng CN, et al., 2008. Diabetes 57, 3239–3246.
2) Wu H and Ballantyne CM. 2017. J Clin Invest 127, 43–54.
3) Hong E, et al., 2009. *Diabetes* 58, 2525–2535.
4) Samaan MC, et al., 2014. *Physiol Rep* 2, e12012.
5) Turnbaugh PJ, et al., 2006. *Nature* 444, 1027–1031.
6) Watanabe C, et al., 2020. *JPFSM* 9, 205–215.
7) Aoki T, et al., 2020. *Nutrients* 12, 2508.
8) Koh A, et al., 2016. *Cell* 165, 1332–1345.
9) Carvalho BM, et al., 2012. *Diabetologia* 55, 2823–2834.
10) Foley KP, et al., 2020. *Mol Metab* 42, 101067.
11) Ogus S, et al., 2003. *Endocrinology* 144, 2865–2869.
12) Bjursell M, et al., 2008. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, 251–260.
13) Oyanagi E, et al., 2018. *JPFSM* 7, 81–85.
14) Kawanishi N, et al., 2010. *Exerc Immunol Rev* 16, 105–118.
15) Fabbiano S, et al., 2018. *Cell Metab* 28, 907–921.
16) Wang S, et al., 2018. *Sci Rep* 8, 13037.

砂防法の政策効果と課題

山陽学園大学 地域マネジメント学部

教授　澤俊晴

（概要）砂防法による土砂災害対策の効果について複数の仮説を提示し、当・不当、違法・適法の観点も含めた検討を行い、問題の原因を推論するとともに改善策の提示を行った。

1　砂防法の位置付け

近代日本における土砂災害対策の枢要な位置を占めたのが「砂防法」であり、120 年以上に渡って同法に基づいて土砂災害対策が行われてきた。

地すべり法や急傾斜地法は、砂防法と「同じような目的を有し、少し紛らわしい」[1]とされるほど類似しており、砂防法から派生的に制定されたものである。たとえば、地すべり法は「砂防法では採択できない都市周辺の地すべり」[2]などに対応して、急傾斜地法は「がけ崩れによる災害は従来からなかったわけではないが、最近の山地丘陵における無秩序な宅地造成等の開発行為によって、とくに市街地周辺のがけ崩れによる災害が多発し、社会問題として大きくクローズアップされ」[3]ことなどに対応して制定された。しかし、現在においても砂防法が土砂災害対策の大宗を占めることに変わりはない。

予算の面から確認してみよう。令和３年度の福岡県の当初予算では、土砂災害対策予算 10,049,133 千円うち、砂防関連が 7,894,893 千円、急傾斜地関連が 1,880,190 千円、地すべり関連が 274,050 千円であり、８割近くを砂防関連が占めている[4]。

また、広島県の令和３年度の予算（令和２年度２月補正を含む）では、土砂災害対策（ハード対策）予算 16,640,925 千円のうち、砂防関連が 11,593,600 千円、急傾斜地関連が 5,042,600 千円、地すべり関連が 4,725 千円であり、7 割が砂防関連である[5]。

また、図表１のとおり、全国の砂防指定地、急傾斜地崩壊危険区域、地すべり区域の合計面積のうち８割以上を砂防指定地が占める。

【図表１　砂防指定地、急傾斜地崩壊危険区域、地すべり区域別面積】

砂防指定地	916,119.84
急傾斜地崩壊危険区域	45,399.80
地すべり区域	126,784.72
合計	1,088,304.36

全国、面積(ha)、 平成 25 年 3 月 31 日現在
※『平成 26 年砂防便覧』

このような土砂災害対策法制における位置付けから、本稿では、砂防法を検討対象とした。

2　砂防法の政策効果

砂防法による土砂災害対策は 120 年以上にわたって実施されてきたが、現在でも毎年のように土砂災害により死者・行方不明者が発生し、家屋損害も甚大である。したがって、砂防法による対策が有効なのかが問題となる。

砂防法が法の予定したとおり運用されていれば土砂災害は減少するのに対して、法の予定したとおりに運用されていなければ土砂災害は減少しないと考えるのが通常である。しかし、このことを確認することは難しい。なぜなら、この説明には、砂防法が土砂災害対策に有効な法制度であるとの仮定がある。しかし、何をもって「有効」とし、何をもって「有効でない」とするのか判断は難しい。

さらに、これまでに発生した土砂災害が、砂防法による対策のおかげで「この程度で済んでいる」のか、あるいは、砂防法による対策の有無にかかわらずやはり「この程度は発生する」ものなのか証明できない。ただ、なお砂防法が土砂災害対策に何かしら有効な法制度であると仮定するならば、次の４つの類型が想定できる。

第一に、砂防法が法の予定したとおり執行されて

1 『概説　水法・国土保全法』須田政勝、2006 年、189 頁
2 『日本砂防史』全国治水砂防協会、1981 年、330 頁
3 『日本砂防史』全国治水砂防協会、1981 年、367 頁
4 令和３年度当初予算の編成概要（令和３年２月福岡県）
5 令和３年度施策及び事業案の概要（令和３年２月広島県）

いる。それにもかかわらず、土砂災害が抑制されていない。つまり、砂防法による対策がなお十分ではなく、政策が「失敗」していると評価する場合である。地すべり法、急傾斜地法の制定は、そのことへの対応とも考えることができる。

第二に、砂防法が法の予定したとおり執行されていない。その結果、土砂災害が抑制されていない。つまり、予算配分や人員配置が行われず実質的に砂防法が失効している、あるいはそれに近い状態にあり、政策が「失敗」していると評価する場合である。実際には、福岡県の令和３年度土砂災害対策予算は 100 億円を超え、広島県では 170 億円を超え、また多くの県で砂防の名前を冠した課が設置されている。

さらに、平成 25 年 3 月 31 日現在で、全国の 90 万 ha 以上の土地（ほぼ鹿児島県の面積 9,187㎢ と同じ。）が砂防指定地とされ、砂防堰堤も 6 万基以上が設置されており（平成 26 年砂防便覧）、予算や人員が一定程度確保されていることは間違いない。

第三に、砂防法が法の予定したとおり執行されていない。それにもかかわらず、土砂災害が抑制されている。つまり、砂防法以外の法令による効果、あるいは事業者・住民の自発的取組、素因や誘因といった自然環境条件の変化といった何らかの要因が効果を発揮している場合であり、砂防法による政策としては「失敗」していると評価する場合である。

第四に、砂防法が法の予定したとおり執行されている。その結果、土砂災害が抑制されている。つまり、行為規制や砂防設備の整備が行われてきたことから政策が「成功」していると評価する場合である。

予算や人員が確保されていることから、砂防法は法の予定したとおり執行されているとすると、第一の類型が妥当であれば、更なる法整備と予算・人員が求められ、第四の類型が妥当であれば、現行の取組みを延長・縮小していくことになる。

ただし、「法の予定したとおり執行」という表現には留保が付く。予算配分や人員配置といった大枠ではなく、さらに細かな「運用」レベルまで検討しないと、適切な「執行」といえるのか判断できない。

そもそも砂防法は、明治 30 年制定と古い法律であるため、そのキーワードである「治水上砂防」の意味さえ定かではない。

そのため、ここでは砂防法の構造や条文、各種通知等から、「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）が砂防指定地として「適切」に指定され、有害行為の取締りや許可条件の付加、行政指導などが「適切」に執行され、「適切」な構造や流域内での位置、基数により砂防設備が施設されることによって土石流等の発生が抑制され、被害が軽減されることを法は「運用」として予定している、と解して論を進めていく。

３　指定の実態

まず、砂防指定地の指定箇所、区域に疑義のある事例を取り上げる。

図表 2 は、平成 26 年 8 月 20 日に発生した広島土砂災害で被害が最も甚大であった広島市安佐南区八木地区（死者 52 名）の上空写真である。

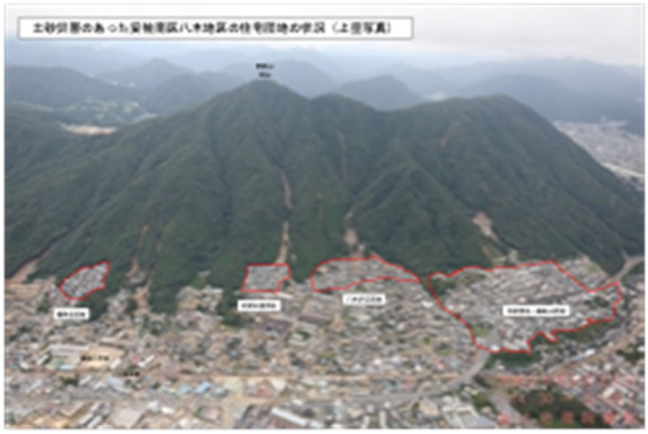
この地区では、図表 3 のとおり、昭和 30 年代から 50 年代にかけて開発された住宅団地で被害が発生している。広島土砂災害の発生以前に砂防指定地であったのは、図表 4 の赤で囲まれた地区で平成 18 年 12 月 6 日国土交通省告示第 1449 号により指定されている。

それ以外の青囲みは、災害発生後に指定された区域である。土砂災害の発生後に指定することに意味がないとはいえないが、砂防法の趣旨からすれば、住宅団地の開発前に砂防指定地に指定し開発を抑制するか、あるいは防災工事の施行を条件とした上で、砂防指定地内での開発を許可する必要があったと考えられる。

また、平成 18 年に赤囲みの区域を指定する際に、なぜ、同じような地形要因にある左右の渓流を指定しなかったのかも疑問である。

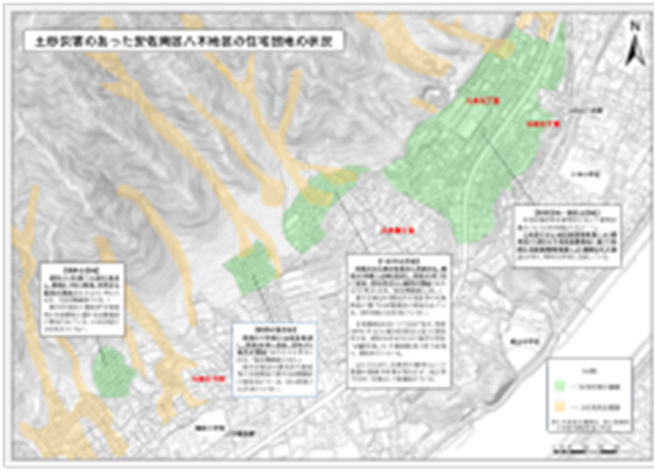
このように砂防指定地の指定順序、指定区域がどのような論理で選定されているのか不明確である。

【図表２　広島市安佐南区八木地区　上空写真】



※「平成 26 年８月 8.20 土砂災害の概要」（広島市資料）

【図表３　広島市安佐南区八木地区　住宅団地状況】



※「平成 26 年８月 8.20 土砂災害の概要」（広島市資料）

【図表４　広島市安佐南区八木地区　砂防指定地状況】



※広島県砂防 GIS 管理システム

４　当・不当の問題

砂防指定地は、平成25年3月31日時点で約70,000箇所、約 52,000 渓流が指定されている。しかし、これは 120 年間で積み上げられてきた数字である。

砂防指定地内では有害行為を規制し土砂災害を抑制することが可能になるため、治水上砂防の観点から必要な箇所については、一斉に指定するか、優先順位を付けて順次、速やかに指定することが望ましい。また、砂防指定地内では私権が制限されるのであるから、箇所・区域が過不足なく指定される必要がある。

しかし、砂防指定地の指定順序の合理性は明らかでなく、面指定、標柱指定、線指定といった指定方法も時期によって変遷している。

指定の区域についても、土石流が発生する可能性のない河口部まで指定されるなど、治水上砂防の観点から妥当性を欠いている事例がある。

さらに、一度指定した箇所について、後日、追加で指定されることが多いことから、必要性がある箇所が指定されていない事例もあると考えられる。たとえば、広島県内では指定件数のうち、約 24%が追加指定であり、約４分の１の箇所で当初の指定が不十分であったことになる。

このような運用となっている背景には、砂防事業の実施を優先するあまり、砂防法の目的の一環である有害行為を規制するために必要な区域に行為制限をかけるという視点が欠落していることがあると考えられる。

５　適法・違法の問題

砂防指定地の指定に「処分性」があるか否かはさておき、少なくとも違法な指定であれば、国家賠償法の「公権力の行使」に該当すると考えられる。

まず、権限の行使＝「指定」が違法となるのは、水上砂防の観点から必要性のない土地を指定し、無用の私権制限をした場合である。ただし、指定権限の行使は大臣の広汎な裁量に委ねられているとされているので、明らかに重大な事実誤認をしているか、目的違反をしているなど裁量権の逸脱・濫用に該当する場合に違法となると考えられる。たとえば、河口部まで指定することは、これに該当するであろう。

次に、権限の不行使も違法となり得る。二つの類型が想定される。

第一の類型は、①指定することなく砂防事業を開始し、砂防事業が終了し砂防設備が施設された後も未指定状態にある、あるいは、②多数の人家がある上流域で開発が行われようとしており次の降雨期に

は確実に土砂災害が発生するといったように治水上砂防の観点から指定の必要性が明白であるにもかかわらず指定しない場合である。

①の場合は、事業費や維持管理費の支出が違法な公金支出と評価される可能性がある。

また、②の場合は、指定しないことを規制権限の不行使と捉え、それが著しく不合理と認められるときに該当すれば、国家賠償法１条に反し違法となると考えられる。

たとえば、指定地外で土砂災害が発生した場合、指定権者である大臣と、指定によって私権制限を受ける土地の所有者等と、土砂災害の発生によって損害を受けた下流住民、という三者関係が構成される。指定権限の行使が大臣の裁量に委ねられていると解すれば、不指定により損害を受けた住民による損害賠償請求は認められない、となりそうである。しかし、土砂災害の発生がかなりの確度で予見され（予見可能性）、かつ、土砂災害の発生によって被る損害が大きく（被害の程度）、さらに、指定さえすれば土砂災害の発生を防ぐ可能性が高い（回避可能性）場合にまで、裁量を認める必要はないであろう。

第二の類型は、大規模開発などにより上流域の山が切り崩され土砂生産域が消失するなど、治水上砂防の観点から指定の必要性がなくなったにもかかわらず、指定を解除しない場合である。この場合は、相当の期間を経過してもなお解除しないことは、裁量権の逸脱・濫用に該当し、違法となる可能性がある。

６　原因を推論する

なぜ、不当であるだけでなく、違法と評価されかねないような不適切な指定が行われ、あるいは指定の解除が行われないのか。原因として、次の４点が推論される。

第一に、技術的予算的な制約である。

毎年、土砂災害は発生しているが、それがどこで発生するのか予測することは困難である。土壌的要因（植生や表層の地質など）、地形的要因（土地の傾斜度、傾斜方向、尾根と谷、山地と平野など）、人為的要因（森林伐採、耕作状況、土地造成など）といった「素因」は様々であり、それらを詳細に調査することは予算的に限界がある。

また、降雨などの「誘因」も、台風による集中豪雨と梅雨時期の長雨とでは降り方が異なるし、単独の積乱雲が発達することで発生する局所的大雨の発生箇所を予測することは困難である。つまり、どこで、いつ、どの程度の降雨があるのか、といった誘因を予測することには技術的な限界がある。

そのほか、地震後の地盤が緩んだ後など「素因」の変動によって降雨の影響も異なってくる。

このように「素因」や「誘因」が不明なままでは、1,000 年単位の長期的スパンならともかく、数十年単位の短期的スパンで土砂災害の発生箇所を予測することは不可能に近い。そのため、土砂災害発生に先立って過不足なく指定を行うことは困難である。

第二に、厳しすぎる私権制限である。

砂防指定地に指定されると所有権等が強力に制限される。そのため、土砂災害発生の予見可能性が高く、発生した際の被害が甚大で、指定による回避可能性が高いが場合でなければ、指定手続を進めることを躊躇わざるをえない。

しかし、第一で述べたように、現在の技術レベルでは、予見可能性、被害の程度、回避可能性を判断することは容易ではない。

また、次の第三とも関係するが、仮に、指定が必要だとしても、指定権者は大臣であるにもかかわらず、実質的な指定の必要性は都道府県知事が判断しているため、私権制限に反対する住民を押し切って、指定手続を進める動機を都道府県知事は持ちにくい。

第三に、指定権者と指定関係図書調製者の乖離である。

砂防指定地の指定は国土交通大臣の権限であり、国土交通省告示で行われている。しかし、指定に必要な関係図書は、原則、都道府県知事が調製し、国土交通大臣に進達することとされている。具体的には、「砂防指定地指定要綱」第三で「都道府県知事は、管内の土地について第二の基準（指定基準･･･筆者注）に該当すると認める場合は、建設大臣に進達するものとする。」とされている。なお、同要綱第四では、「法第六条に基づき建設大臣が工事を施行する場合で、砂防指定地の指定を行う必要があるときは、第

三の規定にかかわらず地方建設局長（北海道開発局長を含む。以下同じ。）が進達を行うことができる。」としているが、国の出先機関が進達する際には「あらかじめ関係都道府県知事に協議しなければならない」（同要綱第五）とされており、国の出先機関による進達はあくまでも例外である。

進達書類とは、同要綱第七で次のとおりとされている。

一　総括的な進達図書（進達個所が二以上の場合）
　1　砂防指定地指定箇所総括表
　2　砂防指定地土地調書総括表
　3　砂防指定地指定進達箇所一覧図
　4　他官庁協議書の写し
二　各進達箇所ごとの申請図書
　1　別記様式一による調書（指定理由調書及び土地調書（区域の表示・面積）のこと･･･筆者注）
　2　実測平面図（縮尺五百分の一から五千分の一程度までの間で砂防指定地を表示するに便利な適宜の縮尺の平面図を用いる。）
　3　不動産登記簿（国有林にあつては林班図）及び不動産登記法第十七条に規定する地図
　4　既指定に係る砂防指定地告示官報の写し

これらの進達図書を元に国土交通大臣は、指定の可否を判断することになる。ただし、実際には、国土交通大臣は現地の状況に詳らかでないため、指定関係図書が進達されたにもかかわらず指定しないことは、まずあり得ないであろう。

しかし、指定権者はあくまでも国土交通大臣であり、指定や不指定の当不当・違法適法の責任も国土交通大臣が負う。

そして、この手続の流れでは、都道府県知事が進達を行う積極的な動機がなければ、治水上砂防の観点から必要性が明白であっても指定されることはない。指定解除についても砂防指定地指定要綱第12により指定手続を準用するとされているので、治水上砂防の観点から必要でないことが明白であっても、都道府県知事が進達しない限り指定は解除されない。

進達に係る都道府県知事の動機としては、指定にあっては「住民の福祉の増進」（地方自治法1条の2第1項）の一環として県民の安全を確保するためや、砂防事業として防災工事を行えば国庫補助があるため、といったことが考えられ、指定解除にあっては無用な私権制限となるため、といったことが考えられる。

ただ、住民から要望があるのは砂防事業の実施であり、それを受けて進達するという動機はあり得るが、それ以外の動機は指定権限も責任もない都道府県知事にとって弱くならざるを得ない。

第四に、公共事業の優先である。

第三の都道府県知事が進達を行う動機とも関係するが、砂防法では、砂防事業の実施に際して、河川法の河川整備基本方針（河川法16条）や河川整備計画（河川法16条の2）のような計画をあらかじめ策定する必要はなく、また、審議会や公聴会からの意見聴取の規定もない。

つまり、砂防事業の箇所付けの自由度は、相当程度高い。言い方を変えれば、地元の要望に即応して、事業を実施することができる。

そのため、砂防事業の実施が優先され、砂防指定地の指定手続は後回しにされる。その結果、事業実施箇所の不指定や、さらには、治水上砂防の観点からはより広範囲を指定すべきであるにもかかわらず、砂防設備が施設される土地（要設備地）のみを標柱指定及び線指定により指定するといったことが発生する。

公共事業費が右肩上がりで増えていた時代には砂防事業を優先するため要設備地のみの指定が多用され、公共事業費の減少が予想され始めた時期に面指定への移行が図られていることもこれを傍証する（当初予算ベースの公共事業関係費は平成9年度がピークで、面指定を求める砂防課長通知は平成7年）。

7　改善策

ここでは、指定権限の適切な行使に向けた改善策を検討する。

まず、害悪の蓋然性（予測可能性）が十分にあり、因果関係も科学的に明らかな事態である「危険」と、予測可能性が低く、不確実性を伴う事態である「リスク」を区分する知見を導入する[6]。

その知見によれば、「危険」については、因果関係が明らかであるので原因となる対象に対し未然防

6 大橋洋一「リスクをめぐる環境行政の課題と手法」『法律からみたリスク（新装増補・リスク学入門3）』岩波書店、2013年、58頁。李斗領「リスク規制における立法手法」早稲田法学、85（3）巻、2010年、1165頁

止のための規制を行えばよいとされる[7]。

「リスク」については、因果関係や害悪の程度が科学的に判明するまで、あるいは、実際に害悪が生じるまで待っていては重大で回復不能な損害が生じるおそれがある（不可逆性を有する）ので、リスク事前配慮（事前の予防、介入、制御、管理）が求められるとされる[8]。ただし、リスク事前配慮の方法の選択は、「科学的判断ではなく、政策判断・価値判断」によって行われるため、「暫定性・実験性が必然的に付随」する[9]。

このような「危険」と「リスク」の区分に従うならば、土砂災害は、毎年発生し、人的物的被害も大きい。つまり、全国的に見れば発生確率が非常に高く、害悪の程度もある程度判明しているように見える。しかし、高水流量や発生確率が計算でき発生箇所がある程度予測できる洪水災害と比べ、土砂災害の場合は、仮に、降雨などの「誘因」はある程度予測できたとしても、時間的予算的制約があるため「素因」（土地の現況）を詳細に調査することは困難であり、具体的な発生箇所の予測はほぼ不可能であり、地域を限定したうえでの発生確率（蓋然性）は、非常に低い。このことから土砂災害は、「リスク」に近い事象と捉えることができる。

このように予測可能性が低く、暫定的・実験的にならざるをえない「指定」については、次の二つの手法が考えられる。

一つは、必要性が少しでも認められる箇所を一律に指定する「一括指定」である。「一括指定」は、さらに、図上調査などの簡易な調査により個々の箇所を特定した上で一斉に指定する方法と、一定の要件（渓流の勾配や過去の雨量など）を明示するだけで、個々の箇所を特定せず包括的に指定する方法の二つが考えられる。

もう一つは、現行予算の枠内で、詳細な調査（資料調査、現地調査、航空レーザ測量などによる「地形調査」、現地踏査、ボーリング調査、簡易貫入試験、弾性波探査などによる「地質・土質調査」、地上雨量計及びレーダ雨量計による「降水量調査」、被害想定区域における人口、人家、農地、公共施設、災害時要援護者施設、防災拠点等の保全対象の分布状況、土地利用実態、今後の開発計画といった「社会状況調査」、荒廃状況及び表面侵食、拡大崩壊などによる「生産土砂量の調査」などをした上で、誰から見ても必要性が明らかな箇所を指定する「個別指定」である。

地域住民の安全安心の確保を優先し、指定漏れがないことを優先するのであれば、「一括指定」が優れているが、私権を過大に制限するおそれが高い。

反対に、「個別指定」では、詳細な調査に基づき必要な箇所のみを指定するので私権制限は相応したものになるが、調査に時間と予算を要するため指定が進まず、結果として必要性が高い箇所が当分の間指定されないままとなるおそれが高い。

実際の指定では、「個別指定」が採用されている。

しかし、砂防法施行から 120 年あまり経過しても、なお指定が続いている現状や砂防指定地外で土石災害が生じている事例に鑑みると、「個別指定」を続けることに疑問を感じざるを得ない。

しかも、地球温暖化に起因した土砂災害の頻発化・激甚化が予想されていることから、既に遅きに逸しているが、今後の改善策として、昨年度の報告で指摘したように私権制限の緩和（条例に規定している規制内容を緩和する）と抱合せで、土石流危険渓流Ⅰの流域を「一括指定」する仕組みの導入を検討すべきであろう。

また、現行の「個別指定」を前提するのであれば、治水上砂防の観点から必要な箇所が適切に指定され、あるいは解除がされるよう、指定権限を都道府県知事に移譲し指定に伴う責任を負わせるとともに、予算については砂防事業の工事費から指定に必要な調査費へと大幅に配分替えし、さらに指定を躊躇うことのないよう私権制限の緩和も合わせて進めることが必要である。

以上

---

7 北村喜宣『現代環境法の諸相・改訂版』放送大学教育振興会、2013 年、51 頁

8 佐々木崇「予防原則の哲学的考察」京都大学文学部哲学研究室紀要:PROSPECTUS、15 巻、2012 年、38 頁。藤岡典夫「予防原則の意義」農林水産政策研究、8 巻、2005 年 3 月、36 頁

9 北村喜宣『現代環境法の諸相・改訂版』放送大学教育振興会、2013 年、54 頁

保育士のキャリア・パースペクティマップの作成と離職防止介入策の考案（１）

山陽学園大学　総合人間学部

松浦 美晴

保育士の離職要因には，外的要因と，当事者の内面に存在する内的要因，さらには当事者の内面で作り出される内的状態の要因が含まれると想定できる。本研究では，保育士の離職予防のための新たな視点として「保育士にとっての多様な選択肢の中での保育職の選択」に焦点を当てる。中心となるのは，「キャリア・パースペクティブ」の概念である。その中に包含される，内的状態をとらえるための手法を検討する。1 つの方法は，個人内で内的状態が生じるプロセスを追跡し，個々の当事者において起こりうる内的状態を抽出することである。しかし，保育士確保のための施策へとつなげるためには，内的状態についてできるだけ多くの保育士のケースに適用可能な結果を得ることにも意義がある。そこで，多数の保育士に対する調査から，内的状態を抽出する方法を考えたい。ありうる要因と内的状態をリストアップし，それらを項目として多数の保育士に回答を求める。得られる回答から，多くの保育士に起こりうるケースを抽出してゆく計画である。調査対象者に反応を求める項目を考えるにあたり，「離職・就業継続の外的要因となりうるもの」，「内的要因としてありうるもの」，「選択される行動」に分けた。既存の調査結果，および，本論著者らの行った保育士資格保持者へのインタビュー調査（未発表）をもとに，「離職・就業継続の外的要因となりうるもの」，「内的要因としてありうるもの」，「離職・就業継続の選択行動」をリストアップした。

背景

保育施設の利用を希望しながら適切な施設に入ることができないという待機児童の問題を解決するため，厚生労働省は日本全国自治体へ待機児童問題解消への取り組みを求めてきた。2021 年に自治体の取り組み状況をまとめ,「保育所等関連状況取りまとめ（令和 3 年 4 月 1 日)」として公表した（厚生労働省，2021)。結果のポイントとして，①保育所等利用定員は 302 万人となり，前年比 5 万人の増加であったこと，②保育所等を利用する児童の数は 274 万人となり，前年比 5 千人の増加であったこと，③待機児童数は 5,634 人となり，前年比 6,805 人の減少であったこと，をあげた。③の具体的な数字として，待機児童のいる市区町村は，前年から 88 減少して 312 市区町村であり，待機児童が 100 人以上の市区町村は，前年から 18 減少して 4 市となり，待機児童が 100 人以上増加した自治体はなかった。待機児童が 100 人以上減少したのは，さいたま市(376 人減)，岡山市（228 人減)，明石市（216 人減）など 13 市区町であった。この取りまとめの内容から，待機児童問題は，自治体の取り組みによって軽減されつつあるといえる。

保育環境をめぐる問題は，保育施設定員の確保から，保育の質の向上へと移りつつある。厚生労働省（2020）の「保育の現場・職業の魅力向上に関する報告書」によれば，女性の就業率の向上等に伴い保育ニーズが増えたため，保育の担い手の確保が困難であることは変わらない。質の高い保育を行うためには保育士の確保が必要であり，そのためには，保育士の就労する現場と保育士の従事する仕事の魅力を高め，保育士のキャリア形成への展望を示すことが重要とされている。厚生労働省のこの報告書は，保育士がキャリアを進める過程の節目における動向を，次のようにまとめている。保育士養成校（保育士資格を取得する主要な途である指定保育士養成施設）の入学者数が微減傾向にあるうえ，卒業生の 15%が民間企業等に一般職として就職している。一般職に就職した者の約 4 割が，その理由を「保育所における保育実習で保育をすることに自信を持つことができなかったから」と回答している。 一方，平成 29 年度より保育士試験が年 2 回になり有資格者が増え，その約 8 割が保育士として就業する意思を

有する。しかし，合格者の約 6 割は，保育士としての就業に関し，労働条件・労働環境，保育・子育て・実習等の経験不足等からくる不安を感じている。また，同報告書では，令和元年度の東京都保育士実態調査の結果から,保育士の離職理由を紹介している。挙げられた離職理由として「職場の人間関係」,「給料が安い」,「仕事量が多い」「労働時間が長い」,「健康上の理由（体力含む）」,「妊娠・出産」,「結婚」がある。また，離職者の約 7 割，そのうち 30 代の女性では 8 割が,短時間勤務での復職意向を持っている。離職理由としての人間関係，待遇，労働環境等の問題を回避しながら，個人要因やライフイベントによる生活の変化に合わせることのできる働き方として,彼らは短時間勤務を選択するのだと考えることができる。有資格者が個人の生活上の利便・都合に合わせて離職・再就職を選択するということである。保育士も一個人であり，キャリア選択の当事者であることを考えれば当然である。

養成校卒業時に就職した保育士の数は，離職によって減少する（厚生労働省，2015）。この段階での離職･就業継続の選択要因を明らかにしておくことが,保育士確保に有効といえる。離職時の選択要因が回避されれば，離職を防ぐことにつながるだけではなく，離職後の業種内での転職や，再就職へもつながる。

保育士の離職要因

離職要因として，人間関係，待遇，労働環境，個人要因，ライフイベント等の存在が明らかにされていることは，既に述べた通りである。

要因には外的要因と，当事者の内面に存在する内的要因が含まれる。さらに次のように，単なる個々の要因だけではとらえきれない保育士のキャリア選択のプロセスの報告がある。

神谷（2010）は，保育士養成校への進学動機が他者からの働きかけにより形成されることを示した。しかし，当事者の行動が，他者からの働きかけの方向に沿って選択されるとは限らない。傳馬・中西（2014）は，保育士をケアし離職を思いとどまらせようとする管理職者の働きかけが結果的に離職の選択を促進した事例をとりあげ，管理職者の働きかけが当事者である保育士の求めるものではなかったと考察した。この事例は，当事者の認知が作り出す内的状態が，選択へと方向づけることを示している。他にも，仕事のやりがいと辞めたい思いのせめぎ合いの中で離職を選択する・思いとどまる（傳馬・中西，2014），かつて自分が選択しなかったもう 1 つの人生の経路を想起することで生じる後悔による離職（香曽我部，2018）も報告されている。

当事者の内面で作り出される，このような内的状態と離職・就業継続の選択との関わりを検討することは，保育士確保のために有効と考えられる。

離職要因のとらえ方と結果の一般化

本研究では，保育士の離職予防のための新たな視点として「保育士にとっての多様な選択肢の中での保育職の選択」に焦点を当てる。中心となるのは，「キャリア・パースペクティブ」の概念である。キャリア・パースペクティブとは「自分の人生における，職業生活を中心とした生き方の，実現可能性が加味された短期的･長期的見通し」(矢崎･金井,2005）と定義される。この見通しの中には，保育士の離職要因となる，外的要因と内的要因，さらに内的状態の要因が含まれると想定される。

以上をふまえたうえで，保育士の離職・就業継続に関わる内的状態をとらえるための手法を検討する。個人内で内的状態が生じるプロセスを追跡し，個々の当事者において起こりうる内的状態を抽出する方法として，複線経路等至性モデル(TEM)（サトウ・安田・木戸・高田・ヴァルシナー，2006）がある。既述の傳馬・中西（2014），香曽我部（2018）が使用した方法であり，当事者本人の内省からその認知過程を取り上げるものである。

一方で，保育士確保のための施策へとつなげるためには，内的状態についてできるだけ多くの保育士のケースに適用可能な結果を得ることにも意義がある。どのような個別要因と,どのような内的状態が,離職・就業継続の選択につながりうるのかを検討することで，保育士個人の選択への新たな働きかけが可能となる。そこで，多数の保育士に対する調査から，内的状態を抽出する方法を考えたい。ありうる要因と内的状態をあらかじめリストアップし，それ

らを項目として多数の保育士に回答を求める。得られる回答から，多くの保育士に起こりうるケースを抽出してゆく。

調査項目候補の選定

調査対象者に反応を求める項目を考えるにあたり，「離職・就業継続の外的要因となりうるもの」，「内的要因としてありうるもの」，「選択される行動」に分けることとする。「内的要因」とは，当事者の内面において生じるものであり，個別要因と既述の内的状態を含める。内的要因をこのように纏めるのは，調査項目として「外的」「内的」と 2 分することにより，回答が容易になると考えるからである。それぞれを先行研究からリストアップしてゆく。リストアップの対象となる先行研究は次のとおりである。

東京都福祉保健局（2018）は，東京都の保育士確保，育成及び定着策のための基礎資料とする事を目的に調査を行った。平成 25 年 4 月から平成 30 年 3 月までの東京都保育士登録者等（書換え登録等を含む。）48,000 人を対象とし，保育士就業中の者の実態，過去に保育士就業経験がある者の実態，保育士としての就業経験がない者の実態，について集計し公表した。

澤津・鎌田・山根（2015）は，短期大学の保育士養成課程卒業者を対象に調査を行った。保育士に想定される離職の理由として 30 項目を提示し，当てはまるものすべてを選択するように求め,10%以上選択された離職要因を多次元尺度法で分類した。①個人的要因-社会的要因の次元,②生活環境－職務環境の次元の 2 次元空間布置をもとに，近い座標の項目のカテゴリー化を行った。

傳馬・中西（2014）は，新卒保育者 1 名が就職してから離職に至るまでのプロセスを，TEM を使って具体的に描き出した。離職に至る径路に向かわせる力として，対象者が行った離職したいというアピールに対し，離職を思いとどまらせようとする副園長の存在があった。離職を思いとどまらせようとする働きかけが離職を促進することになったのは，副園長のかける言葉が，自身が求めるものとはかけ離れていたことが理由であったと考えられた。また，職員意向調査で離職への意向を表明した対象者に対し，園長面談等といった組織としての働きかけがなかったことも，離職を促進した。ただし傳馬・中西は，ここでどのような園側の反応があれば対象者が離職を思いとどまったのかについては不明としている。いずれにせよ，単に「人間関係」という理由だけでは捉え切れない複雑な状況があると，傳馬・中西は結論づけた。

香曽我部（2018）は TEM を用いて，保育士が離職し他の職種に再就職して潜在保育士となっていく経験の連続性を捉え，保育士が潜在化する要因を抽出した。過去の自分の選択「保育者になったこと」への後悔が，現実の「保育者である自分」と反実仮想である「他職種で働く自分」の間での対話関係をもたらし，「他職種で働く自分としてのアイデンティティ」が構成され，最後には現実と反実仮想が入れ替わり，潜在保育士となるというプロセスを明らかにした。

保育士にとってのポジティブな要因としての「やりがい」に着目した研究もある。工藤・久保・高木（2017）は，保育士の雇用環境の質を保ち保育士を確保するために「やりがい」は重要な役割を果たすと考え，保育士の雇用環境の実態調査を行った。結果から，給与という物理的な側面よりも仕事を純粋に楽しめる心理的環境の方が重視される傾向にあり，それが「やりがい」につながる可能性があることを指摘した。

同じく「やりがい」に着目した國田・ 槙尾（2020）は，保育士が集まって行ったグループワークを通して，保育士の「やりがい」を抽出した。成長する子どもの姿や保護者からの感謝，保育士の専門性からくる仕事への誇り，職員同士の共感や連携がやりがいとして挙がった。他者からの評価や助言がやりがいを支えるものとして重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の既存の調査結果をもとに，「離職・就業継続の外的要因となりうるもの」，「内的要因としてありうるもの」，「離職・就業継続の選択行動」をリストアップしたものが表 1 である。ここには，本論著者らの行った保育士資格保持者へのインタビュー調査（未発表）から抽出したものも含んでいる。

表1　既存の調査結果等からリストアップされた要因と選択行動

(1) 離職・就業継続の外的要因となりうるもの
業務負担の量
業務の内容
保育以外の雑務
職員数
勤務シフト
職員間のコミュニケーション
職員のための相談体制の充実度
有給休暇取得のしやすさ（しにくさ）
休暇日数
保育士の権限範囲
保育士の責任範囲
雇用の安定
雇用形態
研修の充実度
職員への評価制度
結婚
給与・賞与等
自分の職業適性
妊娠・出産
子育て・家事
労働時間
働くことが可能な家庭の状況
自身の健康状況
職場の人間関係
職場の慣習
配偶者の意向
家族等の意向
家族の理解と協力
転居
保護者対応
雇用期間が決まっている・定年
通勤時間
職場の人間関係
保護者や地域との関係性
施設の理念や運営方針
施設・上司からの自分への評価
悩みを相談する相手の有無
業務負担を軽減する業務支援システムの有無
時間単位の勤務が可能かどうか
職場の相談体制
保育施設の求人情報
保育施設就職へのサポート
他の職種の求人情報
他職種選択へのサポート
社会の保育士不足の状況
自分の趣味
ボランティアや体験保育
子どもとふれあう機会
成長する子どもの姿
保護者からの感謝
保育士の専門性
職員同士の共感や連携
勤務先選択の自由度
世間の経済状況（景気の良し悪し）

(2) 内的要因としてありうるもの
感じられる職場の雰囲気
仕事と給与のバランス
人を育てようという職場の雰囲気
職場の状況の満足度
給与・賞与への満足度
保育士の仕事で感じられるやりがい
保育士の仕事の楽しさ
保育士の仕事の充実感の度合い
子どもへの思い
保育士としての自信の度合い
保育士の仕事への誇り
自身のキャリアアップの可能性
将来への希望
施設の運営方針への納得感
保育士としての勤務より資格取得が目的
勤務における心労の多さ・少なさ
自分の希望する勤務年数
気合が入らない，頑張れない
保育士として働く意欲
保育士として働く必要性
他職種で働く意欲
他職種で働く必要性
他業種への興味
早期離職に対する世間の評価
早期離職が次の就職に不利に働くと懸念
保育士としての使命感
周囲からの期待
周囲からの期待への負担感
仕事をやらされている感じ
過去の進路選択の機会の有無
勤務園を選択した後悔
他の園で生き生き働く自分を想像
他の園では良い環境があるのではと思う
保育者になったことへの後悔
保育士を目指したときの気持ち
保育士資格の効用として期待すること
自分が望む生活
他のやりたい・やりたかった仕事
他の仕事をして生き生きと働く自分を想像
保育士以外のキャリアへのあこがれ

(3) 離職・就業継続の選択行動
勤めていた職場（施設）を辞める
勤めていた職場（施設）を辞めたいと思ったが思いとどまる
保育職を辞める
保育職を辞めたいと思ったが思いとどまる

分析方法の検討

今後の調査においては，表1の「離職・就業継続の外的要因となりうるもの」，「内的要因としてありうるもの」，「離職・就業継続の選択行動」を調査項目とし，これらに対する回答者の反応を要約することで，多くの保育士におこりうるケースを見いだし

てゆくことになる。分析にあたっては，「選択行動」で回答者をカテゴリー化し，それぞれのカテゴリーが経験する外的要因，内的要因をまとめていく。その際，2つの方法が考えられる。

1つの方法は，回答者に項目の経験について頻度あるいは程度の段階的な評定を求め，評定値の個人間分散をもとに，選択行動と関連する要因を検討する共分散構造分析などの方法である。十分な分散を得られるよう評定段階を設定する必要があり，項目数が増えれば段階評定を求められる回答者の負担は大きくなる。また，分析者は，個人間分散の関連と個人の内面で生じるプロセスとを混同しないよう注意する必要がある(吉田,2002)。もう1つの方法は，項目間関連をとらえることをあきらめ,要因の経験・未経験のみを尋ね，選択行動カテゴリーごとに経験頻度の高い項目を抽出する方法である。項目数が増えることによる回答者の負担は小さいが，得られる情報量は少ない。カテゴリーごとに当事者が経験しがちな要因の抽出にとどまり，それらの相互の関連や因果関係の検討は難しくなる。調査の実施のため，項目数を調整し，得られる情報量と回答者の負担がデータの信頼性に与える影響を天秤にかけながら，いずれの方法を採用するかを決定することになる。

文献

傳馬淳一郎・中西さやか (2014). 保育者の早期離職に至るプロセス：TEM（複線径路・等至性モデル）による分析の試み 地域と住民 : 道北地域研究所年報 32, 61-67.

神谷哲司 (2010). 保育系短期大学生の進学理由による保育者効力感の縦断的変化 保育学研究, 48(2), 92-201.

厚生労働省 (2020). 保育の現場・職業の魅力向上に関する報告書 保育の現場・職業の魅力向上検討会 https://www.mhlw.go.jp/content/11907000/000677595.pdf (2022年1月20日)

厚生労働省 (2021). 保育所等関連状況取りまとめ（令和３年４月１日） 保育所等関連状況取りまとめ（令和３年４月１日）及び「子育て安心プラン」「新子育て安心プラン」集計結果を公表 https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_20600.html (2022年1月5日)

香曽我部 琢 (2018). 保育者が潜在化するプロセス：潜在保育士の後悔という感情に焦点を当てて 宮城教育大学情報処理センター研究紀要：COMMUE, 25, 47-53.

工藤 歩・久保隆志・髙木博史 (2017). 保育人材確保に関する現状と課題：保育士雇用環境アンケート調査の結果から 日本福祉大学社会福祉論集, (136), 127-142.

國田祥子・槙尾真佐枝 (2020). 保育者のやりがいは何によって支えられているのか 中国学園紀要, 19, 141-147.

サトウタツヤ・安田裕子・木戸彩恵・高田沙織・ヴァルシナー ヤーン (2006). 複線径路・等至性モデル：人生径路の多様性を描く質的心理学の新しい方法論を目指して質的心理学研究, 5 (1), 255-275.

澤津まり子・鎌田雅史・山根薫子 (2015). 潜在保育士の実態に関する調査研究：離職の要因を探る 就実論叢, 45, 191-200.

東京都福祉保健局 (2018). 平成30年度東京都保育士実態調査結果（報告書） https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/kodomo/shikaku/30hoikushichousa.html (2022年1月17日)

矢崎裕美子・金井篤子 (2005). キャリア・パースペクティブ尺度作成の試み 日本社会心理学会第 46 回大会発表論文集, 308-309.

吉田寿夫 (2002). 研究法に関する基本姿勢を問う：本来の姿ないし基本に戻ろう 下山晴彦・子安増生（編著）心理学の新しいかたち 方法への意識 (pp.73-131) 誠信書房

タカキビプロシアニジンと澱粉との加熱調理に伴うアミロース消化の低下

山陽学園短期大学　健康栄養学科

廣田　幸子

概要

米粉は団子やパン、菓子などを作る際、様々な植物性食品と共に用いられる。この論文では、タカキビ種子の水性抽出物を加えて加熱したうるち米粉（上新粉）のパンクレアチン依存の澱粉分解について議論する。タカキビ抽出物は、加熱に伴って上新粉から遊離した水溶性アミロースの分解を抑制し、その抑制度は短いアミロースよりも長いアミロースの方が大きかった。この抑制は、タカキビに含まれているプロシアニジンとアミロースとの複合体形成によるものと議論した。さらに、タカキビ抽出物は上新粉から遊離した懸濁可能な澱粉粒子の分解も阻害し、その阻害は、アミロース/プロシアニジン複合体によるアミロペクチン分解抑制のためであると議論した。これらの結果は、タカキビをアミロース含有穀類と調理することにより、グリセミック指数が低い食品の調製が可能であることを示唆している。

１．背景と研究目的

植物由来の食物に含まれるフラボノイドは様々な働きを持つことが知られており、その代表的な働きとして、抗酸化作用、血圧上昇抑制作用、脂質吸収抑制作用などがあり、これらに関して数多く報告されている。これらの働き以外に、血糖上昇抑制作用も報告されている。

フラボノイドによる血糖上昇抑制作用の一つのメカニズムとして､澱粉分解酵素であるα-アミラーゼやα-グルコシターゼなどの阻害が可能である｡現在まで、フラボノイドによるこれらの酵素活性の阻害に関する研究は多くなされてきている。他方、フラボノイドと結合した澱粉のα-アミラーゼに対する基質性の低下も報告されている。このフラボノイドと澱粉との結合様式として、水素結合のような非共有的な結合が議論されている。他方、我々はフラボノイドが澱粉と疎水的に結合することによって、澱粉の基質性の低下を報告してきた。さらに、アズキとうるち米との炊飯過程で、アズキに含まれるプロシアニジンの分解産物が飯と結合することによって、飯澱粉の消化性が低下することも報告してきた（Morina et al., 2020; Takahama et al., 2021)。

アズキ以外のプロシアニジンを多く含む植物性食品として、タカキビ、クロダイズ、リンゴ等が知られている。タカキビは、別名「もろこしきび」あるいは「ソルガム」と言われ、岡山県の郷土食材として昔から用いられている。タカキビと共に炊飯した飯やタカキビを用いて調理した餅は淡赤色をしている。この淡赤色はプロシアニジンの酸化産物のよるものとし推測している。もし、タカキビに含まれているプロシアニジンが、先で述べたように、澱粉消化の抑制に関与しているとすれば、タカキビを米または米の加工品と共に加熱した場合、その澱粉の消化性は低下すると予想される。本研究では、プロシアニジンを含むタカキビ種子の水抽出物と米粉を加熱調理した場合、プロシアニジンがアミロースに結合してその消化を抑え、さらに、アミロース/プロシアニジン複合体がアミロペクチンの消化を抑えることを明らかにする。

２．材料と方法

2.1　材料、試薬、機器

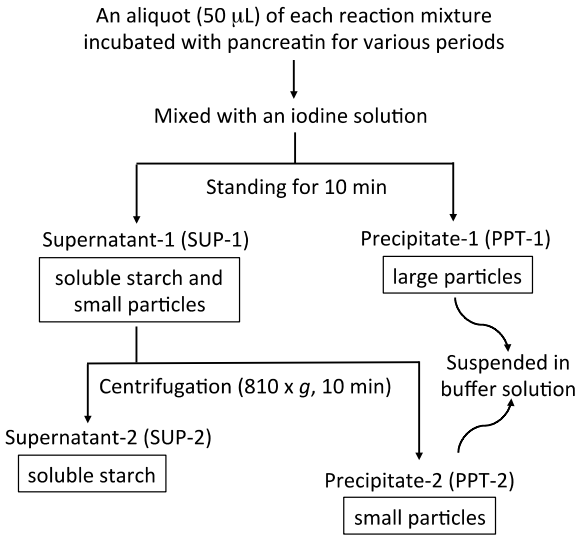
もち粉と上新粉は、丸世製粉（下関市）から、タカキビ種子（*Sorghum bicolor* (L.) Moench) は、すずや穀物（仙台市）から、ブタのパンクレアチンは、FUJIFILM 和光純薬（大阪）から入手した。パンクレアチン中の消化酵素の活性は次のとおりである:プロテアーゼ（26–46 単位 mg^{-1}、pH 8)、α-アミラーゼ（3–5 単位 mg^{-1}、pH 7)、リパーゼ（0.75–1.4 単位 mg^{-1}、pH 8)。ヨウ素溶液（100 mM）は、既報のように調製した（Hirota &Takahama, 2017)。

吸収スペクトルは積分球（ISR-240A）を備えた分

光光度計（UV-2450）（島津製作所、京都）を使用して測定した。測定光の光路長は 2 mm で行った。

2.2　タカキビ抽出物で加熱した米粉の澱粉分解

タカキビ種子(2 g)を 10 mL の 0.15 M NaCl を含む 0.1 M リン酸ナトリウム (Na-Pi) 緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、これを室温（約 20 °C）で約 16 時間放置後、遠心(1830 × *g*, 5 min)によって上清を得た。このように調製したタカキビ水抽出液(2 mL)に上新粉（20 mg）またはもち粉（20 mg）を加え、穏やかな沸騰水中で 10 分間加熱した。加熱後、37 °C に冷却、容量を 2 mL に調整した後、パンクレアチン(10 μg mL^{-1})を加えて反応を開始させた。澱粉分解速度は、反応液の一部(50 μL)を 10 分間隔で 90 分間取り出し推定した。



Scheme 1

2.3　澱粉分解の推定

パンクレアチンによる澱粉の分解は以下のようにして測定した。上で取り出した反応液(50 μL)および 100 mM ヨウ素溶液(0.1 mL)を、1 mL の 0.15 M NaCl を含む 0.1M Na-Pi 緩衝液 (pH 7.0) に順次添加した。この混合物を室温（約 25 °C)で 10 分間静置した(Scheme 1)。静置中に、大きな米粉粒子は沈殿した(PPT-1)。そこで可溶性および懸濁(浮遊)可能な澱粉を含む上相(SUP-1)を取り出し、吸収スペクトルを測定した。続いて、SUP-1 を 810 × *g* で 10 分間遠心し、沈殿物 (PPT-2) と上清 (SUP-2) を調製し、可溶性澱粉を含む SUP-2 の吸収スペクトルを測定した。PPT-2 の吸収スペクトルは、次の方法で求めた。一つは、各インキュベーション時間での SUP-1 と SUP-2 の差スペクトルから、他は PPT-2 を 1 mL の 0.15 M NaCl を含む 0.1M Na-Pi 緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した懸濁液の吸収スペクトルからであった。

澱粉の分解は一次反応的であると仮定した。そこで、500、550、および 700 nm での吸光度の減少を片対数プロットした。半減期は最小二乗法（r > 0.95）で求めた傾きから計算した。上のそれぞれの波長は短鎖、中鎖、および長鎖のグルコースで構成されている澱粉の濃度を反映していると仮定した。

2.4　上新粉に結合したプロシアニジンの推定

タカキビ抽出物 3 mL に上新粉（30 mg）を加え、沸騰水中で 10 分間加熱した後、37 °C に冷却し、これにパンクレアチン加えた。パンクレアチン(10 μg mL^{-1}) を添加してから 0、30、60 分後に一部 (0.4 mL) を取り出し、1 mL の 0.15 M NaCl を含む 0.1 M Na-Pi 緩衝液 (pH 7.0) と混合した。混合物を 10 分間静置し、PPT-1、PPT-2、および SUP-2 を Scheme 1 のように調製した。PPT-1 と PPT-2 は 1 mL の水に懸濁した。また、SUP-2 にはエタノール（最終濃度 70%, v/v) を加え、1830 × *g* で 5 分間遠心し、エタノール不溶性沈殿物を調製した。この沈殿物も 1 mL の水に懸濁した。これらの沈殿物に結合しているプロシアニジンは Amarowicz & Pegg (2006)の方法を用いて推定した。

2.5　統計解析

それぞれの実験は 3 回以上繰り返し、データは平均と標準偏差を表示した。サンプル間の有意差の有無は、Student's t-test ($p < 0.05$) を用いて求めた。

3．結果と考察

3.1 パンクレアチン依存の加熱上新粉澱粉の分解

3.1.1 SUP-1 と PPT-1

加熱した上新粉をパンクレアチン処理前に、Scheme 1 のように調整した SUP-1 の吸収スペクト

ルは、600 nm 付近にピークを持っていた（図 1A trace 0）。この結果は、米粉粒子から拡散した澱粉は主にアミロースで構成されていることを示している。パンクレアチン処理（10 分間）によって、全波長域で吸光度が増加した（trace 10）。この吸光度の増加に伴い、PPT-1 の吸収スペクトルは、trace 0 から trace 10 へ変化した（図 1B）。この変化は、PPT-1 から SUP-1 への澱粉の遊離によるものであると考えられる。パンクレアチン処理を 10 分間以上続けると、SUP-1 の全波長域で吸光度が減少し、吸収極大は短波長側に移動した。この結果は、SUP-1 では澱粉がパンクレアチンによって時間とともにヨウ素と結合できない短い澱粉に分解され、また、その分解速度は PPT-1 からの澱粉遊離速度よりも大きいことを示している。

3. 1. 2　SUP-2

図 1C は、可溶性澱粉が含まれている SUP-2 の吸収スペクトルの時間変化である。パンクレアチン添加前 (trace 0) の吸収スペクトルには吸収極大がなく、600 nm より短波長の吸光度はベースラインを下回っていた。この結果は、SUP-1 (図 1A, trace 0) のほとんどすべての澱粉/ヨウ素複合体が SUP-2 の調製に伴う遠心で沈殿したと同時に、SUP-2 のヨウ素濃度が低下したことを示している。パンクレアチン添加 10 分後 (図 1C, trace 10) では、澱粉/ヨウ素複合体の吸光度は増加した。この増加は、SUP-1 (図 1A, trace 0) の澱粉が可溶化したと同時に PPT-1 からの可溶性澱粉の遊離のためと考えられる。その後の減少は、SUP-2 の可溶性澱粉の分解である。

3. 1. 3　PPT-2

SUP-1 からの SUP-2 の調製に伴って得られた PPT-2 の吸収スペクトルは、まず、パンクレアチンによる各処理時間での SUP-1 と SUP-2 間の差スペクトルから推定した (図 1D)。パンクレアチン添加前 (trace 0) の差スペクトルは、580 nm と 700 nm 付近に肩が観察された。添加 10 分後 (trace 10)では、全波長域で吸光度が減少し、その減少は 700 nm 付近で顕著であった。添加後 10–30 分では、全波長域の吸光度が増加し、その後、徐々に減少したが、550 nm 付近に吸収極大を持つ成分の吸光度減少は遅かった。このことはこの成分が分解されにくいことを示している。

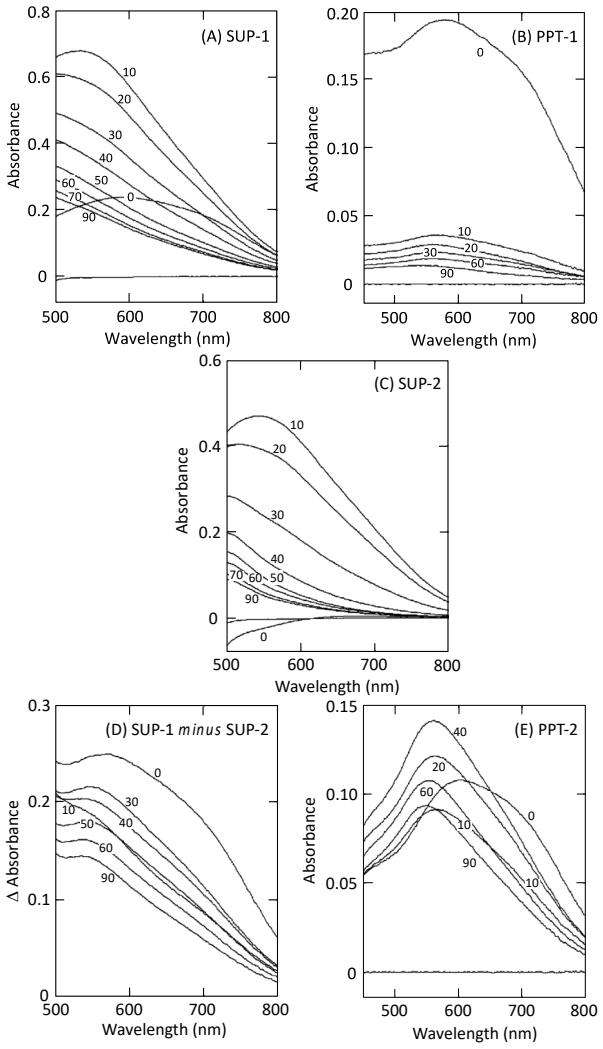


Fig. 1 Pancreatin-induced changes in absorption spectrum of starch-iodine complexes as a function of incubation time. (A) SUP-1, (B) PPT-1 suspended in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0) with 0.15 M NaCl, (C) SUP-2, (D) SUP-1 *minus* SUP-2, (E) PPT-2 suspended in the above buffer solution. Numbers on traces, time in min after the addition of pancreatin.

図 1E は、SUP-1 からの遠心による SUP-2 の調製に伴って得られた沈澱 PPT-2 の懸濁液の吸収スペクトルの時間変化である。Trace 0 には 600 nm と 700 nm 付近に肩が観察された。この肩は図 1D の 580 nm と 700 nm の肩に対応すると考えられる。700 nm 付近の吸光度は 10 分間のパンクレアチン処理で減少

し、その後、550 nm 付近に吸収極大を持つ澱粉が増加し、処理 40 分後から 550 nm 付近の吸光度はゆっくりと減少した。このゆっくりとした減少は、図 1D の 550 nm 付近で減少した吸光度と対応していた。

上の二つの吸収帯 (600 および 700 nm) の由来を確かめるため、試薬アミロース 5KD（平均 DP＝28）と 30 KD（平均 DP＝196）を緩衝液中で加熱/懸濁させ、それらのアミロース/ヨウ素複合体の吸収スペクトルを測定した。5KD アミロースは 570 nm 付近に、30KD アミロースは 650 nm 付近に幅広い吸収極大と 600 nm および 700 nm 付近に肩を持っていた。この結果は、PPT-2 に短いアミロース分子と長いアミロース分子が存在することを示唆している。

SUP-1 と SUP-2 との間の差スペクトルでは、米粉粒子中のアミロペクチンから遊離した短鎖のアミロペクチン/ヨウ素複合体は、510–540 nm の吸収帯 (Wang et al., 2010; Wang et al., 2019)として観察されたが（図 1D）、PPT-2 の懸濁液ではこの吸収帯は観察されなかった（図 1E）。これは、PPT-2 の懸濁液ではヨウ素濃度が低いためであると考えた。短鎖の澱粉に結合しているヨウ素は希釈に伴って、澱粉から遊離すると報告されている（Hollo & Szejtli, 1957）。

3.2 澱粉の分解に対するタカキビ抽出物の影響

図 2 には、加熱した上新粉澱粉のパンクレアンによる分解が示してある。SUP-1 ではタカキビ抽出物を加えずに加熱した場合、澱粉/ヨウ素複合体の 550 nm での吸光度はパンクレアチン添加後 10 分で最大に達し、その後減少したが(○)、タカキビ抽出物と共に加熱した上新粉では、添加後 20 分で最大に達し、その後減少した(●)(図 2A)。この遅延は、タカキビ抽出物による PPT-1 からの澱粉遊離の阻害のためと考えられる(図 2B)。添加 20 分以降の 550 nm での吸光度の減少は、タカキビ抽出物によって抑制され、この抑制は、タカキビ成分による SUP-1 の澱粉分解の阻害を示している。

図 2C には、タカキビ抽出物による SUP-2 の澱粉分解抑制を示している。図 2D には、550 nm での SUP-1 と SUP-2 間の吸光度差の時間変化を、図 2E には、PPT-2 懸濁液の 550 nm での吸光度の時間変化を示している。パンクレアチン添加後 20–50 分間では、タカキビ抽出物による PPT-2 の増加抑制はわずかであったが、この抑制はタカキビ抽出物による PPT-1 からの PPT-2 の遊離阻害のためであると考えられる。添加 50 分後以降では、550 nm での吸光度の減少は、両図ともタカキビ抽出物によって遅くなった。この遅延は、タカキビ抽出物が PPT-2 澱粉の分解/遊離を阻害したためであると考えられる。

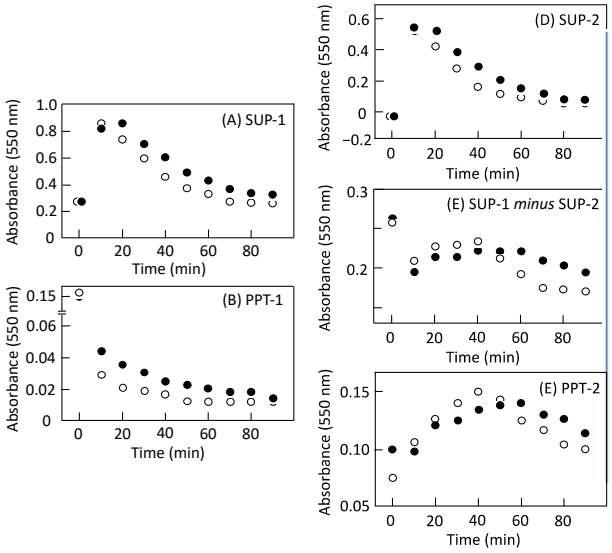


Fig. 2 Effects of sorghum extract on time courses of pancreatin-induced changes in absorbance at 550 nm.

3.3 澱粉分解の半減期のタカキビ抽出物の影響

表 1 は、Scheme 1 で調整した画分での澱粉分解の半減期に対するタカキビ抽出物の影響である。SUP-1 の半減期は、測定波長が短くなるにつれて長くなった。このことは、まず長鎖澱粉が短鎖澱粉に分解され、生成した短鎖澱粉が更に分解されることを示している。タカキビ抽出物は半減期を延長したが、その延長度には波長間での有意差は見られなかった。パンクレアチン添加後 10 分間の PPT-1 からの澱粉遊離の半減期もタカキビ抽出物によって増加したが、表 1 の波長間で有意差は見られなかった。このことは、タカキビ抽出物は PPT-1 からのアミロースとアミロペクチンの両方の遊離を阻害できることを示唆している。

SUP-2 の半減期も、測定波長が短くなるにつれて増大した。タカキビ抽出物は、全ての波長での半減

期を延長させたが、700 nm での延長の程度は 500 nm でのそれの約２倍であった。SUP-2 には可溶性のアミロースとアミロペクチンが含まれていると考えられるので、この結果は、短鎖アミロースやアミロペクチンよりも長鎖アミロースの加水分解がタカキビ成分によってより効果的に抑制されることを示唆している。この抑制機構とし、タカキビに含まれているプロシアニジンによる二分子の長鎖アミロース間での二重螺旋構造の形成が考えられる。

Table 1 Effects of sorghum extract on half-lives of starch hydrolysis

Fraction		Half-life (min) (n = 4)		
		500 nm	550 nm	700 nm
SUP-1[a]	Control	43.4 ± 1.5	33.1 ± 1.2	25.1 ± 1.6
	+ sor	53.8 ± 7.6	42.7 ± 4.9	38.5 ± 4.6
		(124 ± 21)	(129 ± 19)	(154 ± 26)
PPT-1[b]	Control	3.70 ± 0.48	4.03 ± 0.26	3.50 ± 0.16
	+ sor	5.98 ± 1.45	6.08 ± 1.88	5.83 ± 1.31
		(161 ± 32)	(154 ± 35)	(152 ± 32)
SUP-2[a]	Control	26.4 ± 2.3	15.8 ± 1.3	8.4 ± 0.9
	+ sor	31.6 ± 3.9	22.6 ± 2.6	17.0 ± 1.5
		(117 ± 14)	(145 ± 27)	(203 ± 20)
SUP-1 *minus* SUP-2[c]	Control	75.4 ± 9.0	74.1 ± 9.8	55.2 ± 10.2
	+ sor	227 ± 43	180 ± 40	89 ± 20
		(316 ± 83)*	(246 ± 64)*	(155 ± 23)
PPT-2[d]	Control	91.5 ± 6.3	66.5 ± 4.7	41.4 ± 2.6
	+ sor	155 ± 8	101 ± 11	60.1 ± 8.5
		(170 ± 14)	(157 ± 26)	(150 ± 8)*

[a] Half-life was determined using the data of the 20−70 min, 20−60 min, and 20−50 min incubation periods at 500, 550, and 700 nm, respectively.
[b] Half-life was determined using the data between 0 and 10 min of incubation.
[c] Half-life was determined using the data of the 40−70 min incubation period in control at the three wavelengths, and determined using the data of the 40−90 min incubation period at 500 nm, and the 60−90 min incubation periods at 550 and 700 nm in + sor (sorghum extract)
[d] Half-life was determined using the data of the 40−90 incubation period in the control, and the 60−90 min in + sorghum at the three wavelengths.
Numbers in parentheses, values relative to Control.
*, significant difference in half-life from that at 700 nm ($p < 0.05$).

プロシアニジン以外に、コーヒー酸、ケルセチン、および没食子酸エピガロカテキンは、二分子のアミロース間に二重螺旋構造を形成できると報告されている（Chang et al, 2020; Yu et al, 2021; Ekaette & Saldaña, 2020; Li et al., 2020：Takahama & Hirota, 2021）、また、二重螺旋構造のアミロースは一重螺旋構造のアミロースより分解されにくいことも報告されている (Tamura & Ogawa, 2012; Gidley et al, 1995)。

SUP-1 と SUP-2 との差スペクトルから求めた半減期と、PPT-2 懸濁液の吸光度減少の半減期との間には大きな違いは見られなかった。タカキビ抽出物はこれらの半減期を増大させた。差スペクトルから求めた半減期では、その増大は 500 nm および 550 nm の方が 700 nm より大きかったが、PPT-2 懸濁液では、その増大に波長による違いは見られなかった。

上で議論したように、もし PPT-2 懸濁液での半減期が PPT-2 に含まれている短鎖アミロースの分解あるいは遊離によるものであると仮定すれば、表 1 の数値は、タカキビ抽出物が短鎖アミロースの分解/遊離を阻害できることを示している。これと異なって、SUP-1 と SUP-2 との差スペクトルから求めた半減期のタカキビ抽出物による半減期の増大度は、測定波長が短くなるにつれて大きくなった。このことは、PPT-2 ではタカキビ抽出物がアミロペクチンの分解をアミロースの分解より抑制しやすいことを示している。もし、アミロース/プロシアニジン複合体がアミロペクチンを取り囲めば、タカキビ抽出物によるアミロペクチン分解抑制が可能になる。

3. 4 PPT-1、PPT-2 および SUP-2 に結合したプロシアニジンの増減

デンプンの分解を阻害する可能性のあるプロシアニジンが、PPT-1、PPT-2 および SUP-2 から調製した沈殿物 (ppt of SUP-2) に結合しているかどうかを、プロシアニジンからのシアニジン生成を用いて調べた (Amarowicz & Pegg, 2006)。シアニジンは、パンクレアチンを添加する前に得られた沈殿物で生成した（表 2)。PPT-1 でのシアニジン生成はパンクレアチン処理によって減少し、PPT-2 および ppt of SUP-2 では増加した。この結果は、パンクレアチンによって PPT-1 からプロシアニジンと結合した PPT-2、および SUP-2 に存在するプロシアニジンと結合した可溶性澱粉が遊離されたこと、また、これらの遊離した PPT-2 および SUP-2 に結合しているプロシアニジンは、これらの画分での澱粉の分解の阻害に関与して

いることを示している。

Table 2 Cyanidin formed by treating the precipitates by the 1-butanol/HCl/Fe(III) system.

	Cyanidin formed (A_{545} arbitrary unit) (n = 4)		
Incubation time	PPT-1	PPT-2	ppt of SUP-2 [b]
0 min	39.8 ± 3.9 (100)	31.8 ± 3.8 (100)	20.8 ± 5.1 (100)
30 min	35.0 ± 5.0 (85 ± 7)	58.3 ± 13.5 (186 ± 53)	27.8 ± 6.8 (134 ± 19)
60 min	33.8 ± 2.3 (85 ± 6)	68.0 ± 10.6 (214 ± 28)	29.3 ± 8.6 (141 ± 29)

[a] Details are found in Section 2.4.

[b] Precipitate prepared from SUP-2.

4. まとめ

加熱上新粉にパンクレアチンを加えた後、上新粉の一部を採取して澱粉/ヨウ素複合体を作らせた。この複合体を画分し、それぞれの画分での澱粉/ヨウ素複合体の濃度を測定した（Scheme 1）。タカキビ抽出物を加えずに加熱した上新粉では、パンクレアチンは、先ず、PPT-1 (大きい米粉粒子画分) から SUP-2 (可溶性澱粉画分) と PPT-2 (懸濁性澱粉粒子画分) を遊離させた。遊離した SUP-2 の澱粉は、時間と共に分解された。遊離した PPT-2 の澱粉濃度は、時間と共に、減少→増加→減少した。

タカキビ水抽出物は、PPT-1 からの SUP-2 および PPT-2 の遊離を僅かに抑制した。また、この抽出物は、遊離した SUP-2 の分解も抑制し、その抑制は 500 nm < 550 nm < 700 nm の順に大きくなった。この結果から、タカキビ成分であるプロシアニジンは短鎖のアミロースやアミロペクチンよりも、長鎖のアミロースの分解を効率よく抑制すると推定した。

一方、タカキビ抽出物は、PPT-2 の分解も抑制した。この抑制は、分解されにくいアミロース/プロシアニジン複合体がアミロペクチンに結合して、その分解を抑えるためであると議論した。この議論は、アミロペクチンからなるもち粉の分解にタカキビ抽出物は影響を与えなかったという結果と、タカキビ水抽出液と上新粉との加熱に伴って、プロシアニジンが上新粉澱粉と結合できるという結果 (表 2) によって支持された。

このように、タカキビ抽出物中のプロシアニジンは上新粉澱粉の分解を抑制し、その抑制にはアミロースが重要な役割を持つことがわかった。

5．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。また、本研究は、2020－2022年度学術研究助成基金助成金 基盤研究 (C) の助成も受けております。

6．参考文献

Amarowicz, R., & Pegg, R.B. (2006). *Polish J. Food Nutr. Sci.* 15/56, 319–322

Chang, R., Xiong, L., Li, M., Wang, Y., Lin, M.; Qiu, L.; Bian, X.; Sun, C., & Sun, Q. (2020). *Int. J. Biol. Macromol.* 150, 644–653

Ekaette, I. & Saldaña, M.D.A. (2020). *Food Hydrocoll.* 100, 105421, https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105421

Gidley, M.J., Cooke, D., Dark, A.H., Hoffmann, R.A., Russell, A.L., & Greenwell, P. (1995). *Carbohydr. Polym*. 28, 23–31

Hirota, S., & Takahama U. (2017). *J. Agric. Food Chem*. 65(10), 2172–2179.

Holló, J. & Szejtli, J. (1957). Periodica Polytechnica. Chemical Engineering; Budapest 2, 25–37.

Li, Y., Gao, S., Ji, X., Liu, H., Liu, N., Yang, J., Lu, M., Han, L., & Wan, M. (2020). *Int. J. Biol. Macromol*. 163, 1729–1737

Morina, F., Hirota, S., & Takahama, U. (2020). *Int. J. Food Sci. Nutr.* 71, 715–725.

Takahama, U., & Hirota, S. (2021). *Molecules* 11; 26 (20): 6121. DOI: 10.3390/molecules26206121

Takahama, U., Hirota, S. & Morina, F. (2021). *Eur. Food Res. Technol.* 247, 121–131.

Tamura, M., & Ogawa, Y. (2012). *J. Cereal Sci.* 56, 404–409.

Wang, J., Li, Y., Tian, Y., Xu, X., Ji, X., Cao, X., & Jin, Z. (2010). *Starch-Stärke* 62, 508–516.

Wang, C., Wang, Y., Liu, X., Cao, P., Hu, X., Chen, Y., Li, S., Xiao, Y., & Min, Y. (2019). *Starch-Stärke* 71, DOI: 10.1002/star.201800339

プレゴールデンエイジ期におけるキンダートーネン運動学習効果の科学的検証（3 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]、後藤　大輔[3]、梶西　将司[1]

（概要）
子どもにとって、6～12 歳の時期（ゴールデンエイジ期）は神経系の発達がほぼ完成に近づく時期であるが、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期、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。
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（ドイツ式子ども体操）運動学習」による効果について、科学的な測定・検証を目的とする。具体的には、キンダートーネン運動教室を企画・運営する民間企業と連携・協力し、2 つの運動教室（岡山市・広島市）の通学児（3～6 歳）に対し、基礎運動能力テスト（25m走、立ち幅跳び、ボール投げ）および運動スキル測定（逆上がり、足抜き）を実施した。
その結果、キンダートーネン運動学習教室に通っている子どもは、①外遊びの時間が増えるなど生活習慣が改善された、②一定期間以上通う子どもに全国平均値を上回る有意差が見られた、③4～5 歳児において運動スキルと運動能力の間に有意な相関関係が確認されたなど、科学的かつ有効な検証結果が得られた。

Ⅰ．本研究の背景

本研究の目的は、子どもの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）運動学習による効果について科学的に測定・検証することである。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。

本研究では、中国・近畿地区に 4 つの KT 運動学習教室（岡山市、広島市、宝塚市、伊丹市）を展開する㈱エヌ・シー・ピー（岡山市北区、以下、「N 社」）の協力を得て、2019 年度よりその学習効果の検証を試みた。N 社は、1994 年より 27 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（**写真 1** 参照）。



写真 1　N 社の KT 運動学習教室

なお、N 社の KT 運動学習教室に通学する幼児・児童の多くは、同年代の子どもに比べ運動能力が見劣りする場合が多く、保護者が将来の学校体育授業や運動会での成績等を懸念し、「子供に恥をかかせたくない」という想いで通学させるケースが多い。

Ⅱ．これまでの研究成果

Ⅱ－1　1 年目(2019 年度)の研究成果

1 年目の主な研究成果としては、KT 運動学習効果の地域性分析として、以下の 2 点を実施した。
①N 社の 4 教室の現状把握（ヒアリング調査等）
②主要 2 教室（岡山、広島）における保護者アンケート分析

とくに、②の保護者アンケート（無記名）においては、計 259 件（岡山教室 n＝164, 広島教室 n＝95）の有効回答を得た。主な質問内容としては、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」との質問に対し、通学前に比べ「運動が得意になった」との回答が、岡山教室で 1.10 倍、広島教室で 1.49 倍となり、KT 運動教室による運動学習効果の向上が数値データとして示された。

また、KT 教室通学により「子供の基礎的な運動能力（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」との質問に対しては、両教室を合わせて、約 78%が「運動能力が向上した」と回答するなど、運動能力の発達に効果があることが示された（**図１**参照）。

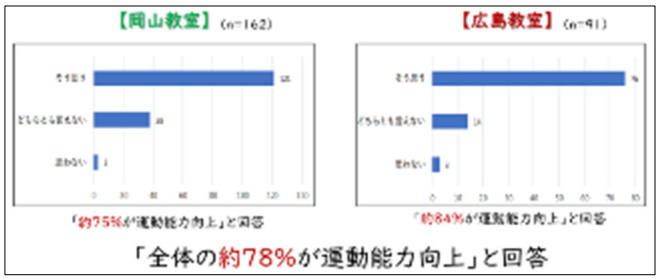


図１　運動が得意か、苦手か

さらに、特筆すべきは「子供の『協調性』が向上したか」、「子供の『コミュニケーション力』が高くなったか」等の質問に対しても、両教室ともに過半数以上が「向上した」と回答するなど、個人の運動能力に加え、集団組織生活面での効果が明らかになった[1]。

Ⅱ－２　２年目(2020 年度)の研究成果

2 年目は、「ナレッジ・マネジメントによる指導ノウハウの形式知化」を主な研究テーマとして取り組んだ。

N 社の指導スタッフは、体育大学卒業者や体操競技の経験者など、計 8 名の指導者がそれぞれ得意の運動分野を持ち、指導にあたっている。しかしながら、各教室内で指導者同士のミーティングや勉強会は定期的に開催されているものの、指導者自らの経験値と体感からの指導が多く、指導者それぞれが保有するノウハウ(Know-how)などを文章・図表・映像等のマニュアルに十分に置換できていないのが現状であった。

本研究では、KT 運動教室にナレッジ・マネジメント手法である SECI モデルを用い、指導者が持つ無形の知識（Knowledge）やノウハウといった「暗黙知」を、文章・画像・動画等の「形式知」へ置換作業を行う「ナレッジ経営」を N 社に導入するための手法について検討を行った。

SECI モデルとは、ナレッジ・マネジメントの 4 つのフェーズ「共同化（Socialization）」「表出化（Externalization）」「連結化（Combination）」「内面化（Internalization）」から構成され、個人、集団、組織がそれらをスパイラルさせて戦略的に知識を創造し、マネジメントすることを目的とする（**図２**参照）。

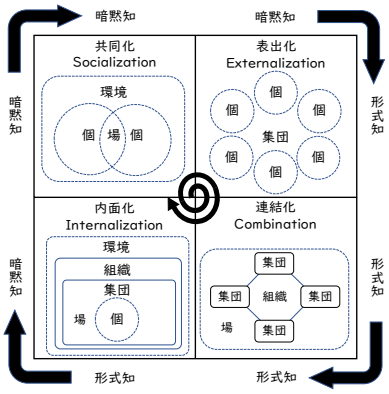


図２　SECI モデル

上述の課題に対して、N 社の主要 2 教室（岡山、広島）において、年齢別の 5 つのクラスの指導風景を動画撮影し、その動画を研究メンバーで協議した上でマニュアル化し、SECI モデル（共同化、表出化、連結化、内面化）」に当てはめ、文字化や動画として保存するなど形式知化を図った（**写真２**参照）。



写真２　専門家と N 社幹部との検証作業

その後、N 社は 2 年目の研究を通じて浮き彫りとなった課題・改善点を克服するため、以下の 2 つの取り組みを行い、SECI モデルを意識したナレッジ経営に取り組んでいる。

①広島教室の店長が月 1 回、本社のある岡山教室にて子どもへの体操指導を行い、スキルと情報共有を図っている。そして、オンラインツールや SNS を活用し、2 教室の指導者が定期的に情報交換を行う仕組みを構築している。

②KT 学習指導のマニュアル（形式知）と指導者が持つ経験と Know-how（暗黙知）をテキスト化し、形式知を進めている。

Ⅲ　３年目（2021 年度）の研究成果

Ⅲ－１　主な研究テーマ

３年目（2021 年度)は、これまでの研究成果を踏まえ、以下の 3 点を主な研究テーマとして取り組んだ

(1) KT 教室に通う子どもの運動能力は、全国平均と比較して優位なのか。つまり、アンケート結果から得られた定性的側面に加え、体力向上効果が定量的データとして得られるのか。

(2) 一定期間以上 KT 教室に通っている子どもは、その通学期間に見合う体力向上効果が定量的データとして得られるのか。

(3) KT 運動教室に通学することによって、将来、子どもが様々なスポーツに適応できるための自己運動コントロール機能が修得できているのか。

Ⅲ－２　具体的な検証項目

(1) KT 運動学習教室通学児の生活習慣に関するアンケート調査の実施

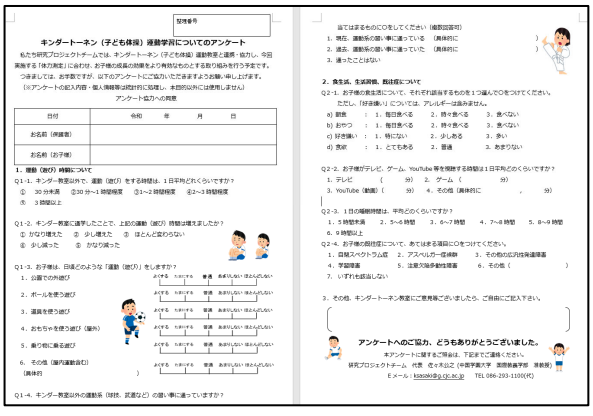

キンダートーネン（子ども体操）運動学習についてのアンケート

図３　子どもの生活習慣に関するアンケート調査

N 社が運営する 2 教室（岡山教室・広島教室）の通学児向け（n=85）に、KT 運動教室以外で運動（外遊び等）をする 1 日の平均時間、日頃の「運動（外遊び等)」の方法、食生活や既往症についてアンケートを実施した（**図３**参照)。

(2) KT 運動学習教室通学児への基礎運動能力テストの実施

プレゴールデンエイジ期の KT 運動学習教室通学児の基礎運動能力を測るため、N 社の主要 2 教室において、基礎運動能力テストを行った（**表１**参照)。

表1　運動能力テスト（岡山教室・広島教室）

	岡山教室	広島教室
実施日	2021年9月20日	2021年10月2日
場　所	N社本社（岡山教室）	鈴が峰公民館
参加者数	43人	42人

基礎礎運動能力テストでは、以下の 2 項目を測定した。

①形態測定として、身長・体重を測定した。

②体力測定として、25m走、立ち幅跳び、ボール投げの 3 種目を測定し、全国平均(2008 年度文部科学省公表値）との比較を行った（**写真３・４**参照)。



写真3･4　運動能力テスト

(3) 運動スキル測定として、逆上がり、足抜きの 2 種目の測定

表2　運動スキル測定（岡山教室・広島教室）

①　逆上がり

項目	チェックポイント	評価
跳ぶ・蹴る	片足の振り上げとともに、反対の足で地面をしっかり蹴ることができている	A・B・C
支える・逆さになる	体を鉄棒に近づけたまま、逆さの姿勢になることができている	A・B・C
回る・起きる	体を回転させながら、軽快に起き上がることができている	A・B・C

②　足抜き

項目	チェックポイント	評価
跳ぶ・蹴る	片足の振り上げとともに、反対の足で地面をしっかり蹴ることができている	A・B・C
支える・逆さになる	両腕でぶら下がったまま、逆さの姿勢になることができている	A・B・C
回る	両腕の間から体を回転させて、脚を中に通すことができている	A・B・C

子どもが逆さの姿勢で鉄棒にぶらさがり、自分の身体を保持・引き上げるなど、基礎的な自己運動コントロール機能について調べるため、逆上がりと足抜きの技能を A（3 点)、B（2 点)、C（1 点）で評価し、運動能力（走・跳・投）との相関関係について分析した（**表２、写真5･6**参照)。




写真5･6　運動スキル測定

なお、分析にあたっては、上述の運動能力テストデータが各年齢層とも必ずしも正規分布となっていないため、スピアマンの順位相関係数を用いた。

Ⅳ　検証結果

Ⅳ－１　生活習慣に関するアンケート結果

「遊びの時間がかなり増えた」(17%)、「少し増えた」(52%)と、合計で約 70%の保護者が KT 運動教室に通うことで、「子どもの遊び時間が増えた」と回答している（**図４**参照)。

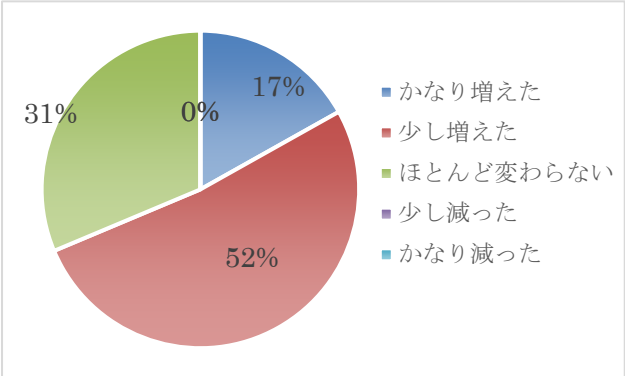


図4　KT 教室通学後、運動(遊び)の時間が増えたか

年齢別では、3 歳児(岡山 72%、広島 80%)、4 歳児(岡山 75%、広島 78%)、5 歳児(岡山 69%、広島 64%)など、KT 運動教室に通うことで、プレゴールデンエイジ期の子どもの生活習慣が改善していることが明らかになった。

Ⅳ－２　運動能力テストの検証結果

今回実施した測定で得られたデータのうち、25m 走、立ち幅跳び、ボール投げの各年齢階級で比較を行った結果、全 18 項目のうち 11 項目で全国平均を上回る結果となった。とくに、25m 走・立ち幅跳びは顕著に差が見られる結果となった（**表３**参照)。

表3　測定データの平均と全国平均の比較

	観測データ			全国平均		
	25m走	立ち幅跳び	ボール投げ	25m走	立ち幅跳び	ボール投げ
男子(4歳)	8.23	79.06	4.25	7.62	82.6	4.7
女子(4歳)	7.85	81.25	3.42	7.91	76.4	3.5
男子(5歳)	6.67	103.33	6.43	6.7	98.1	6.6
女子(5歳)	6.61	97.5	4.81	6.9	90.9	4.5
男子(6歳)	5.99	115	8.04	6.17	111.8	8.8
女子(6歳)	6.47	106.67	6.0	6.36	102.7	5.6

赤字は全国平均よりも良い結果

(資料)全国平均値は、森ら(2011)[2]を参照。

ただし、t 検定を行った結果、どの年齢・性別においても有意差は認められなかった。

一方、一定期間(母数データの平均期間)以上 KT 教室に通っている子どもに限定し、再度 t 検定による分析（全国平均値との比較）を行ったところ、

①25m 走において、4 歳女子と 6 歳男子
②立ち幅跳びにおいて、4 歳女子
③ホール投げにおいて、5 歳女子

の各々の層において、有意差が見られた(**図５**参照)。

この分析結果は、対象母数の減少などから、厳密な統計的有意差とまでは断定できないものの、KT 運動教室に一定期間以上通うことで、運動能力に効果がある可能性があることが示唆される結果となった。

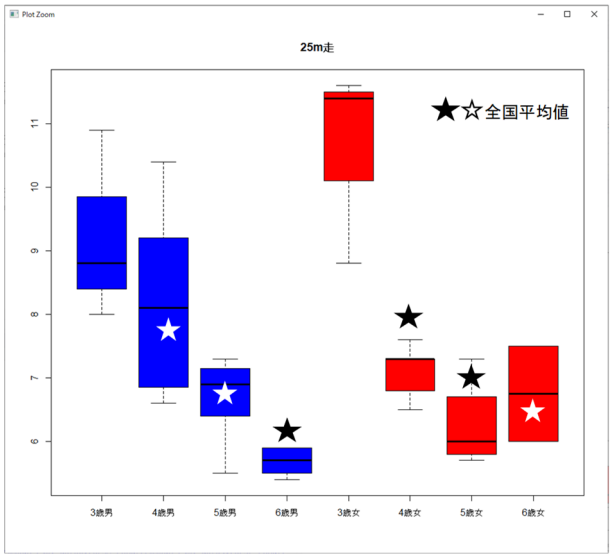


図5　観測データの平均と全国平均の比較(25m 走)

Ⅳ-３　運動スキル測定の結果

逆上がりと足抜きの運動技能と走・跳・投の測定記録との相関関係については、以下のとおりの結果が示された。

(1) 4 歳児の検証結果

①逆上がりと 25m 走との間に有意な相関関係が確認された。

②立ち幅跳びとの間に有意な傾向 (p=0.089) がみられた。

③足抜きと 25m 走・立ち幅跳び・ボール投げとの間に有意な相関関係が認められた。

④逆上がり＋足抜きと 25m 走・立ち幅跳び・ボール投げとの間に有意な相関関係が確認された。

(2) 5 歳児の検証結果

①逆上がりと立ち幅跳びとの間に有意な傾向（p=0.097）が確認された。

②ボール投げとの間に有意差が認められた。

③逆上がり＋足抜きと 25m 走（p=0.070）と立ち幅跳び (p=0.072) の間に有意な傾向が確認され、ボール投げとの間には有意差が確認された。

今回のスキル測定項目である足抜きの動作は、鉄棒にぶら下がった状態で行われるため､身体(体重)を保持する力が必要である。これに加えて、逆上がりでは身体（体重）を引き上げる力が必要となる。さらには、足抜きや逆上がりでは地面を強く蹴る動作や股関節をすばやく屈曲（腿を振り上げる動作）する動きが必要である（**写真 7** 参照)。



写真7　運動スキル測定

つまり、KT 運動教室に一定期間通うことで、身体の発育発達に合わせ、動きに力強さとコントロール機能が加わることにより、子どもの体力および運動スキルが向上することが示唆された。

なお、ボール投げでは、巧緻性と筋パワーの体力要素が評価される。つまり、投動作の発達に力強さが加わると、ボール投げの記録は向上する。

一方で、ボール投げは投動作に対する学習の機会の多少が影響する。したがって、今回得られた結果の解釈については、さらなる検討が必要である。

今回実施した運動スキル測定は、子ども自身がいかに自分の身体や姿勢バランスのコントロール機能を有しているかを測定するものである。これは、将来的にどのようなスポーツ競技に携わるにしても、基本的な運動能力として不可欠なものと言える。

Ⅴ．総括

現代社会は、科学技術の飛躍的進展による生活習慣の変化等により、一般的な日常生活において必ずしも高い身体能力や多くの運動量を必要としなくなっている。なかでも、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から幼児の身体活動が軽視される傾向がある。

こうした状況を踏まえ、文部科学省は「社会環境や生活様式の変化により、子どもの遊ぶ場所、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、子どもの身体を動かして遊ぶ機会の減少を招いている」[3]と指摘する。

本研究は、昨年度（2020 年度）と同様、新型コロナウィルス感染拡大により諸々の活動が大幅に制限される状況下で行われた。

研究 3 年目として、N 社の 2 つの KT 教室（岡山・広島）の通学児に対し、アンケート調査と基礎運動能力テスト、運動スキル測定を実施し、一定の検証結果を示すことができた。つまり、以下の４つのことが明らかになった。

(1) KT 運動学習教室に通っている子どもは、遊びの時間が増えている。特に、3, 4 歳の子どもたちは KT 運動学習教室に通うことで､運動(外遊び)の時間が増えるなど、子どもの生活習慣が改善していることが分かった。

(2) 運動能力テストにおいては、年齢・性別・種目別の全 18 区分のうち、11 項目で全国平均を上回

った。さらに、一定期間以上 KT 教室に通っている子どもについては、とくに女子の測定値が全国平均と比較して統計的な有意差を示すなど、運動能力に効果がある可能性があることが示唆される結果となった。

(3) 運動スキル（逆上がり・足抜き）と走・跳・投能力の相関関係については、多くの年齢・項目において統計的な有意差が確認された。身体の発育発達に併せて、動きに力強さが加わるともに、自身の身体のコントロール機能が付加されることにより、子どもの体力および運動スキルが向上することが示唆された。

Ⅴ．今後の研究に向けて

本年度は、当初 3 年間の研究計画の中で、最終年度である研究活動であった。

無事 3 年間の研究を終えることができたが、コロナ禍が影響し、当初計画の一部についてはほとんど手つかずの状況のものもあった。

また、小学校に入学する 6 歳の体力測定は毎年全国で行われ、そのデータは毎年更新されるが、本研究の対象である 3～5 歳のプレゴールデンエイジ期の岡山県、広島県を含めた全国的な体力測定値は、2008 年以降最新のデータがなく、今回得られたデータを比較・検証するにはやや新鮮味に欠ける側面があるとも言える。

以上を踏まえ、今後の研究課題テーマとしては、以下の点が考えられる。

(1) 昨年度実施した運動能力テストの撮影動画を分析し、生体力学(バイオメカニクス)の視点から、プレゴールデンエイジ期の子どもの運動学習効果について、さらに科学的に定量解析・検証を行う。

(2) 発達障害児に対する効果的な運動支援のあり方について、事例にもとづく定性的分析を行う。

(3) 体力測定データの構築・活用等による「子ども運動カルテ（仮称）」の整備など、KT 運動学習における DX 化推進に向けた調査研究に取り組む。

(4) 昨年度実施した運動能力テストや運動スキル測定を一過性のイベントに終わらせず、開催の定例化を図るなど、地域社会および自治体等に対し、KT 運動学習効果の普及・啓発活動を展開する。

コロナ禍の収束は依然として不透明であるが、だからといって次世代を担う子どもたちの体力向上が軽視される訳では決してない。今後とも、保護者らの理解・協力を得ながら、さらなる発展的な研究を目指したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究課題として採択頂いた(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、アンケート調査および基礎運動能力テストにご協力頂いた KT 運動教室(岡山、広島)の通学児と保護者の皆様、また N 社の 2 教室の指導員スタッフの皆様にも厚く御礼申し上げます。

参考文献

[1] 佐々木公之、大田住吉、桃原司「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)運動学習効果の価格的検証および 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)、ウエスコ学術振興財団令和元年度研究成果報告書、pp.259-268.

[2] 森司朗 他「幼児の運動能力における時代推移と発達促進のための実践的介入、平成 20～22 年度文部科学省科学研究費補助金（基盤研究Ｂ）研究成果報告書」2011 年、pp8－9.

[3] 文部科学省「幼児期運動指針」 https://www.mext.go.jp/a_menu/sports/undousi-sin/1319771.htm , 2021/04/15 閲覧。

QGIS を用いた小田川上流地域の空間データ分析

中国短期大学　情報ビジネス学科

藤本　宏美

今日ではいつどのような災害が起こるか予測できない．平成 30 年 7 月豪雨では，西日本を中心に全国的に広い範囲で記録された台風 7 号および梅雨前線等の影響による集中豪雨となり，地震による災害以外では，近年では未曽有の災害となった．倉敷市真備町では河川の増水によるバックウォータ現象が発生し，井原市でも支流の河川の堤防の決壊が確認されたほか，川沿いの道路の陥没や川水の勢いによる道路側面の浸食や堆積も確認された．井原市では 125 年前に起きた「井原の大水」など水害が度々起きている．定住者は祖先からの口承や町の昔話等で知識がある場合もあるが，近年の家族形態の変化や地域社会等との関係の変化によって説話を伝えられること自体も減少している状態である．そこで本研究では，説話の調査により昔話の語り手の高齢化による伝承の消滅を防ぎ補完することと，空間データを用いることにより洪水等の災害における重要ポイントの洗い出しを目的とした QGIS を用いた空間データを作成及び分析を行う．初年度である今年度は，井原地域（旧井原・後月地域）を中心とした地域に伝わる口承や昔話などの説話の調査を行った．

1.はじめに

世界において，今日ではいつどのような災害が起こるか予測できない．平成 30 年 7 月豪雨では，西日本を中心に北海道や中部地方など全国的に広い範囲で記録された台風 7 号および梅雨前線等の影響による集中豪雨となり，地震による災害以外では，近年では未曽有の災害となった．西日本豪雨で岡山県の犠牲者 61 人のうち，51 人の犠牲者を出した倉敷市真備町では河川の増水によるバックウォータ現象が発生した．この真備町を流れる小田川では，真備町以外にも矢掛町でも堤防の決壊が確認され，井原市でも支流の河川の堤防の決壊が確認されたほか，川沿いの道路の陥没や川水の勢いによる道路側面の浸食や堆積も確認された．小田川では，60 年に一度，もしくは 100 年に一度起こるか起こらないかと言われていた洪水であり，定住者は祖先からの口承や町の昔話等で，知識がある場合もあるが，近年の家族形態の変化や地域社会等との関係の変化によって説話を伝えられること自体も減少している状態である．二瓶の「平成 30 年 7 月豪雨 小田川における洪水氾濫状況」(1)のように真備地域は取り上げられることも多いが，上流地域についての研究は少ない．また，真備地域の河川の流れが変わっていることは，取り上げられているが江戸時代の井原・後月の地図と現在では，少しながらではあるが川の流れが変わっていることもわかる．そこで，本研究では，井原地域（旧井原・後月地域）を中心とした地域に伝わる口承や昔話などの説話の調査を行う．

次に説話を基とし，QGIS を用いた空間データを作成する．最後に空間データを用いて洪水等の災害における重要ポイントの洗い出しを行いシミュレーションすることを最終目的としている．

本研究により，

a 説話の調査により昔話の語り手の高齢化による伝承の消滅を防ぎ，補完すること．

b 空間データを用いることにより洪水等の災害における重要ポイントの洗い出しをすること．

その２点の成果が得られる．また，洗い出しを行うことにより，災害時におけるフォールトツリーやベイジアンネットワークの事象発生確率の計算に役立つのではないかと考えられる．

初年度の研究では，QGIS を用いた空間データを作成をするための基となる旧井原・後月地域に伝わる口承や昔話などの説話の調査を図書館の資料・社会調査の手法を用いて，聞き取り調査を行い，その後実際に現地に行き調査・検証を行った．

2.井原地区（旧井原・後月）の地形と小田川

まずはじめに本研究の調査地区である井原市と小田川について説明する．

井原市は岡山県の西南部に位置し，西は広島県に接する．中心市街は高梁川支流の小田川の流域の平野部に広がり，地形的には井原市街地を除いては，ほとんどが山々に囲まれた農山村である．

小田川は図 1 に示すように広島県神石郡神石高原町周辺から南東方向に流れる．石灰岩の地質の吉備高原を侵食しながら渓谷を形成し，山野峡を抜けて井原市に入り，天神峡を抜けて井原市街で東流に転じた後，倉敷市真備町と総社市との境界付近で高梁川へ注ぐ[2]．



図 1　小田川

3. 旧井原・後月地域に伝わる口承や昔話などの説話

3.1 説話の収集

井原語りの会「話輪和会」の井上晴正氏にご協力をいただき旧井原・後月地域に伝わる口承や昔話の資料収集を行なった．資料は井上氏らが編纂したもののほか，井原市内の図書館（井原・芳井・美星）と神辺図書館の蔵書を収集した．しかしながら，新型コロナウイルス感染症の感染拡大防止措置（緊急事態宣言及びまん防発令）のため図書館や資料館の閉館の影響もあり予定していた資料の約 60％程度しか集めることができなかった．

3.2　フィールドワーク

枝益六が著作した「後月の地理」[1]で紹介されている土地と，水に関連した地名・伝承が残っている場所のフィールド調査を行なった．*調査では，鬼橋と重玄寺跡も行く予定ではあったが，土砂災害の影響で中止した．

2 で述べた小田川は河川延長 ：72.9 km （広島県 32.7 km ，岡山県 40.2 km ）(2)となっているが，この地理で述べられている長さ十里三十町（43km）は岡山県内の河川延長ではなく，山野川・芳井川・七日市川つまり福山市山野町から井原市と小田郡矢掛町小田あたりまでではないかと考えられる．また幅は数十間（約 100m）と記述があり当時の川幅も分かる．



図 2　井原市地図

図 2 に示す番号順に紹介する．

①鯉の川

大旱魃で雨が欲しい時も昔から水が枯れたことがない．後月の地理では「昼夜源泉混々と湧き出る泉」[3]と表現されている．

②井森神社

上流にあるどこかの神社の御神体が流れ着いた場所とも言われている．

③水車小屋跡（森谷）

吉備高原の断層と水脈を利用した水車小屋があった地域の 1 つ．現在ではダムができた影響もあり，水車を回せるだけの水力を確保できない．水車では製

1 『川相誌　全』[3]に掲載されている枝益六が明治 22 年頃，高等精研小学校の生徒たちに後月郡内の地理や歴史を習得させるために作成したもの．明治時代後月郡と呼ばれている小学校区を高屋から順次紹介し，井原の校区で終えている．また各学区の産業や地理（地質）・歴史に加え，当時栽培されていた植物にも精通している地誌である．

粉を行っていた.

④談義所

この場所には真言宗寺院の長法寺があり仏教学，宗乗学を研修する僧堂（談義所）があった．しかしながら洪水で流れることが度重なり，現在は長法寺は笠岡に移動している．この場所には地名としてのみ残っている.

⑤縣主神社

鴨別命がこの土地を苦しめるミズチを退治したとの伝承がある．そのミズチを祀っている神社．⑦で記述する稲木川の川の流れをミズチに例えているのではないかとも言われている．別説では大サンショウウオだったのではないかという見解もある.

⑥鳴尾の淵跡（図３）

⑤に祀ってある鴨別命とミズチが戦った場所という言い伝えがあり，年に一度鴨別命の神輿とミズチがこの場所で対話すると言われている．現在は池が埋められて田んぼとなって４m 四角ぐらいしか残っていない.

⑦天保川と稲木川

小田川と稲木川の合流地点．稲木川から小田川に合流させるために，下流の掘削を行い，天保川を新たに整備し,今まで沼地であった土地が水田となった．稲木川が蛇行し，氾濫も起こしやすい形状だったため計画的にまっすぐする改修工事を馬越恭平が始めた．（改修工事終了は昭和 28 年）

工事以前,付近は木之子沼と呼ばれる湿地帯だった.

⑧出雲大社木之子教会

神社合祀前は，厳島神社（現 縣主神社内）があったとも言われている

⑨船岩

岩礁．穴の海辺だった名残．周囲が沼地だった頃は冬になると多数の鶴が飛来した

⑩猿尾

川の水勢を抑えるために岸から川の中央部に向かって突き出した土手．この猿尾が，小田川の流れを西から東に変えた跡の一つであるかもしれない

⑪足次神社（遺跡）（図４）

芳井町大字川相大社に 1012 年頃まで約 150 年鎮座していた.「社谷」「天屋」「若宮」の近くに「神子の峠」という地名もある．2 回の奉遷があり，応永の頃に現在の場所（井原町倉掛）に移されたと言われている．小田川の源流の一つでもある．水の流れ道が豪雨のたびに少しずつ変わっているそうだ.

⑫足次山神社（郷社）

井原市の郷社．元は芳井町川相→足次山→現在の場所へと奉遷された．この境内にある池の水はもともと湧き出るため増水する可能性もあったため，池は深く掘られていたと伝えられている.

⑬鯨

鯨が迷い込んだという口承のある地域．現在では砂防指定地となっている．砂防ダムと貯砂池がある.

⑭大曲（でんぐら堂）

旧山陽道で，単調な旅に変化をつけるために一里塚と共に大曲を作った．新しいまちづくりによる土地区画整理事業で姿を消した.

でんぐら堂は水野勝成が浪人時代に干飯を干していたら，大雨が降り，飛ばされたり，流されたりして砂か干飯か見分けることができなかった．という話が残っている．また，小田川は西にも流れていたが水野勝成により東のみに流れるように流れを変えたという伝承が残っているのもこの辺りの地域である.



図 3　鳴尾の淵



図 4　川相地区山中（足次神社跡地）

「後月の地理」で当時栽培されていた植物・産物で現在は衰退しているものを図２に書き加える.

a.うどんと製紙業

b.畳表などの敷物
c.蕈
d.蔦と五倍子
e.千畝竹
f.五倍子
g.藍
h.桃（不言渓）

3.3　考察

特産物・産業に繋がるいわゆる換金作物は図 2 を見ても分かるように小田川流域周辺に広がっている．うどんと製紙業は，宿場町周辺で栄えているが，両方とも冷たい谷川の水や井戸水が必要である．また上記で記した猿尾・足次山神社・鯉の口・大曲がりや鯨の話など小田川西域説の可能性も示唆される．良質の藍を育てていたと言われている与井・梁瀬・梶江では，現在もマムシが出ると言われている．マムシは藪に住んでいて水場周辺に多く出現し，山間部の水田や小さな川周辺で見かけることも多い．また藍の匂いを避けるとも言われているので，マムシ除けの意味でも植えられていたのではないかと考えられる．

千畝竹と呼ばれる良質の竹が生息している重玄寺跡地へと向かう山道は土砂災害以来，通行止めになっている．また，足次山神社（跡地）がある川相地区だけではなく他の地区でも，平成 30 年 7 月豪雨により土砂や立木が倒れておりそのままになったり，令和 3 年 8 月の豪雨でさらに土砂や立木が倒れるなどの被害もある．さらに，山中ではこの場所に限らず，猪が地面を掘り込んだ穴による天然の落とし穴が発生していてかなり危険な環境もあるが，過疎化が進んだ地域では，穴埋め作業が出来るだけの労力や資金がないのでそのまま放ったらかしにしていることも現実である．

8/12 の宇戸川と小田川の合流地点付近の写真である．宇戸川より流れ出た水は茶色の水で，小田川からの水はまだそこまで濁っていない状態で境界線ができている．これは，濁った川の上流に濁る原因があると考えられる．この原因については，分からないが「宇戸川流域は赤土質で主に泥質礫岩や粘板岩が分布していて，宇戸川沿いに傾斜の大きい斜面が続いている．」[(4)]

そのため，急傾斜地崩壊危険個所，警戒区域，特別警戒区域や土石流警戒区域，特別警戒区域に設定されている場所もある．また片塚地域は，塩基岩質凝灰岩であり赤土質という地質[(4)]から，古くから好適土壌条件であるゴボウが特産であると考えられる．その二つの地域の地層から原因の洗い出しができるのではないかと考え，今後地層と災害の因果関係について研究を進めていきたい．



図 5　8 月 12 日　小田川と宇戸川合流付近

４．まとめと今後の展望

新型コロナウイルス感染症の感染拡大防止措置（緊急事態宣言及びまん防発令）のため図書館や資料館の閉館の影響もあり予定していた資料の 60%程度しか集めることができなかった．

また聞き取り調査についても，スノボール・サンプリング中に上記と同じく感染拡大防止措置が発令され，安易にインタビューができない環境もあり現在中断している．また，令和 3 年 8 月豪雨（8/12～）の土砂災害のため現在も通行止めで調査ができなかった場所など多数あり環境面での調査の進行が遅れてしまった．

しかしながら今回の調査や集まった分だけの資料を読み解いた結果，途中段階ではあるが説話が残っている地域と浸水したまたは災害が発生（もしくは災害以降危険区域に指定された）場所が一致している箇所も多いことが明らかとなった．今後も調査を継続して説話をデータベース化し，その後本格的な分析・QGIS により，公開地図データと資料や口承により整理された井原・後月地域の小田川周辺の地図の作図を進める．また収集した口承・伝承はテキストマイニングを行い傾向を分析し，災害の継承となる口承は重点的に地名を表す．また，今年度の調査で

感じたことはこれらの残っている伝承は年代がバラバラになっているのでそれについても時代ごとに透過出来る様に工夫することも課題の一つだと考える.この地図の作成により，昔話の語り手の高齢化による伝承の消滅が危惧されている中，これから先，伝承する上でも重要な役割を果たすという循環を生み出したい.

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わりましたことを深く感謝申し上げます.

また井原語りの会「話輪和会」井上晴正氏をはじめ本研究にご協力を賜わりました皆様に深く感謝申し上げます.

［参考文献］

(1) 二瓶泰雄，平成30年7月豪雨 小田川における洪水氾濫状況，消防防災の科学，№136 2019（春季）,pp.12-18，2019

(2) 小田川 （高梁川水系）ウィキペディア（Wikipedia)，https://ja.wikipedia.org/wiki/小田川_(高梁川水系)，(参照 2022-03-24)

(3) 藤井定市，川相誌全，pp.309-320，1959

(4) 岡山県内地質図作成プロジェクトチーム,2020,改訂版岡山県内地質図及び同説明書，pp.32-35，西部技術コンサルタント，岡山

（「速く走る」走る方指導法の開発）

（環太平洋大学）

（梶谷亮輔）

（概要）本研究の目的は，球技系選手の走り方や体力的特性を評価し，縦断的に短距離選手のトレーニングを実践することで，多競技に応用可能な走り方の指導方法を開発することであった．そこで，大学ラグビー選手 7 名を対象に，スプリントおよびジャンプの測定を実施し，約 1 ヶ月トレーニングを実施した後に，再度測定を行なった．結果として，30m タイムの向上，接地様式の改善，RJ 能力の向上が認められた．指導内容は 1 回目の測定から修正点や改善点を導き出し，そこから必要だと考えられる内容を考案した．このとき，技術的な要因として姿勢の改善と腿上げを意識，接地をつま先にしてトレーニングする意識などを持たせた．そして，体力的な要因として RJ のように接地時間を短くしてジャンプするトレーニングを頻繁に取り入れた．このように，技術と体力双方を同時に高めることを目的としてトレーニングを行うことでパフォーマンスの向上が認められた可能性が示唆された．

背景

走ることは，児童からアスリートまで数多くの人々が経験している運動である．そして，速く走ることは，人間が競争の中で追求している重要課題である．これを達成するために，陸上競技の世界では，一流短距離選手のバイオメカニクス的要因（動作や力発揮），体力的要因（筋力やジャンプ能力），あるいは形態的要因（身長や下肢長）などを調査し（Delecluse et al.，1995 伊藤ほか，1998；岩竹ほか，2002；Young et al.，1995），得られた報告が，現場で実践しているトレーニングの根拠となっている． 一方で，球技系種目であるサッカーやラグビーにおいても速く走ることが重要である（Barnes et al.，2014）．しかしながら，これらの競技における速く走ることを目指すトレーニングの根拠は不足しており，トレーニングの結果は「どうなるかわからない」という状況下で指導がなされていることも否定できない．

こうした現状にはあるものの，短距離コーチがサッカー選手に対して走り方の指導を試み，単一事例ではパフォーマンスが向上したとの報告もある．しかし，実際にどのような根拠を基にトレーニングを試み，どこに（動作）変化が起き，また多く対象者にも当てはまる普遍的な事象であるかは不明である．これを明らかにし，指導の方法を提案することは多くの指導者，競技者が待ち望んでいるものである．本研究において，陸上競技者の短距離トレーニングで疾走タイムが向上した場合，スポーツ種目の垣根を越えたトレーニング内容となることが予想される．これまで，良い走り方については，トップアスリートから小学生を対象に数多くの報告がなされているものの（伊藤ほか，1998），そこに導くための方法については未確立であった．また，データを基にした改善例などの報告については陸上競技短距離選手を対象としたものばかりである．こうした現状から，他のスポーツ選手の走り方を改善させ，速くなったという報告ができれば，スポーツ種目に関係なく速く走るための指導方法として確立させることができると考える．

そこで本研究では，球技系選手の走り方や体力的特性を評価し，縦断的に短距離選手のトレーニングを実践することで，多競技に応用可能な走り方の指導方法を開発することを目的とした．

方法

1. 対象者

ラグビー部に所属する 11 名の大学生とした．なお，本研究では 1 回目（1st）および 2 回目（2nd）の両方の測定に参加することのできた 7 名のデータを示すこととする．また，対象者の身体特性は，身長：171.3±5.64cm，体重：82.0±6.53kg であった．

2.　測定内容

陸上競技場トラックにて，スタンディングスタートからの 30m の全力疾走を 2 回実施した．このとき，対象者の側方から高速度ビデオカメラ（CASIO 社製，EX–F1）を用いて，毎秒 300 コマ，露出時間 1/2000 秒で撮影した．さらに，30m のタイムを測定するために光電管を設置した（図 1）．

また，マルチジャンプテスタ（DKH 社製）を用いて，カウンタームーブメントジャンプ（垂直跳　以下「CMJ」と略す）とリバウンドジャンプ（5 回連続ジャンプ　以下「RJ」と略す）の 2 つのジャンプをそれぞれ 2 回測定し，下肢の力・パワー発揮特性を評価した．なお，このとき，CMJ は反動を利用してできる限り高く跳ぶことを意識し，RJ はできる限り接地時間を短くし高く跳ぶことを意識させた．

なお，トレーニング前（1st）とトレーニング後（2nd）の 2 回に渡り測定を実施した．

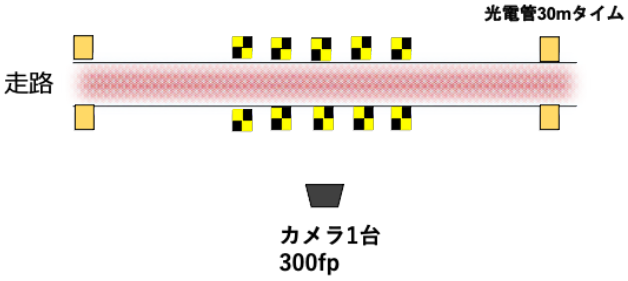


図1 スプリント測定の設定

3. 算出項目

スプリントは，30m の疾走タイム，接地時間，接地様式を算出した．また，研究主体者および研究分担者の 2 名で動画を確認し，接地様式を判定した．なお，この 2 名は陸上競技短距離を指導するコーチであり，日頃から疾走動作を主観的および客観的に評価している．

CMJ と RJ は，マットスイッチから跳躍中の滞空時間（s）と接地時間（s）を求め，跳躍高（m）を以下の式によって算出した．

跳躍高（m）=1/8・g・（滞空時間）^{2}

また，“RJ_{index}”（図子ほか，1993）を以下の式によって算出した．これは，できる限り短い接地時間で高い跳躍高を獲得する能力を示す指標であり，RJ の評価指標である．

RJ_{index}（m/s）=跳躍高（m）/接地時間（s）

4. 短距離走のトレーニング

トレーニングは，pre 測定で得られたデータから短距離走を専門とするコーチ 2 名で解釈し，そこから弱点を判断した．なお，指導の観点で示していることがおおよそ予想される改善点であることから（図 3），これらを改善するトレーニングを実施した．具体的には，足首の力発揮を高めるプライオメトリックトレーニング，腕振りを改善し遊脚の遅れを少なくするなどが挙げられる．

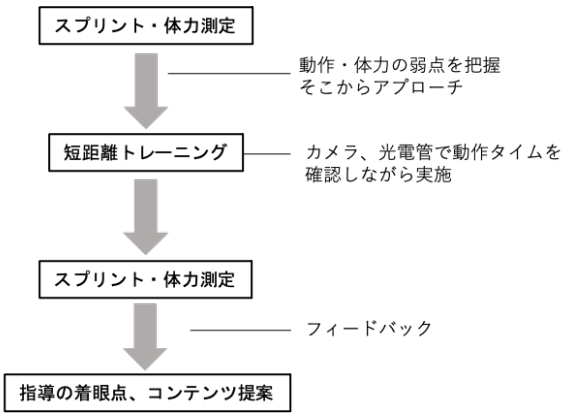


図2　測定→指導→測定のイメージ

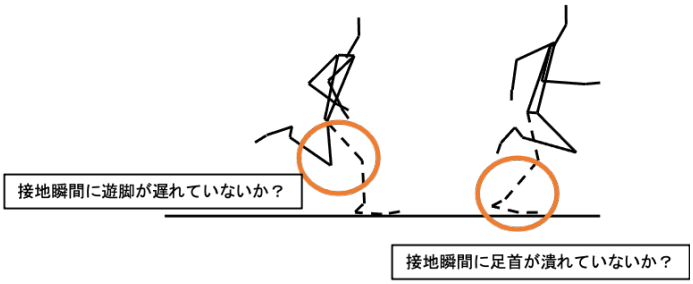


図3　指導の観点

5. 統計処理

各測定項目の平均値および標準偏差を算出した．また，各測定項目間の pre と post の比較には対応のある t 検定を用いて有意差を検定した．なお，いずれの統計処理においても，有意性は危険率 5%未満で判定した．

結果

図 4 には，1st と 2nd における 30m タイム，接地時間，および接地様式の比較について示した．30m タイムは，1st では 4.39±0.16s，2nd では 4.33±0.07s であり，2nd は 1st と比較して有意に速いことが認められた．接地時間については，1st では 0.103±0.007s，2nd では 0.100±0.006s であり，両者の間に有意差は認められなかった．接地様式については，1st ではつま先接地（1 名），フラット接地（2 名），踵接地（4 名），2nd ではつま先接地（4 名），フラット接地（2 名），踵接地（1 名）であった．

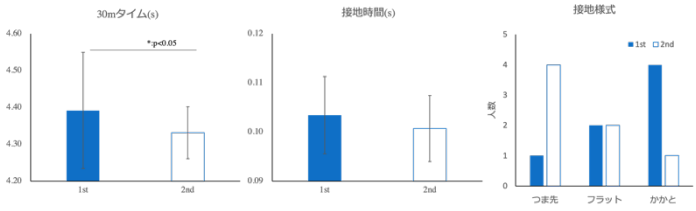


図4　1stと2ndにおけるスプリントパラメータの比較

図 5 には，1st と 2nd における CMJ の跳躍高の比較を示した．1st では 42.1±3.33cm，2nd では 42.7±3.38cm であり，両者の間に有意差は認められなかった．

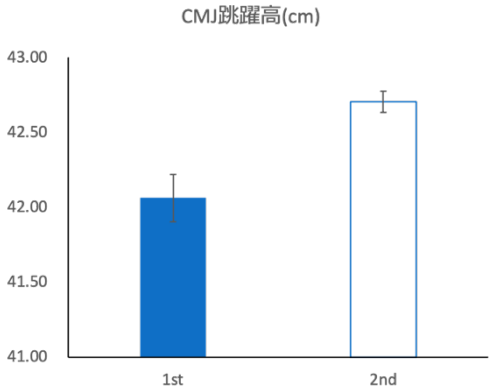


図5　1stと2ndにおけるCMJの比較

図 6 には，1st と 2nd における RJ の index，接地時間，跳躍高の比較を示した．Index については，1st では 2.05±0.15m/s，2nd では 2.11±0.18m/s であり，2nd は 1st と比較して有意に高いことが認められた．接地時間については，1st では 0.158±0.007s，2nd では 0.151±0.006s であり，2nd は 1st と比較して有意に高いことが認められた．跳躍高については，1st では 32.6±2.56cm，2nd では 32.1±2.24cm であり，両者の間に有意差は認められなかった．

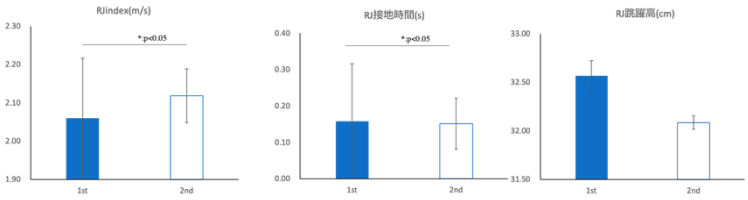


図6　1stと2ndにおけるRJの比較

考察

本研究の目的は，球技系選手の走り方や体力的特性を評価し，縦断的に短距離選手のトレーニングを実践することで，多競技に応用可能な走り方の指導方法を開発することであった．そこで，大学ラグビー選手を対象に，スプリントおよびジャンプの測定を実施し，約 1 ヶ月トレーニングを実施した後に，再度測定を行なった．

まず，スプリントの測定結果をみてみると，30m の疾走タイムにおいてトレーニング後の 2nd において有意に速いことが認められている．したがって，短距離走のトレーニングをラグビー選手が実践することで，1 ヶ月という短期間の中でもタイムが向上する可能性が示唆された．このとき実践した短距離走のトレーニングとして，動きの見直しが実施された．これはいわゆる「足が流れる」といった短距離走においてネガティブに働く脚の動きの改善を目的とするものである．具体的には身体を立てる（前傾姿勢にならない）ような意識を持ちながらドリルやスプリントを実施することが挙げられる．また，腿上げ系のドリルも多く取り入れた．ここでポイントに挙げられることは，1st の測定結果である接地時間および接地様式についてである．接地時間については，短距離選手と比較して速度が遅いことも影響し，比較的長めである．また，接地様式については，つま先接地が 1 名のみにとどまり，踵接地が 4 名も存在していた．これは，疾走速度の向上を目指す際には，修正が必要な点であることから，接地様式が自然と変更されるように，ジャンプ系のトレーニングも同時に取り入れた．具体的には，伸張短縮サイクル運動であるプライオメトリック系のトレーニングを中心にして，つま先での接地意識を持たせた．

その内容も相まって，2nd では接地時間に有意差は認められなかったものの，接地様式には大きな変化が認められつま先接地が 4 名で踵接地が 1 名となった．

このことも踏まえてジャンプの測定結果を概観する．まず, CMJ において有意差は認められなかった．このことは，垂直跳の跳躍高を向上させるような筋力向上系のトレーニングを目的として実施しなかったことも影響していると考えられる．次に，バリスティックなジャンプ運動であり，トレーニングにも頻繁に取り入れた RJ の数値は，Index の向上と接地時間の短縮が認められている．短距離選手においても，RJindex が高まることで疾走速度が向上することも報告されていることから，この指標を一定のレベルまで引き上げる必要はあるものと推察される．さらに，RJindex は接地時間と跳躍高により構成されており，本研究の結果からは接地時間の短縮を介して RJindex の向上が引き起こされたと解釈することができる．したがって，短距離走トレーニングで広く用いられているプライオメトリックトレーニングはラグビー選手においても有効であり，これにより，スプリント時の接地様式の変化も引き起こる可能性が示唆された．

まとめ

ラグビー選手を対象に 1 ヶ月間短距離走のトレーニングを実践することで, 疾走タイムの向上や RJ 能力の向上が認められた．また，動きや体力を独立してトレーニングを実践するのではなく同時に行うことでパフォーマンスの向上が認められたと考えられる．

参考文献

伊藤　章・市川博啓・斉藤昌久・佐川和則・伊藤道朗・小林寛道（1998）100m中間疾走局面における疾走動作と速度との関係．体育学研究 43:260-273.

Delecluse, C., Coppenolle, H. V., Willems, E., Leemputte, M. V, Diels, R. and Goris, M. （1995）Influence of high-resistance and high-velocity training on sprint performance. Med. Sci. Sports Exerc. 27: 1203-1209.

岩竹　淳・鈴木朋美・中村夏実・小田宏行・永澤健・岩壁達男（2002）陸上競技選手のリバウンドジャンプにおける発揮パワーとスプリントパフォーマンスとの関係．体育学研究，47: 253-261.

Barnes, C., Archer, D. T., Hogg, B., Bush, M., and Cochrane, J. L. (2001) Anticipatory effects on knee joint loading during running and cutting maneuvers. Med. Sci. Sports Exerc., 33(7): 1176-1181.

Young, W., Wilson, G. and Byrne （ 1995 ） Relationship between strength qualities and sprinting performance. J Sports Med. Phys. Fitness, 35: 13-19.

女性アスリートの月経随伴症状を含むコンディションの実態調査
～若年層から始める女性アスリートのための健康教育構築に向けて～

環太平洋大学 体育学部 体育学科

前川　真姫

女性の健康を考える上で、月経は欠かせない要素である。月経随伴症状は、勉学・就学の妨げや生活の質の低下、パフォーマンスの低下を招くと言われているが、月経周期を考慮した体調管理について参考にできる情報は少ない。また、無月経は骨粗鬆症や骨折のリスクを高めるため、将来の健康にも影響を及ぼす。そこで、本研究では、若年層の女子アスリートを主対象に、アスリートとしての健康管理に加え将来を見据えた健康教育を行うことを目標に、基盤となる若年層の女性アスリートのデータを収集し、若年層の女性アスリート向け教育プログラムの作成を目指す。今年度は、月経状態を含むコンディションの実態調査を実施し、月経痛等の症状によるコンディションの相違を検討した。月経と睡眠状態には関連性があると考えられているが、本研究ではそれらに明確な関連が認められなかった。月経随伴症状も睡眠の質評価も、様々な要素が複雑に関連し合った結果として現れるものと考えられるため、より詳細な生活習慣等の実態把握が必要といえる。また、月経痛の要因には、一般的に痩せ型や過体重が考えられているが、本研究では月経痛には体格の影響だけではないことが示唆された。若年層の女性の健康を考える上では、過度な痩せに対する注意喚起に加え、適正体重の範囲であったとしても、月経状態は、栄養、睡眠、運動量、ストレスなどと関連しうるため、更なる検討が必要である。これらは、次年度以降、詳細に検討し、若年層の女性アスリートのための健康教育構築に繋げることとする。

1. はじめに

女性の健康やQOL(quality of life)ならびにQOW（quality of work）の維持及び向上を考える上で、月経は欠くことができない重要な要素といえる。近年、月経周期に伴う女性ホルモンの変化によって生じる頭痛、嘔気、便秘下痢、月経痛、腰痛等の身体的症状や、眠気、イライラ、抑うつ等の精神的症状等の月経随伴症状が、勉学・就学の妨げや生活の質の低下を招くことが明らかにされている(Nur et al. 2013,Chen et al.2017)。なかでも、女性アスリートにとっては、月経は体重コントロールなどコンディショニングを難しくする要因にもなるため、専門的な知識と支援が求められる。2013年に国立科学センターから「女性アスリートのためのコンディショニングブック」が発刊され、女性トップアスリートの月経に関する問題が顕在化し実態調査が進んでいる。

申請者らも、運動部女子学生（n=310）を対象に月経に関する実態調査（2019年11月～）を行い、月経前症状 71.3%、月経困難症 90.9%と非常に高い割合であることを確認した。また、その多くの学生が月経随伴症状への適切な対処に関する知識が不十分であることが分かった。この要因の一つに、参考となる情報が乏しいことが挙げられる。女性アスリートは運動習慣のない者と比較して、練習やトレーニング強度の変化､精神的ストレス等の要因により、食事の量や睡眠の質が変動することが報告されているが（Erlacher et al.2011,Monma et al. 2018)、月経周期を考慮したコンディショニングの指標として参考にできる情報が少ない。また、女性ホルモンには骨を強くする作用があり、20歳頃には骨量のピークを迎える。無月経は骨粗鬆症や骨折のリスクを高めるため、若年層を対象とした月経に関する教育は将来の健康にも繋がる重要な内容と言える。

本研究は若年層の女子アスリートを主対象に、アスリートとしての健康管理だけでなく将来を見据えた健康教育を行うことを目標に、基盤となる若年層の女性アスリートのデータを収集し、若年層の女性アスリート向け教育プログラムの作成を目指す。

初年度にあたる 2021 年度は、月経状態を含むコンディションの実態調査を実施し、月経痛等の症状

によるコンディションの相違を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

K 大学に所属する女子学生を対象に、月経状態や運動習慣、睡眠状態に関するアンケート調査、身体計測を実施した。なお、アンケート調査に回答した者は 204 名であった。そのうち、身体計測のすべての項目を実施した者は 129 名であった。

(1) アンケート調査

対象者に Web 形式のアンケート調査を実施した。調査は、以下の項目について質問した。

1) 月経状態

・月経 1 週間前の痛み（10 段階評価）
・月経中の痛み（10 段階評価）
・直近 3 ヶ月以内の月経周期
・月経に伴う出血の日数

2) 運動習慣

・専門とする競技種目
・競技年数
・競技レベル
・1 週間あたりの平均的な練習あるいはトレーニング日数（トレーニング頻度）
・1 日の平均的な練習あるいはトレーニング時間

3) 睡眠状態

睡眠の質を評価するために、日本語版ピッツバーグ睡眠質問票を用いた。本質問紙は C1：睡眠の質、C2：入眠時間、C3：睡眠時間、C4：睡眠効率、C5：睡眠困難、C6：睡眠剤の使用、C7：日中覚醒困難、の 7 要素 18 項目で構成されている。各項目は 0-3 点の 4 段階で評価され、睡眠障害の程度を表す総合得点（0-21 点）が高いほど睡眠の質が悪いと評価される。合計点が 6 点以上となる場合、睡眠の質の低下と定義されている。参加者には、過去 1 ヶ月における睡眠状況を回顧法で回答を求めた。

(2) 身体計測

3D ボディスキャナにより全身体積、全身表面積、各部位の長さと周径囲を計測した。InBody により体重、脂肪量および徐脂肪量、体脂肪率を計測し、InBody Score と SMI（骨格筋指数）により身体組成を評価した。骨密度測定器を用いて骨年齢を求めた。

(3) 統計処理

統計処理はすべて SPSS26 を用いて実施した。アンケート調査においては、回答者すべての回答(n=200)の単純集計を行った。また、各質問項目の間のピアソンの積率相関係数を求め、相関関係を確認した。全ての調査・測定を実施した者（129 名）について、月経 1 週間前の痛みと月経中の痛みの段階により、それぞれ群分けを行い、一元配置分散分析による比較検定を行った。なお、群分けは 10 段階評価のうち 0 と回答した者を無痛群、1～4 の回答を軽度群、5～7 の回答を中程度群、8～10 の回答を重度群とした。

3. 結果

(1) アンケートによるコンディションの実態調査

1) 月経状態

月経 1 週間前の痛みおよび月経中の痛みについての回答は表 1 に示す通りであった。

表 1　月経 1 週間前の痛みおよび月経中の痛み

評価	月経 1 週間前の痛み	月経中の痛み
0	80 名	14 名
1	19 名	13 名
2	21 名	23 名
3	19 名	14 名
4	12 名	16 名
5	13 名	12 名
6	15 名	17 名
7	7 名	31 名
8	9 名	27 名
9	2 名	17 名
10	3 名	16 名

月経周期では、76.0%（152 名）が周期的な日数を回答した一方、「周期が不規則」が 23.5%(47 名)、「3 か月以上なし」が 0.5%（1 名）であった。出血日数は、3 日以内が 12.0%(24 名)、4～6 日が 81.0%（162 名)、7 日以上が 7.0%（14 名）であった。

2) 運動習慣

専門とする競技は、球技種目が最も多く 32.5%（65 名)、次いでサークル・無所属が 32.0%(64 名)であった。その他には、陸上競技、柔道、剣道、ダンス、チアリーディング、マーチングなどの種目が挙がった。競技年数は 7.65 ± 4.35 年であった。

競技レベルは、全国大会レベルが42.0%（84名)、地方大会レベルが31.0%(62名)、それ以外が25.5%（51名)、無回答が1.5%（3名）であった。

1週間あたりの平均的な練習あるいはトレーニング日数（トレーニング頻度）は4.2±2.4日であった。また、1日の平均的な練習あるいはトレーニング時間は2.6 ± 1.6時間であった。

3）睡眠状態

ピッツバーグ睡眠質問票を基に評価した結果、平均値は4.5 ± 2.8点であった。6点以上で睡眠の質が低いと評価された人は28.5%（57名）であった。なお、「実際の睡眠時間は何時間くらいでしたか？」という問いに対する回答は、6.2 ± 1.0時間（最小値；3.0時間，最大値；9.0時間）であった。

4）各項目間の相関関係

月経1週間前の痛みと月経中の痛みとの間に有意な正の相関関係が認められた（$r=0.55$, $p<0.01$)。トレーニング頻度とトレーニング時間との間に有意な正の相関関係が認められた（$r=0.78$, $p<0.01$)。その他の項目間には有意な相関関係が認められなかった。

(2）月経痛等の症状によるコンディションの相違

1）月経1週間前の痛みとコンディションについて

月経1週間前の痛みによる群分けの結果、無痛群が56名、軽度群が43名、中程度群が24名、重度群が6名であった。群間比較の結果、有意な差が認められた項目は身体計測におけるInbodyScoreと全身表面積のみであった。また、月経1週間前の痛みとInbodyScoreとの間に有意な負の相関関係が認められた（$r=-0.28$, $p<0.01$)。一方、全身表面積との間には有意な相関関係は認められなかった。

2）月経中の痛みとコンディションについて

月経中の痛みによる群分けの結果、無痛群が11名、軽度群が42名、中程度群が37名、重度群が39名であった。群間比較の結果、すべての項目において有意な差は認められなかった。

4. 考察

本研究は、月経状態を含むコンディションの実態調査を実施し、月経痛等の症状によるコンディションの相違を明らかにすることを目的とした。先行研究において、高負荷のトレーニングや精神的なストレスにより、月経前の諸症状が悪化する要因となることが報告されていることから(Sadler et al.2011, Heim et al.2013)、練習およびトレーニングの頻度や時間が月経前痛や月経痛と関連するものと仮説を立てていたが、本研究における実態調査の結果からは関係性を読み取ることはできなかった。また、女性ホルモンの分泌や変動の調節と睡眠調節機構は、同様の視床下部下垂体軸を介す経路にて制御され、睡眠の質が低い者では、月経痛が強いことが報告されている（Kazama et al.2015）が、本研究においては睡眠の質と月経痛の度合いとの間に有意な相関関係は認められなかった。このことから、月経随伴症状も、睡眠の質評価も、様々な要素が複雑に関連し合った結果として現れるものであると考えられ、より詳細な生活習慣等の実態把握が必要であるといえるだろう。

月経痛等の症状によるコンディションの相違について、主に身体計測の結果を基に検討を進めたが、特徴をつかむには至らなかった。平田ら(2002)は、BMI19.8未満のやせ型の女子学生の月経痛の有訴率が体格の普通の女子学生に比べて高いことを報告している。また、一般的にも痩せ型や過体重が月経痛の要因との考えから、適正体重の維持の重要性が語られている。今回の結果はこれらを支持する結果は示されなかったものの、若年層の女性の健康を考える上では、やはり過度な痩せに対する注意喚起は必要であろう。

5.次年度に向けて

申請書の目的2に掲げたトレーニング期間に伴う月経随伴症状を含むコンディションの変動に関する検討は、コロナ禍で様々な制限がある中ではあるが、対象者の基礎体温の測定を継続して実施できている。今後は、月経周期の各期間における女性ホルモン濃度の計測および体力測定を実施していく予定である。

また、2022年度の目標として掲げていた「女性アスリートのための健康教育プログラムの作成および実施」については、関係機関との連携を円滑に進めることができたため、前倒しで実施した。2021年度

においては、学内外の専門家による講話を定期的に開催した。参加者は、性別を問わず、アスリート学生、一般学生、指導者、保護者、一般であった。2021年度に実施した講話内容は以下の通りである。

第1回【女性の健康】月経の仕組み、月経諸症状とその対応

第2回【女性スポーツと健康】減量と身体パフォーマンス、減量・増量の考え方

第3回【アスリートとサプリメント】効果的なサプリメントの摂取

第4回【アスリートと栄養】体重管理（減量）の考え方と食事管理の実践

第5回【アスリートのコンディショニング】睡眠とコンディショニング

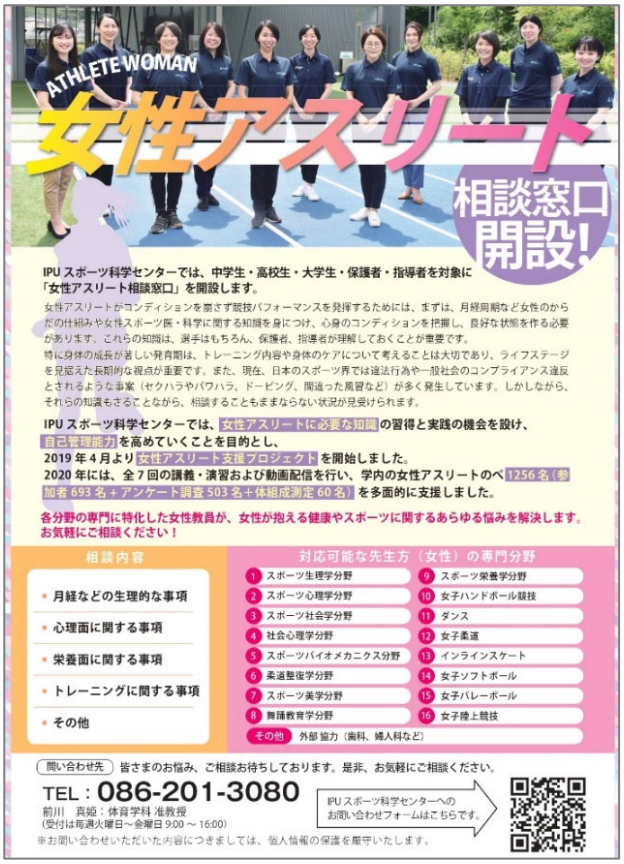
第6回【アスリートとWinning mentality】セルフハンディキャッピングに気をつける

第7回【スポーツコンプライアンス】スポーツコンプライアンスを知りスポーツの価値を見直す

第8回【DV根絶のために】私たちができること

受講者からの感想は、「分かりやすい」「自分の体と向き合いたい」「試合でとてもいかされ、自己ベストの更新や標準記録突破につながった」など、学生が、身体や健康問題を自分のこととして捉え、考え、行動へ移すことができている様子が伺えた。この他に、アスリートの健康教育と関連して、排便状態に関する調査やセクシュアリティに関する認知度・理解度調査を実施している。

さらに、2021年度は、中学生・高校生・大学生・保護者・指導者を対象とした、アスリート相談窓口を開設した（右図参照）。女性アスリートを支えるネットワークの構築に向け、今後も測定・調査を継続して行い、横断的かつ縦断的な検討により、さまざまな視点から、現在そして将来をも見据えた女性アスリートの健康支援を行ってい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。

引用文献

Chen H., Wang XT, Bo QG et al.: Menarche, menstrual problems and suicidal behavior in Chinese adolescents. J Affect Disord 209(44): 53–58, 2017.

Erlacher D, Ehrlenspiel F, Adegbesan OA et al.: Sleep habits in German athletes before important competitions or games. J Sports Sci 29(8): 859–866, 2011.

Heim C, Jeffrey Newport D, Heit S et al.: Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. Sci Ment Heal Stress Brain 9(5): 84–89, 2013.

平田まり，隈部敬子，井上芳光（2002）青年期女性における月経痛の頻度とやせとの関連． 日本公衆衛生雑誌. 49 巻 6 ,516-524.

Kazama M, Maruyama K, and Nakamura K.: Prevalence of dysmenorrhea and its correlating lifestyle factors in Japanese female junior high school students. Tohoku J Exp Med 236(2): 107–113, 2015.

Monma T, Ando A, Asanuma T et al.: Sleep disorder risk factors among student athletes. Sleep Med 44: 76–81, 2018.

Nur Azurah AG, Sanci L, Moore E et al.: The Quality of Life of Adolescents with Menstrual Problems. J Pediatr Adolesc Gynecol 26(2): 102–108, 2013.

Sadler C, Smith H, Hammond J et al.: Lifestyle factors, hormonal contraceptives and premenstrual symptoms: The UK Southampton Women's Survey. Eur PMC Funders Author manuscripts 19(3): 391–396, 2011.

終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践に関する研究

新見公立大学健康科学部看護学科

安藤　亮

近年の高齢化とともに維持血液透析患者の高齢化も年々進んでいる．高齢化の進行に伴い、最期までどう生きたいかを引き出し、それを支えるケアであるエンドオブライフケアの重要性も増している。終末期の維持血液透析患者との関わりについて、透析の中止はすなわち死を意味し，つらい決断である家族の思いを尊重したうえで話し合いを行う等の困難があることや，透析の中止を決定するうえで看護師の困難として中止の判断について葛藤があることが明らかとなっている。本研究では，医療・ケア方針の検討に必要な看護実践について看護師が自己評価を行い、医療･ケア方針の検討における困難感や葛藤の軽減につながることをねらいとして，終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践尺度を開発し、妥当性、信頼性の検証を行った。

はじめに

近年の高齢化とともに，維持血液透析患者の高齢化も年々進んでおり，日本透析医学会の調査によると，特に 70 歳以上の透析患者が増加していることが明らかとなっている（花房ら，2021）．高齢化の進行に伴い、最期までどう生きたいかを引き出し、それを支えるケアであるエンドオブライフケアの重要性が維持血液透析患者についても増している。

終末期の維持血液透析患者との関わりについて、透析部門に勤務する看護師への調査(本田ら,2010)では,「透析の中止はすなわち死を意味し，つらい決断である家族の思いを尊重したうえで話し合いを行う」等の困難があることが明らかとなっている．また、海外の研究（Hussain J.A，et al，2015）においても，看護師の困難として透析の中止の判断について葛藤があり、中止することが患者の真の要求（genuine request）なのか判断しかねることが明らかとなっている。

透析の差し控えはすなわち死を意味すること、透析は患者の日常生活の一部となっている一方で、終末期においては苦痛を伴い生活の質を下げるものにもなり得る等の特徴があり、がんや心不全などの他の慢性疾患とは異なる特性があり、終末期にある維持透析患者の医療・ケアの方針決定には、専門的な看護実践が必要であると考えられる。

そこで本研究では，まず研究 1 として終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践尺度を作成し、妥当性，信頼性の検討を行うことを目的とした。尺度の開発により，医療・ケア方針の検討に必要な看護実践について看護師が自己評価を行い、医療・ケア方針の検討における困難感や葛藤の軽減につながると考える．

目的

終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践尺度の妥当性，信頼性の検討を行う．

方法

1.対象者

本研究の調査対象者は，全国の維持血液透析を実施している入院病床を有する日本透析医学会の認定施設及び教育関連施設より，無作為に抽出した 250 施設の透析部門に勤務する看護師各 4 名,計 1000 名である．看護師の選定条件については，看護師経験年数が 5 年以上である者とした．

2.調査方法

調査は無記名自記式質問紙調査およびオンライン調査により行った.

調査期間は2021年9月～10月.

3.調査内容

調査内容は，対象者の基本属性（年齢，看護師経験年数・透析看護経験年数），終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践尺度原案23項目，併存的妥当性を検討するために看護師の倫理的行動尺度改訂版（大出，2019）で構成した.

なお，終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践は，調査票の冒頭に「『当事者』とは,『患者本人』,『家族』,『その他の重要他者』のことを指す」こと，「『専門職』とは，医師・看護師等の医療職者，介護職者，ソーシャルワーカー等の患者に関わる専門職者のことを指す」ことを明記し，回答を「行っていない」から「行っている」の4件法で求め，それぞれ0～3点で得点化した.

4.終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践尺度原案の作成

終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践尺度原案の作成については，筆者らが実施した調査（安藤ら，2022），医学中央雑誌，PubMedを用いた文献検討，終末期における意思決定についての国内外の資料を項目収集の際の参考とした．内容的妥当性の確保のため，筆者と看護系大学の教員2名，尺度の開発に精通した保健学分野の研究者1名，看護実践経験の豊富な大学院生1名にて各項目の見直しと表現の修正を繰り返し行い，5因子23項目からなる尺度原案を作成した.

5.分析方法

1)妥当性の検討

(1)構造的妥当性の検討

終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践の因子構造を確認するために，項目特性の検討により採択された項目を用いて，探索的因子分析（プロマックス回転）を実施した．なお，因子数については終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践に関する質的研究の結果（安藤ら，2022）より5因子（〈患者の真の思いとの対峙〉,〈患者,家族,医師の共通認識の促進〉,〈医師との信念対立がありながらも，患者らしく最期までよりよく生ききることに向けた医師との協働〉,〈医療職者・介護職者間の対話〉,〈透析見合わせの見極めのための身体状態の注意深い観察〉)を想定し，初期の因子負荷量0.30以上を基準とした（伊藤，2019）．次に，探索的因子分析により得られた因子を一次因子,「維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践」を二次因子として配置した二次因子構造モデルを仮定し，このモデルの適合性を確認的因子分析により検討した．推定法はいずれもロバスト重みづけ最小二乗法を用い，確認的因子分析におけるモデルの適合度指標は，Root Mean Square Error of Approximation（以下，RMSEA），Comparative Fit Index（以下，CFI）を算出した．適合度の基準値は,CFI>0.90，RMSEA <0.05（良好），<0.08（良），<0.1 （可）とした（友利ら，2019）.

(2)併存的妥当性の検討

併存的妥当性は，開発した尺度と看護師の倫理的行動尺度改訂版の合計得点のPearsonの相関係数を算出した．倫理的行動尺度は，生命倫理4原則である「自律尊重」「無危害」「善行」「正義（公正）」に依拠し，看護師の行動を測定するものとして開発された尺度である（大出，2019）である．一方，今回開発しようとする尺度は，患者の自律の尊重，提供する治療が患者に与える益・不利益，権利擁護などに関わる看護実践を含む内容である．これらより，両者の間には理論的に関連があると予想され，正の相関があると仮定した.

2)信頼性の検討

尺度の信頼性については，Cronbach’s α係数を算出した.

データ分析にはMplus7.4，SPSS Statistics 27，Exametrika 5.5を使用した.

6.倫理的配慮

本研究は新見公立大学倫理審査委員会の承認を得たうえで実施した．（承認番号：228）

調査対象施設の看護管理者および調査対象者には，文書により研究の主旨，権利保護等について説明をおこなった．調査への同意の確認は，調査票に同意

確認欄を設け行った.

結果

1.対象者の基本属性（表1）

配布した調査票1000部のうち,336部が回収でき,そのうち不備のない280部（有効回答率83.3%）を分析対象とした.対象者の平均年齢は45.3±8.4歳,看護師経験年数の平均は21.4±8.8年，透析看護経験年数の平均は9.4±6.9年であった.

表1　対象者の基本属性

n=280

項目	Mean		SD
年齢	45.3	±	8.4
看護師経験年数	21.4	±	8.8
透析看護経験年数	9.4	±	6.9

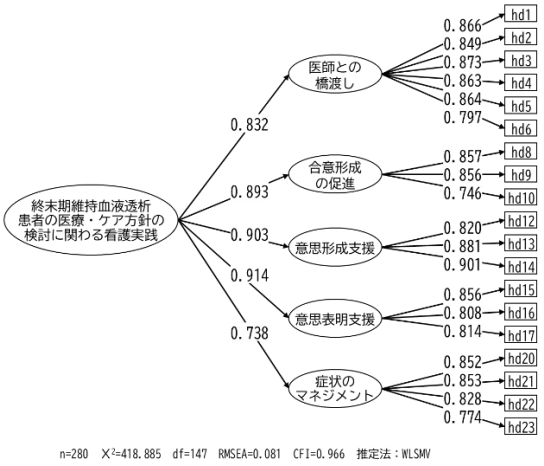
2.構造的妥当性の検証（表2，図1）

準備した 23 項目での探索的因子分析を行った結果，項目 7，11，18，19 は複数の因子に 0.30 以上の因子負荷量を示したため削除した（表 3）．次に残った 19 項目で 5 因子二次因子モデルを仮定し確認的因子分析を行った．結果，モデルの適合度はχ^2=418.885，df=147，RMSEA=0.081，CFI=0.966 であった（図 1）.

第1因子は6項目からなり，患者と家族，その他の重要他者から構成される当事者と医師間において,医療・ケア方針における共通理解を促進する【医師との橋渡し】とした．第2因子は3項目からなり，専門職種間で医療・ケア方針に関する意見の対立の調整やケアチームの組織などを行い，合意形成を促進する【合意形成の促進】とした．第3因子は3項目からなり,患者の意思決定能力をアセスメントし,本人の意思をより明確にすることを支援する【意思形成支援】とした．第4因子は3項目からなり，医療・ケア方針を選択することは患者の権利であることを伝え，家族とともに意思の表明をできるように支援する【意思表明支援】とした．第5因子は4項目からなり，患者の全身状態の観察と苦痛症状の緩和のためのケアを行う【症状のマネジメント】とした.

表2　終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践尺度の探索的因子分析

項目	因子1	因子2	因子3	因子4	因子5
1 私は，当事者と医師による終末期の医療・ケア方針についての話し合いの内容を記録している	**0.723**	0.092	-0.032	0.004	0.142
2 私は，病状や治療方針の認識にずれが，当事者と医師との間で生じていないかを再確認している	**0.802**	-0.155	-0.044	0.065	0.255
3 私は医師に，当事者の透析見合わせを含めた医療・ケア方針への希望や思いについて伝えている	**0.656**	0.084	0.086	-0.032	0.186
4 私は，患者の病状や医療・ケア方針について，患者，家族のそれぞれが理解できているかを確認している	**0.743**	-0.009	-0.036	0.178	0.079
5 私は，患者の病状や医療・ケア方針について，必要性を感じた時には，患者や家族に補足説明をタイムリーに行っている	**0.756**	0.147	0.067	0.011	-0.041
6 私は，医師の病状説明に同席し，疑問や不安などを当事者が声にできていないときには，代弁し医師に伝えている	**0.738**	0.258	0.112	0.014	-0.248
7 私は患者，家族に医療・ケア方針を検討するうえで必要な社会資源に関しての情報を提供し，患者・家族が理解できているか確認している	0.482	0.323	0.073	0.138	-0.089
8 私は，患者に関わる専門職者間で医療・ケア方針についての意見が対立している場合，それぞれの専門職者の意見の根拠・思いを尋ねている	0.298	**0.504**	-0.069	-0.128	0.264
9 私は，当事者の状況に応じてケアチームを柔軟に作り，医療・ケア方針を検討している	0.167	**0.866**	-0.152	0.094	-0.106
10 私は必要時には，臨床倫理委員会や緩和ケアチーム，専門看護師などにコンサルテーションを依頼している	0.155	**0.733**	-0.066	0.018	-0.072
11 私は患者が臨死期（死の直前1週間程度）であると捉えたときに，患者の医療・ケア方針について専門職者間で話し合っている	0.036	0.374	0.069	-0.160	0.414
12 私は，患者の医療・ケア方針の検討における，意思決定能力（理解・認識・選択・表現する能力）をアセスメントしている	0.097	0.224	0.175	0.028	**0.416**
13 私は，患者自身の”いのち”に対する価値観と医療・ケア方針への希望を確認している	0.072	-0.058	-0.081	0.171	**0.869**
14 私は，患者の医療・ケア方針について希望だけでなく，その理由も尋ねている	0.088	-0.11	0.063	0.272	**0.692**
15 私は，家族の患者への思いや，家族の医療・ケア方針への希望を確認している	0.223	-0.098	0.051	**0.817**	0.037
16 私は，患者と家族が病状や医療・ケア方針についてお互いの思いを話せるような機会を作っている	0.069	0.264	-0.080	**0.565**	0.105
17 私は，患者に医療・ケア方針を選択する権利があることを伝えている	-0.058	0.275	0.060	**0.393**	0.280
18 私は，患者の医療・ケア方針についての意向を代弁し専門職に伝えている	-0.029	0.391	0.050	0.330	0.270
19 私は，患者と家族の医療・ケア方針の希望が変化していないかを継続的に観察している	-0.083	0.432	0.035	0.342	0.273
20 私は，患者の生活や療養に関わる人々から情報を収集し，患者の身体状態を把握している	-0.019	0.211	**0.462**	0.253	0.020
21 私は，患者に疼痛，呼吸困難，悲嘆等の耐え難い身体的・心理的苦痛が生じていないかを観察，アセスメントしている	-0.039	-0.067	**0.998**	0.083	-0.073
22 私は，患者の急変の可能性について，多面的に観察を行い，予測している	0.123	-0.190	**0.959**	-0.073	0.016
23 私は，終末期における苦痛を緩和するケアを実施している	0.008	0.251	**0.481**	-0.059	0.146
因子間相関	1	0.621	0.471	0.476	0.536
プロマックス回転，WLSMV	2		0.538	0.564	0.679
RMSEA：0.062	3			0.454	0.587
	4				0.556



n=280　X²=418.885　df=147　RMSEA=0.081　CFI=0.966　推定法：WLSMV

図1　終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践尺度の構造的妥当性

3.併存的妥当性の検討

本尺度の合計得点は，看護師の倫理的行動尺度改訂版の合計得点と有意な中程度の相関（r=0.411）が得られた.

4.信頼性の検討（表3）

本尺度のCronbach’s α係数は,【医師との橋渡し】が0.912,【合意形成の促進】が0.793,【意思形成支援】が0.848,【意思表明支援】が0.804,【症状のマネジメント】が 0.804，合計得点については0.940であった.

表3　内的整合性からみた信頼性

	α係数
医師への橋渡し	0.912
合意形成支援	0.793
意思形成支援	0.848
意思表明支援	0.804
症状のマネジメント	0.804
合計得点	0.940

α係数：cronbach's α係数

考察

1.構造的妥当性の検討

23項目の尺度原案について，項目特性の検討をした結果，すべての項目について識別力，困難度はともに良好な値を示したため，本尺度の各項目は肯定的，否定的のいずれかに偏ることなく，適切に医療・ケア方針に関わる看護実践を測定することができたと言える.

探索的因子分析の結果，基準を満たさない4項目を削除し，19項目で構成される5因子二次因子モデルを仮定し，データへの適合性を確認したところ，適合度指標は統計学的許容水準を概ね満たし，モデルはデータに適合した．この結果は本尺度の構造的側面からみた妥当性が検証されたことを意味する.

2.併存的妥当性の検討

終末期維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護実践尺度の合計得点と看護師の倫理的行動尺度改訂版の合計得点の間に有意な中程度の正の相関（r=0.411）を認め，併存的妥当性について確認できた.

3.信頼性の検討

内的整合性について，各因子のCronbach's α係数は0.793～0.912，合計得点については0.940であり，本尺度は一貫性を持った項目で構成されていると言える．このうち，【合意形成の促進】の信頼性係数のみ0.793とやや低い結果となったが，項目数が3項目と少ないことを加味すると十分な値である.

4.尺度の活用可能性

本尺度を用い，透析部門に勤務する看護師が具体的に医療・ケア方針に関わる看護実践をそれぞれの下位因子について実践内容を詳しく振り返ることで，自己の看護実践における課題の発見や，できている実践の肯定的な評価にもつながる．また，本尺度を用いて医療・ケア方針の検討における看護実践の必要性に看護師が気づき，自分を含めた関係者全員の価値観や思いを声にすることの重要性を認識できる．これらより，終末期にある維持血液透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護の質の向上に資すると考える.

研究の限界と今後の課題

本研究においては「当事者」を「患者，家族，その他の重要他者」，「専門職」を「医師・看護師等の医療職者，介護職者，ソーシャルワーカー等の患者に関わる専門職者」とし，尺度開発を行った．それぞれの用語の意味は限定されている可能性があり，これは本研究の限界である.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，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いたします.

なお､本研究成果の一部を日本看護研究学会中国･四国地方会第35回学術集会にて発表した.

引用文献

・ 安藤亮，名越恵美，實金栄（2022）：終末期維持透析患者の医療・ケア方針の検討に関わる看護師のジレンマ・曖昧さへの対処．臨床倫理，11，1-11.
・ 花房規男，阿部雅紀，常喜信彦，他（2021）：わが国の慢性透析療法の現況（2020年12月31日現在）．日本透析医学会誌，54(12)：611-657.
・ 本田智子，高橋良幸，谷本真理子，他：終末期維持血液透析患者にかかわる看護師の実践知．日本腎不全看護学会誌，12(2)，72-79，2010.
・ Hussain J.A.，Flemming K，Murtagh F.E.，et al(2015)：Patient and Health Care Professional Decision-Making to Commence

and Withdraw from Renal Dialysis: A Systematic Review of Qualitative Research. CJ of the American Society of Nephrology 10: 1201-1215.
・ 伊藤大幸, 谷伊織, 平島太郎(2019)：心理学・社会科学研究のための構造方程式モデリング：Mplus による実践　基礎編, ナカニシ出版, 京都.
・ 大出順(2019)：看護師の倫理的行動尺度改訂版の作成, 日本看護倫理学会誌, 11(1), 13-19.
・ 友利幸之助, 京極真, 竹林崇(2019)：作業で創るエビデンス　作業療法士のための研究法の学びかた, 医学書院, 東京.

大原美術館所蔵の油彩作品を対象とした光学調査を基にした研究

公益財団法人大原美術館

柳沢秀行

（概要）

油彩画は、カンバスや板などの支持体のうえに、絵具を積層させて制作が進められる。

画家は、その塗り重ねによって、質感や色彩など独自の表現を追求するのだが、それがゆえに、表面の目視だけでは、どのような絵具が下層にあり、またどのような手順において画家が制作を進めていったのかを確かめることはできない。さらに、下層の不可視性は、塗り重ねられた絵具同士の収縮率の違いによって、亀裂などの作品の保存状態の確認を難しくもさせる。

本調査では、紫外線、赤外線など、不可視光による撮影画像といった、従来の光学的調査に加え、蛍光X線分析などによる調査により、油彩画の組成分析を試みた。

すでにこれまでの調査によって、表面目視では金に近いような絵具が見受けられるジョバンニ・セガンティーニ《アルプスの真昼》や、1919年の制作当初は、金に近い表現があることを当時の批評が伝える関根正二《信仰の悲しみ》に対して、いずれも金や金属質の成分は確認できなかったなどの成果を上げてきた。それらの成果を踏まえ、より大規模な調査に、本研究で取り組む計画を立てた。

もっとも、COVID-19 感染拡大防止の観点からの移動制限などにより、予定した光学機器による臨床的な調査を断念せざるを得なかった。しかしこうした状況でも、従来の調査結果を基にした共同研究者での検討を進め、関連学会での発表を行うことができた。

（本文）　大原美術館は、すでに倉敷中央病院の協力により、アルベルト・ジャコメィティ《キュビスム的コンポジション一男》の CT スキャン撮影を行い、同作品の内部構造を明らかにするとともに、その制作過程を考察する調査を行った。

また倉敷市オリエント美術館の協力により銅と鉄など異なった金属を組み合わせて制作されたバイメタル剣を、また東京理科大の協力のもと古代エジプトのファイアンスについて、いずれも＋兵庫県佐用郡佐用町にある大型放射光施設 Spring-8 において、組成分析調査にかけるなどを行って来た。

こうした経験から、作品についての光学的な調査の有用性を実感し、さらに、昨2020年度からは、東京理科大、東京電機大、東京芸術大学との協同により、光学機器を活用して、油彩画作品の組成調査に取り組んできた。

これまでも、油彩画作品に関して紫外線撮影による加筆箇所の確認を行うことがあったが、さらに踏み込んで、蛍光 X 線分析による絵具の組成調査を行うと、制作年の推定や、金属由来の成分の有無などが確認できる。

蛍光 X 線分析のシステムについては、当館での調査に携わった阿部善也（東京理科大学→東京電機大学）により、すでに、2020 年 9 月 5 日に、日本文化財科学会第 37 回大会で、下記のように報告されている。

これまでに 7.1 keV（Fe-K 吸収端）から 37.4 keV（Ba-K 吸収端）までの間で 14 元素の分析が可能であることを確認したが、今回の自作のモデル試料を用いた検証によりさらに Ni、Se、Br、Sb ついても分析が可能であることが確認でき、X 線の照射に伴う色材やワニスの視認できる変質は生じなかった。

また、同一元素であっても価数や化学状態によって X 線の吸収端エネルギーが異なることを利用し、金属銅と 1 価、2 価の酸化銅、鉱物であるマラカイト中の銅などの化学状態別のイメージングにも成功した。

油彩画の絵具層中に生じた事例が多数報告されている Pb、Zn の金属石鹸の生成を模した試料の分析では、金属石鹸の粒度の違いや絵具表面の凹凸まで正確に視覚化できる可能性を明らかにした。
さらに、事前の XRF 分析だけでは確認できなかったバーミリオンやジンクホワイトなどに起因する特徴的な元素をイメージングすることで、その存在を可視化することができた。

加えて、この油彩画に対して連続X線を用いた通常のX線透過撮影も行い、一般的に油彩画の X 線吸収の主要因の一つと考えられる Pb によるイメージング像とその違いを比較することで、通常のX線透過像の読影に有益な情報を得られることが分かった。
このように、様々な元素を含む絵具が塗り重ねられて構成される油彩画の分析においては、元素ごとのイメージングが可能な本法の利用が有用であることを視覚的に示すことができた。
(「 放射光 X 線吸収端差分法による大原美術館所蔵アンリ・マティス《マティス嬢の肖像》非破壊元素イメージング」)

すなわち、いくつもの絵具層が重ねられて成立している油彩画において、表面目視ではわからない下部層にどのような絵具層があるのかを、蛍光 X 線分析によって知ることができるわけである。そのことは、作品の制作手順の確認や、あるいは、絵具によっては使用される時期が限定される(ある時期だけ使用されていたケースや、19世紀に開発された絵具ならば、制作年は必然的にそれ時期となる、など)ゆえに、制作年の推定にも役立つというわけである。

具体的にケースとして、これまでに得られた知見を書きとめる。

アンリ・マティスによる≪マティス嬢の肖像(以下、本作)≫では、肘掛椅子に座る人物と背景の間に明らかに両者と無関係な水色が視認できる。マティスが、同様のモチーフを描いた他の作品では、背景に海や空が描かれる事例があることから、本作においても表面に見える紺黒色の絵具層の下に、海あるいは空の描写が存在する可能性が考えられている。

調査の結果、背景部分の最上層となる紺黒色の下の水色の絵具層では、肘掛け椅子の手すりの形状とは異なる直線的な図像や線描も多数見受けられ、現在とは異なるイメージが存在している可能性が高められた。また絵画右下部分に、明らかに異なる組成の絵具が確認され、過去に絵具層が剥落し、修復処置を行ったものであると考えられる。

また、人物の目の高さを境界として右側背景のみに明確な Pb 成分の濃淡が確認されたことで、マティスは黒色絵具で背景を塗りつぶす前には、人物の目の高さで背景部分の色調を変えるなどしていた可能性が明らかとなった。

こうした光学的な調査による知見に、美術史研究からの知見を重ねると、当初、マティスは本《マティス嬢の肖像》において、帽子と紺黒色の背景との間にわずかに覗く、水色の絵具層において、現在、表面から観察できる図像とは異なる線描やモチーフの描写があり、それを上から紺黒色の絵具で覆い隠すように塗りこめたという推定が出来、本作品の制作のプロセスや、マティスの芸術的創造の在り方を考察する重要な知見を得ることが出来た。

こうした調査のプロセスや結果については、本研究に携わる大原美術館の塚本貴之、孝岡睦子も共同研究者として名を連ね、第43回文化座保存修復学会(2021年7月15日)での口頭発表「油彩画の新規の非破壊元素イメージング技術としての放射光X線吸収瑞差分法の開発」として報告され、その概要も活字化されている。

この他にも、これまでも、エル・グレコ《受胎告知》、ジョバンニ・セガンティーニ《アルプスの真昼》、パブロ・ピカソ《鳥籠》、《頭蓋骨のある静物》、ジョルジュ・ルオー《道化師(横顔)》、関根正二《信仰の悲しみ》について、東京理科大学、東京電気大学、東京芸術大学の協力を得て、光学調査を実施し、本年度もそれを継続、拡大しての作品からの光学的な情報収集を検討していた。

しかしながら、COVID-19 感染拡大防止の観点からの移動制限などにより、当初、予定の活動がほぼできなくなってしまいました。

しかしながら、E-mail 等を活用しての連絡により、これまでの調査によって得られた情報についての検討

や、高額で重量もある機器の輸送や設置の手順の検討により、当館での限られた時間内での効率的な測定方法についてでなど臨床的な調査手法についての検討を進めた。

斜面崩壊の規模を予測するための崩壊土砂層厚の分布調査手法に関する研究

統合物性モデル技術研究組合※1　岡山大学自然科学研究科※2

西垣　誠※1　　鈴木　茂之※2

自然斜面内の崩壊に対して最も危険な弱部（風化層，潜在崩土層）の厚さの分布状況の推定は，斜面崩壊の規模の推定に対して最も重要な課題である。本研究では、山全体を俯瞰した「崩壊土砂量の推定」を効率的に行うことを目的として，ミニラムサウンディング試験機の仕様を基に，斜面における作業性と高い貫入能力を有する軽重量のサウンディング機器を開発した。

はじめに

近年，我国の各地で短時間の雨量や累積雨量が観測史上最大となることがしばしばあり，これに伴う斜面崩壊の発生件数の増加および発生規模の大規模化が懸念される。また，近年の災害は過去に想定した外力を上回る可能性が指摘されている。

斜面崩壊は，表層崩壊，深層崩壊，地すべり性崩壊に大別され，斜面崩壊全体の約 95%が傾斜度 30 度以上の斜面で発生していると言われている[1]。また，このうちの 80%以上が表土や崩積土が崩落する表層崩壊に分類されている[1]。

2018 年に発生した西日本豪雨災害でも土石流が，道路施設の管理区域外にある山の頂上付近からでも生じており，既設の対策施設や道路施設を乗り越えて破壊した事例や，土砂災害防止法に基づく急傾斜地崩壊危険箇所の定義外の 20～30 度程度の緩斜面においても表層崩壊が発生した事例が確認されている[2]。写真―1 は岡山大学北側に位置する傾斜 26 度程度の半田山で発生した斜面崩壊である。

また，2021 年 5 月に福井市足羽川沿いでは，過去複数回の地すべりや崩壊が発生した斜面の隣接地で，想定していない大規模な斜面崩壊が発生し，河道閉塞により県道が冠水した事例がある[3]。このように頻発する土砂災害に対して，崩壊危険箇所の特定と崩壊土砂量の推定精度の向上は喫緊の課題である。

1. 研究目的

本研究では，自然斜面崩壊においては，豪雨後に崩壊した斜面の対策を実施していた現状に対して，崩壊前に日本中の斜面の危険度をあらかじめ予測することを目的としている。また，その予測により，崩壊する前に自然斜面の安定化(治山)を提案して，安定化対策を実施する国土管理を目標としている。



写真―1　半田山の斜面崩壊（2018 年 7 月）

その目的に対して，近年では，自然斜面の地山の表面の地形把握が，レーザー計測（ＬＰ）によって可能になっている。このような現状の技術を駆使して国土全体の地盤内の情報を統合して国民の安全と安心を構築することを究極の目的としている。この自然斜面に対しての目的を達成するには，以下の事項の研究，技術開発が必要であると考えられる。

（a）自然斜面内の風化層の厚さの分布の推定
（b）斜面内の水径（ミズミチ）の分布の推定
（c）斜面崩壊，地すべり，落石の危険度の推定
（d）斜面崩壊対策（グランドアンカー，表面・地下排水施設等）の健全度診断

本研究では，このような多くの目的の中で，自然斜面の風化層の厚さの分布の推定を研究目的とした。

自然斜面内の崩壊に対して最も危険な弱部（風化層，潜在崩土層）の厚さの分布の推定は，斜面崩壊の規模の推定に対して最も重要な課題である。

このような斜面内の弱部の 3 次元的な分布に対しては，弾性波探査等の物理探査が有効である。しかし，現状では，この物理探査結果に対しての精度の確認が必要である。その確認手法として，ボーリング調査やサウンディング試験による補完が必須である。そこで，斜面における作業性と高い貫入能力を有する軽重量のサウンディング機器の開発，製作した結果について報告する。

2. 斜面調査の各種サウンディング機器

斜面における風化層厚を確認する主な調査手法には，簡易動的コーン貫入試験（以下，簡易貫入試験と称す，JGS1433）や標準貫入試験（JISA1219），スクリューウエイト貫入試験（旧スウェーデン式サウンディング試験，JISA1221）がある[4]。これらのサウンディング機器の性能を表―1 に示す。ここで，簡易貫入試験とスクリューウエイト貫入試験は，玉石あるいは礫を含む土質では適用範囲外であり，礫打ちの影響を低減できる打撃エネルギーの大きなサウンディング機器の開発が課題である。

標準貫入試験は，あらゆる土質に適応可能である。しかし，ボーリング掘削と併用のため仮設が大掛かりであり，自然斜面の多数の地点で試験することは困難である。

3. 軽重量サウンディング試験機の開発

今回開発した軽重量サウンディング試験機（写真―2，以下，ＬＷＣＰＴ（Light Weight Cone Penetration Test）と称す）は，高い貫入能力と斜面での運搬を考慮し，写真―3 に示すミニラムサウンディング試験機（以下，ミニラムと称す，JGS1437-2014 動的コーン貫入試験方法の中型に相当）の仕様に基づき，表―2 に示す改良を実施した。その主な特長は，30kg のハンマーを 15kg ずつ 2 個に分割し，試験時にボルトで一体化したことと（写真―4，5），ハンマーの吊り上げ装置を電動ホイスト（写真―6）にして動力を発電機としたことである。

表―1　斜面調査用サウンディング機器性能比較表[5]

項　目	簡易貫入試験(JGS1433)	標準貫入試験(JISA1219)	ｽｸﾘｭｰｳｴｲﾄ貫入試験(JISA1221)
ﾊﾝﾏｰ、おもり質量(kg)	5	63.5	100
落下高さ(mm)	500	760	―
先端ｺｰﾝ、ｼｭｰ	先端角 60 度､外径 25mm	ｼｭｰ角度 19 度 45’ 外径 51mm	(ｽｸﾘｭｰﾎﾟｲﾝﾄ)
ﾛｯﾄﾞ外径(mm)	16	40.5	19
適用性	作業が簡易。礫、玉石含む地盤に不適。	あらゆる地質に適応。土層判定可能。ﾎﾞｰﾘﾝｸﾞ機械と併用。	軟弱地盤を対象に静的貫入抵抗測定。礫、玉石含む地盤に不適。

表―2　ミニラムとＬＷＣＰＴの比較[5]

項目	ミニラム	ＬＷＣＰＴ
ﾊﾝﾏｰ質量	30kg　1 体	30kg 運搬時 2 分割
落下高さ	35cm	35cm
ﾊﾝﾏｰ吊上方法	ｴﾝｼﾞﾝ,油圧モーター,ﾁｪｰﾝ	発電機,電動ﾎｲｽﾄ,ﾁｪｰﾝ
先端ｺｰﾝ	先端角 90 度,φ36.6mm	先端角 90 度,φ36.6mm
脚	4 本	3 本(急斜面用予備 1 本)
ロッド	φ28mm,4.7kg	φ28mm,3.8kg(中空)
引抜き方法	油圧駆動引抜き装置	電動ﾎｲｽﾄ
運搬方法	本体の車輪で人力運搬	部品に細分し人力運搬
合計質量	270kg(本体のみ 135kg) ﾛｯﾄﾞ 4.7kg/本	85.8kg(発電機 15kg 含) ﾛｯﾄﾞ 3.8kg/本

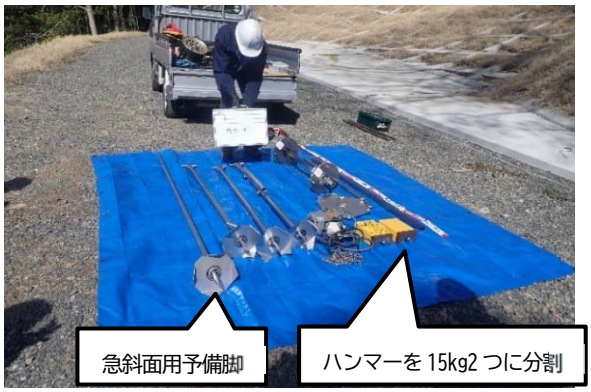


写真―2　ＬＷＣＰＴ全景

吊り上げ装置と動力の改良により，機材の合計重量はミニラム（270kg）の 3 割程度の 85.8kg に軽量化でき，分割すると現状のドローンでも運搬できるようにした。



写真―3　ミニラム全景



写真―4　開発したＬＷＣＰＴ１式（発電機除く）



写真―5　分割したハンマー近景



写真―6　電動ホイストとハンマー

4. ＬＷＣＰＴの試行

西日本豪雨災害時に，斜面崩壊が発生した岡山大学北側の半田山（標高 152m）において，ＬＷＣＰＴを試行した。斜面崩壊時の規模は，幅 45m，長さ 170m，深さ 2m 程度であり，今回の試験箇所は，頭部滑落崖から 20m 程度下方の管理道沿いに位置し，表層には礫混り砂質土からなる崩積土が分布する。現在は，前述写真―2 等の背景に写るように吹付枠工が施工済みである。

サウンディング試験は，推定Ｎ値 30 以上を確認できる深度まで実施した。

ＬＷＣＰＴによる推定Ｎ値は，ミニラムと同様に式(1)により算出する[6]。

$$N=Nm/2-0.16M_V \qquad (1)$$

ここで，Ｎｍは貫入量 20cm 当たりの打撃回数，M_V（単位 N･m）は貫入ロッドのトルクである。

図―1 にＬＷＣＰＴにより推定したＮ値と，当試験箇所の近傍で崩壊時に実施された簡易貫入試験による推定Ｎ値を示す。

簡易貫入試験による推定Ｎ値は，式(2)により算出する[7]。

$$N=1.1+0.3\cdot Nd \quad (Nd>4) \qquad (2)$$
$$N=0.66\cdot Nd \quad (Nd\leqq 4)$$

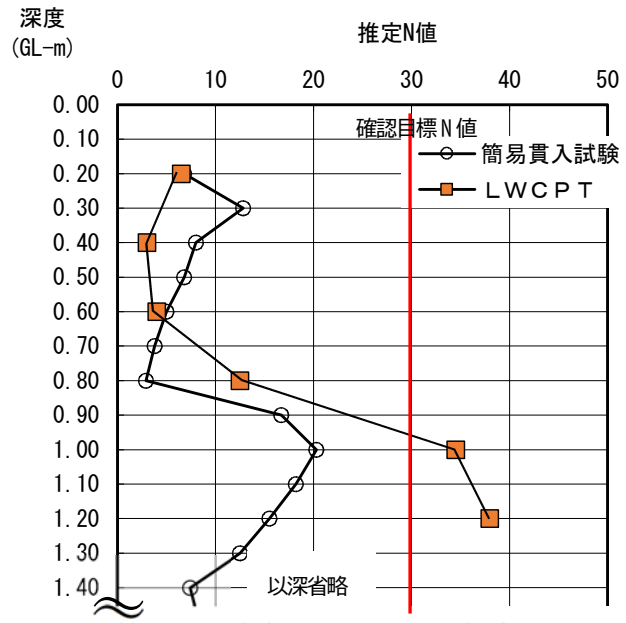
ここで，Ｎｄは簡易貫入試験の貫入量 10cm 当たりの打撃回数である。

今回の試験地点では，深度 1m において，推定Ｎ値 35 の地盤が確認されたが，簡易貫入試験地点のＧＬ－1m では推定Ｎ値 20 であり，それ以深推定Ｎ値が低くなる傾向であった。

二つの試験による推定Ｎ値の差異は，現場状況から，基盤岩の凹凸ではなく，不均一に混入する転石の影響と推察される。

単位面積当たりのコーン先端エネルギーは，ＬＷＣＰＴは 97.9kJ/m^2，簡易貫入試験は 49.9 kJ/m^2 であり，打撃のエネルギーは今回開発したＬＷＣＰＴの方が大きいが，礫の硬さや大きさにより高止まりしたと推察される。

斜面における潜在崩土層厚を把握するためのサウンディング試験では，礫や転石と基盤岩を区別することが重要である。



図―1 簡易貫入試験とＬＷＣＰＴの推定N値比較図 [5]

5. まとめ

本研究により得られた結論を以下に列挙する。

(1) ミニラムサウンディング試験機（ミニラム）の仕様に基づき，斜面での使用を考慮した軽重量サウンディング試験機（ＬＷＣＰＴ）を開発した。

(2) ＬＷＣＰＴは，30kg のハンマーを運搬時に 2 つに分割し，ハンマーの吊り上げを電動ホイストと発電機にすることで，全体質量を 270kg から 85.8kg に軽量化した。

(3) ＬＷＣＰＴの試行の結果，推定N値 35，38 の地盤を確認した。

6. 今後の課題

本研究において斜面で人力運搬できる軽重量サウンディング試験機（ＬＷＣＰＴ）を開発した。しかし，潜在崩土層厚分布の推定には，最終調査深度が礫か基盤岩かを判断できる装置の追加等の改良が必要であることがわかった。

このような観点から，今後の課題として以下の事項が考えられる。

(1)浮石や転石の根入れ深さを振動計測により推定する手法を参考に [8]，ハンマー打撃時に先端コーンから地盤に伝わる振動波形特性を解析し，転石と基盤岩を区分。

(2)土層確認のためにＬＷＣＰＴ先端をサンプリング可能なコーンに交換できる仕様への改良（写真―7，8）。



写真―7　サンプリング可能な先端コーン試作



写真―8　試作コーンによる試料サンプリング状況

(3) ＬＷＣＰＴと 3 次元弾性波探査，常時微動アレー探査，空中電磁探査，ＤＡＳによる振動計測等の物理探査結果の照合による潜在崩土層厚の推定精度向上。

(4) 電動補助装置（パワースーツ）の改良による斜面上におけるＬＷＣＰＴの運搬の効率化（写真―9）。



写真―9　開発中のパワースーツ

(5) 潜在崩土分布地の 3 次元物性モデルの作成と 3 次元浸透流解析による豪雨時の崩壊土砂量の推定精度向上。

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より研究補助金支援を受けました。また，協同組合岡山県土質試験センター西村輝センター長にはサウンディング試験機の計画・製作に協力いただきました。岡山大学西村伸一教授には簡易貫入試験データを提供いただきました。地盤工学会中国支部岡山地域セミナー構成員の方々には，試験機の試行と改善に向けた助言をいただきました。岡山大学施設企画部には、西日本豪雨時に斜面崩壊が発生した半田山を試験フィールドとして提供していただきました。ここに記して謝意を表します。

参考文献

〔1〕 建設省河川局砂防部傾斜地保全課・建設省土木研究所砂防部急傾斜地崩壊研究室:「がけ崩れ対策の実態」,『土木研究所資料』,第 3651 号, pp.81-84, 1999。
〔2〕 木村隆行・笹井友司・井上真・西垣誠:「激甚化する地盤災害の技術課題と展望」,『公益財団法人地盤工学会中国支部・論文報告集 地盤と建設』, Vol.38, No.1,pp.9-18, 2020。
〔3〕 福井新聞 ONLINE：https://www.fukuishimbun.co.jp/articles/-/1314488 (2021.6 取得)。
〔4〕 国土交通省水管理・国土保全局：『国土交通省河川砂防技術基準調査編』,p.第 19 章第 4 節-4, 2014.4。
〔5〕 西垣誠・井上真：「斜面崩壊規模の予測のための軽重量サウンディング試験機(LWCPT)の開発」,『高速道路と自動車』,第 64 巻,第 11 号,2021 年 11 月号,pp.47-50,2021。
〔6〕 菅原・鈴木・菅原：「小型動的貫入試験機の開発とその利用」全地連・技術フォーラム’97（名古屋）,pp.461-464,1997。
〔7〕 公益財団法人地盤工学会：『地盤調査の方法と解説―二分冊の 1－』, p.322,2013。
〔8〕 深田隆弘・谷口達彦・澁谷啓：「振動計測に基づく斜面上転石の落石危険度評価方法の提案」,『土木学会論文集 C（地圏工学)』,Vol.69,No.1,pp.140-151,2013。