

課題番号	総 17-001 継続 総 16-001
------	----------------------------

平成 29 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 30 年 3 月 23 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 加藤 直人



所属・資格 文理学部・教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 文理学部 情報科学研究所

1 研究課題 東アジアにおける都市形成プロセスの実態解明とそのデジタル化をめぐる研究		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 加藤直人	文理学部・教授	モンゴル・満洲族要因の分析
○研究分担者 粕谷元	文理学部・教授	イスラム要因の分析
古川隆久	文理学部・教授	日本要因の分析
松重充浩	文理学部・教授	現地中国政治要因の分析
須江隆	生物資源科学部・教授	歴史的連続性の分析
関根智子	文理学部・教授	地理情報の分析
田中ゆかり	文理学部・教授	多言語状況の分析
山口守	文理学部・教授	中国思想・文学との関連分析
日吉秀松	スポーツ科学部・准教授	現代中国への規定要因分析
松橋達矢	文理学部・准教授	社会歴史的要因の分析
谷聖一	文理学部・教授	デジタルアーカイブシステムの構築
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
(1) 基盤研究 (B) 平成 30 年度～32 年度「清代「内陸アジア交易ネットワーク」の形成・展開と文化変容における歴史的特徴の解明」研究代表者：加藤直人→不採択 (2) 基盤研究 (C) 平成 30 年度～32 年度「租借地大連・旅順における中国人社会の発展と日中相互関連展開の実態解明」研究代表者：松重充浩→採択 (3) 平成 29 年度研究助成「奨励研究」一般財団法人第一生命財団「都市とくらしの分野」「交通網再編に伴う集住地域形成プロセスの多系性をめぐる社会学的研究—東京 15-20km 圏のブルーカラーベルト地帯を事例として—」研究代表：松橋達矢→採択 (4) 基盤研究 (C) 平成 30 年度「文化大革命における目的とプロセスに関する分析」研究代表者：日吉秀松→不採択 (5) 基盤研究 (C) 平成 30 年度～32 年度「ヴァーチャル方言研究の展開」研究代表者：田中ゆかり→採択 (6) 「千代田学」事業 (千代田区) 平成 30 年度「WebGIS を用いた千代田ヴァーチャル時空散歩アプリの構築」研究代表者：田中ゆかり→採択		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (☑・否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：文理学部情報科学研究所

氏名：加藤直人

4 研究目的

本研究は、平成28年度採択を受けた2年計画の研究課題を継続するものであり、その目的とするところは、前年度と変わらず以下の通りである。

- ①今日の東アジア諸都市が直面する政治・経済・社会の諸問題の多くは、急速な国際化状況下で展開する新たな技術的水準と各都市が歴史継承体的に形成してきた実態の角逐に起因していることは、周知の事実となっている。このことは、東アジア諸都市が抱える諸課題解決に向けては、各都市形成の歴史的事実の解明が不可欠な課題であることを意味している。
- ②本研究は、上述課題の好個な事例である、歴史的な多民族共住地域である中国東北地域においてロシアや日本などの列強の影響を強く受けながら急速な都市形成が進んだ20世紀前半のハルビンを具体的な研究対象として、日本大学文理学部の特徴である「文理融合」研究環境をフルに活かしつつ、歴史学、地理学、文学、言語学、社会学、情報学の各研究分野研究者との共同研究を通じて解明し、その成果を広く社会に還元できるデジタルアーカイブを構築することにある。

5 研究概要

平成29年度においては、年5回の全体ミーティングにより各研究者間の情報共有と相互討論をおこないつつ、次の作業を実施した。

(1) 平成28年度からの継続作業

- ①平成28年度において抽出・整備が完了した日本大学文理学部所蔵ハルビン関係資料中で、デジタル化および基盤システムへの登録・蓄積が未完了分のデータ入力作業を引き続きおこなった。
- ②平成28年度に完成した過去から現在に至るデジタル空間データ（デジタル地図）に、各時点の道路、鉄道、駅、建物などと連関する文字資料を入力し、地理情報と文字情報を同時に可視化するビューアシステムの構築作業を継続した。さらに、①で作成されたデジタル資料の中で地図上に位置を示すことが可能な資料については、地理情報を付加し、位置を示すデータを入力する作業も継続した。

(2) 平成29年度の新規作業

- ①上述「(1) ①」の作業が終了したビジュアル資料に関して、その書誌的内容を反映した検索システムとビューアシステムを構築して、日本大学文理学部資料館デジタルアーカイブなどにおいて一般公開をおこなった。
- ②ハルビンの都市形成の新たな歴史像創出に向けて、〈文献資料－画像資料－地理情報－各種関連情報（歴史学、地理学、文学・言語学、社会学などからの知見）〉の統合的考察を可能にする公開国際学術シンポジウムを開催した。
- ③平成28年度に作成したデジタル空間データを3D化する作業を行う。また、デジタル空間データの道路に対してネットワーク構造を構築するなど、WebGIS上での空間分析のためのデータ作成を行う。

実施研究所：文理学部情報科学研究所

氏名：加藤直人

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

上述した研究概要に関する主な研究成果は、以下の通りとなっている。なお、本研究プロジェクト全体にわたる概況に関しては、研究組織 HP (<http://kery.sakura.ne.jp/research-furtherance/index.html>) にて公開している。

(1) ハルビンのデジタル地図構築に関する研究成果 (主に、関根、田中、谷により遂行)

平成 28 年度以来入力を継続してきた、絵葉書を主とする各種資料 (各種ビジュアル資料情報、各種文献資料情報、等々) から抽出したメタデータを、ハルビンの 1910 年代、1920 年代、1930 年代の市街地図上に落とし込み、建物を中心とする「景観情報+地理情報+文字情報 (与謝野寛・与謝野晶子『満蒙遊記』) + 時間情報」からなる、ハルビンデジタル地図を構築し、公開した (<http://ahj.chs.nihon-u.ac.jp/harbin/>)。本成果は、ハルビン都市形成史を、総合的かつ視覚的にとらえることができる新たな資料空間創出の最初の一步となるものであり、当該研究領域に新たな資料水準を提供するものと位置づけられる。

また、同ビューアシステムは、他の隣接研究分野への援用も可能なものであり、この点に関しては、本研究成果を基礎とした他の研究助成金へのエントリーへの可能性を開くものでもあり、実際、本研究分担者の田中により「千代田学」へのエントリーがなされて、採択されたことも付言しておきたい。

(2) 各種データベースの構築と公開 (主に、加藤、松重、日吉、谷により遂行)

本研究作業の重要な成果の一つに、日本大学文理学部が所蔵する貴重な各種資料の整理・公開がある。この点に関して、平成 28 年度において、既に、現地刊行定期刊行物 (『満蒙』1920~31 年分、『朝鮮及満洲』1909~43 年分) の記事タイトル約 2 万件の検索インデックス情報のエクセルソフトへの入力を完了していたが、本年度においても他の文献データ (『満洲日日新聞』の 1907-31 年モンゴル関係記事タイトル、『奉天公報』1912-31 年総目次、等) につき作業を継続し、約 8 千件の検索インデックス情報をエクセルソフトに入力した。

また、入力済みの『朝鮮及満洲』に関しては、http://ccc.sakura.ne.jp/korea_manichuria/で、『満蒙』に関しては、http://ccc.sakura.ne.jp/manichuria_mongolia/で、それぞれ、その検索システムと共に公開している。加えて、当該期の写真データとしては最もまとまった形での刊行となっている『亜東印画集』574 件に関しても、本学所蔵全てに関して、日本大学文理学資料館デジタルアーカイブにおいて多様な検索方法が可能な形で公開している (<http://ahj.chs.nihon-u.ac.jp/dm/main.php>)。

(3) ハルビン都市形成における多元重層構造実態の解明

本研究の重要な課題は、本項目標記の課題を、各種専門分野 (歴史、地理、民族、思想、言語、政治・経済) の学際的検討を通じて明らかにすることにある。この課題に対して、本年度も計 5 回の全体ミーティングを実施し、研究組織メンバー相互の情報共有と相互討論を実施しつつ追究した。その成果は、以下の通りである。

(イ) 歴史的多元重層構造の解明 (主に、加藤、松重、粕谷、古川、須江により遂行) :

従来のハルビン都市形成史研究は、同都市建設がロシア主導により実施され、その外形的特徴が西洋的だったことから、同都市の特徴を「ロシア的都市」あるいは、その内実を問わない「中国における国際都市」と位置づけてきた。しかし、本研究においては、ハルビンの都市形成が、様々な国家、民族、文化の諸要素を重層的かつ相互連関的に内包する特徴を持つものだったことを、以下の諸点から明らかにした。

①ロシアのハルビン建設は無人の野に孤立的に進められたものではなく、その労働力確保や土地購入において歴史継続的に現地の有力者層を形成していた所謂「旗人」層を中心とする中国人との連関性の下で進められ、そのことはハルビンに西欧的なものと清朝的 (中央ユーラシア的かつ中国的) なものの歴史的重層性をもたらすこととなり、それが集中的に現れてくるのがハルビンの中国人街となる「傅家甸」の都市行政のあり方や景観であることが、関内の歴史継承的な当該事象との比較により確認にされた。

②この重層性が所謂「帝国」的規模をもっていたことにより、その政治・経済的空間では、「国

実施研究所名：文理学部情報科学研究所

氏名：加藤直人

研究結果（つづき）

「民国家」単位では多様な国民となる諸民族が、相互に関連しつつ縦横に展開することとなり、それが、ハルビンに多元的要素と国際的な諸関係が交差するという意味での国際性を付与するものとなった。より具体的には、ロシア人、中国人、日本人、日本植民地下の朝鮮人や台湾人、モンゴル人、タタール人などの相互連関的な活動がおこなわれることを通じて、ハルビンに国際関係の争点都市としての意味を付与していくことが明らかにされた。別言すれば、ハルビンの「国際性」の内実が、同都市が内包する多様性により喚起されていることが確認された。

(ロ) 文化的重層性と多元性の確認（主に、山口、田中により遂行）：

ハルビンが内包する重層性・多元性は、上述した歴史的な政治・経済面からだけでなく、文化面からも確認された。より具体的には、当該期ハルビンの写真資料や絵葉書などに記録された、看板などの様々な文字資料の分析を通じて、ある地域の主要な文化コードのあり方を示すものとなり、それが、所謂「日本人街」や「中国人街」などの、都市内における民族・文化的境界のあり方を示すものとなっていること、しかも、それが時間的経過と共に、流動性を持つものだったことが明らかにされた。また、これらの成果は、従来の当該研究が実証的に明らかにすることができなかったハルビン都市空間が持つ文化的ダイナミズムを明らかにした成果として位置づけられる。

(ハ) 現在との歴史的連続性の解明（主に、関根、松橋、日吉により遂行）

上述してきた主に 20 世紀初頭から中盤にかけてのハルビン都市形成の諸特徴は、現代ハルビンの諸特徴に如何なる影響を与えるものだったのであろうか。このことは、本研究の持つパースペクティブを考える上で重要な課題ともなっている。しかしながら、その追究において前提となる現在の中華人民共和国ハルビン市の現地調査は、様々な規制がある現在の同国研究環境をふまえると実現は難しく、当初研究協力を内諾していた現地協力者からも「調査不可」の連絡があった。このため、本研究プロジェクトでは、文献研究による上述したハルビン都市形成上の諸特徴を反映したと考えられる現代中国政治のあり方と、主に都市形成実態を検討する上で有効となる方法論を提示することで、次善の策とした。

前者に関しては、1960 年代後半から 1970 年代前半に至る所謂「文化大革命」期において、武装闘争を媒介とした「毛沢東主義」に象徴される強圧的な一元的イデオロギーにより、中国社会が内包した多様性が急速に失われていく過程が追究された。この点は、前述した多元重層的都市という側面を持つハルビンが、「文化大革命」期に急速に「中国都市」という側面を前面に押し出していくことと、1980 年代以降のハルビンで「国際性」「異国性」を現実のハルビンと相対的に切り離しつつ言わば「観光商品」化していく過程の内的理路を解明していく上で、有効な視座を提供するものと言えよう。また、後者に関しては、都市における公共交通を事例に、都市の諸変化に大きな影響（葛藤や再秩序化）を与える住民移動の実態把握の GIS を利用した方法論構築と東京圏を事例とする実証的研究がなされた。これらの成果が、現代ハルビンの実態把握にどこまで有効であるかは後日を期すしかないが、重要な方法的作業仮説を提供する成果であると位置づけられる成果であると考えられる。なお、関根の GIS を利用した方法論的成果は、高齢化問題などの都市が抱える新たな課題の解決に極めて有効な実践的な内容を持つものであることを付言しておきたい。

(4) 国際学術交流、公開シンポジウム、企画展示会の開催

上述研究活動の成果は、後述する個別論文等の成果物とは別に、以下の形で、広く一般に公開された。いずれも、多数の来場者を得て、本学における研究水準と資料情報発信能力の高さを広く PR する機会となった。

(イ) 公開国際学術シンポジウム：「写映された『満洲』—具象化される〈帝国〉—」、平成 29 年 10 月 21 日開催、会場；日本大学文理学部 3 号館 5 階 3509 教室。

(ロ) 企画展：「『満蒙』関係寄贈資料展—記録化された在『満洲』日本人の日常と記憶—」、会期；平成 29 年 12 月 11 日～12 月 23 日、会場；日本大学文理学部資料館展示室。

実施研究所名：文理学部情報科学研究所

氏名：加藤直人

研究結果（つづき）

(5) 研究プロジェクトメンバー個人の主な研究成果物

- ・「咸豊年間、「新疆」における大銭の鑄造について：天理図書館所蔵「伊犁奏摺稿檔」の分析をとおして」、加藤直人、『桜文論叢』、査読あり、第96巻（長沼宗昭教授古稀記念号）、1-15頁（2018）
- ・「清代の文書資料と満洲語」、加藤直人、国立台湾師範大学歴史学系編『第二屆「跨越想像的邊界：族群・禮法・社會」、國際學術研討會論文集2』、1-12頁（2017）
- ・“The Turkish Revolution between Secularism and Islam: The Three Laws Enacted by the Grand National Assembly of Turkey on March 3, 1924,” Gen Kasuya, Sophia Journal of Asian, African, and Middle Eastern Studies 35 (2017)
- ・「ムスタファ・ケマル（アタテュルク）：国父の功績と負の遺産」、粕谷元、鈴木董編『悪の歴史 西洋編 [上]・中東編』、清水書院、390-401頁、（2017）
- ・「近代日本における建国神話の社会史」、古川隆久、『歴史学研究』、査読あり、2017年6月号〔958号〕、27-36、46頁（2017）
- ・「植民地期台湾で巡回上映された娯楽映画の特徴」古川隆久、三澤真美恵編（出版協力国立台湾歴史博物館）『植民地期台湾の映画』東京大学出版会、30-60頁、（2017）
- ・『近代中国都市案内集成 大連編』に記録された中国人」、松重充浩、松重充浩・木之内誠・孫安石監修『近代中国都市案内集成 第43巻』、ゆまに書房、3-25頁、（2017）
- ・『シリーズ・近代アジアの都市と日本：近代中国都市案内集成 大連編』（全18巻）、松重充浩・木之内誠・孫安石監修、ゆまに書房、（2017）
- ・「南宋・洪邁『夷堅志』に関する二つの国際会議と今後の研究動向」、須江隆、『人間科学研究』、査読あり、第14号、85-96頁、（2017）
- ・「宋代列状小考一祠廟の賜額・賜号の申請を中心に」、須江隆、『長沼宗昭教授古希記念論文集』（『桜文論叢』第96巻）、査読あり、掲載ページ未定、（2018年2月刊行予定）
- ・「GISによる近接性研究の進展」、関根智子、『E-journal GEO』、公益社団法人日本地理学会、Vol.13(1)、（2018）
- ・「境界に関する地理学的研究」、関根智子・高阪宏行、『日本大学文理学部情報科学研究所年次研究報告書』No.17、1-10頁（2017）
- ・「方言」、田中ゆかり、計量国語学会編『データで学ぶ日本語学』、朝倉書店、69-83頁、（2017）
- ・「方言・共通語イメージその比較と年層差から読み取れること一」、田中ゆかり、『南山形ことば調査報告書2』、17-25頁、（2017）
- ・「アフター・バベル—華語語系文学が聞き分ける声」、山口守、『三田文学』、査読あり、第96巻第131号、174-187頁、（2017）
- ・「張我軍と映画『東洋平和の道』及び大東亜文学者大会について」、山口守、『研究所年報』第10号、大妻女子大学草稿・テキスト研究所、5-24頁、59頁、62-63頁、68-69頁、（2017）
- ・「1970年における「国家主席」の設置をめぐる議論の本質に関する考察」、日吉秀松、『研究紀要』（日本大学文理学部人文科学研究部）、査読あり、第94号、127-138頁、（2017）
- ・「東亜共同体形成所面臨的課題」、日吉秀松、王冲・金相淳編『東北亜和平之路—東北亜如何合作』（東亜和平研究院2017研究項目：察哈爾外交与国際関係叢書）、察哈爾学会、80-87頁（2017）
- ・「社会調査と社会調査教育のあいだ—『交通インパクトの社会的効果に関する第9次調査』を中心に」、松橋達矢、『社会と調査』第19号、70-78頁、（2017）
- ・「「丸の内」をめぐる「景観」論争の系譜—『開発主義』と『市民の動員』の観点から」、松橋達矢、『関東都市学会年報』第18号、13-26頁、（2017）
- ・「Computational Thinkingの測定手法の探究：Bebras Challenge vs 実プログラミング」、松澤芳昭、村田和義、谷聖一、情報教育シンポジウム論文集(2017巻14号)、93-100頁、（2017）
- ・“Informatics and Programming Education at Primary and Secondary Schools in Japan”, International Olympiad in Informatics(11巻) Susumu Kanemune, Shizuka Shirai, Seiichi Tani、143-150頁、（2017）

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

平成29年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 30 年 4 月 18 日

日本大学学長 殿

氏 名 高橋 博樹



所属・資格 文理学部・教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 文理学部自然科学 研究所

1 研究課題 高圧力技術を用いた新規鉄系超伝導体研究と独創的超伝導物質探索プロセスの開発		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 高橋 博樹	文理学部教授	研究総括、高圧電気抵抗測定、高圧 X 線回折実験
○研究分担者 川上 隆輝	文理学部准教授	高圧磁気測定、高圧電気抵抗測定
上岡 隼人	文理学部准教授	光学測定
久保 康則	文理学部教授	電子状態シミュレーション
岩田 展幸	理工学部教授	材料合成、薄膜作製
山本 寛	理工学部特任教授	材料合成、薄膜作製
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
岩田展幸 基盤研究 (C) 2次元強磁性スピン配列を持つ反強磁性誘電体/強磁性積層膜による電界印加磁化反転 H29~H31年度 採択 高橋博樹 新学術領域 領域名:時・空・圧—引力制御が拓く新超伝導科学 計画研究「超高圧による引力制御」代表者 H29申請 不採択		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (☑・否) いずれかを○で囲んでください。

否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：文理学部自然科学研究所

氏名：高橋 博樹

4 研究目的

本研究は、新しいタイプの超伝導体の発見をきっかけとして、新しい超伝導体の機構解明、新超伝導体および関連する新機能製材料の開発をめざした研究である。

超伝導の研究では超伝導転移温度(T_c)が一つの指標となり、基礎と応用の両面から、高い T_c を持った超伝導物質の新規探索や機構解明に関心が持たれている。とりわけ高温で超伝導を示す高温超伝導体に関しては、銅酸化物超伝導体(1986年)、鉄系超伝導体(2008年)の発見がある大きなブレイクスルーになっている。しかしながら超伝導発現機構についての議論はまだ続いており、周辺物質の開発も精力的に行われている。研究代表者高橋のグループは、一次元的はしご型格子を持つモット絶縁体である鉄系化合物 $BaFe_2S_3$ が、圧力下で金属化を経て超伝導を示すことを発見した(2015年)。はしご型鉄系超伝導体は、引き続き精力的な研究が行われている鉄系超伝導体のみならず、銅酸化物超伝導体も含めた、高温超伝導現象についての知見が得られる可能性があり、学術的に重要である。本研究では、機構解明、新物質開発をめざした物性測定、理論計算をさらに推し進める。電気抵抗、磁気測定、X線回折、熱膨張、光学測定などを低温高圧下で行う。

また、最近、様々な金属薄膜や酸化物薄膜で、界面の電荷移動を通して電荷キャリアを制御し、薄膜試料の超伝導転移温度を制御するという方法が報告されている。垂直方向の奥行きが極めて小さい薄膜の積層界面ではお互いの物質間の電氣的、磁氣的な相互作用が大きく影響を及ぼし合うことから、興味深い物理的性質が示されている。新規高温超伝導物質に注目すれば、ギンツブルグモデルを満足する2次元伝導系金属インターカレート2層グラフェン、および極めて薄い伝導層を誘電体で挟んだ積層膜が有力な候補材料となる。この代表的な伝導層はバルクでは導電性、強磁性の性質を示すが、極めて薄いため常磁性の半導体(絶縁体)となる。本研究ではこれら試料に圧力を加えることで、伝導層のひずみにより電子状態の変化が起こり、さらに誘電体層の電子・ホール対と伝導層電子の相互作用により、超伝導が誘起されると考えている。伝導層は様々な物質を選択することができるため、薄膜界面間の電荷移動、磁性、格子振動などの相互作用の制御を自由に行うことができると考え、薄膜試料に対してより広い範囲で電荷キャリアを制御する技術確立することができる。超伝導のみならず、多くの基礎研究やデバイスへの応用が期待される。

5 研究概要

研究代表者高橋のグループは、はしご型構造を持つ鉄化合物 $BaFe_2S_3$ が圧力印加の下で超伝導を示すことを発見し、2015年に英国科学誌 Nature Materials に発表した。1次元的はしご型構造を基本構造とする鉄系物質での超伝導の発見は世界最初であり、国内外に向けて、先駆的研究を示す結果となった。本研究では、これらの研究成果をもとに、新超伝導物質開発および鉄系超伝導体の超伝導機構解明に資する結果を得ることを第一の目的とした。一方、物質の圧力効果は、物質内部の電子状態の変化を利用するものである。本研究では、従来の圧力効果の実験に加え、積層薄膜などの界面に、10万気圧を超える圧力を加えることで、電荷分布や磁気相互作用を変化させ、電子状態変化やキャリア移動を誘起することを試みるという独創的な手法を確立することを第二の目的とした。これは、非超伝導物質の超伝導化という可能性も含まれる。

以上の目的のために以下の研究を進めた。

- ・スピンラダー型超伝導体 $BaFe_2S_3$ の周辺物質を調べた。SをSeで置換した $BaFe_2Se_3$ は1気圧で $BaFe_2S_3$ とは異なる磁性を示すが、圧力下で超伝導を観測できた。両者の磁氣的性質は異なるため、超伝導発現の起源を探る上で興味深い。また、鉄系超伝導体 $TbFeAsO_{1-x}H_x$ の反強磁性相で圧力誘起超伝導を見いだした。
- ・理論的側面から、圧力効果に伴う電子状態の変化を第一原理計算により評価し、電荷密度分布の圧力効果をFeAs層に注目して調べた。転移温度への圧力によるFe, Asの結合の変化が果たす役割を吟味し超伝導との関係を調べた。
- ・平面四配位無限層構造をもつ酸水素化物 $SrVO_2H$ の高圧下の物性について研究を行った。酸水素化物のヒドリド(H)の球状の軌道(1s軌道)に着目し、量子力学的な結合の性質を利用した電子状態の制御を確立させることと、この性質を利用した新奇な超伝導体の発見を目指して研究を行った。
- ・Ti酸化物の金属絶縁体転移の機構について、分光学的に調べ、また圧力下の電気抵抗測定により高圧下で金属領域が安定となることを観測した。薄膜化により超伝導が報告されていることから高圧下の金属状態と薄膜の電子状態の関連性を調べる。
- ・2層グラフェン間にFeもしくはCaを挟み込んだ試料の作製と電気特性の温度依存性、また圧力効果を調べた。また、膜厚の極薄い(1~10ユニット程度)の伝導層を誘電体でサンドイッチした積層構造を作成する。同様に、伝導層の電気特性の圧力効果を明らかにする。

実施研究所：文理学部自然科学研究所

氏名：高橋 博樹

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

新しい超伝導体の機構解明、新超伝導体および関連する新機能製材料の開発をめざした研究を進めるため、複数のテーマについて研究を進めた。

1. はしご型鉄系化合物 BaFe_2Se_3 の圧力下の性質

圧力誘起超伝導を示す BaFe_2S_3 についてのこれまでの研究から T_c が、圧力に対して最大値 17 K のドーム状に変化を示すことが示されている。S を Se で置換した BaFe_2Se_3 は、 BaFe_2S_3 と同様にはしご形構造を持つが、異なった磁気構造を持っている。 BaFe_2S_3 は、1 気圧でストライプ型の反強磁性を示し Fe あたり $1.3 \mu\text{B}$ の磁気モーメントを、 BaFe_2Se_3 はブロック型の反強磁性を示し Fe あたり $2.8 \mu\text{B}$ の磁気モーメントを持つ。高圧下の電気抵抗測定から BaFe_2Se_3 においても圧力誘起超伝導が 11 GPa, 11 K で観測された。実際のところ、 BaFe_2S_3 の圧力誘起超伝導を発見する以前に、 BaFe_2Se_3 の圧力効果も調べていたのであるが、そのときは超伝導を観測することはできなかった。今回良質の単結晶が合成できたおかげで超伝導を観測できたと考えられる。両物質とも超伝導発現に鉄の d 電子による反強磁性揺らぎが関与していると思われるが、 BaFe_2Se_3 の方が低い T_c をもつのは、1 気圧の磁気モーメントが大きいことに由来しているかもしれない。圧力下では、通例、磁性相が抑制される傾向があり、これらのはしご型物質では、反強磁性相が圧力下で抑制されたときの反強磁性磁気揺らぎが超伝導発現にとって重要であると考えている。また、理論計算では BaFe_2Se_3 の磁気モーメントは 11 GPa では完全に消失していないことが指摘されており、より高圧下で磁気モーメントがさらに抑制されると、より高い T_c が得られることが指摘されており、現在さらに高圧下での測定を進めている。また、 BaFe_2S_3 では過剰に含まれる Fe に応じて 1 気圧での磁性相の磁気転移温度が異なることが報告されている。今回測定を行った BaFe_2Se_3 においても Fe が過剰に含まれる結晶が合成されており、超伝導への過剰 Fe の依存性などについても比較検討を行い、磁性と圧力下で発現する超伝導性との関係を調べる予定である。

2. はしご型鉄系超伝導体 BaFe_2S_3 の周辺の混晶系物質の圧力下の性質

混晶系 $\text{Ba}_{1-x}\text{Cs}_x\text{Fe}_2\text{S}_3$ は $x=0$ がブロック型反強磁性、 $x=1$ がストライプ型反強磁性で、中ほどの組成で磁性が抑えられている。この磁性が抑えられている組成物質 ($x=0.25$) の電気抵抗測定を高圧下で行い新規超伝導体の開発を行った。また、この混晶系の中間組成でエネルギーギャップが最小となる組成 (最も金属に近い組成 $x=0.65$) においても電気抵抗測定を高圧下で行った。結果からは、これらの物質では、金属絶縁体転移が観測されたが超伝導は観測できなかった。研究結果の 1 で報告したようにこの混晶系のエンドメンバーの BaFe_2Se_3 は良質の単結晶が合成されたことにより圧力誘起超伝導を示している。混晶系 $\text{Ba}_{1-x}\text{Cs}_x\text{Fe}_2\text{S}_3$ においても、より良質の単結晶を合成できれば、超伝導を見いだすことができるかもしれない。元素置換において Se と S を比較した場合、多くの化合物では Se 化合物の方が強い共有結合性のために金属的である。この物質系では S の化合物の方が、高圧下で金属的になる傾向がある。その理由については今後明らかにしたい。また、 BaFe_2S_3 の Ba を Cs で置換することによるキャリアドープ (ホールドープ) を行い、電気抵抗測定を高圧下で行った。この $\text{Ba}_{1-x}\text{Cs}_x\text{Fe}_2\text{S}_3$ ($x=0.05$) において、金属絶縁体転移、超伝導転移が観測されているが、系統的な結果はまだ得られていない。異なる組成物質などを対象により詳しく調べる予定である

3. 水素をドープした 1111 型鉄系超伝導体の圧力効果

1111 鉄系超伝導体の $\text{LaFeAsO}_{1-x}\text{F}_x$ は、鉄系超伝導体発見当初に最初に注目され、研究代表者高橋のグループが細野東京工業大学教授らと共同でいち早く圧力効果を測定し、 T_c が 26 K から 43 K まで上し、銅酸化物に次ぐ T_c を持つ高温超伝導体であることを発見した物質である (2008 年英国科学誌 Nature に掲載)。 $x=0$ の母物質は半金属反強磁性体で超伝導を示さないが、酸素のフッ素置換による電子ドープによって反強磁性が抑制され、超伝導が出現する。このことから超伝導の起源の一つとして反強磁性揺らぎが考えられている。また、フッ素置換は 15% 程度が上限であったが、水素 (H) 置換による $R\text{FeAsO}_{1-x}\text{H}_x$ が (R = 希土類元素) 成功し 50% を超える領域まで元素置換され、 x に対する T_c の完全なドームが観測された。1111 型

実施研究所：文理学部自然科学研究所

氏名：高橋 博樹

研究結果（つづき）

鉄系超伝導体 $R\text{FeAsO}_{1-x}\text{F}_x$ は一連の鉄系超伝導体の中で、最も高い T_c (55 K) を示し磁氣的性質との関連も指摘されており精力的に研究が進められている。また、高ドープ域まで試料が合成されたことで、 T_c ドームの高ドープ側に再び反強磁性相(AF2)が出現することが報告された。この高ドープ域での反強磁性相は $x=0$ の母物質の反強磁性相(AF1)とは磁気構造などの性質が異なり、超伝導との関連については、まだほとんど研究が進んでいない。反強磁性相(AF2)と超伝導が関係しているのであれば、反強磁性相(AF2)を圧力で抑制した場合に新しい超伝導相が出現するのではないかという事が期待されることから、反強磁性相(AF2)の圧力効果を調べるために高圧下での電気抵抗測定を行った。 $R\text{FeAsO}_{1-x}\text{H}_x$ ($R=\text{La, Sm}$)の場合、 T_c ドームの高ドープ側現れる反強磁性相(AF2)に圧力を加えると、反強磁性が抑制されるが、超伝導は今のところ観測されていない。また、より高圧下での性質を調べるために、 R 元素をさらにイオン半径の小さい Tb に置き換え、圧力下の性質を調べた。 $\text{TbFeAsO}_{1-x}\text{H}_x$ についても他の化合物と同様に高ドープ側に反強磁性相(AF2)が観測され、圧力を加えたところ、27 GPa, 3.5 K で圧力誘起超伝導と思われる電気抵抗の急減少が観測された。超伝導であることの確証を得るため、磁気抵抗、磁化の測定を高圧下で行う予定である。また、低温高圧下での結晶構造の決定も併せて計画している。

4. 鉄系超伝導体の圧力効果の理論的手法によるアプローチ

鉄系超伝導体は鉄とヒ素などのプニクトゲンによる四面体構造の層が超伝導層の舞台と考えられており、キャリアドープまたは加圧により転移温度が類似の変化を示し、四面体が正四面体構造になる条件下で転移温度が最高になることが実験的に確認されている。この超伝導と結晶構造の強い因果関係を電子論的な視点で調べるため、典型的な鉄系超伝導物質、1111型 LaFeAsO , 122型 BaFe_2As_2 について、加圧下での電子状態の変化を第一原理計算による研究を進めた。これらの超伝導層電子状態の圧力への応答は鉄と鉄、鉄とヒ素の結合状態を圧力下で詳細に調べることで行われる。そのため加圧下での鉄、ヒ素の電荷密度分布 (CHD) を計算し、等値面表示 (ISP) により CHD を可視化した。その結果、顕著な CHD の圧力依存性が電子面を形成する2個のバンドの電子状態において見いだされた。その特徴は電子構造の吟味により鉄の d 状態とヒ素の p 状態間の混成による鉄ヒ素共有結合に起因し、局在性を示す鉄の d 状態が鍵になることが判明した。他の鉄系超伝導体の物質系 (21113型、111型、11型) についても同じ視点で体系的に調べ、この研究との比較から圧力による超伝導発現の解明と鉄系超伝導発現の起源に迫りたい。

5. 鉄酸化物

平面四配位無限層構造 (2次元構造) をもつ鉄酸化物 $\text{Sr}(\text{Fe}_{0.8}\text{M}_{0.2})\text{O}_2$ ($M=\text{Mn, Co}$) と酸水素化物 SrVO_2H の圧力印加に伴う磁氣的・電氣的な転移の研究を行った。鉄酸化物 $\text{Sr}(\text{Fe}_{0.8}\text{M}_{0.2})\text{O}_2$ ($M=\text{Mn, Co}$) は、およそ 32 万気圧まで圧力を加え、Fe-Fe 間結合距離が 3.1 Å まで減少すると、どちらも高スピン ($S=2$)—中間スピン ($S=1$) 転移を起こすことを明らかにした。これは、スピン転移の説明に通常使われる結晶場によるものではなく、鉄原子同士の直接相互作用によるスピン転移であることをあらわしている。このスピン転移と同時に絶縁体—金属転移と反強磁性—強磁性転移が生じる。これは、スピン転移が起こることでより電気伝導性を向上させる働きのある軌道に電子が移動することで、局在的な状態で安定する超交換相互作用から遍歴的な状態で安定する二重交換相互作用に電氣的・磁氣的性質が変化したことを示している。一方、酸水素化物 SrVO_2H の研究では、二つのことを明らかにした。一つ目は、負の電荷をもつ水素 (ヒドリド) H が極めて圧縮されやすい性質であることを見つけ、かたい酸化物に柔らかさを取り入れた分子設計への応用が可能であることを明らかにした。二つ目は、ヒドリドと遷移金属の対称性の違いから、金属間相互作用を切断し、ヒドリドが世界一薄い「金属原子セパレーター」となり、体積ロスなく、原子レベルで電子状態の次元性を制御できることを明らかにした。

6. チタン酸化物

還元による酸素欠陥を有するマグネリ相のような還元型酸化物は、高い電子伝導性や金属絶縁体転移 (MI

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

実施研究所：文理学部自然科学研究所

氏名：高橋 博樹

研究結果（つづき）

転移) など特異な機能性を有しており、基本的な性質に加え、電極材料や光学素子などへの応用的視点からも興味を持たれている。またこの系における MI 転移は、光励起でも誘起されることが知られており、相転移過程を観測することを通じて、相転移メカニズムの解明に向けた研究がなされている。本研究では、約 150 K で MI 転移を示す Ti_4O_7 および関連物質について調べた。最初に、合成条件の最適化を行い、良質の結晶を得た。これらの結晶を用いて、MI 転移の素過程について時間分解分光を始めとする各種の計測を行うとともに、高圧下での電気抵抗測定を行った。MI 転移は高圧下で大きく抑制され 4 GPa 以上の圧力下ではほぼ金属的な振る舞いを示す。MI 転移が圧力下で消失する現象は 2003 年に報告されていたが、より高い圧力下の性質については詳しく調べられていなかった。本研究では約 20 GPa までの圧力で調べたところ、電気抵抗の電流依存性が見られた。現在、その機構について調べている。また、関連物質である Ti_3O_5 は 150 K 付近で構造相転移とともに MI 転移を示し、2.4 GPa までの圧力範囲で転移が抑制されるのが観測された。より高い圧力まで調べる予定である。

Ti 酸化物について、最近、 Ti_4O_7 , γ - Ti_3O_5 薄膜でそれぞれ 3.0 K, 7.1 K で超伝導を示すことが東工大友教授のグループによって報告された。本研究では、 Ti_4O_7 , Ti_3O_5 の単結晶試料について高圧下で電気伝導性を調べていたことから、薄膜試料の超伝導転移の圧力効果を調べるため、友教授のグループより薄膜試料の提供を受け、圧力効果の測定を行った。現在のところ、薄膜試料の T_c は圧力に対して減少傾向にある。単結晶との比較を行い、単結晶での超伝導発現の可能性について詳しく調べる予定である。

7. 薄膜

化学気相成長法を用いて Cu 箔に単層グラフェンを成長させた。Cu 箔を溶解してグラフェンを取り出す際、 $Fe(NO_3)_3$ 水溶液(濃度 0.06、0.12mol/L)、もしくは $CaCl_2$ 水溶液(濃度 0.12mol/L)を用いた。溶解すると同時に、グラフェンに Fe もしくは Ca を付着させた。金属の付着していないグラフェンを別途作成し、Fe (or Ca) が付着しているグラフェンに貼り合わせることで、金属をインターカレートした 2 層グラフェンを作製した。同様な手法で、純水でリンスすることによって金属イオンを洗い流し、金属の付着していない 2 層グラフェンも作製した。その場合、ラマン散乱において、 2691cm^{-1} に 2D ピークを持ち、4 つのピークに分離できる典型的な 2 層グラフェンと同等な結果を得た。金属をインターカレートした場合、2D ピークは、 $2691\pm 3\text{cm}^{-1}$ に現れたが、3 つのピークで分離できた。インターカレートした金属との相互作用や格子の乱れが原因と考えている。インターカレートしていない 2 層グラフェンは、室温に置いて $690\Omega/\text{sq}$ のシート抵抗を示し、温度低下と共に、徐々に上昇した。 $Fe(NO_3)_3$ 水溶液(濃度 0.06、0.12mol/L)を用いて、金属を挟み込んだ場合、それぞれ室温で $500\text{k}\Omega/\text{sq}$ 、 $1.30\text{k}\Omega/\text{sq}$ のシート抵抗を示した。温度変化に対する挙動は、半導体的、合金的であった。 $CaCl_2$ 水溶液を用いた場合、室温で $6.43\text{k}\Omega/\text{sq}$ で合金的な温度変化を示した。

文献に報告されているような超伝導現象が発現しなかった原因は、大きく分けて 2 つあると考えている。

i) 作製したグラフェンが単結晶単層グラフェンでないこと、ii) インターカレートした金属原子が均一に分布していないことである。我々が作製したグラフェンは Cu 箔のグレインに依存し、結晶軸が異なった小さな単結晶単層グラフェンが集まった多結晶単層グラフェンであると予想している。伝導キャリアがグレイン間を横断する時、散乱の原因となっていると予想している。インターカレートした金属原子が均一に分布していないと、キャリアが感じるポテンシャルが周期的では無くなり、同様に散乱原因になると考えている。今回、Ca をインターカレートした 2 層グラフェンについて、層間距離を変化させ、層間の電荷移動を誘起する目的で、膜に垂直方向に圧力を加え、電気抵抗測定を行った。加圧にはダイヤモンドアンビルを用い、薄膜の破壊を避けるためにアンビル面と薄膜の間に NaCl 層を挿入して加圧を行った。3 GPa まで電気抵抗は半導体的で、マイクロクラックと思われるノイズも多く見られ、これはインターカレートした元素の不均一性によると思われる。また、50 K 以下で求めた活性化エネルギーは圧力に対して増加する傾向にあった。加圧方法については、まだ検討の必要性があり、異なる薄膜に対して測定を試行しながら確立していく予定である。

一方、誘電体単結晶基板 $SrTiO_3$ (STO)(001) 上 160K 付近に強磁性キュリー温度を持つ $SrRuO_3$ (SRO) 薄膜を作製した。STO 基板表面にステップ-テラス構造を出現させるために、純水および BHF を用いて SrO 層

注：必要に応じて、このページをご使用ください

実施研究所：文理学部自然科学研究所

氏名：高橋 博樹

研究結果（つづき）

をエッチングし、アニール処理を施した。SRO 薄膜は、パルスレーザー堆積法を用いて作製した。ヒータ温度 730°C、酸素 10Pa、KrF エキシマレーザーを用い、ターゲット表面での照射エネルギー密度は、1.7J/cm²とした。膜厚は約 4nm である。SRO 薄膜はステップフロー成長し、ステップ・テラス構造が明瞭に確認できた。

課題番号	総17-005
	継続
	総16-006

平成29年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 30 年 5 月 1 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 _____ 村井 秀樹



所属・資格 _____ 商学部・教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 _____ 商学部 会計学研究所

1 研究課題 地方創生のための自然資本の価値化 ～北海道下川町と企業連携による制度設計モデル～		
2 研究組織		
氏 名	所属部科枝・資格	役割分担
○研究代表者名 村井 秀樹	商学部教授	全体の総括・自然資本会計
○研究分担者 田村八十一 吉田武史 丸山 温 吉岡 拓如 合計 5名	商学部教授 商学部准教授 生物資源科学部教授 生物資源科学部准教授	地方自治体の財務分析 地方自治体の財政、公会計 持続的林業開発 森林吸収源と炭素会計
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 ・否 いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：会計学研究所

氏名：村井 秀樹

4 研究目的

今日、企業会計のディスクロージャーにおいて、従来の財務情報に加え、非財務情報である環境、社会、ガバナンスを含めた統合報告書が出されるようになった。自然資本（水、空気、土地等）はこれまでその根源的な価値を認識されずに、生産手段として利用されてきた。しかし、温室効果ガスによる地球温暖化の影響から生じる自然災害が、企業のみならず国家に甚大な被害を及ぼしてきている。自然資本や生物多様性を、企業、地方自治体、国が適切に管理し持続的に利用するためには、自然資本の価値を適切に認識、測定、開示していかなければならないのである。

一方、地方創生が喫緊の課題の中で、持続可能な地域社会を形成するためには、地域の最大の資源である自然資本を価値化し、地方創生の柱とする必要がある。そこで、企業と地方の連携ツールとして自然資本を中核に位置づけ、制度設計を図る。そのためには、まずエネルギーの地産地消型のコミュニティーを形成しなければならない。ここでは、下川町の森林資源を活かしたバイオマス発電事業に注目する。下川町は、全国11箇所しかない「環境未来都市」に認定されている。下川町で実験的に導入されている自然資本金や炭素会計をより精緻化し、日本の一つのモデルとして、全国に普及・展開することを研究目的とする。この研究には、日大の教員（商学部、生物資源学部、法科大学院所属）が連携して、現場のNPO、企業の産官学協力によって推進するものである。本研究の最終目標は、下川町に持続的な森林管理が行き届く「日大の森」をつくることである。本学の当該研究が一つのモデルとなって、わが国の地域創生に大いに貢献できると確信している。

5 研究概要

① 自然資本の取組と展望

日本における農山村は、豊富な地域資源を供給する中で発展し、資源の枯渇ともに衰退してきた。農山村の衰退は、国家の根本にかかわる問題であり、将来にわたって活力ある日本を維持していくためにも、地方創生は喫緊の課題である。そこで、環境自治体として、全国的に先進・先駆的な「環境未来都市下川町」をフィールドとして、農山村に蓄積されている地域資源である「自然資本」に着目し、地方創生の柱の一つとして、その価値化を創造するため、まず、自然資本価値化の制度設計を行う。一方、企業においてはサプライチェーン化での自然資本へのダメージの数値化、数量化、いわゆる「見える化」が行われ、環境先進企業などでは統合報告書での明示化が進んできている。そこで、企業における自然資本への取組みについて、経緯、必要性、今後の展望などについて調査、分析する。これらをもとに、自然資本の活用方法と企業との連携方法について検証する。

② 自然資本の活用方法；町外企業との連携検討

下川町における自然資本を適切に管理し、地域経済の活性化、さらに地域における雇用の場の創出などを図る。そして、企業会計との連動で、企業の自然資本使用に相当する資金提供を受けて（“自然資本価値化オフセット”）、この資金を再び「自然資本」の醸成に循環させて、自然資本を醸成していくシステム構築が極めて重要である。下川町の自然資本評価の結果を町外企業と連携する方法について、企業と下川町の連携方法の可能性がある。また、実施可能な方法について、既に制度化されている町独自の「森林（もり）づくり寄付」制度と企業の環境会計の連携が考えられる。そして、企業のプロジェクト参加を得て、自然資本価値化モデルを設計し、実証への可能性を検証する。

実施研究所：会計学研究所

氏名：村井 秀樹

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

I. 本研究の学術的な特色・独創的な点及び結果と意義

①人口減の防止策

日本は、2008年をピークとして人口減少時代へ突入し、今後一貫して人口が減少し続けると推計されている。地域によって状況が異なり、地方では深刻な人口減少に直面している市町村が多い。下川町での自然資本会計の導入とその精緻化ならびに自然資本の持続的な管理は、地域経済の活性化、さらには地域における雇用の場の創出などを図ることができよう。このように、「自然資本」を核として、「資金」を循環させて、さらに自然資本を醸成していくシステム構築ができれば、人口減の課題解決の一助となる。ひいては国家基盤の再構築に資するのである。

②目指すべき「日本の将来方向」を示す

将来にわたって活力ある日本社会を維持することが基本であり、国民の地方移住や結婚・出産・子育てといった希望を実現する。取組むべき「政策目標」は、人口減少克服・地方創生に正面から取り組むとともに、地域の特性に即した対応や制度全般の見直しを進めていく必要がある。すなわち、地域の特性に即した地域課題の解決を、地方が自律的に解決することが可能となる。地域住民の参加も得る形で、地方の発意と自主的な取組を基本とし、国がそれを様々な面で支援していく。この研究は、企業と地方自治体を結ぶものであり、産学官の連携の強みが遺憾なく発揮される。自然資本価値化モデルが地方創生の柱の一つとなる。

③研究の学術的背景（本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ）

国連は、生物多様性の経済的価値の定量化を目指し、2008年に「生態系と生物多様性の経済学(The Economics of Ecosystem and Biodiversity, TEEBと略す)」を発表した。これは、経済学的手法で、自然の恩恵(生態系サービス)を評価し、自然の価値を認識し、ステークホルダーに「可視化」しようとするものである。しかし、この手法は多種多様であり、現在、自然資本連合(Natural Capital Coalition)が、Natural Capital Protocolが、自然資本の評価・管理手法の国際的な統一フレームワークを構築している。

しかし、本研究のように、自然資本会計を基軸に、人々が安心して生活を営み、子供を産み育てられる社会環境を作り出すことによって、活力にあふれた地方の創生を目指すという総合的な研究は皆無である。地方において、自然資本を活用した「仕事」が「人」を呼び、「人」が「仕事」を呼び込む「好循環」を確立することで、地方への新たな人の流れを生み出すとともに、その「好循環」を支える「町」に活力を取り戻すことが可能になる。本研究は、この一助となる。

II. 平成28年度～29年度の研究内容と得られた知見

①「自然資本会計」の定義内容とそれらの評価・検証システムを構築するための問題点を、環境法、公会計、CSR論、環境会計、公企業論の諸側面などから、各研究者は先行研究をサーベイした。

②研究担当者による「日本大学商学部学術研究会」を設置した。

・第1回研究会6月20日(月)日大本部で研究関係者6名出席開催

自然資本の定義内容・評価・検証システム構築の問題点について、各研究者を「社会科学系班」「自然科学系班」に分けて研究を進めることとした。

自然資本の価値化を共有する中で、自然資本が学術研究フィールドとして極めて有益であることから、「日本大学の森(仮称)」の設置を今後検討することとした。

実施研究所名：会計学研究所

氏名：村井 秀樹

研究結果（つづき）

- ・第2回研究会8月6日（土）北海道下川町で研究関係者6名出席開催

自然資本の価値化を図っていくにあたり、その実証として第1回研究会の議論で出された「日大の森（仮称）」の在り方について提起され、議論を深めた。その議論の中で、様々な意見がだされた。具体的には、自然資本を適切に評価し、自然資本（フロー）を醸成していくことを踏まえ、それをもとに生態系サービス（フロー）を企業等との連携を通じて如何に価値化していくか、グローバルな視点で社会状況、企業環境なども踏まえながら考える必要がある。一案として、ストックをもとにフロー活用の取組として、「森林内への馬飼育によるメンタルヘルス対策」を検討することとした。

- ・第3回研究会9月24日（土）日大本部で研究関係者4名出席開催

適切に価値評価されていない「自然資本」を見つけ出し、それを数量的・金銭的に「価値化」する。企業会計との連動を図り、企業から自然資本使用に相当する資金提供を受け、この資金を再び「自然資本」の醸成に循環させて、自然資本を醸成していくシステム構築を検討していくこととした。

- ・第4回研究会平成29年1月27日（金）北海道下川町で研究関係者5名出席開催

自然資本を醸成していくシステム構築の実証として自然資本（森林・馬）のメンタルヘルスケアを実践して一つの可能性を検証することとする。

（ヒアリング調査）

研究協力者等2名が、6月20日（月）に国連環境計画金融イニシアティブ特別顧問末吉竹二郎氏、トヨタ自動車株式会社環境部藤井英夫氏、環境省森本官房長から自然資本についてヒアリングを行った。

自然資本（持続可能な開発目標SDGs）の新しい計測モデルは、プログラム自体を他へ提供でき、国際的にも求められていることから、下川でつくる必要性について共有した。研究関係者4名等が、11月14日（月）に国連環境計画金融イニシアティブ特別顧問末吉竹二郎氏と三井住友信託銀行CSR部長金井司氏からヒアリングを行った。今のGDPでは図れない本当は価値があるものをもう一度自然資本に光を当てて見直す。見失った価値を価値としてみる。そういう時代の扉を開けるという役割があることなどについて共有した。

Ⅲ. 下川町の自然資本の価値評価モデルの提案

① 森林内でのホースセラピー

自然資本と生態系サービスは、ストックとフローの関係である。自然資本（ストック）を適切に評価し、その自然資本を利活用（フロー）して自然資本の価値化を図り、さらに価値化された自然資本を利活用し、さらなる価値化を図りながら、持続可能な地域社会を創造していくことが自然資本活用による地方創生モデルとなりえると考え。自然資本の利活用に当たっては、社会ニーズに対応するとともに社会の課題に的確に対処できるプログラムを提案する必要がある。そこで、自然資本の価値化モデルとして、森林をフィールドとして馬を活用した生態系サービスのプロジェクトを提案する。

②背景

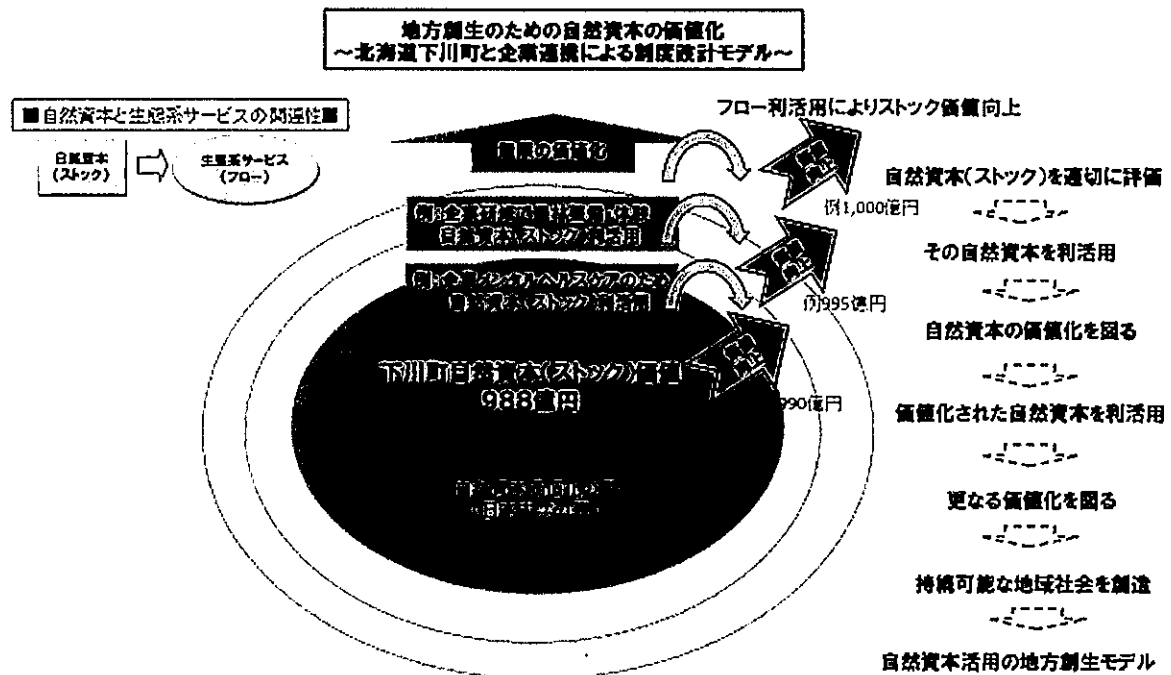
その背景は、労働安全衛生法が改正（平成27年12月1日施行）され、常時使用する労働者に対して、医師、保健師等による心理的な負担の程度を把握するための検査（ストレスチェック）を実施することが事業者の義務となった。（労働者数50人未満の事業場は当分の間努力義務）検査結果は、検査を実施した医師、保健師等から直接本人に通知され、本人の同意なく事業者には提供することは禁止される。

研究結果（つづき）

検査の結果、一定の要件に該当する労働者から申出があった場合、医師による面接指導を実施することが事業者の義務となる。また、申出を理由とする不利益な取扱いは禁止されている。面接指導の結果に基づき、医師の意見を聴き、必要に応じ就業上の措置を講じることが事業者の義務となっている。

IV. 地方創生のための自然資本の価値化イメージ

下川町の自然資本（ストック）の価値は988億円である。この自然資本を基盤として、先のとおり生態系サービス（フロー）プログラムを提供することによって、さらにストック価値が向上する。その過程で人・モノ・カネが動き、人・モノ・カネが相乗効果をもたらし、地域の活性化が図られる。一つのプログラムが起きることによって、さらにストックを活用した様々なプログラムが起きる要因となる。そして、地域は様々な角度から地域の活性化が図られ地方創生が推進されていく。



研究結果 (つづき)

V. 環境未来からNの時代

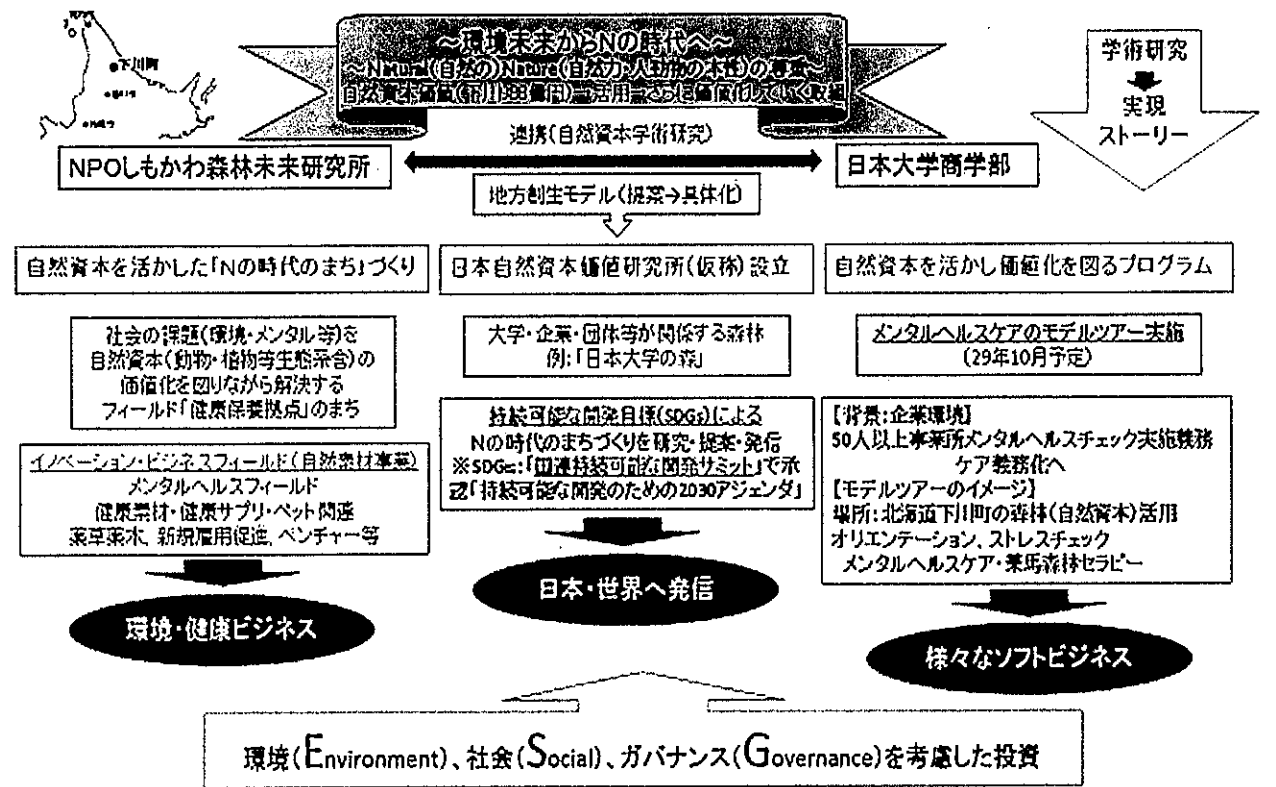
地方創生のための自然資本の価値化モデルの研究を踏まえ、下川町における環境未来からNの時代への提案をしたい。Nは、ナチュラルのN、日本大学のN、NPOのNでもある。日本大学の「N. 自主創造」は、山あり谷ありだが進んで行け、ドットは原点を忘れるな、であると聞き及んでいるが、地方創生を進めるに当たっての心構えを示唆していると思う。

提案の一つ目は、自然資本を活かした「Nの時代のまち」づくりである。社会における環境、メンタル等の課題を動物、植物等の生態系を含む自然資本の価値化を図りながら解決し、健康保養地を整備していく。健康保養地の整備を進めるとともに、地域の素材を活かし、環境・健康関連のビジネスを創造していく。近年のペットブームを視野にペット関連等の商品開発は、地域に新たな産業を創造し、人材の誘致を含め地方創生を総合的に推進するものであり、Nの時代のまちづくりの基盤となる。

二つ目は、下川町のこれまでの先駆的、先進的な取組みを踏まえ、そして自然資本に関する研究が地方創生からも極めて重要であることから、全国に発信できる日本自然資本価値研究所（仮称）の設置である。NPO法人しもかわ森林未来研究所内に事務局を設置し、下川町との関わりのある数多くの著名な方々や団体の支援、協力を得ながら運営を行っていく。その中で研究や交流、体験フィールドとして「日本大学の森（仮称）」を位置づけることができる。

「日本大学の森（仮称）」は、学術研究や学生研修の場、関係者のメンタルヘルス等様々な活用が期待できる。今後、設置及び利活用について研究を行って行く必要がある。

三つ目は、自然資本を活かし価値化を図る様々な生態系サービスのプログラムを実証していくことである。イメージは次のとおりである。




課題番号	総 17-008 継続 総 16-009
------	----------------------------

平成29年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成30年4月6日

日本大学学長 殿

氏 名 仁科 淳良 

所属・資格 理工学部・教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 理工学部 理工学研究所

1 研究課題				
創薬リード化合物探索を目的とするミャンマー伝統医薬成分探索と治療効果の科学的解明				
2 研究組織				
氏 名	所属部科校・資格		役割分担	
○研究代表者名 仁科 淳良	理工学部／教授		計画の立案と研究の統括、伝統医薬中の活性成分の探索	
○研究分担者 鈴木 孝	薬学部／教授		化合物の生理活性の検索	
早川 智	医学部／教授		伝統医薬と西洋医薬の差異の数値化	
内山 武人	薬学部／教授		単離化合物の化学構造の解明	
深津 誠	短期大学部／教授		天然物からの有効成分の抽出と化合物の構造決定	
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況				
氏 名	申請年度	研究種目	研究課題	採・否
仁科 淳良	平成30～32年度	基盤研究(C)	ミャンマー伝統医薬中の抗糖尿病・抗肥満物質の探索	否

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 否 いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：理工学部 理工学研究所

氏名： 仁科 淳良

4 研究目的

本研究は、これまで殆ど研究対象とされてこなかったミャンマー伝統医薬の有効成分探索と薬理効果の科学的な解明を通して、創薬のリード化合物を見出すとともに西洋医薬とミャンマー伝統医薬の薬効の差異を明らかにする。

最近になって経済的発展が著しいミャンマーでは、西洋医薬が比較的安価に入手できる環境にありながら、西洋医薬病院と伝統医薬病院が対等に存在しており、先進国に比較して伝統医薬が国民に浸透している。伝統医薬病院の医師は、例外なくミャンマー伝統医薬には絶大な効果があると述べているが、その科学的な検証は殆どなされておらず、経験則のみで有効成分が不明の伝統医薬が多数使用されている。本研究では、ミャンマーのパセイン大学に日本大学の教員を派遣し、研究法を現地研究者に指導することにより、共同研究体制を確立する。次に日本大学とパセイン大学が共同でミャンマー伝統医薬の有効成分と相乗物質、拮抗成分等を単離し、化学構造を同定する。さらに、保健省医学研究所の統括により現地医師の協力のもとに、パセイン伝統医薬病院またはパセイン総合病院（西洋医薬病院）で治療を受ける同一疾患患者の臨床的背景と、治療効果、生存曲線やQOL改善効果を含む長期予後ならびに臨床検査結果を比較し、ミャンマー伝統医薬と西洋医薬の効果の違いを明らかにする。現時点で分析的研究が未着手のミャンマー伝統医薬の有効成分の化学構造を明らかにし、有効成分の薬効を明らかにすることにより、創薬のシードとなる新しい化合物を見出す可能性が高く、両国にとっても大きなメリットとなると期待できる。さらに、本研究では、西洋医薬病院または伝統医薬病院に通院する、がん、糖尿病、肥満、抗炎症、高血圧、動脈硬化患者の臨床経過ならびに疾病マーカー、副作用頻度を比較することにより、ミャンマー伝統医薬の長所を明らかにする。

5 研究概要

①ミャンマー伝統医薬の調達

先ず、共同研究先のパセイン大学と共同研究体制を確立する。先方の担当者と、研究遂行能力を確認する。次に、ミャンマー伝統医薬 57 種をパセイン大学から調達する。

②ミャンマー伝統医薬の成分探索

57 種のミャンマー伝統医薬のメタノール抽出物を各種クロマトグラフィーで精製し、含有化合物の純品を得る。得られた化合物を質量分析計、核磁気共鳴測定装置（NMR）等で解析するとともに、薬理活性を測定し、最終的に、有効成分の化学構造と含有量を明らかにする。さらに、有害な不純物の特定を試みる。成分探索は、日本大学だけでなく、パセイン大学でも実施する。

現在 57 種のミャンマー伝統医薬基本配合が存在する（有効成分は不明）。日本大学理工学部とパセイン大学が共同で、57 種のミャンマー伝統医薬に存在する化合物を探索し、有効成分を特定する。

具体的には、57 種のミャンマー伝統医薬のうち、汎用されるもの 20 種程度をミャンマー政府の許可を得て、日本に輸入する。輸入した伝統薬成分をメタノールで抽出した後、濾過、乾燥を行い、メタノール抽出物を得る。メタノール抽出物から、所定の方法でヘキサン画分、水メタノール画分、ブタノール画分に細分化する。各画分の生理活性を測定し、最も活性が高い画分をクロマトグラフィーで精製し、含有成分（粗精製物）を分取する。粗生成物の生理活性を測定し、活性を示したものを HPLC で精製し、単離化合物を得る。単離化合物の生理活性を測定し、活性を示した化合物（有効成分）の機器分析データ（NMR、MS、IR 等）から、有効成分の化学構造を同定する。有効成分の生理活性の新規性を調査し、必要に応じて国際特許出願する。有効成分の生理活性測定には、培養細胞株と器官培養を用い、抗酸化物質、免疫調節物質、抗がん物質、抗糖尿病物質、抗肥満物質、抗炎症物質、抗高血圧物質、抗動脈硬化物質を特定する。

③ミャンマー伝統医薬の効果の数値化

保健省医薬研究所が統括し、現地医療機関倫理委員会と患者本人の同意を得てパセイン総合病院（西洋医薬）とパセイン伝統医薬病院のがん、糖尿病、肥満、抗炎症、高血圧、動脈硬化患者の臨床経過と疾病マーカーを臨床検査で比較することにより、西洋医薬と伝統医薬の作用の差異を把握し、ミャンマー伝統医薬の効果の科学的に解明する。

実施研究所：理工学部 理工学研究所

氏名：仁科 淳良

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

①ミャンマー伝統医薬の成分探索

1) 原料生薬の入手

本年度はミャンマー最大の生薬企業である FAME 社から *Cissus repens* Lam. 中の抗ガン成分の探索を依頼されたので、学生1名を本研究に振り向けた。また、FAME 社から新たに成分探索を行うべき生薬として、表1に記載した生薬に関して提案を受けた。

表1 研究対象候補生薬

Botanical name	Reported number (PubMed)
<i>Cissus repens</i>	3
<i>Cissus discolor</i>	1
<i>Silybum marianum</i>	1127
<i>Sciptis alba</i>	85
<i>Picrothiza kurroo</i>	148
<i>Embilca officinalis</i>	577
<i>Momordica charantia</i>	815
<i>D. discolor</i>	15
<i>A. indica</i>	21
<i>A. indica</i>	23
<i>Paras foetida</i>	448
<i>Acacia catchu</i>	2865
<i>Simoes javanica</i>	152
<i>Echinacea purpurea</i>	1152
<i>Piper betle</i>	268
<i>So. indicum</i>	41
<i>Zynura procumbens</i>	37
<i>Phyllanthus niruri</i>	189
<i>Schisandra Chinensis</i>	983
<i>Arisema vulgaris</i>	3791
<i>Andrographis paniculata</i>	722
<i>Mimosa pudica</i>	212
<i>Withania somnifera</i>	985
<i>Stephalia officinalis</i>	2282
<i>Morinda citrifolia</i>	640
<i>Pueraria mirifica</i>	88
<i>Asaradicta indica</i>	1233
<i>Aconis calamus</i>	480
<i>Alpinia galanga</i>	728
<i>Desmodium stramonium</i>	3
<i>Astragalus membranaceus</i>	1002
<i>Mucuna pruriens</i>	242
<i>Mesaspis major</i>	316
<i>Moringa oleifera</i>	779
<i>Anardo donar</i>	184
<i>Terminalia arjuna</i>	1241
<i>Anguica sinensis</i>	780
<i>Salix alba</i>	1659
<i>Sp. indica</i>	1
<i>Serenoa repens</i>	379
<i>Tinospora cordifolia</i>	336
<i>Alysicarpus v. indica</i>	5
<i>Peperomia indica</i>	25
<i>Alysicarpus indica</i>	17

こちらでそれぞれの生薬の先行研究を調査した結果、黄色に色づけした生薬は先行研究が少ないので、次年度研究対象とし、抽出原料を FAME 社から調達するべく手配中である。

2) 生薬中の生理活性物質探索

i) *Cissus repens* Lam. 中の抗腫瘍成分の探索

300g の *C. repens* を 1500ml のヘキサンに一晚浸漬後に濾過と乾燥を行い、ヘキサン抽出物 1.35g を得た。残渣に 1500ml の酢酸エチルを加えてヘキサン抽出と同様に酢酸エチル抽出物 5.19g を得た。同様にメタノール抽出物 25.1g を調製した。中圧クロマトグラフィーでメタノール抽出物を精製し、2 化合物を単離した。MS、NMR、単結晶 X 線構造解析等で 2 化合物を Bergenin、Resveratrol と同定した。

ii) *Cinnamomum tamala* Nees. 葉部メタノール画分の成分探索および生理活性評価

ミャンマーのパセイン大学より入手した *C. tamala* 葉部 (100g) を用いた。初めに、*C. tamala* 葉部のヘキサン画分、酢酸エチル画分、メタノール画分を薄層クロマトグラフィー (TLC) で分析し、最適分画条件を検討した。中圧クロマトグラフィーでメタノール抽出物を精製し、1 化合物を単離した。MS、NMR、単結晶 X 線構造解析等で当該化合物を Kaempferitrin と同定した。Kaempferitrin の抗ガン性を測定したが活性は認められなかった。

iii) *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers 茎部酢酸エチル画分の成分探索
T. cordifolia 茎部の酢酸エチル画分に着目し、含有成分の精製を行った。薄層クロマトグラフィーより、*T. cordifolia* 酢酸エチル画分の最適分画条件の検討を行った。中圧クロマトグラフィーで酢酸エチル画分を精製し、1 化合物を単離した。MS、NMR、単結晶 X 線構造解析等で当該化合物を Vanillin と同定した。

iv) *Andrographis paniculata* 茎部の成分探索および生理活性評価
A. paniculata 茎部メタノール抽出物(14.97g)をヘキサン、酢酸エチル、メタノールを用いて分画した。メタノール画分と酢酸エチル画分を研究対象とし、中圧クロマトグラフィーで精製し、3 化合物を単離した。MS、NMR、単結晶 X 線構造解析等で単離化合物を Swertiamarin、Swertianin、Oleanolic acid と同定した。3 化合物のうち Swertiamarin にはメラニン産生抑制作用 (美白作用) が認められた。

v) *Pterocarpus santalinus* L. 木部メタノール画分の成分探索
P. santalinus 木部 (600g) を粉碎し、500ml のヘキサン、酢酸エチル、メタノールにそれぞれ浸漬した。ヘキサン画分、酢酸エチル画分、メタノール画分のうち、本研究ではメタノール画分 (43g) を用いた。中圧クロマトグラフィーで精製し、2 化合物を単離した。MS、NMR、単結晶 X 線構造解析等で 1 化合物を Pterostilbene と同定した。もう一つの単離化合物に関しては化学構造の同定を進めている。Pterostilbene には腫瘍細胞傷害活性とメラニン産生抑制作用 (美白作用) が認められた。

実施研究所名：理工学部 理工学研究所

氏名： 仁科 淳良

研究結果 (つづき)

vi) *Vitex trifolia* L. 葉部 メタノール抽出物の成分探索

V. trifolia 葉部メタノール抽出物(100.1g)をヘキサン、酢酸エチル、メタノールを用いて分画し、酢酸エチル画分(34.58g)を研究対象とし、含有成分を中圧カラムクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製した。結果、TLC分析で単一スポットを示す7化合物(単離化合物1~7)を得た。MS、NMR、単結晶X線構造解析等で7化合物のうちの3化合物をそれぞれHinokinin、Methylcubebin、5-(((3R,4R,5S)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)-tetrahydro-5-methoxyfuran-3-yl)methyl)benzo[d][1,3]dioxole(新規物質)と同定した。3化合物のうちMethylcubebinには抗糖尿病作用が認められた。

vi) *Piper longum* L. 茎部酢酸エチル画分の成分探索

P. longum 茎部(100.1g)をヘキサン画分(19.9g)、酢酸エチル画分(23.3g)、メタノール画分(44.8g)に分画し、薄層クロマトグラフィーで明確なスポットが確認できた酢酸エチル画分を研究対象とした。中圧カラムクロマトグラフィーを用いて、固定相シリカゲル、移動相ヘキサン：酢酸エチルまたは固定相ODS、移動相メタノール：水で分画し、化合物1~3を得た。EI-MSの分析結果から化合物1~3の分子量はそれぞれ324、308、324であることが分かった。それぞれの1次元NMRスペクトルと単結晶X線構造解析の結果により、化合物1は(+)-Licarin、化合物2はE)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-methyl-5-(prop-1-en-1-yl)benzofuran-7-ol(新規化合物)、化合物3はeupomatenoid 7であると判断した。またMTT試験により生理活性評価を行った結果、化合物1はがん細胞に対する活性が認められなかった。化合物2は肺がん、乳がん、胃がん、化合物3は肺がん、乳がん、胃がん、白血病に対する傷害作用が認められた。また化合物2、3にはメラニン産生抑制作用が認められた。

○研究業績 (投稿中を含む)

Induction of Neuronal Differentiation by Extracts from 57 Kinds of Traditional Medicinal Plants in Myanmar, Atsuyoshi Nishina, Kei Yoshii, Makoto Fukatsu, Yasunori Kushi, Yuusuke Suzuki, Motohiko Ukiya, *Journal of Research Institute of Science and Technology, College of Science and Technology, Nihon University*, 139, (2017) 1-11.

Purification of Pyridylaminated Oligosaccharides Using 1,2-Dichloroethane Extraction. Suzuki Y, Okano A, Kabayama K, Nishina A, Tanigawa M, Nishimura K, Kushi Y. *Anal Sci*. 2016;32(5):487-90. doi: 10.2116/analsci.32.487.

Poly I:C induces collective migration of HaCaT keratinocytes via IL-8. Takada K, Komine-Aizawa S, Hirohata N, Trinh QD, Nishina A, Kimura H, Hayakawa S. *BMC Immunol*. 2017 Apr 24;18(1):19. doi: 10.1186/s12865-017-0202-3.

The Rosiglitazone-Like Effects of Vitexilactone, a Constituent from *Vitex trifolia* L. in 3T3-L1 Preadipocytes. Nishina A, Itagaki M, Sato D, Kimura H, Hirai Y, Phay N, Makishima M. *Molecules*. 2017 Nov 22;22(11). pii: E2030. doi: 10.3390/molecules22112030.

②国際貢献

上述のFAME社と日本財団の依頼によりミャンマーの東部のパーンにある生薬原料センターの分析能力向上に寄与することとした。生薬原料センターにはこれまで使用されていなかった高速液体クロマトグラフィーがあったが、共同研究に当該装置を使用するためには修理と校正の必要があった。平成29年に研究代表者が当該生薬原料センターに行き、高速液体クロマトグラフィーの修理とセットアップを行った。実際に先方が商品化しているウコンの主成分であるクルクミンの分析を修理した高速液体クロマトグラフィーで行った。

平成29年度はFAME社に複数回出向き、お互いの生薬に関する情報交換を行った。たとえば、紫外線をさえぎるために *limonia acidissima*、*Santalum spicatum*、*Santalum album*、*Premna integrifolia*、*Pterocarpus santalinus*、*Mansonia gagei*、*Aquilaria agallocha* が、抗がん用途に *Cissus repens* & *Cissus discolor* (Rhizome)、*Curcuma caesia* (Rhizome)、*Curcuma longa* (Rhizome)、*Valeriana wallichii* (Rhizome)、*Annona squamosa* (fruit)、*Carica papaya* (leaf)、*Kaempferia paviflora* (Rhizome)、*Zingiber cassumunar* (Rhizome)、*Melastoma malabathricum* (Aerial parts)、*Albizia lebbek* (Bark)が利用されていることが分かった。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

課題番号	総 17-009
------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成29年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成30年4月12日

日本大学学長 殿

氏 名 高瀬 浩一



所属・資格 理工学部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 理工学部 理工学研究所

1 研究課題		
金属ナノ材料／半導体複合系に基づく太陽光エネルギーの安定供給技術の開発		
2 研究組織		
氏 名	所属部科枝・資格	役割分担
○研究代表者名 高瀬浩一	理工学部物理学科・教授	・金属ナノ粒子／酸化チタン複合系の構築と水素発生試験 ・光／熱／電気エネルギー変換素子の開発
○研究分担者 加藤隆二	工学部・教授	・金属ナノ粒子／酸化チタンの水素発生機構の解明（超短時間分光計測） ・金属ナノ粒子の液相合成
須川晃資	理工学部物質応用化学科・准教授	・金属ナノ粒子の液相合成 ・金属ナノ粒子／酸化チタン複合系の構築と水素発生試験
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
研究代表者：高瀬 浩一 科学研究費助成事業（基盤研究（C））（H30～H32）：330万円 採択 「光触媒/多波長吸収金属ナノワイヤーコアシェルアレイによる可視光利用高効率水素生成」		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (可) 否) いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：理工学部 理工学研究所

氏名：高瀬 浩一

4 研究目的

2015年度の政府のエネルギー計画では、現在2%程度の自然エネルギーの利用を2030年までに24%に引き上げるとある。この実現には、発電環境依存の強い自然エネルギーの有効な利用技術は勿論、エネルギーを安定に供給できるシステムの構築も要する。自然エネルギーには、地熱・太陽光・風力・潮力・水力が挙げられるが、特に無尽蔵かつスケールの大きい太陽光エネルギーを利用した発電は魅力的である。しかし、自然環境に強く依存する故、安定な電力供給が難しいという課題がある。本研究では、先進ナノ材料の合目的な複合設計により、学術的にも新規性の高い光電気化学現象を利用して、この課題の抜本的な解決を図る新たな太陽光エネルギー利用技術を創製する。

現在、太陽光エネルギーの社会・産業利用の根本は、光/電気エネルギー変換現象を基とする半導体太陽電池の利用が主流である一方、コスト面で課題が多く、安定供給のためには更に高価な蓄電デバイスを更に要する。一方、もう一つの有力候補技術として、半導体光触媒による水から水素エネルギーへの変換がある。光エネルギーを容易に貯蔵可能な次世代エネルギーである水素に変換することによって、安定なエネルギー供給が望める。しかし、水素発生に必要なプロトン (H^+) の還元には、 TiO_2 などの広バンドギャップ材料を必要とし、太陽光に僅か(6%)にしか含まれない紫外光でしか駆動できない。しかし最近、この半導体に金属ナノ粒子を複合化させることで、太陽光の約半分を占める可視光を照射することで水素が発生することが報告された。¹これは金属ナノ粒子に特有な局在型表面プラズモン共鳴 (Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR) の励起によって光触媒活性が可視光応答化した結果であり、この原理を積極的に活用すれば、理論的には可視～近赤外に渡る太陽光全波長によって水素発生が可能な光触媒を実現できる。具体的には、金ナノ粒子/ TiO_2 複合体が太陽光エネルギーを水素エネルギーに変換することができる。今回の試みでは、この複合体の作成を行い、その機能性を明らかにする。

5 研究概要

本研究では、無尽蔵な太陽光エネルギーを我々の消費社会で使用可能かつ蓄積可能なエネルギーに変換することを目指す。蓄積できるエネルギーの形態として、(1)水素エネルギー、(2)熱エネルギーが考えられる。平成29年度は、これらのエネルギーに変換できる「革新的ナノエネルギー変換材料」の創成を試みた。

1. 水素エネルギー変換材料

光触媒は、光エネルギーを利用して半導体から電子や正孔を取り出し、これを利用することで一種の化学反応を促進させる物質である。この機能を利用すると、水を分解して水素を生成することができる。しかしながら、光触媒物質は太陽光に僅かしか含まれない紫外線にしか反応しないことから、その変換効率は小さいままであった。そこで、本研究では、金ナノ粒子の特徴的な光吸収現象に注目し、金ナノ粒子で生成される大きなエネルギーをもった電子を光触媒物質に注入することで、強度の高い可視光を利用して水を高効率で分解できるような菌ナノ粒子/光触媒複合体の作成を行った。

2. 光熱変換材料

蓄積できるエネルギーのもう一つの形態として熱が挙げられる。本研究では、効率よく太陽光エネルギーを熱に変換できる物質合成にチャレンジした。太陽光を効率よく熱に変えるには、太陽光強度の最も高い400～500 nmの光を吸収する材料が適切であると考えられる。また、光熱変換は、材料の形にも強く依存することが知られているので、より光吸収が起こりやすい三角プリズム型の試料作成を目指した。

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

1. 光触媒による水分解を利用した水素生成

(1) 金ナノ粒子/TiO₂単結晶の作成

まず、はじめに、金ナノ粒子をTiO₂単結晶基板に配置したものを作成した。金ナノ粒子は、市販されているもので、凝集を防ぐ分散液中に入っており、直径は30 nmから40 nmである。この分散液を単結晶基板に滴下し、電気炉で溶媒を蒸発させて金ナノ粒子/TiO₂複合体を作成した。金は、ただ、滴下しただけなので、基板に対して十分な密着力があるかどうか分からない。今後、この複合体を水に浸した後、水より取り出し、走査型電子顕微鏡を用いて金ナノ粒子がそのまま留まっているかどうか確認をする予定である。また、ナノ粒子が留まっていたなら1 ccの水に複合体を浸し、これを太陽光シミュレータ下におくことで、水が分解されるかどうかを確認する。

(2) 金ナノ粒子/TiO₂ナノワイヤーの作成

金ナノ粒子/TiO₂ナノワイヤー複合体の作成ため、まず、核となる金ナノ粒子を作成した。MgO基板上に数10 nm程度の金薄膜を電子ビーム蒸着装置(MBE)で成膜し、この膜を加熱することで平均直径50 nm程度の半球状金ナノ粒子を得た。次のステップとして、この金ナノ粒子を分子線ビーム蒸着装置に入れ、基板を金ナノ粒子が溶ける程度の温度に保ち、チタンと酸素をガス状で供給することによりTiO₂ナノワイヤーの作成を試みた。酸素ガスの流量調整にはマスフローコントローラを用い、1分間に0.1 ccから5ccの酸素を供給し実験を行った。ガス量が0.1から1 cc程度では、ナノワイヤーの成長は見られなかった。2 ccの流量では、粒子状の形成は認められたが、ワイヤー状の形成には至らなかった。2 cc以上の流量では、MBE装置の真空レベルが10⁻² Paレベルになり、ターボ分子ポンプに過大な負担がかかる状況でMBEの運転限界に達してしまったので、本研究室の成膜装置では、これ以上の成膜は不可能であると判断される。

研究室の装置では、これ以上の成膜は不可能である。今後は、成膜方法をパルスレーザーデポジション(PLD)法(またの名をレーザー-MBE法)に変えて、酸素分圧が高い中で成膜を行う予定である。なお、我々の研究室にはこの装置はないので、他研究室の力を借りていきたい。

(3) 金ナノワイヤー/TiO₂コアシェル構造の作成

上述の実験結果を踏まえ、作成する構造体を酸化物ナノワイヤーを必要としない構造に変えてみることにした。具体的には、金ナノワイヤーをTiO₂で包んだコアシェル構造の作成を試みることにした。

まず、金ナノワイヤーの作成には、40 nm程度の規則配列したナノ細孔を有する陽極酸化ポーラスアルミナをナノテンプレートとして、このナノ細孔に電界メッキ法により金を埋め込み、金ナノワイヤーの作成を行った。陽極酸化ポーラスアルミナのナノ細孔の底部にはバリア層と呼ばれる絶縁体が存在しているので、これを除去しないと導電性が得られないため、メッキ法による金の埋め込みは出来ない。そこで、電圧降下法と呼ばれる方法により、陽極酸化のために印加する電圧を徐々に小さくしていき、バリア層に貫通功をあげる。その後、化学的方法により更にバリア層を削り取り、電界メッキができるようにする。この調整を行ったポーラスアルミナ基板に対して金メッキ液を用いて電界メッキ法により金をナノ細孔に埋め込んだ。電界メッキ法の最適条件を探すために、電極に印加した電圧と極板間に流れる電流の関係を調査し、より大きい電圧が流れる電圧にてナノワイヤーの作成を行ってみた。その結果、ポーラスアルミナのナノ細孔の底部にわずかな金の堆積を確認できたが、ワイヤー状にまで埋め込むことはできなかった。ポーラスアルミナの表面を電子顕微鏡で観察してみると、その表面に多くの金が偏析しており、これが原因でナノホールへの埋め込みができていないことがわかった。その後、いろいろな直流電圧を試してみたがこの傾向は変わらなかった。そこで、直流電圧印加から交流電圧印加に変更し実験を行った。印加電圧の範囲は、±10 Vで周波数は1 kHzであった。その結果、ポーラスアルミナのナノホールに300 nm程度の長さのナノワイヤーの作成に成功した。しかしながら、ナノワイヤー作成には、再現性が乏しく、試料を安定して作成するには至っていない。これは、ポーラスアルミナのナノ細孔底部のバリア層の除去レベルにばらつきがあり、膜全体としての電気抵抗が大きくばらついているためであると推察される。現状では、アルミニウム板を基板として用いてきたが、今後は、これをやめ、アルミニウム/金/SiO₂/Si多層膜を用いることに、この基板上的アルミニウムをポーラスアルミナに変えた後、ナノ細孔の底部のバリア層を完全に除去することで、金ナノワイヤーの作成を安定かさせる予定である。この多層膜の作成は、我々のMBE装置でも可能であるが、

研究結果 (つづき)

分子線ビームは大きな運動エネルギーを持ち合わせていない。このため、アルミナや金の基板への密着力が小さく、これらが簡単に基板からはがれ落ちると考えられる。そこで、大きな運動エネルギーで成膜をできるスパッタリング法が望ましい。この装置も我々の研究室にはないので、他研究室に試料作成を依頼したいと考えている。この多層膜の準備が出来次第、電界メッキ法により金ナノワイヤーを作成し、これに対して、MBE法によりTiO₂薄膜を蒸着させたい。さらに、金ナノワイヤーに対して酸化物薄膜を均一に成膜できる方法として原子層堆積法(ALD)がある。この装置も我々の研究室にはないので、外部委託成膜を利用して金ナノワイヤー/TiO₂ コアシェル構造を作成していく予定である。

2. 光熱変換材料の創成

本研究で目指す光熱変換材料の必要条件是、以下のようである。

- ・劣化することなく、安定に高い光熱変換特性を有すること
- ・太陽光の効率良い吸収を目指し、幅広い波長域に渡る光吸収を有すること

金属ナノ粒子は自由電子の集団振動に伴って外部光とカップリングして局在型表面プラズモン共鳴(LSPR)を発現し、分子を遥かに超える光消失特性を有する。LSPRに伴う光消失の失活プロセスは、無放射失活(熱失活)、および放射失活(光散乱失活)に分類され、これを決定する因子は、ナノ粒子を構成する金属種、形状、サイズと多様である。これまでにLSPR特性が良く知られてきたAuナノ粒子の光熱変換材料が良く研究されてきたが、AuのLSPRは500 nm以上で発現するゆえ、太陽光に最も多く含まれる400-500 nmの光を効率よく吸収することができない。すなわち本研究の本質は、上記の条件を満たし、かつ新規性の高いAu種以外の光熱変換金属ナノ材料の創出を目指すものである。特に本年度では以下の材料について検討した。

1. 白金がドーブされた三角形銀ナノプレート (Pt-doped Ag nanoprisms: Pt/AgPRs)
2. 球形パラジウムナノ粒子 (Pd nanospheres: PdNSs)

上記の材料について、その新規性と研究結果について下記する。

(1) 白金がドーブされた三角形銀ナノプレート (Pt-doped Ag nanoprisms: Pt/AgPRs)

銀ナノ粒子は400 nm以上でLSPRを発現することが可能であるが、非常に先鋭な光消失バンドを示す故に、太陽光を効率よく吸収することができない。例えば球形銀ナノ粒子は400 nm付近で先鋭な光消失バンドのみを示す。そこで本研究では、異方化された銀ナノ粒子を合成する技術を確立し、幅広い波長域に渡る光消失を目指した。

球形銀ナノ粒子(直径:約10 nm)の分散水溶液のpHを11.5に制御し、クエン酸存在下でLED光を照射することによって、500 nm付近にLSPRバンドを有する三角形銀ナノプレート (AgPRs)を合成するに至った (Figure 1)。また、LED光の波長を制御することによって、600 nm, 750 nm付近にLSPR消失バンドを有するサイズの大きなAgPRsを合成可能であることを見出した (Figure 1)。さらにこれらAgPRsの光熱変換効率を測定したところ、いずれのAgPRsも70%を超える光熱変換効率を示すことを明らかにした。代表的な光熱変換材料である異方性金ナノ粒子(金ナノロッド)の光熱変換効率を参照として合成し、その光熱変換効率を測定したところ約60%であった。ゆえに、AgPRsの光熱変換効率が極めて優れていることが伺い知れた。

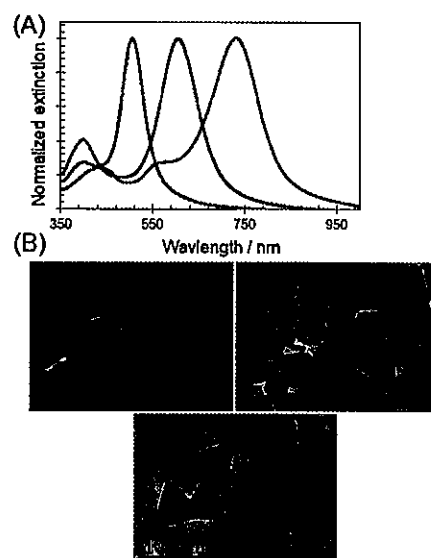


Figure 1. (A) 種々のサイズのAgPRsの光消失スペクトル。(B) LED光波長を制御することによって合成された種々のサイズのAgPRsのTEM像。

実施研究所名：理工学部 理工学研究所

氏名：高瀬 浩一

研究結果 (つづき)

一方、AgPRsは光照射に伴って発生する自己熱によって形態が崩壊する脆弱性を示し、その耐久性に難があることが分かった。この課題を解決するために、AgPRsの分散水溶液に塩化白金酸を少量添加し、自発的な電気化学的置換反応によって、AgPRs表面上に数原子層レベルの極薄い白金層を蒸着したところ、AgPRsの光学特性をほぼ維持したまま、形態安定性の飛躍的な改善が示され、高光強度レーザー光の照射に対しても安定になることを見出した。以上の結果より、耐久性、および可視域の幅広い波長域にわたって高い光吸収特性を示す光熱変換材料の新規創出が達成された。

(2) 球形パラジウムナノ粒子 (Pd nanospheres: PdNSs)

Pd種のLSPR特性は研究が進展しておらず、球形Pdナノ粒子のLSPRは深紫外域にてLSPRを発現すること以外、ほとんど未開拓領域であると言える。我々は、微小な球形金ナノ粒子(粒子径:20 nm程度)を核とした核成長法の要領で、82~242 nm範囲内で種々のサイズのPdNSsの合成に成功した (Figure 2(A))。これらナノ粒子はAuナノ粒子を核とし、Pdが被覆されたコアシェル形態を形成していることをHAADF-STEM測定により確認した (Figure 2(B))。さらに、これらナノ粒子では、AuのLSPRが厚いPdシェルで完全に遮蔽され、疑似的に球形Pdナノ粒子として扱えることを理論的、実験的に検証した。

これらナノ粒子の消光スペクトルをFigure 2(C)に示す。粒子径82 nmでは400 nm付近に双極子モードに該当するLSPRバンドを示した一方、サイズが大きくなるにつれてこのバンドの大きな長波長シフトが観察された。また、サイズの成長につれて短波長域に多重極モード(四重極, 八重極)に該当するLSPRバンドが発現し、結果として、242 nmサイズのPdNSsは紫外から近赤外の幅広い波長域に渡って光消失を示す稀有なプラズモニックナノ材料であることを実験的に証明するに至った。

さらに面白いことに、通常、サイズの大きなプラズモニックナノ材料はその失活プロセスの大半は光散乱であり、光熱変換効率は著しく低い。我々の合成したサイズの大きなPdNSsは約67%という非常に高い光熱変換効率を示すことが確認された。恐らく可視から近赤外に渡ってPd金属種が高い誘電率の虚部成分を有することに起因すると考えられた。以上の結果より、サイズの大きなPdNSsは、熱力学的に最も安定な球形形状であるにも関わらず、単一粒子で紫外~近赤外域にわたって高い光熱変換特性を有する、太陽光集光材料として非常に適したプラズモニックナノ材料であることを実証できた。

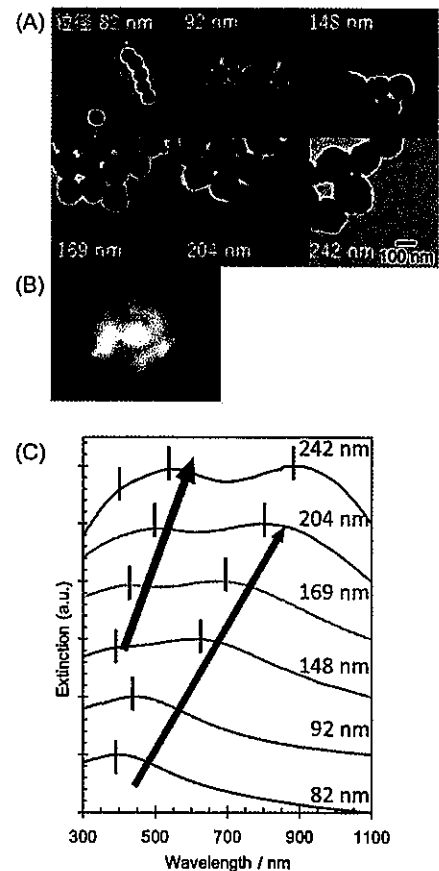


Figure 2. (A) Auナノ粒子を核として合成されたAu(コア)/Pd(シェル)型ナノ粒子のTEM像。(B) Au(コア)/Pd(シェル)型ナノ粒子のHAADF-STEM像(東京理科大学の石黒教授との共同研究による)。(C) 種々のサイズのPdNSsのコロイド水溶液の消光スペクトル

注：課題番号を記入してください。

平成29年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成30年4月9日

日本大学学長 殿

氏 名 高 寄 正 樹



所属・資格 生産工学部・専任講師

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 生産工学部 生産工学研究所

1 研究課題 トップアスリートの視覚ストラテジーと脳機能評価による運動制御の解明		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 高 寄 正 樹	生産工学部／専任講師	脳活動評価，研究の統括
○研究分担者 佐 藤 佑 介	商学部／准教授	視覚ストラテジーの解明
深 見 将 志	商学部／専任講師	アスリートの内省報告の解析，トレーニングプログラム作成への応用を検討
佐 藤 秀 明	法学部／専任講師	アスリート（個人競技）の動作分析と評価
平 木 貴 子	経済学部／専任講師	アスリートの内省報告の解析，統計解析
城 間 修 平	文理学部／助教	アスリート（団体競技）の動作分析と評価
合計 6名		
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
基盤研究（C）平成30年度～平成32年度「運動負荷が反応抑制・変更機能に関わる大脳皮質活動に及ぼす影響の解明」（代表者：高寄正樹，4,940千円），不採択		

※「6 研究結果」について，ホームページ等での公開（◎・否） いずれかを○で囲んでください。
否の場合は，理由書を添付して下さい。

実施研究所：生産工学部生産工学研究所

氏名： 高 寄 正 樹

4 研究目的

ヒトは適切な運動を遂行するために、運動制御に対して視覚情報を利用している (Land, 2004)。スポーツ競技においてもアスリートは最適なパフォーマンス発揮のために視覚ストラテジーを駆使している (Heinen, 2011)。視線行動に関する研究は、これまでさまざまなスポーツ種目を対象として行われており、本プロジェクトメンバーも体操競技の視線行動による研究成果を報告している (Sato et al., 2017)。これらの研究によって、一般アスリートが競技中に「どこ」へ「いつ」視線を向けているのかということが明らかにされているのである。

しかしながら、「どのように」見ているかということについては、生理学実験的に検討されたものは少ない。つまり、対象に視線を向けているが、注視しているのか、それともぼんやりと見ているだけなのかを議論するための定量的な証拠は十分に得られていないのである。加えて、国際大会に日本を代表して出場するトップアスリートの視覚ストラテジーと脳機能に関するデータはほとんどないため、一流選手が行う運動制御は完全に解明されていない。

そこで本研究は、運動制御を極めたトップアスリートが最適なパフォーマンス発揮のために ①「どこ」を「どのように」に見て、視覚情報を得ている (視覚ストラテジー) のか、②その視覚ストラテジーがどのようにパフォーマンスに影響を及ぼすのかを、視線解析と脳波解析を中心とした自然科学的実験手法によって明らかにすることを目的とした。将来的には、本研究で得られた成果をもとにトレーニング方法の開発を見据えており、本研究はその基盤的研究として位置付けている。2020年には東京オリンピック・パラリンピックが控えており、“スポーツ日大”の本学所属トップアスリートのパフォーマンス向上に寄与する研究として期待される。

5 研究概要

本研究は、実際の競技場面ならびに反応課題を実施した際の視線活動ならびに脳活動の記録から、トップアスリートの視覚ストラテジーと最適なパフォーマンスを發揮するための運動制御機構について明らかにすることを目的としており、2カ年計画で進める。

まず初年度は、「トップアスリートが競技中に行う視覚ストラテジーの解明」を目的に、トップアスリートと一般アスリートを実験参加者とし、その選手が競技中に「どこ」を「どのように」見ているのかという視覚ストラテジーを明らかにする。参加者は、本研究の目的および方法について十分な説明のうえ、同意が得られた本学に所属する (もしくは出身の) トップアスリート (日本代表の経験を有する選手) および、日本代表経験のない一般アスリートとする。アスリートのスポーツ種目はオープンスキル (環境が変化する) 競技で対人競技とする。実験課題は、各アスリートの競技における試合形式とする。そして、実験時には視線活動をアイマークレコーダーにより、脳活動および筋活動を脳波計により、動作映像についてはハイスピードカメラを用いて記録する。さらに実験後には、アスリートよりインタビュー形式にて内省報告を記録する。これらの指標をもとにトップアスリートと一般アスリートの比較を行い、トップアスリート特有の視覚ストラテジーを明らかにしていく。

2年目は、「トップアスリートの視覚ストラテジーがパフォーマンスに与える影響の解明」を目的に、視覚性の反応抑制・変更課題を用いて、トップアスリートの実行する視覚ストラテジーが、最適なパフォーマンス発揮のための認知機能を含めた運動制御に及ぼす影響について明らかにする。実験課題の視覚性の反応抑制・変更課題は、一般的な PC ディスプレイによる刺激ではなく、実験参加者の視覚ストラテジーの影響が大きくなることが予想される大型スクリーンへの投影を行う。加えて、より競技場面に近づけるため、通常、反応課題では座位姿勢にて行われるが、本研究においては立位姿勢により課題を実施する。実験時に記録する指標は、初年度と同様とする。実験参加者は初年度と同じトップアスリートと一般アスリートにノンアスリートを加えて比較する。それらの参加者群の反応抑制・変更課題時の視覚ストラテジーならびに脳活動様式を比較検討する。これによりアスリートよりも高水準なパフォーマンスを發揮しているトップアスリートが運動制御に視覚ストラテジーをどのように役立っているのかを明らかにする。

実施研究所: 生産工学部生産工学研究所

氏名: 高 寄 正 樹

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

トップアスリートが競技中に行う視覚ストラテジーの解明

本年度(初年度)においては、トップアスリートと一般アスリートを実験参加者とし、アスリートが競技中に「どこ」を「どのように」見ているのかという視覚ストラテジーを明らかにすることを目的とした。実験参加者は、本研究目的のとおり対人競技であるフェンシングとボクシングのアスリートであった。アスリートは国際大会において日本代表として出場経験のあるトップアスリートと、日本代表の経験を有しない一般アスリートとした。トップアスリートはフェンシング競技では女性6名(サーブル3名, エペ3名), ボクシング競技では男性2名であった。一般アスリートの実験参加者数もトップアスリートと同数のフェンシング競技6名(サーブル3名, エペ3名, すべて女性), ボクシング競技2名(いずれも男性)であった。本研究は、日本大学生産工学部人を対象とした研究倫理審査委員会の承認を受けて実施された(S2016-018)。実験は2課題を実施した。まずは、静的な状態において、視対象に対して注視している場合と、視線を向けているが焦点をあわせずぼんやり眺めているような場合には、脳活動および視線行動でどのような活動様式がみられるかについて検討を行った。2つ目の課題は、実験参加者の競技における相手と対峙した試合と同形式による攻防とした。実験においては視線活動、脳活動、筋活動、動作映像、内省報告および実験者の主観的感觉を評価するVisual Analogue Scale (VAS)を記録した。視線行動の記録にはウェアラブル型のアイトラッカーTobii Pro グラス2 (Tobii製)を参加者に装着させた。記録条件はサンプリング周波数100 Hzとした。得られたデータは、Tobii Pro Glasses Analyze (Tobii製)によって分析され、眼球輻輳角、固視回数、固視時間等が算出された。脳活動の記録には、モバイル多チャンネル脳波アンプeego sports (ant neuro製)を用い脳波を記録した。記録条件はサンプリング周波数1 kHz, 高域遮断周100 Hz, 低域遮断周波数0.01 Hzとし、頭皮上32カ所から記録した。記録された脳波は高速フーリエ変換によるスペクトル解析を行い、3-30 Hzにおける θ (3-7 Hz), α (8-12 Hz), β (13-30 Hz)の各帯域の成分の含有率を算出した。筋活動は、利き腕側の上腕三頭筋と動作の動き出しに使用される部位(フェンシング: 腓腹筋, ボクシング: 腹斜筋)より脳波計へ導出した。プレー中の実験参加者の身体動作については、2台のハイスピードデジタルカメラ(カシオ製)を設置し、サンプリング周波数240 Hzで撮影した。撮影された映像から動作分析ソフトウェアにより、動作に関する定量データ(動作開始のタイミング等)を算出した。実験時の内省報告についてはプレー映像を見ながらのインタビュー形式で行った。VASは測定機器による実験参加者への主観的な干渉度合いを測るため、紙面上にて記録した。なお、本研究の研究参加者であるトップアスリートは時間的制約が多いため、実験スケジュールの調整に苦慮し、実際の実験が予定よりも遅れてしまった。加えて、当初予定よりもデータ解析に時間を要することが判明した。実験に関しては、フェンシング、ボクシングともにトップアスリート、一般アスリートのデータ収録に成功しているが、今回の報告では、解析を終えているフェンシング選手のみ結果について報告する。

【課題1】静的な状態での固視およびファジー視

実際の試合形式で相手と対峙した際の平均的な距離(フェンシング: 3 m, ボクシング: 1 m)の目線の高さに固視点を提示し、しっかりと焦点を合わせて固視した場合(Gaze条件)と、視線を保持したまま眼筋の緊張を解いて、注意を向けないようにぼんやりと見るようにした(朴と吉田,2011)場合(Fuzzy条件)との視線行動と脳活動をそれぞれ比較した。視線行動の結果、どちらの条件であっても実験参加者が提示指標に対して固視を行っていることが認められた。他方、脳活動の分析結果は両条件間の違いを明るみにした。脳波のスペクトル解析の結果、大脳皮質の視覚領域では、3-30 Hzに含有される周波数成分はGaze条件では α 帯域にピークがあるのに対して、Fuzzy条件においては θ 帯域にピークが出現していた。一般的に読書や計算などの認知処理がなされている場合は、 β や α など比較的高い周波数帯域の活動性が高まっていることが知られている。一方、眠気を催しているなど意識レベルが低下しているような大脳皮質活動が低下している場合は、低い周波数帯域の割合が高まることが知られている。つまり、アスリートが対象物に対してしっかりと焦点をあてているときよりも、ぼんやりと眺めるように視線を向けている状態では、大脳皮質視覚領域では低い周波数帯域による活動が大きくなっており、大脳皮質における情報処理活動のレベルとしては低減していることが示唆された。これまで、Fuzzyな状態時の脳波成分についての先行研究は見当たらない。

実施研究所：生産工学部生産工学研究所

氏名： 高 寄 正 樹

研究結果（つづき）

この知見を得られたことは、今後の本研究を進めていくという点においても、非常に有益な結果を導くことができたといえる。

【課題2】相手と対峙した試合形式での攻防におけるアタック局面

実験課題は、相手と対峙した試合と同形式による攻防とした。実験場所は、フェンシングについてはフェンシング場の正式な規格のフェンシング競技用ピストを使用した。ボクシングについては、体育館アリーナにボクシングのリングの規定サイズに適合するラインでプレー範囲を設定した。トップアスリートと一般アスリート、それぞれ通常のパフォーマンスを発揮させる必要があるため、対戦はトップアスリート同士、一般アスリート同士とした。解析対象区間は、実験参加者が自らアタックを仕掛け、それが決まった（ポイントになった）局面を実験参加者につき5局面ずつを採用した。記録された脳波の解析結果としては、アタック局面における大脳皮質視覚領域は θ 帯域の活動性が高まり、 α 、 β 帯域の活動性は低下していた。課題2のアタック局面（Attack条件）における各帯域の含有率を課題1のGaze条件ならびにFuzzy条件と比較したところ、Attack条件における θ 帯域の含有率は3条件の中で最も高く、 α 帯域においては3条件の中で最も低かった。Attack条件における β 帯域の含有率は、Gaze条件よりも低く、Fuzzy条件と同等であった。これらの結果より、アタック局面における大脳皮質視覚領域の活動は、対象に焦点を合わせず視線を向けている時と同水準であることがわかった。そして、その時の視線の方向は、対戦相手の頭部や胴体、サーベル等に向けられていた。その際の眼球回転速度は、固視をしていると評価できる速度を下回っていた。課題1同様に、アスリートは特定の位置を固視しているといえよう。これらの結果から、アスリートはアタック局面においては、しっかりと対象に焦点を当てるように注視しているのではなく、ぼんやりと視線を向けているということが示唆される。これは、周辺視野を利用してより多くの視覚情報を得ようとしていること、また、攻撃を仕掛けてくる相手への対応や攻防のストラテジーの組み立てなど多くの事象に対して、限られた注意資源が配分されているということを示している可能性が考えられる。0~10ポイントで評価されるVASの値は、「普段どおりできた」についてはトップアスリート 5.0 ± 1.8 、一般アスリート 6.0 ± 2.4 、「プレー中に（脳波）キャップが気になった」についてはトップアスリート 0.8 ± 0.8 、一般アスリート 1.0 ± 1.2 、「プレー中にグラスが気になった」についてはトップアスリート 6.9 ± 2.6 、一般アスリート 6.4 ± 3.6 であった。いずれの項目もトップアスリートと一般アスリートには有意な差はみられなかった。測定機器の装着による干渉については、事前から予想されていたため、測定機器の装着後に視線計測のキャリブレーションを行うなどして実験環境への順応を図ったが、「プレー中にグラスが気になった」については、やや高い値が記録されてしまった。これは本研究における研究の限界であると考えられる。一方で、動的な運動時の脳波の記録は、これまでは技術的問題により体動によるノイズが脳波に混入してしまい、解析に耐えうるものではなかった。しかしながら、本助成により購入することができた脳波計eego sportsはこの技術的問題を概ね解決しており、解析に耐えうるデータを記録することができた。これまでほとんど発表されていない動的運動時の脳活動を捉えられたということは、大きな意義がある。また、視線ストラテジーの研究では、「いつ」「どこ」を見ているかという問いに対しては多くの研究報告がなされているが、それを「どのように」見ているかという問いに対して、定量的なデータで示したものはない。本研究では、視線活動の定量的データに加え、脳活動の定量的データから視覚ストラテジーを検討することで、アスリートが競技中、「どのように」視対象を見ているかということを明らかにすることができた。

なお、初年度の研究成果の一部であるフェンシング競技アスリートを対象とした結果については、桜門体育学会平成29年度大会（第8回大会）において、「フェンシング競技選手のアタック局面における視覚ストラテジー」として報告した。さらに、ボクシング競技のアスリートのデータも加えた結果については、北米神経科学会（Society for Neuroscience 48th Annual Meeting）において報告する予定である。

次年度は、反応抑制・変更課題を用いて、トップアスリートの実行する視覚ストラテジーが、最適なパフォーマンス発揮のための認知機能を含めた運動制御に及ぼす影響について明らかにする。実験参加者は初年度と同じトップアスリート、一般アスリートに加えて、特別な競技経験を有しないノンアスリートとする。それらの参加者群の反応抑制・変更課題時の視覚ストラテジーならびに脳活動様式を比較検

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

実施研究所：生産工学部生産工学研究所

氏名：高 寄 正 樹

研究結果（つづき）

討する。これによりまずアスリート特有の視覚ストラテジーについて明らかにしたのち、より高水準なパフォーマンスを発揮しているトップアスリートが運動制御に視覚ストラテジーをどのように役立てているのかについて明らかにしていく。


課題番号	総 17-014
------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成 29 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 30 年 04 月 02 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 平山 篤志 

所属・資格 医学部・(教授)

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 医学部総合医学研究所

1 研究課題 LDL受容体KO豚における冠動脈不安定プラークのインターベンション後の治療戦略作成		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 平山篤志	医学部／教授 (平成 30 年 3 月 31 日退職)	研究の統括
○研究分担者 大西彰 梶川博 大滝忠利 浅野早苗 羽尾裕之 高山忠輝 李予昕 春田裕典	生物資源科学部／教授 生物資源科学部／教授 生物資源科学部／准教授 生物資源科学部／助教 医学部／教授 医学部／准教授 医学部／准教授 医学部／助教 (平成 30 年 3 月 31 日退職)	モデル動物の開発と解析 効果的な高脂肪食の開発 モデル動物の計画的生産 高脂肪食効果の評価 病理学的解析 血管内画像診断の解析 実験プロトコル作成、動物実験の実施 動物実験の実施
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
2018 年 4 月～2020 年 3 月 Vascular IIR Research Program (国際競争的助成金)に申請したが、不採択であった。 研究代表者：李予昕(Yuxin Li) 研究課題目：Effect of rivaroxaban on in-stent neoatherosclerosis after DES implantation 応募研究費：€210,000 (約 2700 万円)		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (可)・否) いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：医学部総合医学研究所

氏名：平山篤志

4 研究目的

急性心筋梗塞等の虚血性心疾患の治療法として、冠動脈内腔をステントで拡げる冠動脈インターベンション (PCI) が中心的な治療法として行われている。内膜増殖抑制作用を有する薬剤溶出性ステント (DES) が開発され、早期の再狭窄の問題は劇的な改善をみせたが、DES 留置後慢性期のステント内新規動脈硬化による遅発性ステント血栓症と晚期再狭窄などの合併症が問題となった。これらの合併症は、今までは適切な動物モデルが存在しなかったため、事前の動物実験では認識されず、臨床で 10 年間近く使用されて初めて判明した事である。適切な動物実験で正確な評価や長期的な観察が臨床応用前に可能であれば、より安全性が担保されると考えられる。

我々は遺伝子組換え技術と体細胞クローン技術との併用により、LDL コレステロール受容体ノックアウト (LDLR^{-/-}) ブタを作製した。LDLR^{-/-}ブタに4ヶ月間の短期間高脂肪食負荷より、ヒトと極めて高い類似性を持つ冠動脈不安定プラークが形成した。さらに LDLR^{-/-}ブタをミニブタ系統と交配し、長期間飼育しても体格の変動が小さい LDLR^{-/-}ミニブタを作製した。本研究は不安定プラークを持つ LDLR^{-/-}ミニブタを用いて、不安定プラーク病変部位に最新の第3代 DES および最近開発された生体吸収性スキャホールド (BVS) 留置後、留置部位における長期間の経時的血管反応を観察し、DES または BVS 留置後の最善の治療戦略を検討する。

5 研究概要

冠動脈の動脈硬化に対する PCI 治療では金属ステント (BMS) が使用されていたが、内膜増殖反応による再狭窄の問題があった。そこで、内膜増殖抑制作用を有する DES が開発され、早期の再狭窄の問題は劇的な改善をみせた。しかしながら、DES は長期予後の改善効果については限界があり、例えば DES 留置後の死亡率や急性冠症候群 (ACS) の発症率は従来の BMS と比較して差が認められず、DES 留置後慢性期のステント内新規動脈硬化による遅発性ステント血栓症と晚期再狭窄などが理由として考えられている。最近の臨床研究では、血管内光干渉断層撮影 (OCT) などの血管内イメージング法を利用してステント内新規動脈硬化、遅発性ステント血栓症等存在を評価していたが、ヒトにおいては組織病理学的検証が困難であり、メカニズムを探るには本質的な限界があり、実験動物による研究が不可欠になった。

我々はすでに LDLR^{-/-}ブタを用いて高脂肪食負荷で冠動脈不安定プラークモデル作製を成功した。本研究はこの LDLR^{-/-}ブタをミニブタ系統と交配して作製した LDLR^{-/-}ミニブタを用いる。高脂肪食負荷で冠動脈不安定プラークモデル作製後、不安定プラーク病変部位に DES および BVS 留置し、留置部位における長期間の経時的血管反応を検討した。研究期間内に、ステント留置部位の経時的な血管反応、ステント留置後合併症の制御機構、留置後慢性合併症の予防治療法を検討した。

本研究で使用する LDLR^{-/-}ミニブタは今まで世界で発表された 2 種類の遺伝子変異また組換えブタ/ミニブタモデルと比較して、ヒトの冠動脈不安定プラークと極めて高い類似性を有している。またミニブタのデバイス留置後の血管反応はヒトより 10 倍ほど速いため、ヒトの慢性経過を短期間で観察できることが本研究の学術的な特色であり、限られた研究期間内で意義ある実験結果を出せる根拠となる。BVS は最近開発されたデバイスであるため、長期間の安全性と有効性の検証データは無いままである。本研究は患者 BVS 留置 10 年後の結果を模擬できるため、新たなデバイスの開発から臨床応用への不可欠な担保と架け橋となる。

実施研究所：医学部総合医学研究所

氏名：平山篤志

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

LDLR-/-ブタをミニブタ系統（サクラコユキ）と交配（人工授精）し、F2-F4世代のLDLR-/-ミニブタを作製した。LDLR-/-ブタでは生後1年で体重200キロに対して、LDLR-/-ミニブタでは生後1年で体重80キロ以下になり、長期間飼育しても体格の変動が小さいことに成功した。またLDLR-/-ミニブタより採血し、血算、生化学、血中脂質プロファイルを測定した。LDLR-/-ミニブタはLDLR-/-ブタと同様の血算、生化学、また血中脂質プロファイルを持っていた。普通エサでは、血中トータルコレステロール濃度は620mg/dl、LDLコレステロール濃度は430mg/dlであり、1.5%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食を1日1キロの量で1ヶ月間食べさせると、血中コレステロール濃度は2倍以上増加した。

出産直後のLDLR-/-ミニブタの耳刻みから組織小片を採取し、遺伝子検定を行った。遺伝子検定後、生後1ヶ月から離乳させ、普通の子豚用エサを食べさせた。生後2ヶ月に、養豚所から医学部研究支援部門のブタ飼育室に入荷した。静脈から採血検査を行った後、3ヶ月齢のLDLR-/-ミニブタに1.5%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食を1日1キロの量で4ヶ月間食べさせた。当初、高脂肪食にアンジオテンシン、糖質、揚げ物などの添加物を混ぜて、酸化ストレスを促進させる予定だったが、予備実験で高コレステロールと高脂肪だけで、十分動脈硬化プラークを作成できたので、1.5%コレステロールと15%牛脂だけを含む高脂肪食にした。また不安定プラークの作成を加速するため、牛脂を電子レンジで20分加熱してからコレステロールとエサを混ぜた。また作られた高脂肪食をミニブタに食べさせる前に冷蔵庫に1ヶ月間保存するなど高脂肪食を酸化させた。この方法で、4ヶ月の高脂肪食負荷で、冠動脈プラークモデルを作製することが出来た。

4ヶ月間高脂肪食負荷後、LDLR-/-ミニブタをケタミン5mg/Kg筋注にて麻酔鎮静を図った。その後静脈ルート確保し、カテーテル台に仰臥位に固定した。その後気管挿管を行い、1回換気量10-15ml/Kg、20回/分にて呼吸管理をし、酸素50%と鎮静・鎮痛作用を有するセボフルラン1~4%を吸入させ全身麻酔とした。十分な鎮静と鎮痛を確認したのち、大腿部また頸部のシース挿入部を剃毛・消毒を行い、局所麻酔（1%リドカイン10mlを皮下投与）下で、シースにて動脈穿刺を行い動脈ラインを確保した。動脈圧ラインと心電図による血行動態監視下でシースより挿入したカテーテルと血管内イメージングデバイスにより冠動脈の観察を行った。冠動脈カテーテル操作後、デバイス・シースを抜去し手動的に圧迫、止血を確認したのち麻酔より離脱し終了とした。血栓閉塞を予防するために、留置三日前から実験終了まで抗血小板薬とアスピリン81mg/日とクロピドグレル75mg/日を経口投与した。デバイス留置手術施行中、活性凝固時間>300秒を達成するためにヘパリンも血管内投与した。感染予防のため、カテーテル操作中に、点滴に抗生剤セファゾリン1gを入れた。ブタの冠動脈ではスパズムが起りやすいので、造影上スパズムが起り、また心電図上STが上がる場合には、即ちニトロールを経カテーテルで冠動脈内投与した。

ブタ冠動脈に冠動脈造影、血管内超音波（IVUS）で三枝冠動脈を観察したところ、不安定プラーク病変の特徴と部位を確認した。冠動脈の前下行枝、回旋枝、また右冠動脈のうち一本の冠動脈に0-3ヶ所プラーク、また一個の心臓に（三本の冠動脈合わせて）平均3ヶ所プラークが形成することができた。線維性成分が多い安定性プラークと脂質コアを含む不安定プラークともを観察された。プラーク病変の特

実施研究所名：医学部総合医学研究所

氏名：平山篤志

研究結果（つづき）

徴と部位を確認後、IVUSで病変部の血管内径を測定し、留置ステントのサイズを決めた。その後、ランダムにDESとBVSを選択し、同一個体の異なる冠動脈にDESとBVS両方を留置した。三枝冠動脈に2種類のデバイスを平均配分するように配し、ステント拡張後の外径と病変部血管内径は1.2:1とした。

留置したDESとBVSは異なる2種類のステントであり、DESは金属製のため、恒久的に冠動脈に残る。DES留置後の残存金属より留置部位の血管運動機能を失う、また金属による異物反応などの問題がある。BVSは生物吸収性であるため、時間の経過とともにポリラクチドが分解消失するため、血管運動機能を取り戻す可能性や異物反応が起こりにくいといった利点がある。表1はDESとBVSの類似点と相違点を示す。BVSの材料はポリラクチドであるため、パラフィンブロックとパラフィン切片を作成できるため、DESより病理学解析は容易であった。

表1: DESとBVSの類似点と相違点

	薬剤の塗布	材料	生体吸収性	留置後合併症
DES	あり	金属	血管内に恒久的に残る	内皮機能障害、ステント内新規動脈硬化、血栓症、再狭窄など
BVS	あり	ポリラクチド	時間とともに分解し生体に再吸収される	まだ不明

ブタ冠動脈のステント留置後の血管反応はヒトより早く、ステント内の新生内膜がヒトでは1年間で形成されるが、ブタでは1ヶ月間で形成される。本研究の2年間の観察期間内にヒトでは10年以上に相当するステント留置後の慢性期合併症を評価できると考える。本研究では、ステント留置後の観察期間は1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、また12ヶ月と設定した。ヒトではDES留置後ステント内新規動脈硬化の発生率は3-5年: 46%; 5-7年: 62%; 7年以上: 74%のように時間とともに増加するため (Lee SY, et al. Circ Cardiovasc Interv. 2015)、本研究は12ヶ月の観察期間内にデバイス内新規動脈硬化形成することを十分期待できる。当初、高脂肪食負荷でLDLR-/-ミニブタの動脈硬化病変は急速に進展するので、DESまたはBVS留置後の観察期間内に未治療部位の不安定プラークが破裂する可能性があり、プラーク破裂より急性冠症候群が発症したら、救命が出来ない場合もあるかと思われたが、現在までに急性冠症候群発症は観察されなかった。

ステント留置1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、また12ヶ月後、前述のように麻酔後、冠動脈造影、OCT、IVUSと血管内視鏡を用いてステント内の血栓、血管内膜変化を定性、また定量的に観察した。冠動脈カテテルおよび血管内イメージング観察終了後、深麻酔下において脱血を行い安楽死とした。安楽死後は生理食塩水による還流を行い、10%ホルマリン液による還流固定を行い、組織の採取（心臓、腎臓、上行～下行大動脈、頸動脈）を行い、病理組織学的に検討した。心臓を摘出後、冠動脈と周りの組織を剥離し、ステント留置部位以外の冠動脈は0.5cmずつ切り出し、パラフィン切片で組織病理学的に解析した。DES留置部位は樹脂包埋で組織病理学的に解析した。BVS留置部位の冠動脈はパラフィン切片で組織病理学的に解析した。

冠動脈造影と血管内イメージングで以下の評価項目を検討した。DESまたはBVS留置の密着性 (stent apposition / stent malapposition)、内腔面積/体積、血管面積/体積、ステント面積/体積、新生内膜

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

実施研究所名：医学部総合医学研究所

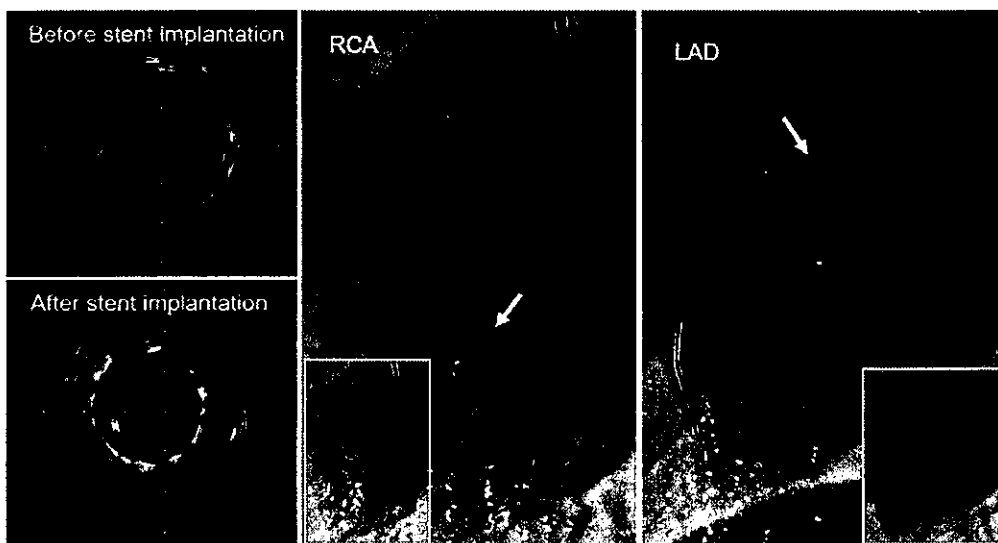
氏名：平山篤志

研究結果（つづき）

またステント内新規動脈硬化面積/体積、新生内膜またステント内新規動脈硬化の成分。組織病理学の評価項目は以下にした。DES または BVS 留置の密着性、内腔面積、血管面積、ステント面積、新生内膜またステント内新規動脈硬化面積、ステント内新規動脈硬化の成分、線維被膜の厚さ、血栓量、血管内皮の損傷、平滑筋細胞の遊走及び増殖、ステント留置部位の栄養血管、DES または BVS ストラットおよび血管内皮の損傷部位への血栓の付着、ステントストラット周囲のフィブリン蓄積、活性化した炎症細胞の浸潤、石灰化、粥種出血、壊死性脂質コア、細胞外基質の蓄積、各種サイトカイン、また、BVS の場合は吸収サイトの組織変化（平滑筋細胞、プロテオグリカン、コラーゲン）など。

本研究に使用する LDLR-/-ミニブタは商品化されていないので、共同研究施設からの譲渡より使用した。そのため、常にブタを入荷することができない。また、本研究は4ヶ月間の特殊餌飼育期間、その後3ヶ月から12ヶ月間の観察期間が必要であり、合わせて7ヶ月間から16ヶ月間の長期間飼育が必要であり、十分な飼育スペースが必須である。動物飼育施設のブタケージ数の制限もあり、現在の進捗状況は以下である。3ヶ月間観察群の3頭の内2頭の実験が終了した。12ヶ月間観察群は3頭にステント留置し、3頭とも2018年9月までに実験終了予定である。6ヶ月間観察群の3頭の内2頭は現在特殊餌負荷中、2018年5月にステント留置予定である。

本報告書は3ヶ月間観察群の結果をまとめた。3ヶ月間観察群では、DES と BVS とともに留置直後ステントと血管壁密着し、内腔の表在性血栓を認めなかった（下図）。



3か月後、冠動脈造影では、ステント留置部位に軽度狭窄（25-50%）が認められた。IVUSで観察したところ、DES と BVS とともにステントの内側に新生内膜が観察され、血栓は認めなかったが、新生内膜が薄いので、成分を解析できなかった。深麻酔下において脱血を行い安楽死とし、還流固定後、心臓を摘出した。心臓の表面に虚血部位を認めなかった。冠動脈を摘出後、心臓を基底部から心尖部まで、0.5cm 間隔で輪切りし、心筋を観察したところ、心筋梗塞巣を認めなかった。冠動脈を摘出後、BVS 留置部位の冠動脈をパラフィン切片、DES 留置部位の冠動脈を樹脂包埋切片で染色（HE、EVG、MT 染色）し、ステント留置後の血管反応を観察した。DES と BVS とともに平滑筋細胞が主成分とした新生内膜が形成され

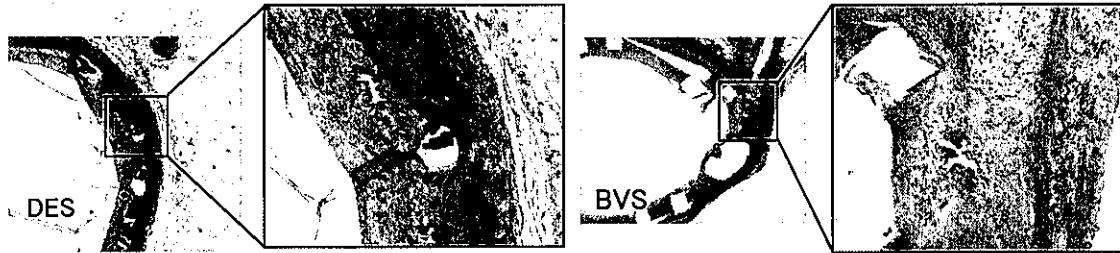
注：必要に応じて、このページをご使用ください。

実施研究所名：医学部総合医学研究所

氏名：平山篤志

研究結果（つづき）

た。新生内膜の中に炎症性細胞浸潤、ステントのストラット周囲のフィブリン蓄積、断片化された石灰化、泡沫状マクロファージなどが観察され、DES と BVS 両群の間に新生内膜の成分が類似した。DES と BVS 両群ともに、ステント内血栓は認められなかった。



以上、我々は DES と BVS ステント留置後の血管反応を観察した。BVS 留置 3 ヶ月後、DES に対する非劣性が示された。またステント留置 3 ヶ月間の短期間内に、新生内膜に泡沫状マクロファージ、石灰化などのステント内新規動脈硬化所見を観察された。このように短期間に PCI 患者ステント留置後の遅発性血管反応を模擬し、冠動脈ステント内新生動脈硬化の大動物モデルを作成することに成功した。今後、このモデルを用いて 6 ヶ月と 12 ヶ月の観察結果を解析し、各種ステント留置後合併症の制御機構を解明する。

課題番号	総 17-017 継続 総 16-019
------	----------------------------

平成 29 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 30 年 4 月 5 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 篠田 雅路



所属・資格 歯学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 歯学部 総合歯学研究所

1 研究課題 神経刺激療法による神経障害性疼痛制御メカニズムの解明を目指した研究拠点形成		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 篠田 雅路	歯学部・准教授	研究の計画と総括 動物の作成と疼痛関連行動解析 後根神経節の電気生理学的解析
○研究分担者 山本 隆充	医学部・教授 (平成 29 年 3 月 31 日退職)	神経刺激療法効果の臨床的調査解析
小林 一太	医学部・准教授	神経刺激療法効果の臨床的調査解析
草間 國子	薬学部・教授	生化学的解析
藤田 智史	歯学部・准教授	大脳の電気生理学的解析
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
採択 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 「慢性の痛み解明研究事業」 研究開発課題名：三叉神経障害性疼痛に対する新たな予防および治療システムの構築 研究開発代表者：岩田 幸一 研究開発担当者：篠田雅路、小林真之 平成 29 年度 7,200,000 円 平成 30 年度 2,200,000 円		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (○・否) いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：総合歯学研究所

氏名：篠田 雅路

4 研究目的

神経障害性疼痛とは、さまざまな原因によって侵害受容神経が異常に興奮する状態が継続することで発症する。代表的な神経障害性疼痛には、坐骨神経痛や頸椎症、带状疱疹後神経痛、糖尿病性神経障害による痛みなどがあり、40代以上に多く、日本では約600万人以上の神経障害性疼痛患者が存在すると推定されている。現在、そのような神経障害性疼痛に対して多くの治療法が試みられているが、十分な除痛・鎮痛が得られない患者は多く、難治性神経障害性疼痛に対する効果的治療法の確立が望まれる。

このような多くの治療法の中で現在、神経障害性疼痛の治療法として神経刺激療法（ニューロモデュレーション療法）が注目を集めている。ニューロモデュレーション療法には経皮的電気刺激法、脊髄と脊椎の間にある硬膜外腔に電極を留置して行う電極埋め込み式電気刺激法、針電極による脳深部や脊髄への電気刺激法があり、神経障害性疼痛に対して著しい除痛効果を得ることができていることが知られている。現在、臨床においては、薬物療法や神経ブロック療法によって効果の得られない難治性神経障害性疼痛患者に適用されている。このように、ニューロモデュレーション療法は広く臨床応用され除痛効果が確認されているが、その除痛メカニズムはほとんど解明されていないのが現状である。そのためニューロモデュレーション療法の施行に関しては主治医の裁量に任されることが多いため、各施設によって神経刺激方法は多種多様である。より効果的な刺激パラメーターを確立するためには、神経刺激による除痛メカニズムの解明が急務である。

そこで、神経障害性疼痛に対するニューロモデュレーション療法の除痛メカニズムを明らかにするための基礎研究拠点を確立するために、まず神経障害性疼痛に対し脳脊髄へのニューロモデュレーション療法を行った患者を対象とし、ニューロモデュレーション療法の疼痛抑制効果を神経障害の原因疾患や神経障害の部位ごとに比較検討し、各神経障害性疼痛別に最適な神経刺激方法を見出す。さらに、ニューロモデュレーション療法による神経障害性疼痛制御メカニズムを解明するために神経障害性疼痛モデルを確立し、脳、脊髄および後根神経節細レベルでの神経活動性および細胞内物質の変化、神経節内のグリア細胞の活性変化を解析する。得られた基礎研究データを集約し、ニューロモデュレーション療法による神経障害性疼痛制御メカニズムの全容を解明し、EBMにもとづいたニューロモデュレーション療法選択基準のグローバルスタンダードを確立することが本研究の目的である。

5 研究概要

1. ニューロモデュレーション療法における神経障害性疼痛に対する疼痛抑制効果の解析

薬物療法等で十分な疼痛抑制効果が得られない患者を対象に各種の脳脊髄刺激療法を行った。申請者の施設は数百例の脳脊髄刺激療法の経験を有しており、手術手技は従来行ってきた安全性の確立した方法で行った。手術前後、もしくは刺激オン時と刺激オフ時で疼痛抑制効果を visual analog scale 等で比較した。加えて、刺激強度、刺激幅、刺激頻度といった刺激条件による疼痛抑制効果の違いを評価した。これにより各ニューロモデュレーション療法の疼痛抑制効果を神経障害の原因疾患や神経障害の部位ごとに比較検討し、最適な神経刺激方法を見出すことができた。

2. 神経障害性疼痛抑制に最適な電気刺激パラメーターの確立と疼痛抑制機構の解析

基本的には従来から神経障害性疼痛に関する研究で用いてきた、片側のL5脊髄神経を6-0絹糸で、結紮して神経を損傷する脊髄神経損傷後神経障害性痛モデルを用いた。神経障害性疼痛モデル動物に対して、von Frey filamentによる機械刺激を与え逃避反射閾値を測定した。さらに、前年度に最も除痛効果が高いことが示されたパラメーターにて、電極埋め込み式電気刺激法による脊髄への電気刺激を行い、疼痛関連行動の変化を解析した。さらに、脊髄神経損傷後神経障害性痛モデルに対する同パラメーターの電気刺激法による脊髄への電気刺激後、脊髄レベルでの神経活動性およびグリア細胞の活性化が抑制されていることが示された。

3. 坐骨神経損傷モデルにおけるニューロモデュレーションがもたらす大脳皮質疼痛受容領域の応答変化

神経障害性疼痛モデルとして坐骨神経損傷モデルを作製し、体性感覚野の侵害情報処理が脊椎骨にニューロモデュレーションを行った時に変調するのかを検討した。すなわち、1.5 g/kgのウレタン麻酔下にて電極のみを挿入したニューロモデュレーション（-）群と実際に電気刺激を行ったニューロモデュレーション（+）群間で、ラットの後肢に電気刺激を行い一次体性感覚野における反応を、膜電位感受性色素による光学計測法によって時空間的に記録し、得られる応答に差があるのかを検討した。記録には実態顕微鏡にCCDカメラを装着したMiCAM02イメージングシステム（BrainVision社製、現有設備）を用いてマクロ的な視野で行った。その結果、ニューロモデュレーションにより侵害刺激による大脳皮質の応答性が低下する可能性が示された。

実施研究所：総合歯学研究所

氏名：篠田 雅路

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

1. ニューロモデュレーション療法における神経障害性疼痛に対する疼痛抑制効果の解析
パーキンソン病患者の温度侵害刺激に対する痛み閾値の脊髄刺激療法による影響

平成28年度はドラッグチャレンジテストの結果と dual-lead SCS の効果を比較して、脊髄刺激の適応となる脳卒中後疼痛について検討し、脳卒中後疼痛においてはケタミンが有効な症例を選択して dual-lead SCS を行うことによって、脊髄刺激による疼痛抑制の有効率を高めることができることがわかった。今年度はさらに各神経障害の原因疾患や神経障害の部位ごとにニューロモデュレーション療法の疼痛抑制効果の比較検討を進めるため、パーキンソン病 (Parkinson's Disease: PD) における慢性疼痛にターゲットを絞った。過去の研究から、パーキンソン病の43~83%に慢性疼痛が合併すると報告されている。パーキンソン病に伴う疼痛のうち、運動症状ないしは薬物血中濃度と関連したものは、PD-related pain (PD pain: パーキンソン病関連痛)とも呼ばれている。PD pain は抗パーキンソン病薬の調整により日内変動を改善することで緩和が得られる可能性がある。しかし進行期においては、疼痛の緩和は薬物の調整だけでは困難なことが多い。近年、PD pain に対する脊髄刺激療法 (Spinal Cord Stimulation: SCS) の有効性が注目されている。一方で SCS の疼痛改善メカニズムは脊髄分節性 (segmental inhibition) と脊髄分節よりさらに中枢 (supra-spinal effect) における modulation が推定されているが明らかになっていない。そこで下肢の難治性疼痛に対して下位胸髄の SCS 導入中の PD 患者7例を対象とし、SCS の刺激を入れた時 (stimulation-on: stim-on) 及び刺激を切った時 (stimulation-off: stim-off) の温度侵害刺激による疼痛閾値を量的感覚検査 (Quantitative Sensory Testing ; QST) で測定し、SCS 刺激部の脊髄分節以下 (下肢領域) と分節より中枢 (上肢領域) で比較した。その結果、下肢の冷刺激に対する痛覚閾値 (Cold Pain Threshold ; CPT) と温刺激に対する痛覚閾値 (Heat Pain Threshold ; HPT) は、SCS により有意に上昇することが示された。一方、SCS の刺激領域より中枢側の上肢領域において、CPT は有意な低下を認め、HPT では有意な変化を認めなかった。

本研究により、SCS が PD 患者の温度侵害刺激に対する疼痛閾値を上昇させることが示された。また PD 患者に伴う腰下肢痛に対する SCS の疼痛改善も確認できた。SCS の疼痛改善メカニズムとしては、刺激脊髄分節レベルでの segmental inhibition が主体であることが推定される。これらの結果をまとめて国際誌に投稿し、現在論文審査中である。

脊髄背側と腹側の同時刺激による脊髄刺激療法の疼痛抑制

各ニューロモデュレーション療法の疼痛抑制効果の詳細な比較検討をさらに進めるため、脊髄背側と腹側の同時刺激による脊髄刺激療法の疼痛抑制を解析した。一般に、神経障害性疼痛に対して脳脊髄刺激療法が有効であることが分かっている。しかし、腕神経叢引き抜き損傷後の疼痛に対しては、通常の脊髄背側の刺激では刺激感を誘発することは難しく、疼痛抑制効果が得られにくいことが知られている。腕神経叢引き抜き損傷後の疼痛患者に脊髄の腹側および背側にそれぞれ刺激電極リードを配置し刺激



図1 脊髄の背側と腹側に留置した刺激電極

したところ、疼痛抑制効果を得られた症例を報告する。症例は36歳男性、腕神経叢の引き抜き損傷により右上肢の疼痛がみられた。刺激電極リードを脊髄の背側と腹側にそれぞれ留置した(図1)。通常の脊髄背側の刺激では刺激感は誘発されなかった。背側と腹側の電極リードを用いて刺激すると刺激感が誘発され、疼痛抑制効果を得ることができた。脊髄背側と腹側の同時刺激では、従来のSCSよりも深部を刺激する事ができ、疼痛軽減に有用であると考えられた。これらの結果をまとめて、国際誌 (Acta Neurochir) に投稿し、受理された (Acta Neurochir (2018) 160:639-643 641)。

実施研究所名：総合歯学研究所

氏名：篠田 雅路

研究結果 (つづき)

2. 神経障害性疼痛抑制に最適な電気刺激パラメーターの確立と疼痛抑制機構の解析

深麻酔下にて片側 L5 脊髄神経を 6-0 絹糸にて結紮し、坐骨神経損傷モデルを作製した。坐骨神経損傷モデル動物の確立にあたっては、従来の研究における動物モデル作製方法を参考にした。片側 L5 脊髄神経の 6-0 絹糸による結紮と同時に胸髄 (L1 to L4) の脊椎骨にニューロモデュレーション用刺激電極 (ユニークメディカル社製) を接触させ 6-0 絹糸による縫合により設置固定した。片側 L5 脊髄神経結紮 1 日後、この坐骨神経損傷モデルの坐骨神経支配領域 (足底部皮膚) に von Frey filament による機械刺激 (1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 26, 30, 40, 50, 60 g) を与え、機械刺激に対する逃避反射閾値を測定した。片側 L5 脊髄神経結紮前の逃避反射閾値は 30 ± 7 g であったのに対して神経結紮 1 日後には 4 ± 1 g となり、有意に逃避反射閾値の低下が見られたことから ($P < 0.05$)、片側 L5 脊髄神経結紮側の足底部皮膚に機械痛覚過敏が生じていることが確認された。逃避反射閾値測定 30 分後、実際のヒトに対するニューロモデュレーション療法において使用されている脊髄電気刺激装置 (メドトロニック社製) を用いて、脊椎骨に設置したニューロモデュレーション用刺激電極を使って電気刺激を施行した。電気刺激のパラメーターは平成 28 年度の研究成果によって機械刺激に対する逃避反射閾値低下の抑制に最適と考えられた電気刺激パラメーター (240 μ s/60Hz) を用いた。深麻酔下にて、ニューロモデュレーション用刺激電極を使って電気刺激 (240 μ s/60Hz) を 6 時間行った。電気刺激後一時間たったのち、完全に神経障害性疼痛モデル動物が麻酔から覚醒しているのを確認し、von Frey filament による機械刺激による坐骨神経支配領域 (足底部皮膚) の逃避反射閾値を測定した。神経結紮後の足底部への機械刺激に対する逃避反射閾値が 4 ± 1 g だったのに対し、6 時間の電気刺激後では逃避反射閾値が約 20.5 ± 5.5 g となり、有意に逃避反射閾値の低下が抑制された ($P < 0.05$)。

さらに、ニューロモデュレーション用刺激電極を使った電気刺激 (240 μ s/60Hz) 終了 12 時間後、足底部の von Frey filament による機械刺激に対する逃避反射閾値が 12.5 ± 2.5 g となっており、有意に逃避反射閾値の低下が抑制されていた ($P < 0.05$)。よって、脊髄電気刺激による足底部の機械痛覚過敏抑制効果が刺激終了 12 時間後においても持続していることが確認された。つぎに、深麻酔下にて脊髄後角を露出させたのち、延髄脊髄後角の神経細胞から足底部皮膚への機械刺激に反応する単一神経活動を導出し、触刺激、侵害刺激 (ピンチ刺激) 足底部皮膚への von Frey filament による機械刺激に対する脊髄後角の侵害受容ニューロン応答性変化を詳細に検索した。足底部皮膚への触刺激に対する侵害受容ニューロンの応答性は無処置ラットの脊髄後角から導出された侵害受容ニューロン応答性と有意な差は認められなかった。さらに、ピンチ刺激に対する侵害受容ニューロンの応答性も無処置ラットの侵害受容ニューロン応答性と有意な差は認められなかった。また、足底部皮膚への von Frey filament による機械刺激に対する脊髄後角の侵害受容ニューロン発火頻度は強度依存的に増強し、無処置ラットの侵害受容ニューロン発火頻度と比較して増加傾向にあったものの有意な侵害受容ニューロン応答性の増強は見られなかった。足底部皮膚へ機械刺激に対する侵害受容ニューロン応答特性は無処置ラットの応答特性と明らかな差異が観察されなかった。以上のことから、片側 L5 脊髄神経の 6-0 絹糸結紮による坐骨神経損傷による神経障害性疼痛モデルにおいて発症する足底部皮膚の機械痛覚過敏は、ニューロモデュレーション用刺激電極を使った電気刺激 (240 μ s/60Hz) によって有意に抑制され、その抑制は脊髄後角の足底部皮膚投射侵害受容ニューロン応答性の可塑的変化が関わっていることが示唆された。次に、坐骨神経障害性疼痛モデルに対して上記の結果から得られた最適なニューロモデュレーション療法 (240 μ s/60Hz) 施行後において脊髄のグリア細胞の特性変化を調べるため、ニューロモデュレーション療法または偽療法施行後、脊髄からスライス標本作製し、ミクログリア活性化状態を免疫組織学的に解析した。坐骨神経損傷後に足底部皮膚への von Frey filament による機械刺激に対する逃避反射閾値が有意に低下したラットにおいて、脊髄への電気刺激 (240 μ s/60Hz) により損傷側脊髄後角表層 (L5) のミクログリアが非損傷側と比較して有意に活性化していた ($P < 0.05$) (図 2)。さらに、最適なニューロモデュレーション療法 (240 μ s/60Hz) 施行後、損傷側脊髄後角表層のミクログリア活性化が有意に抑制された ($P < 0.05$)。これまでの多くの研究から、活性化ミクログリアから放出される様々な分子が二次ニューロンの興奮性を増強し、異常疼痛を引き起こされることが分かっている。この結果は、本研究課題である神経障害性疼痛に対するニューロモデュレーション療法による除痛効果の神経機構の解明に大きく寄与するものである。

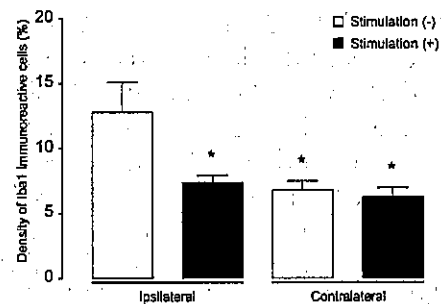


図 2 電気刺激によるミクログリア活性の変化

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

実施研究所名：総合歯学研究所

氏名：篠田 雅路

研究結果 (つづき)

3. 坐骨神経損傷モデルにおけるニューロモデュレーションがもたらす大脳皮質疼痛受容領域の応答変化

本研究では神経障害性疼痛モデルにおける疼痛評価として、後肢に対する刺激応答性を記録した。実験前日に坐骨神経損傷モデルを作製しこれを2群に分けた。すなわち、ニューロモデュレーション用刺激電極（ユニークメディカル社製）を接触させた状態で設置し、実際には電気刺激を行わなかったニューロモデュレーション（-）群と、実際に電気刺激を行ったニューロモデュレーション（+）群の間で応答性の比較を行った。実験当日、ウレタン 1.5 g/kg を腹腔内に投与し全身麻酔を行った。その後、ラットを固定し、頭蓋骨を露出させ、観察野の右側頭蓋骨に開窓を行った。硬膜を除去し膜電位感受性色素の RH-1691 (1 mg/kg) を脳表に処置した。ラットを実態顕微鏡に CCD カメラを装着した MiCAM02 イメージングシステム（BrainVision 社製）に移動し、左側後肢に電極を留置した。視野の大きさは 6.4 mm × 4.8 mm で、電気刺激は 5 V (100 μs) を 20 ms 間隔で 5 回連続して行い、その応答を記録した (図 3)。膜電位感受性色素を用いた光学計測は、その信号が小さく平均加算が必要となり、今回は 40 回平均加算を行った。その結果、ニューロモデュレーションを行った群では応答が小さくなることが示された。

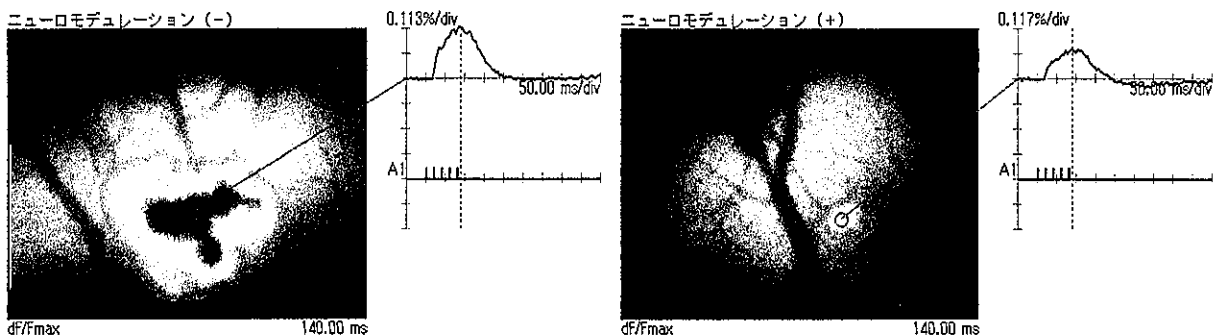


図 3 ニューロモデュレーションによる応答特性

(左に右側頭頂部の脳表と応答 (赤応答大、緑応答小) を示した図を示す。左側が吻側、右側が尾側となっている。右に応答中心部の蛍光輝度強度の経時的な変化 (黒) と刺激のタイミング (赤) を示している。縦の点線で示すタイミングで得られる応答を左図に示している。

次に、坐骨神経損傷モデルにおけるニューロモデュレーションがもたらす大脳皮質応答特性を詳細に解析したところ、ニューロモデュレーションを行った群では最大応答が減弱し、また、応答面積の広がり小さくなる傾向が認められた (最大応答, $P=0.09$; 応答面積, $P=0.29$; $n=6$) (図 4)。これらの結果はニューロモデュレーションによって侵害刺激によって誘発される大脳皮質の応答性が低下する可能性を示唆している。今回行った検討では上記のような傾向が認められるものの、統計学的に有意な差があるとは言えない。その原因として、坐骨神経損傷モデルにおける応答性には大きなばらつきが存在したことによる。このことから、神経損傷によって誘発される侵害受容情報処理機構の変容には個体差が存在すること示唆される。全般的な差を検出するには現在、一般的に行われている例数よりも多く必要となること、さらに応答が大きくなるケースとならないケースにおけるニューロモデュレーションの影響を明らかにするため、ニューロモデュレーションを行う前後での比較実験を行える実験系を立ち上げ、今後の研究を発展させる必要性を示唆している。

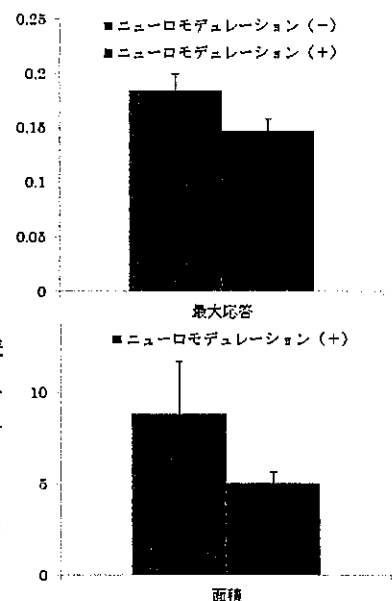


図 4 最大応答と応答面積の比較

平成29年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 30 年 4 月 6 日

日本大学学長 殿

氏 名 今井 健一



所属・資格 歯学部・教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 歯学部 総合歯学研究所

1 研究課題 EBV 関連難治性疾患の発症機序の解明と新規治療法開発に向けた研究拠点形成		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 今井 健一	歯学部/教授	研究の立案と統括
○研究分担者 武井 正美 金子 忠良 八田 善弘 武市 収 北村 登 神尾 宜昌 高井 英樹	医学部/教授 歯学部/教授 医学部/教授 歯学部/准教授 医学部/准教授 歯学部/准教授 松戸歯学部/専任講師	関節リウマチの臨床及び動物モデル研究 EBV 関連リンパ腫と歯周病の免疫組織学的解析 腫瘍化機序の解明と臨床データ解析 EBV 感染細胞の生化学的及び免疫組織学的研究 関節リウマチ関連リンパ腫の臨床研究 EBV の分子生物学的研究 歯周病の臨床及び動物モデル研究
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
1)神尾 宜昌 基盤研究 C: 口腔細菌の制御を基盤としたインフルエンザ予防戦略の確立に向けた基礎的研究 (2018~2020年 採択) 2)高井 英樹 基盤研究 C: miRNA の発現調節による歯周組織構成細胞の分化誘導析 (2018~2020年 採択) 3)今井 健一 研究助成金 (一丸ファルコス株式会社) (2018年 採択)		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (☑/否) いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：歯学部総合歯学研究所

氏名：今井 健一

4 研究目的

歯周病と関節リウマチは、共に骨破壊を伴う難治性の炎症性疾患であるが、未だその病因は解明途上にある。申請者らは、Epstein-Barr virus (EBV)が両疾患の発症に関与し得ることを新たに突き止めた。一方、本邦で初めて見出された老人性びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫は、特にEBV陽性例において予後不良であることが知られているが、その理由は解っていない。また、メトトレキサート(MTX)投与中の関節リウマチ患者に認められるリンパ腫においても、EBVの関与が報告されているが発症機序は不明である。世界に類を見ない早さで高齢化が進むとともに、EBV感染が多いわが国では、いずれの疾患においても罹患率の上昇と重症度の高い患者が増加することは確実で、病因の解明をはじめとする早期の対策が求められている。しかし、EBVはヒトにしか感染しないため通常の動物実験が行えないことから、EBV感染症の個体レベルでの解析や治療法開発に関する研究は世界的に遅れている。

本プロジェクトは、加齢とともに増加するEBV関連難治性疾患の病因解明と新規治療法の開発を目指すことを目的とし、ウイルス学、歯周病学、リウマチ学及び血液・腫瘍学の専門家が研究グループを形成、基礎から動物、臨床研究に至るまで一貫性を持ってEBV研究を進める。1つの病原微生物に焦点を当てた新規性の高い研究であるため、日本大学がEBV感染症研究の拠点となり得る。さらに、研究の推進を通して、大学院生を含む若手研究者の育成と国民の健康増進、ならびにEBVが関与する胃がん等他の悪性腫瘍や潰瘍性大腸炎などの難病研究の発展にも貢献できると考える。

5 研究概要

EBV感染症という共通の特徴を踏まえ、EBV研究に実績のある歯科と医科の研究者が共同で分子生物学的基礎研究から臨床研究、また動物モデル研究に至るまで独自のシステムを構築し研究を進めている。具体的には以下の4つのテーマに取り組んでいる。

1) 歯周病と関節リウマチ患者におけるEBV感染状態と疾患発症との関連性の解明

申請者らは、本邦で初めて歯周病及び関節リウマチの病態進行とともに患部からEBVが検出されること、また世界に先駆けて歯肉と滑膜組織にEBVのRNA(EBER)が認められることを発見し、EBVと両疾患との因果関係を示している。さらに、EBV研究の最重要課題である潜伏感染について研究を進め、その成立と再活性化機構を転写レベルで示した。EBVと両疾患との関連性をより明確にするために、EBVがどのように炎症性疾患の発症に関与をしているのかを基礎・臨床研究により明らかにするとともに、患部におけるEBVのコピー数やウイルス遺伝子を定量し、EBVの潜伏感染状態もしくは活性化レベルとの関連性を調べている。

2) 老人性EBV陽性びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫及びMTX関連リンパ増殖異常症(MTX-LPD)の発症機序の解明

現在、約700症例の老人性びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫の遺伝子及び組織学的解析を進めており、リンパ腫発症と進展に関連する臨床的パラメーターの同定を目指している。がん遺伝子の発現及びM2マクロファージの浸潤と予後不良との関連性、及び予後予測因子の同定を進めている。さらに、日本大学板橋病院の臨床データベース及びオーダーメイド医療プロジェクトで集積した遺伝子データを解析することにより、EBV関連MTX-LPDの発症メカニズムを解明する。

3) ヒト免疫化マウスを用いた疾患動物モデルの開発及びEBVによる歯周病と関節リウマチ発症の証明

超免疫不全マウス(NOGマウス)にヒトCD34陽性細胞を移植し作成したヒト化マウスを作製し、本マウスの顎骨や関節の詳細な解析を進めるとともに、新たにヒト化マウスの歯肉と関節にEBVを局所投与することにより、歯周病と関節リウマチの発症を試みている。本解析により、EBVと両疾患との直接的な因果関係を示す。

本研究の推進により、EBV関連疾患の診断及び新規治療法開発のための分子基盤の構築に繋がることが期待される。

実施研究所：歯学部総合歯学研究所

氏名：今井 健一

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

①歯周病と関節リウマチ患者におけるEBV感染状態と疾患発症との関連性の解明

1) EBV が歯肉上皮細胞にも感染していること、EBV の膜蛋白遺伝子 Latent membrane protein (LMP1)の発現と歯周ポケット深さとが関連していることが示された。そこで今回、LMP1 は炎症性サイトカインを誘導することで、歯周病の発症に関与しているのではないかと推察し実験を行った。その結果、LMP1 の導入により、IL-1 β 、IL-8 及び TNF- α の mRNA 発現上昇が認められた。特に、IL-8 の mRNA の発現は顕著で、LMP1 の導入量及び時間依存的に大量の IL-8 産生が誘導された。また、LMP1 は NF- κ B を活性化すること、DN 型 I κ B α が LMP1 誘導性 IL-8 産生を抑制することが解った。さらに、 Δ LMP1 を用いた実験から、LMP1 の TRAF と TRADD 結合領域が LMP1 による IL-8 産生に必須であることが明らかとなった。今回の結果から、我々は、EBV が歯肉線維芽細胞から IL-6 と IL-8 を誘導することを報告しているが、LMP1 誘導性の炎症性サイトカインが破骨細胞形成を促進する等により歯周病の発症に深く関与していることが示唆された。EBV 関与機構の解明は、これまで細菌感染のみでは説明が困難であった歯周病発症機序の解明に繋がる可能性がある。

2) EBV 感染と病気との関連性をより詳細に調べるために臨床研究を行った。歯周基本治療後に、歯周病変部位での出血(%)およびポケット深さ(mm)の減少が認められ、健常部位と歯周病変部位で EBV DNA ゲノムコピー数の減少が認められた。一方、出血とポケット深さの改善が認められなかった症例では、EBV の減少がみられなかった症例が複数例あった。以上の結果から、基本治療前後の EBV コピー数と、臨床パラメータの改善度に相関関係が示唆された。

さらに、新たにインプラント周囲炎についても研究を開始した。インプラント周囲粘膜炎および周囲炎は、オッセオインテグレーションが達成された機能下のインプラントに、細菌感染や過重負担などの結果生じた周囲粘膜の炎症性病変または骨の吸収を伴う炎症性疾患である。インプラント周囲溝における EBV と *P. gingivalis* の検出を real-time PCR 法を用いて行った。その結果、*Porphyromonas gingivalis* と EBV の両方が検出されたのは、健常 PPD の 0ヶ所 (0%)、3 mm 以下のインプラント周囲溝 14 部位中 2ヶ所 (14.2%)、5 mm 以上のインプラント周囲溝 14 部位中 12ヶ所 (85.7%) と、深い周囲溝で最も高い値となった。本結果は、EBV と細菌が共存して周囲組織の破壊に関与していることを示唆する。

3) 根尖性歯周炎を引き起こす原因菌である *Porphyromonas endodontalis* の代謝産物により EBV が再活性化されることを明らかにするため、EBV 感染細胞を用いて EBV 再活性化のシグナルとなる BZLF1 活性および ZEBRA (BZLF1 蛋白)の発現を実際の患者サンプルを用い検索した。その結果、*P. endodontalis* の培養上清中から酪酸を検出し、その培養上清を添加した EBV 感染細胞から BZLF1 活性 (Luciferase assay)および BZLF1 の発現 (Real-time PCR 法)を認め、Western blot 法により ZEBRA の発現を認めた。EBV 感染細胞に *P. endodontalis* の培養上清を添加したところ、EBV 再活性化のシグナルである BZLF1 活性と発現および ZEBRA の発現を認めたことから、歯根肉芽腫内の *P. endodontalis* が EBV を再活性化させる可能性が示唆された。また、*Fusobacterium nucleatum* と EBV 量、及び *F. nucleatum* と BZLF-1 の検出量の間に関連性が認められることも見出した。

②老人性EBV陽性びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫及びMTX関連リンパ増殖異常症 (MTX-LPD) の発症機序の解明

1) びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) の高齢者は予後不良である。2008年のWHO分類では高齢性EBV陽性DLBCLが予後不良疾患として独立した。最近では必ずしもEBVの存在が予後を規定するわけではないと報告されており、他の因子が予後を規定していると考えられた。われわれは比較的均一な治療 (R-CHOP療法) が行われた大規模な高齢者DLBCL集団で臨床的なパラメータから予後因子を解析した。

実施研究所名：歯学部総合歯学研究所

氏名：今井 健一

その結果、高齢者 DLBCL では年齢、アルブミン値、Charlson Comorbidity Index が予後因子となることを明らかにした。

現在、血管内大細胞性リンパ腫 (IVL) における EBV 感染とがん遺伝子及び染色体転座との関連性について研究を進めている。

2) EBV 陽性患者における骨粗鬆症の検索・ EBV が破骨細胞を刺激する可能性が示されている。EBV 関連リンパ腫の発症にはある程度の期間 EBV が感染していたと考えられるので、感染による破骨細胞活性化で骨密度が減少している可能性を推察し、EBV 感染リンパ腫と非感染リンパ腫で骨密度 (腰椎正面 age matched) を測定した。ステロイドが長期に投与されていた EBV 陽性リンパ腫 1 例で骨密度がやや低かったが、全体的に大きな差は認められなかった (EBV 陽性例の平均骨密度 111.5%、EBV 陰性・不明例の平均骨密度 118.7%)。現在、解析数を増やすと共に、詳細な解析を進めている。

③ヒト免疫化マウスを用いた疾患動物モデルの開発及び EBV による歯周病と関節リウマチ発症の証明

1) EBV は成人のほとんどに感染しているが、異常増殖により悪性リンパ腫や上咽頭癌などを引き起こす。EBV は霊長類のみにしか感染しないため、動物実験が困難である。この点を克服するため、超免疫不全マウス (NOG マウス) をヒト化した後、EBV を感染させたマウスが実験に用いられている。EBV 陽性のリンパ増殖性疾患は予後不良であるにも関わらず、*in vivo* における解析が遅れているため、発症機序含め不明な点が多い。有効薬がないことから研究の発展が急務である。そこで今回、1) NOG マウスを用い EBV 陽性悪性リンパ腫モデルマウスの作成を試み、2) 実際のヒト悪性リンパ腫との類似性を主に免疫染色及び分子生物学的手法を用いて解析することにより、モデルマウスとしての有用性を検討した。

NOG マウス (実験動物中央研究所) に CD34 陽性ヒト臍帯血を静脈内注射しヒト化させた後、EBV を投与することにより作製した。ヒト組織は、東海大学病院にて EBV 関連リンパ腫と診断された患者の生検組織を用い、各種サイトカイン及び細胞表面抗原を免疫染色解析した。クローナリティの比較検討は、ヒト化マウスの切片より DNA を回収し H 鎖の PCR、及び κ と λ 鎖の免疫染色を行い検討した。

その結果、免疫染色及びクローナリティ解析の結果、本モデルマウスと実際のヒトの EBV 関連リンパ腫は、腫瘍細胞のみならず腫瘍微小環境も非常に類似していた。また、ヒトと同様のサイトカイン (IL-10 や TNF α 等) 及び CD163 陽性のマクロファージがリンパ腫の発症と進行に関与していることが示唆された。従って、本モデルマウスは EBV が関連する発癌メカニズムの解明のみならず、新規治療薬の開発のために有用であると考えられた。

2) われわれは、ヒト臍帯血由来幹細胞を NOG マウスに移植し、そこに EBV を感染させる事でびらん性関節炎の発症を引き起こし、従来では考えられなかった RA モデルマウスの確立と以前より追求していた EBV と関節リウマチの関連性を動物実験レベルで証明した。今までヒト化 RA のモデルは証明された事がなくこのモデルマウスを使用する事によって、初めてヒトのびらん性関節炎の発症の解析を行う事が可能となった。今回、このモデルマウスの関節炎評価を組織学的検討で行うと共に、関節炎の主たる原因の 1 つであるマクロファージが関節破壊にどの様に関与するかを検討した。また、EBV 感染 NOG マウスはさらに高濃度の EBV を感染させるとリンパ腫を発症することが証明されている。我々もびらん性関節炎を発症する 50 倍の濃度の EBV を感染させリンパ腫を発症させることを証明している。一方メソトレキサート (MTX) は関節リウマチ (RA) の第一選択薬として知られているが、MTX 投与によりリンパ増殖性疾患 (LPD) が発症する事が報告されている。その発症に EBV が関与していると言われているが、現在そのメカニズムを直接証明したものはまだ認められていない。そこで、びらん性関節炎を来す濃度の EBV を感染させた NOG マウスに MTX を投与し、LPD の発症の有無も確認する。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

実施研究所名：歯学部総合歯学研究所

氏名：今井 健一

またこのマウスはヒト造血幹細胞を移植して作製されているため B 細胞、T 細胞、NK 細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞などヒト免疫系の主要細胞が分化、作動するため、MTX に LPD がどのようなメカニズムで発症するかをヒトの免疫系で検討した。

実験の結果、EBV 感染マウスにおいては、全例で大腿骨遠位部後面関節辺縁の滑膜起始部に、骨びらんを伴う関節炎が認められた。それに対して、同週経過後に検討した EBV 未感染マウスは、いずれにおいても骨びらは観察されなかった。膝関節骨びらん部における破骨細胞形成を主に免疫染色にて検討した結果、EBV 感染マウスの膝関節組織骨びらん部には多核細胞が複数存在し、その多核細胞は TRAP 染色で陽性を示すとともに、ヒト cathepsinK が陽性であった。さらに、骨髄培養細胞の中には大型の多核細胞が認められ、それら細胞は、TRAP 染色、そして抗ヒト特異的 cathepsin K 抗体を用いた免疫染色にそれぞれ陽性を示し、破骨細胞のマーカーを有することがわかった。さらに、ヒトミトコンドリアに対する特異抗体を用いた免疫染色にも、上記多核細胞は陽性を示した。

MTX 関連開先においては、MTX を投与した EBV 感染 NOG マウスでは少数ではあるが、脾臓、肝臓内に異型性の高いリンパ球浸潤を認め、リンパ腫の発症を疑わせる所見が見られた。しかし、その頻度は低く、MTX を投与した全てのマウスにリンパ腫が発症したと言う事ではなかった。

また、EBV 感染後 4 週目、8 週目と解剖時に採血を行い、末梢血の EBV 量をリアルタイム PCR で測定し、MTX 投与群、非投与群での末梢血での EBV の変動を確認した。MTX 投与、非投与群の EBV 感染 NOG マウスの末梢血の EBV の DNA を測定したが、末梢血内には EBV はほとんど検出されなかったが、解剖直前のマウスでわずかに EBV が検出されたマウスが存在した。今年度、詳細な解析を進めていく。

課題番号	総17-019
------	---------

平成29年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成30年 4月 20日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 小方 頼昌



所属・資格 松戸歯学部・教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 松戸歯学部口腔科学研究所

1 研究課題		
歯周病の発症と進行への miRNA の役割の解明		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 小方 頼昌	松戸歯学部・教授	研究立案、細胞培養と総括
○研究分担者 鈴木 直人 中山 智宏 田邊 奈津子 中山 洋平 鈴木 由紀 神尾 宜昌 目澤 優	歯学部・教授 生物資源科学部・教授 歯学部・准教授 松戸歯学部・専任講師 生物資源科学部・専任講師 歯学部・准教授 松戸歯学部・助教	パスウェイ解析、遺伝子データベース解析 遺伝子データベース解析 ELISA、ウエスタン解析 免疫組織化学的解析、ルシフェラーゼアッセイ マイクロアレイ解析、DNA抽出 トランスフェクション実験、ELISA 免疫組織化学、リアルタイムPCR、細胞培養
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 否 いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：松戸歯学部口腔科学研究所

氏名：小方 頼昌

4 研究目的

歯周病のリスク因子である、細菌、宿主、環境因子は、複雑に絡みあい歯周病の発症と進行に関与する。MicroRNA (miRNA) は、長さ約 22 塩基の 1 本鎖 RNA で、標的遺伝子の発現を抑制するノンコーディング RNA であり、発生、形態形成、細胞増殖、ガン、炎症等の疾患に関与する。日本人の中等度～重度慢性歯周炎に、Toll-like receptor 4 (TLR4) 遺伝子の+3725 塩基対部位に存在する 1 塩基多型が関与する可能性が報告された (Fukusaki *et al.*, J Periodont Res, 42: 541-545, 2007)。我々は、TLR4 遺伝子の+3725 塩基対部位の 1 塩基多型は、3'側非翻訳領域 (3'-UTR) に有り、同部位への miRNA の結合を介して TLR4 の発現量と歯周炎の発症に関連することを報告した (Sato *et al.*, J Biol Chem, 284: 25163-25172, 2012)。本研究では、歯周炎の発症と進行に関与する miRNA の検索とそのメカニズムを解明するために、炎症歯肉と健康歯肉で発現する遺伝子の違いをマイクロアレイで検索する。*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学を併用して、歯周炎発症と進行に関与する遺伝子と miRNA を同定し、新たな診断基準となる病因論の解明と新規治療法開発に向けた分子基盤を構築する。

miRNA マイクロアレイと DNA マイクロアレイに、同じ全 RNA を使用することにより、歯周炎歯肉組織中で発現が変化する miRNA と遺伝子を網羅的に解析するとともに、歯周炎の発症と進行に関与する miRNA と遺伝子を同定し、相互関係を解明できることが、本研究の学術的な特徴である。また、炎症性歯肉中の miRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで、関連タンパク質発現を、免疫組織化学で解析することで、miRNA と炎症関連タンパク質の局在および発現細胞を明らかにすることができる。miRNA は、遺伝子発現を抑制することから、miRNA がどのようなメカニズムで歯周病に関与するのか (直接的、間接的に種々の遺伝子発現を介して関与するのか?) の解析が困難であることが予想される。しかし、miRNA と DNA マイクロアレイ解析後に、GeneSpring GX を用いてデータ解析し、さらに、遺伝子ネットワーク、情報伝達系のデータベースである Ingenuity Pathways Analysis (IPA) で解析することで、歯周炎の発症と進行に重要な遺伝子ネットワークおよび情報伝達系を解明することを最終的な目的とする。歯周病と miRNA の関係に関する研究は少なく、独創的で、意義は大きく、成果が期待できると思われる。

5 研究概要

歯周炎の発症と進行に関与する miRNA の働きを解明するため、多角的に系統立った研究を以下の様に進める。

- (1) 歯周炎で発現が変化する miRNA を、炎症および非炎症性歯肉を用いた miRNA マイクロアレイで解析し、その解析結果を、リアルタイム PCR で定量的に再確認する。
- (2) miRNA マイクロアレイ解析と同じ全 RNA を使用して、DNA (エクソン発現解析用) マイクロアレイを行い、その結果をリアルタイム PCR で定量的に再確認する。
- (3) 2つのマイクロアレイの結果から、歯周炎で発現が変化する miRNA と関連遺伝子を、GeneSpring GX ソフトウェアおよび遺伝子ネットワーク、情報伝達系を解析できるデータベースの Ingenuity Pathways Analysis (IPA) を用いて炎症と関連する遺伝子ネットワーク、情報伝達系を解析する。
- (4) 炎症歯肉組織で増加または減少した miRNA 遺伝子を挿入した発現プラスミドを構築し、細胞内で miRNA を過剰発現させる。または、miRNA インヒビターを用いて miRNA の発現を抑制し、さらに炎症性サイトカインで刺激することで、炎症歯肉組織内の環境を再現し、炎症関係遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR で解析する。タンパク質発現に関しては Western Blot を用いて解析する。
- (5) 歯周外科手術時に切除除去した炎症性歯肉中の miRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) で解析する。miRNA の作用で発現が変化する関連タンパク質発現は、免疫組織化学で解析する。歯肉組織中の miRNA と炎症関連タンパク質の局在および発現する細胞を明らかにする。
- (6) 以上の研究成果を総合し、新たな診断基準の基となる病因論の解明と新規治療法開発に向けた分子基盤を構築する。

実施研究所：松戸歯学部口腔科学研究所

氏名：小方 頼昌

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

我々は、これまで骨芽細胞の分化に関与する転写因子の働きとその発現変化に興味を持ち、研究を続けてきた。その中で、骨芽細胞の分化に重要な働きを持つ、塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF2) と cAMP 刺激による、細胞内転写因子と骨シアロタンパク質 (BSP) の発現変化に関して報告した (Shimizu *et al.*, J Biol Chem, 276: 5459-5466, 2001. Samoto *et al.*, J Biol Chem, 278: 28659-28667, 2003. Shimizu *et al.*, Bone, 39: 42-52, 2006)。さらに、DNA マイクロアレイを用いて、骨芽細胞に対する FGF2 と cAMP の効果を網羅的に解析して報告した (Nakayama *et al.*, J Oral Sci, 54: 251-259, 2012)。これらの研究を通して、マイクロアレイテクニックを習得した。また、歯周外科手術時に切除除去した炎症性歯肉とインプラント手術時に切除した非炎症性歯肉から全 RNA を抽出し、両歯肉組織での miRNA の発現量の違いを miRNA マイクロアレイで解析した。炎症性歯肉で最も発現が増加した3つの miRNA は、miR-150、miR-223 および miR-200b であった。一方、最も発現が減少した3つの miRNA は、miR-379、miR-199a-5p および miR-214 であった (Ogata *et al.*, J Oral Sci, 56: 253-260, 2014)。韓国のグループから、炎症および非炎症性歯肉を比較した同様の解析結果が報告されたが、炎症性歯肉組織で発現が増加または減少した miRNA は、我々の解析結果と全く異なる結果であった (Lee *et al.*, Biocell, 35: 42-49, 2011)。一方、中国と米国のグループからの解析結果は、miR-223 に関して我々の解析結果と共通していた (Xie *et al.*, Int J Oral Sci, 3: 125-134, 2011, Stoecklin-Wasmer *et al.*, J Dent Res 91; 33-38, 2012)。miR-223 は、血小板から分泌され、終末糖化産物により誘導される血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こし、ガン、炎症、2型糖尿病、リウマチ、自己免疫性疾患等に関与することから、歯周病への関与が示唆される。miR-150 の過剰発現は、インバリアント NKT (iNKT) 細胞の減少を引き起こす。リウマチ、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症等の自己免疫性疾患では、iNKT 細胞の減少が認められることから、miR-150 の自己免疫性疾患への関与が示唆される。2型糖尿病マウスの血管平滑筋細胞 (VSMC) では、炎症性サイトカインと miR-200 の発現が増加しており、miR-200b は E-box 結合転写抑制転写因子である Zeb1、NFκB 複合体の阻害剤である IκB タンパク質をリン酸化する IKKβ を抑制し、炎症反応を調節すると考えられる。

miR-223 または miR-200b 発現プラスミドをヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に導入し、IL-1β (1 ng/ml) または TNF-α (10 ng/ml) で 24 時間刺激後、全 RNA およびタンパク質を抽出した。炎症性サイトカインである IL-1β および IL-6、miR-223 の標的遺伝子である IκB kinase α (IKKα) および mitogen-activated protein kinase phosphatase 5 (MKP-5)、miR-200b の標的遺伝子である IKKβ、Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1)、Cadherin1 (CDH1)、Cyclooxygenase 2 (COX-2) の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR で、タンパク質発現レベルを ELISA またはウエスタンブロット法で検索した。

HGF を IL-1β または TNF-α で刺激すると、IL-1β と IL-6 の mRNA 量は増加し、miR-223 を過剰発現させると、IL-1β と IL-6 の mRNA 量はさらに増加した。HGF での IL-1β と IL-6 の mRNA 量は、IL-1β または TNF-α 刺激で増加し、miR-223 インヒビターを導入すると、IL-1β および IL-6 の mRNA 量は減少した。HGF を IL-1β 刺激し miR-223 を過剰発現させると、IL-1β および IL-6 タンパク質の顕著な増加が認められた。

miR-223 の標的遺伝子である MKP-5 の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現させると減少したが、IKKα の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現しても変化しなかった。しかし、Western blot の結果から、miR-223 を過剰発現させると IKKα のタンパク量は減少した。また、miR-223 の過剰発現で、p38MAPK のリン酸化が促進された。

以上の結果から、miR-223 は IKKα の発現を、mRNA の分解ではなく、翻訳阻害のプロセスで発現を抑制すると考えられた。IL-1β と TNF-α 刺激で増加した IL-1β および IL-6 の発現は、miR-223 が NF-κB の活性を抑制する IKKα と p38MAPK のリン酸化を抑制する MKP-5 を阻害することで、さらに増加したと考えられた (Matsui and Ogata, Effects of miR-223 on expression of IL-1β and IL-6 in human gingival fibroblasts. J Oral Sci, 58: 101-108, 2016)。

実施研究所名：松戸歯学部口腔科学研究所

氏名：小方 頼昌

研究結果（つづき）

(Ogata *et al.*, MicroRNA expression in inflamed gingival tissues and the effects of miR-223 on expression of inflammatory cytokines in human gingival fibroblasts. 12th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting. 22~24 Sep 2017, Seoul, Korea)

HGF を IL-1 β 、IL-6 または TNF- α で刺激すると、miR-200b の発現量の増加が認められた。この結果は、炎症歯肉と健康歯肉を比較した miRNA マイクロアレイの結果と一致した。HGF を IL-1 β または TNF- α で刺激すると、IL-6 と IL-1 β の mRNA 量およびタンパク質発現量は増加したが、両刺激と同時に miR-200b を過剰発現させると、増加した IL-1 β と IL-6 の mRNA 量およびタンパク質発現量は部分的に有意に抑制された。HGF を IL-1 β または TNF- α 刺激すると、IL-6 の mRNA 量およびタンパク質発現量は増加し、miR-200b インヒビターを導入すると、IL-6 の mRNA 量およびタンパク質発現量はさらに増加した。

HGF を IL-1 β または TNF- α で刺激すると、miR-200b の標的遺伝子である IKK β の mRNA 量は増加するが、miR-200b を過剰発現させると有意に減少し、miR-200b インヒビターの導入でさらに増加した。IKK β のタンパク質量をウエスタンブロットで解析した結果、IKK β のタンパク質量は miR-200b の過剰発現で減少し、miR-200b インヒビターの導入で増加した。ZEB1 mRNA 量およびタンパク質発現量は、miR-200b の過剰発現で減少し、E-カドヘリン mRNA 量およびタンパク質発現量は、miR-200b の過剰発現で増加した。また、COX-2 mRNA 量は、miR-200b の過剰発現で抑制された。

以上の結果から、miR-200b は IKK β 、ZEB1 および COX-2 の発現を抑制し、E-カドヘリンの発現を増加させた。IL-1 β と TNF- α 刺激で増加した IL-1 β および IL-6 の発現は、miR-200b が NF- κ B の活性化を促進する IKK β を抑制したことから、減少したと考えられた。さらに、ZEB1 および COX-2 の発現が減少することで、炎症反応が抑制されると考えられる。

(Ogata *et al.*, Effects of miRNAs on the expressions of inflammatory cytokines in human gingival fibroblasts. American Academy of Periodontology, 9~12 Sep 2017, Boston, USA. 小方 頼昌 ヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 発現への miR-200b の影響 第 61 回春季日本歯周病学会 2018 年 6 月 1~2 日、東京. Ogata *et al.*, MicroRNA expression in inflamed gingival tissues and effects of miR-200b on the expression of Interleukin-6 in human gingival fibroblasts. EuroPerio9 20~23 June 2018, Amsterdam)

接合上皮は、ヘミデスマゾームを介してエナメル質に付着する非角化の歯肉上皮であり、ポケット底部に接するため、細菌感染のバリアーとしての機能を有すると考えられる。しかし接合上皮に発現するタンパク質やそれらの機能についてはほとんど解明されていない。近年、接合上皮に発現するタンパク質として amelotin (AMTN)、odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM)、follicular dendritic cell secreted protein (FDC-SP) 等が発見されている。我々は、接合上皮での AMTN、ODAM および FDC-SP の発現と局在が炎症に伴い変化することを免疫組織化学的に解析した(Nakayama *et al.*, *Odontology*, 105: 329-337, 2017)。また、ヒト上皮細胞での AMTN の遺伝子発現は炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 β で上昇すること、FDC-SP の遺伝子発現は、TNF- α で増加するが IL-1 β ではほとんど増加しないことを報告した (Yamazaki *et al.*, *Inflamm Res*, 67: 351-361, 2018. Iwai *et al.*, *Genes Cells*, 23: 161-171, 2018. Noda *et al.*, *J Oral Sci*, in press, 2018. Yamazaki *et al.*, *FEBS Open Bio*, in press, 2018)。現在、接合上皮発現タンパク質の機能を解析するために、炎症時の AMTN、ODAM、FDC-SP 遺伝子およびタンパク質の発現が miRNA によってどの様に調節されているかの解析を行っている。


課題番号	総 17-024 継続 総 16-023
------	----------------------------

注：課題番号を記入してください。

平成 29 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 30 年 4 月 2 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 井上 菜穂子 

所属・資格 生物資源科学部・専任講師

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 生物資源科学部 生命科学研究所

1 研究課題 捕食者誘導型骨格筋肥大メカニズムの解析		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 井上 菜穂子	生物資源科学部・専任講師	研究計画立案・質量分析イメージング
○研究分担者 森 司 柳澤 幸雄 朝比奈 潔 早川 智 野呂 知加子 鈴木 佑典	生物資源科学部/教授 生物資源科学部/教授 生物資源科学部/教授 医学部/教授 生産工学部/教授 理工学部/准教授	飼育実験と遺伝子解析担当 実験計画法立案担当 組織学実験担当 組織化学解析担当 プロモーター解析担当 質量分析担当
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
<p>科学研究費 若手研究 H30 不採択</p> <p>研究代表者：井上 菜穂子</p> <p>研究科題名：カエル幼生をモデルとした骨格筋メタボロミクスによる筋肥大化メカニズムの解明</p>		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (可・否) いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：生物資源科学部生命科学研究所

氏名：井上 菜穂子

4 研究目的

一般に骨格筋は運動などのトレーニングにより肥大・増強されるが、本研究で用いるカエル幼生は捕食者と共生させることによるストレスで骨格筋が肥大する。これは古くから知られている生態系の表現型可塑性変化であるが、そのメカニズムは明らかにされていない。

そこで捕食者誘導による骨格筋肥大モデルを用いて骨格筋の代謝物動態を解析し、運動非依存的な骨格筋肥大メカニズムを明らかにすることを目的とする。骨格筋組織が収縮以外のトリガーによって肥大するメカニズムが明らかになれば、運動療法が処方できない高齢者や生活習慣病患者への新たな治療法を提案することが可能である。具体的には

- ①骨格筋内脂質代謝動態の解析
- ②質量分析イメージング法を用いた筋線維タイプ（速筋・遅筋）ごとの脂質組成の解析、
- ③骨格筋の肥大を誘導する物質が含まれるヤゴ水の分析

を計画し、本研究によって運動非依存的な骨格筋肥大の制御プロセスを明らかにする。

差本型



ヤゴ誘導型

図1: エゾアカガエルの捕食者誘導モデル

5 研究概要

骨格筋は、体内の糖・脂質代謝において重要な臓器であり、その生理機能には脂質が重要な役割を担っていることが判っている。ヒトでは骨格筋に蓄積する脂質の「質」によってインスリン感受性が大きく変化することが知られている。例えば、中鎖脂肪酸はインスリン感受性を低下させるが、高度不飽和脂肪酸は逆に上昇させる (Cell. 2010 3;142(5):687-98.)。よって骨格筋脂質の「質」に着目した解析の重要性が示唆されている。しかしながら骨格筋は脂質代謝特性の異なる線維（遅筋・速筋）が混在しており、脂質代謝をとらえるのが大変難しい組織である。すべてをすりつぶして行う従来の手法では、骨格筋の機能と脂質代謝の関連性を議論することが困難であった。本研究の特徴である質量分析イメージングは、切片上で筋線維ごとの脂質分子種組成を明らかにすることができる唯一の手法であり、すでに申請者は筋線維タイプによってことなる脂質代謝動態について解析を行っている優位性をもつ。本法は切片上で筋線維ごとの脂質分子種組成を明らかにすることができる唯一の手法であり、骨格筋脂質代謝研究を飛躍的に前進させる可能性をもつ。

糖尿病をはじめとする生活習慣病の予防・治療の第一選択に運動療法があげられているように、骨格筋の主要な働きは運動（収縮）することによる糖・脂質代謝の亢進及びそれに付随するエネルギー産生にある。しかし加齢等に伴い骨格筋が萎縮すると、これらの働きが減退する。そこで、Quality of life (QOL)の向上のためにも、骨格筋の肥大、及びその筋量の維持は大変重要なテーマとなっている。しかし、実際はどのように筋肥大がおこるのか、そのメカニズムについては不明な点が多い。そのメカニズムを明らかにするために、薬剤や運動負荷による骨格筋肥大モデルは複数開発されてはいるが、その反応は概ね不可逆的である。一方、我々のモデルでは可逆的に骨格筋が再構成する。よって骨格筋組織の可塑性を解析することのできる最適なモデルであると考えている。また両生類の脂質組成についての研究はそもそも新規性が高い。

両性類における脂質代謝物の解析はこれまでに例がないので、まずは一般的なりピドミクスや質量分析イメージングの手法を用いた脂質代謝物の網羅的な解析をもとにした代謝物マップの作成を目指す。

その後、捕食者ストレス誘導型の骨格筋肥大モデルをエゾアカガエル及びネッタイツメガエル (*X. tropicalis*) で作成し、前述の脂質マップから特徴的な挙動を示す分子を抽出する。さらにはこれらの表現型を誘発するであろうヤゴ由来の生理活性物質を同定し、運動非依存的に起こる骨格筋再構成のメカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

実施研究所：生物資源科学部生命科学研究所

氏名：井上 菜穂子

6 研究結果 (4,000字以上記入してください)

H29年度の研究項目は下記の5つであった。以下にそれぞれの項目ごとの進捗状況を述べる。

① 捕食者ストレス誘導型骨格筋肥大・萎縮モデルの解析

昨年度確立したモデルの手法を用いて、今回は同様に *X.tropicalis* においても捕食者暴露による飼育実験を行った。前回有意な骨格筋肥大が見えた30日間の共飼育モデルの作出を試みたが、同じように飼育をしたエゾアカガエルに対して、*X.tropicalis* においては骨格筋の顕著な肥大は認められなかった。つまり、エゾアカガエル幼生で見られる顕著な表現型の可塑性は、同じ生態系に属するもので顕著である、ということがわかった。しかし、これまでの先行研究より、捕食者ストレスによって変化する遺伝子変化は共通している可能性がある。そこで、これらに注目して解析をすることとした。*X.tropicalis* は既にゲノムが2010年に解読されており、比較解析の準備が整っている。一方、エゾアカガエルはいまだ未知の遺伝子が多いため、変化が確認された遺伝子をクローニングすることとした。

② 各モデル特異的な脂質分子種の抽出と脂質代謝疾患モデルとしての応用

③ *X. tropicalis* のゲノム相同性検索

①の結果より、まずはエゾアカガエル幼生で捕食者暴露、特に今回はヤゴによる暴露で変化する遺伝子に着目し、そのクローニングを試みた。これまでの先行研究より (Mori T et al. BMC Genomics 2015)、ヤゴ暴露によってエゾアカガエル幼生の尾部で Solute carrier family 22 member 5 (carnitine transporter; OCTN2) の遺伝子が有意に発現増加することが示されていた。しかし、このとき推定された遺伝子はヒトの遺伝子情報を元に UniProt (<http://www.uniprot.org/>) より抽出した情報にすぎず、エゾアカガエルの尾部に本当に OCTN2 が発現しているのか、またその遺伝子配列の類似性がヒトと比較して妥当なのかはわからなかった。そこで今年度は、OCTN2をはじめ、その上流で脂質代謝に関連する各種遺伝子

(PGC1 α , PPAR α , SREBP1) 及び、骨格筋に関わる遺伝子 (Myh7b, Myh4), 骨格筋の肥大・萎縮に関わる遺伝子 (Atrogin1) のクローニングを試みた。その結果、SREBP1 以外の遺伝子については部分配列を得ることができ、それぞれの遺伝子の相同性について、*X.tropicalis* 及びヒトと確認をしたところ、高いものは80%

以上の相同性が確認された (Table 1)。現在は OCTN2 の完全長クローニングを試みると同時に、Realtime-PCR 法を

	Atrogin 1	PGC1 α	PPAR α	MHC 4(fast)	MHC 7(Slow)
<i>X. Laevis</i>	83.3%	100.0%	82.5%	86.3%	71.6%
<i>X. Tropicalis</i>	83.3%	-	99.5%	87.3%	71.6%
Homo Sapiens	75.4%	77.4%	58.8%	80.6%	72.8%
<i>Rattus norvegicus</i>	73.8%	77.0%	63.3%	79.4%	73.0%

用いて、捕食者暴露による変動を観察する予定にしている。ここで変動が確認できれば、捕食ストレスが尾部骨格筋における脂質代謝を制御している可能性が示唆される。

骨格筋の脂質代謝変動を議論する際に、その骨格筋の筋タイプを同定することが重要である。骨格筋には糖代謝を基本として瞬発的な収縮が得意な速筋と、脂質代謝を基本として、持久的な収縮が得意な遅筋に分かれる。両生類の場合、幼生の間は速筋しか存在していないとされ、特にカエルの報告では、成体に変体後、雌の咽頭筋にのみ、遅筋が発現するとされている (Dev Genes Evol. 2008)。しかし、今回捕食者ストレスで発現が上昇しているとされる OCTN2 は、ミトコンドリアにおける β 酸化に関連するカルニチンの輸送体であり、骨格筋でいうと、遅筋に豊富に含まれているタンパク質である。つまり、今回、捕食者ストレスによって、カエル幼生の尾部骨格筋が、速筋タイプから遅筋タイプに変化した可能性が考えられる。そこで、カエル幼生の遅筋 (Myh7b) と速筋 (Myh4) のマーカーとなる遺伝子のクローニング及び、筋線維タイプの変化を観察するために、特異的抗体の選別なども行っている。

実施研究所名：生物資源科学部生命科学研究所

氏名：井上 菜穂子

研究結果 (つづき)

④ ヤゴ水に含まれる骨格筋増強因子の分析と調節領域に結合する物質の検索

昨年度の研究により、ヤゴ由来の生理活性因子がヤゴの尿に存在している可能性を確認するため、本年度はヤゴ尿からの低分子代謝物の抽出を試み、その抽出物をLC-MSによって解析に供した。また、それ以外にも、従来から生理活性が確認されていたヤゴ水だけでなく、ヤゴ尿添加のヤゴ水、また、限外ろ過により高分子タンパク質を除去したヤゴ尿、沸騰によってタンパク質変性を起こしたヤゴ尿など複数のヤゴ尿を作成し、生理活性の計測を行った。現時点ではまだNが足りず、有意な結果はえられていないが、おそらく、ヤゴ尿に存在する何らかの低分子代謝物がエゾアカガエルの活動量低下にみられる生理活性を持っていることがわかった。現在は、これらのLC-MS解析により、物質の同定を試みている。

現時点でわかっているヤゴ尿のLC-MS解析結果からは、ヤゴ自身の生理反応による様々な低分子代謝物の検出ができています。特にヤゴ尿の活性は飢餓状態のヤゴ由来尿の活性が高いことが知られていることから、飢餓時に顕著に高値を示す物質に着目し、絞込みを検討している。

原著論文

1. Visualization of lipids in skeletal muscles by mass spectrometry imaging
Goto-Inoue N, Sato T, Fujii NL.
J Phys Fitness Sports Med, 査読あり 6 (4): 001-005 (2017)
2. Utilizing mass spectrometry imaging to map the thyroid hormones triiodothyronine and thyroxine in *Xenopus tropicalis* tadpoles
Goto-Inoue N, Sato T, Morisasa M, Kashiwagi A, Kashiwagi K, Sugiura Y, Sugiyama E, Suematsu M, Mori T. Anal Bioanal Chem. 査読あり 410(4):1333-1340. (2018) IF=3.431

学会発表

1. 動物医学研究センターセミナー 2017 Jun Fujisawa (招待講演)
質量分析イメージングによる低分子代謝物の可視化
井上菜穂子
2. 第59回 日本脂質生化学会 2017 Jun 15 Kyoto (口頭発表)
質量分析イメージングを用いた骨格筋肥大時の脂質解析
井上菜穂子、森笹瑞季、柳澤幸雄、朝比奈潔、早川智、野呂知加子、鈴木佑典、森司
3. 日本大学学部連携シンポジウム 2017 Nov Funabashi (口頭発表)
捕食者誘導型骨格筋肥大メカニズムの解析
井上菜穂子
4. 日本大学学部連携シンポジウム 2017 Nov Funabashi (ポスター発表)
魚肉摂餌によるラット骨格筋肥大時の代謝物解析
森笹 瑞季, 佐藤 友彦, 内田 健志, 韓 力, 藤谷 美奈, 宇都宮 さち, 上東 亮太, 岸田 太郎, 森 司, 井上 菜穂子
5. 第64回 日本食品科学工学会 2017 Aug 30 Fujisawa (招待講演)
シンポジウム 最新イメージング技術と食品分野への応用
質量分析イメージングの食品科学分野への応用 井上菜穂子

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

課題番号	総 17-026 継続 総 16-025
------	----------------------------

注：課題番号を記入してください。

平成 29 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 30 年 3 月 15 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 飯島 洋



所属・資格 薬学部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 薬学部 薬学研究所

1 研究課題 抗 COMT 不全薬 -新規腎保護薬を目指して		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 飯島 洋	薬学部・教授	統括、作用機序、構造活性相関
○研究分担者 高宮 知子 齋藤 弘明 丹羽 典朗 小林 弘子 桑田(楠瀬) 隆生	薬学部・専任講師 薬学部・専任講師 薬学部・准教授 薬学部・准教授 松戸歯学部・専任講師	遺伝子組換え 誘導體合成 反応速度論解析 蛋白質化学分析 結晶構造解析
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
申請 平成 30 年度科学研究費基盤(B) 不採択 研究代表者：飯島 洋		
申請予定 ブリストル・マイヤーズスクイブ(株)研究助成 H30 春受付開始 研究代表者：飯島 洋 持田記念財団研究助成 H30 春受付開始 研究代表者：飯島 洋 東京生化学研究会研究助成 H30 夏受付開始 研究代表者：飯島 洋		

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (・否) いずれかを○で囲んでください。

否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：薬学部薬学研究所	氏名：飯島 洋
----------------	---------

4 研究目的

カテコール-O-メチル転移酵素 (COMT) はアドレナリン (NE) や 2-ヒドロキシエストラジオール (2HE) などのカテコール化合物を基質として、その水酸基をメチル化する酵素である。メチル基供与基質は S-アデノシルメチオニン (SAM) である。SAM はメチル基を転移し、S-アデノシルホモシステイン (SAH) に変換される (図 1)。

生体内において SAH はホモシステインから導かれる (COMT 自身が生成する SAH は微量である) が、高い血中ホモシステイン濃度は心血管障害 (心筋梗塞、脳梗塞) のリスクファクターとしてよく知られている。ヒトでは血中ホモシステインと SAH 濃度は比例関係にあるから (Poirier LA. *et al.* Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 2001)、高い血中ホモシステイン濃度は COMT の活性低下に反映されているはずである。高い血中ホモシステイン濃度は COMT 不全 (COMT 活性が抑制) の一因である。(図-2) 近年、COMT の生体内における機能低下が、腎機能低下、血管障害、高血圧などに深く関与していることが明らかにされている (COMT 不全)。

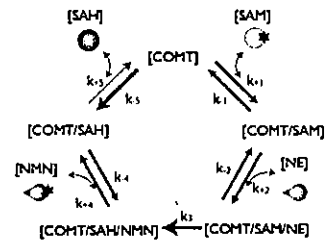


図 1 COMT の触媒サイクル
SAH による生成物阻害の強さは k_5 , k_5 によって決まる。

我々は COMT 不全の解消は、新規の腎臓・心血管系保護作用をもたらすと考え、COMT の賦活化物質の探索を行った。スクリーニングの結果、トリアゾール (TRZ) 系の賦活化化合物とオキサビシクロノナン (OBCN) 系を見出した。本研究の最終目標；複数の研究者の専門性を統合し、(i) OBCN 系化合物の COMT 賦活化機構を実験的数理的に解析し、その結合部位の立体構造を明らかにし、それらの情報に基づいて、(ii) 理論的な分子科学計算を活用することで合理的に現在のリード化合物の活性を高めたリード化合物を合成により創製する。

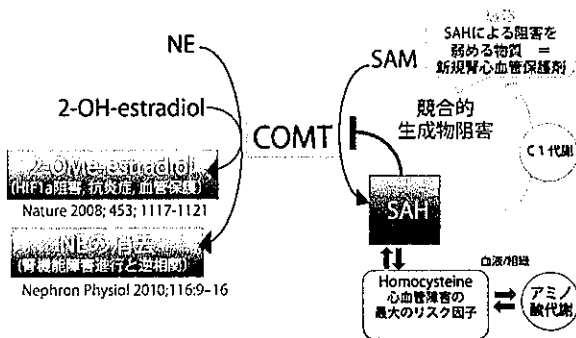


図 2 COMT 不全と賦活化物質

SAH による生成物阻害の解除ができれば NE の消去、2ME の生成増加の両方が達成できる。

5 研究概要

本研究の最終的な目的は、生体内で SAH により抑制されている COMT の活性を解放し、末梢循環中の NE 濃度を低下させ、2-hydroxyestradiol からの 2-methoxyestradiol の生成を向上させる化合物を創製し、COMT の生理条件での制御機構を解明することである。本年度の研究では下記の点について努力した。

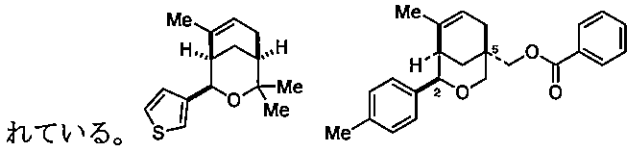
- (1) 高活性化化合物の合成、探索：現在我々は試験管内で COMT を賦活化できる化合物を 2 つ取得している。Oxabicyclononane 系化合物に関しては合成方法を確立できたので、新規化合物の合成を実施した。また、新たな賦活化物質を探索し、従来の化合物よりも EC_{50} が 1/3 の新規骨格を見出した。
- (2) 賦活化メカニズムの理論式の構築：迂回路モデルを提唱してきたが、モデルの理論式を導くことができず、シミュレーションに留まっていた。本研究期間中に非平衡定常状態を簡単に表現するアイデアを得た。迂回路モデルの理論式を構築できた。
- (3) 酵素画分の dimer-monomer 混在への対応：我々が実験に使用している COMT は、遺伝子組み換え大腸菌で発現させたヒト COMT である。これを精製しているが、dimer と monomer の混合であることが、様々な実験結果の解釈を難しくしていた。本研究では分析ゲル濾過クロマトカラムの新規導入により、実験直前、直後の dimer-monomer 比率を 15 分の分析で求めることができるようになった。
- (4) 化合物と COMT の複合体の結晶構造：化合物と COMT の複合体の立体構造が判明すれば、化合物がどのように賦活化をするのかを直接的に証明し、さらに高活性化化合物のデザインにも繋がるので、結晶構造解析は大阪大学タンパク質研究所との共同研究として数年越しの挑戦を続けてきた。本研究では、単なるタンパク質試料の供給者にとどまらず、どういう組成と手順で結晶化を試みるべきかまで踏み込んで検討を加えた。

実施研究所：薬学部薬学研究所	氏名：飯島 洋
----------------	---------

6 研究結果 (4,000 字以上記入してください。)

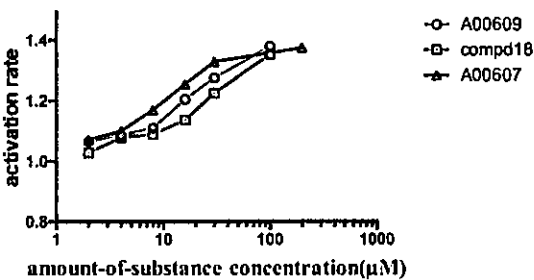
(1) 高活性化合物の合成、探索

(i) Oxabicyclononane 系化合物誘導体を 5 化合物合成した。2 位置換基を変化させた誘導体を合成したが、A00013 を上回る活性を示した化合物は得られなかった。Oxabicyclononane 系化合物はステロイドと類似した立体構造を持っているが、賦活化活性を持つステロイド誘導体の構造活性相関と照らし合わせると、合成誘導体は 5 位置換基が A00013 に比べて小さいことが不利であると想像される。今回の誘導体合成では、5 位方向への構造展開も企画していたが、合成の収率が稼げず、物質を得ることが難しかった。今後は、5 位方向の置換基を検討する方向へ展開する予定である。その方針に従った化合物 1 つがすでに得ら

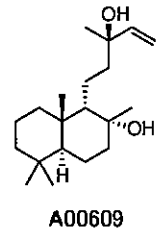


(ii) ステロイド誘導体に賦活化活性があったことから、decaline 系化合物のスクリーニングを実施した。その結果、ジテルペン骨格を有する化合物群に活性があることが判明した。購買可能な化合物のライブラリ (仮想ライブラリ) を検索し、15 個の decaline 系化合物を購入した。その中から、A00607 に A00013

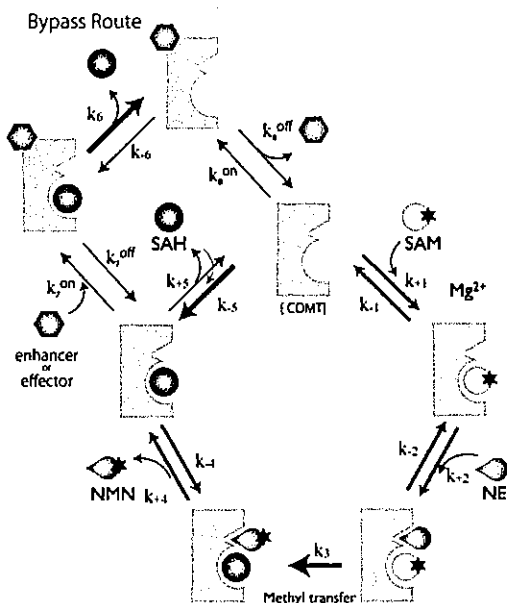
171020_assay45_賦活化率_SAH(-)并齊



や化合物 18 よりも低い EC₅₀ を見出した。図に示した様に、どの化合物も賦活化率は+40%程度で頭打ちになる。酵素反応系に SAH の酵素分解系を共存させた時の賦活化率も 40%程度であり、SAH の除外による賦活化の上限であると想像される。A00607 の EC₅₀ は 30μM であり、現時点でもっとも高活性である。本化合物は購入可能であり、今後、動物実験などを行う点で明るい展望である。



(2) 賦活化メカニズムの理論式の構築



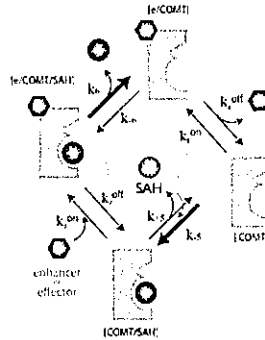
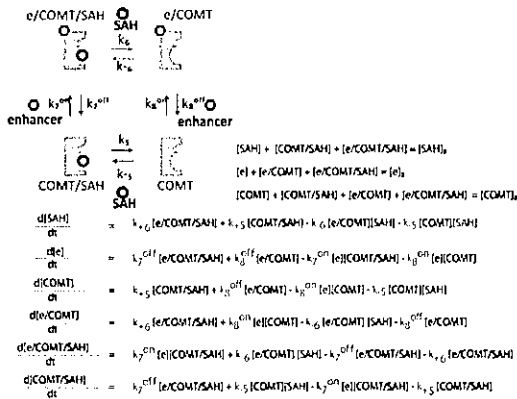
SAH による強い生成物阻害は、COMT/SAH 複合体の乖離定数 $K_d^{SAH} = k_{+5}/k_{-5}$ が小さいことによる。賦活化化合物はこの K_d^{SAH} を大きくすることを、酵素反応速論解析と平衡透析によって実験的に確認している。

迂回路モデルでは賦活化物質 (e: enhancer あるいは effector) の性質を説明するために、反応サイクル中でもっとも安定であると考えられる COMT/SAH 複合体に結合し、e/COMT/SAH 複合体を形成するという仮説に基づいている。通常酵素反応と同様に反応の各段階は定常状態であるとする、(X) の連立方程式が成立するがこの解を求めることはできなかった。その後、検討を続けたところ、定常状態を保つには、ある状態への流入量とその状態からの流出量が同一であればよく、さらに迂回路モデルの様に環状である場合は、その流入/流出量がどこでも一定 (constant net-flux) であることに気がつき、(Y) の式が得られた。これは容易に解くことができ、(Z) のような解を得た。(Z) から分かることは下記のように要約できる。

実施研究所名：薬学部薬学研究所

氏名：飯島 洋

研究結果 (つづき)



$$\begin{bmatrix} k_7^{on}[e] & 0 & 0 & k_7^{on} \\ k_5[SAH] & k_5 & 0 & 0 \\ 0 & k_7^{off}[e] & k_6^{on} & 0 \\ 0 & 0 & k_6 & k_5[SAH] \end{bmatrix} \begin{bmatrix} [COMT] \\ [COMT/SAH] \\ [e/COMT/SAH] \\ [e/COMT] \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} J \\ J \\ J \\ J \end{bmatrix}$$

J ≠ 0, [SAH], [e] >> [COMT]total
J > 0時計回りの flux が起こっている

(X) 速度論に基づく定常状態の論理式

(Y) 非平衡定常状態の考え方による理論式

努力したが複雑で解けなかった。

$$J = \frac{(k_5 k_6 k_7^{on} k_8^{off} - k_5 k_6 k_7^{off} k_8^{on}) [e] [SAH] [COMT]_{total}}{k_7^{on} k_8^{on} (k_6 + k_5 [SAH]) [e]^2 + k_5 k_6 (k_7^{on} + k_7^{off} [e]) [SAH]^2 + \{ k_5 k_7^{on} (k_6 + k_7^{on}) + k_6 k_8^{on} (k_5 + k_7^{off}) \} [e] [SAH] + \{ k_6 k_7^{on} k_8^{off} + k_5 k_8^{on} (k_5 + k_7^{off}) \} [e] + \{ k_5 k_6 k_7^{off} + k_5 k_8^{off} (k_5 + k_7^{off}) \} [SAH] + k_5 k_8^{off} (k_5 + k_7^{off})}$$

分母は共通

$$[COMT]^{free} = \frac{k_6 k_7^{on} k_8^{off} [e] + k_5 k_6 k_7^{off} [SAH] + k_5 k_8^{off} (k_5 + k_7^{off})}{k_7^{on} k_8^{on} (k_6 + k_5 [SAH]) [e]^2 + k_5 k_6 (k_7^{on} + k_7^{off} [e]) [SAH]^2 + \{ k_5 k_7^{on} (k_6 + k_7^{on}) + k_6 k_8^{on} (k_5 + k_7^{off}) \} [e] [SAH] + \{ k_6 k_7^{on} k_8^{off} + k_5 k_8^{on} (k_5 + k_7^{off}) \} [e] + \{ k_5 k_6 k_7^{off} + k_5 k_8^{off} (k_5 + k_7^{off}) \} [SAH] + k_5 k_8^{off} (k_5 + k_7^{off})} [COMT]_{total}$$

(Z) 迂回路モデルの論理式

多くなることを示す。つまり、賦活化物質がある場合は生成物障害を与える SAH がフリーの COMT を増やすことになる。この性質は実験的に観察されていたが、今回論理式として証明できた。

(i) 迂回路モデルでは、flux の流れは、COMT と SAH から COMT/SAH が生じる向きであり、これが賦活化を導く流れである。つまり、生成物障害に関わる賦活化物質が効果を示す場合は、生成物障害があることを利用しているという一見矛盾の感じる流れがある。

(ii) e の濃度が一定である時、フリーの COMT の量は $(a*[SAH]+b)/(c*[SAH]^2 + d*[SAH]+b)$ という式で表現される。この関数の形態は(C)の様になるので、SAH 濃度がある程度の濃度までは、SAH 濃度が高い方がフリーの COMT が

(3) 酵素画分の dimer-monomer 混在への対応:我々はヒト COMT (天然配列に比較し、N 末に 2 残基 Gly-Ser の付加、C 末の 7 残基 Pro-Gly-Ser-Glu-Ala-Gly-Pro の欠落がある。216 残基、24KDa) を pGEX-2 発現ベクター (GE Healthcare 社) により Glutathione-S-transferase 融合タンパクとして大腸菌(BL-21)で生産し、GST 部分を利用した affinity 精製の後、thrombine で GST 部分を切断してイオン交換クロマトグラフィとゲル濾過クロマトグラフィで精製している。同様の構成でラット COMT の発現系 (天然配列に比較し、N 末に 2 残基 Gly-Ser の付加のみ。上記ヒト COMT と同じ長さ。) も有しているが、どちらの COMT も最終精製においても dimer と monomer の混合物として得られた。ゲル濾過クロマトグラフィでは分子量 48KDa と 24KDa の二つのピークとして分離されるが、それぞれの画分 (monomer, dimer) は非常に遅い変換速度で、monomer と dimer の平衡にある。精製酵素画分が均一ではないという制約は長らく様々な実験結果の解釈を難しくしてきた。本研究では、分析用のゲル濾過カラム(Superdex 75 increase 6/150)を導入し、酵素画分の monomer-dimer 比率を 15 分で測定できるようになった。

実施研究所名：薬学部薬学研究所

氏名：飯島 洋

研究結果 (つづき)

その結果、下記の結論を得た。

(i) Monomer から dimer への変化速度は遅く (日の単位)、精製してから 2 日程度ならば dimer の生成は 10%以下である。

(ii) Dimer から monomer への変化速度はそれよりは速く、精製した時点で 10%程度の monomer が発生し、5 日程度経過すると、monomer 65・ dimer 35 程度の比率の平衡に達する。(4℃, 0.5 mg/mL, pH7.4 50mM HEPES, 2mM DTT) このことは、従前の COMT/SAH の結合実験 (平衡透析法、等温熱測定法) で結合部位数 n が 0.6-0.7 であったことと対応するものと解釈できる。

(iii) Monomer 画分と dimer 画分を混合し、その比率を変えて、酵素活性を測定したところ、dimer (monomer 0%へ外挿)には活性がないことがわかった。また、monomer100%の回転数は 11 回/分と見積もられ、従来水準と一致していた。

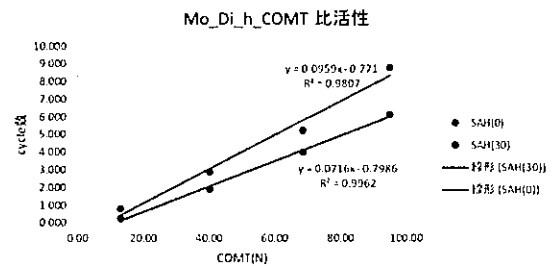
(iv) 賦活化化合物を加えると、30 分程度で、dimer の率が低下し、monomer の比率が上昇した。このことは迂回路モデルにおける e/COMT 複合体の存在で説明できる。ただし、このために見かけの酵素活性が上昇しているのかについては、本研究の本質的な理論基盤に関わることであり、さらなる注意深い検討が必要である。

(v) Monomer からは dimer も生じるが、oligomerの方が生じやすい。Oligomer は変性タンパクであると思われるが、その発生の程度は一般的なタンパク質のレベルである。活性型である monomer が比較的安定であることで安心した。

(4) 化合物と COMT の複合体の結晶構造:複合体の X 線結晶構造解析は数年前から大阪大学タンパク質研究所鈴木守准教授とのタンパク質研究所の共同研究課題としての支援を受けながら進めてきたが難航している。従前は精製タンパク質と化合物溶液をお渡しする一般的な方式であったが、本研究では、より密接な連携のもとで結晶化を試みた。賦活化化合物と COMT の間の結合定数は 104 程度であるとする COMT の濃度も化合物の濃度も高くなくては複合体の形成量には限界があるはずである。そこで、薄い COMT 溶液に可能な限り高濃度の化合物を加え、その溶液を濃縮し、数 mg/mL の濃度まで濃縮した物を結晶化に提供することにした。また、本研究では、従来結晶が得られないのはタンパク質の純度の問題であるかもしれないことも考慮し、COMT の強力な阻害剤であるニテカポンとの結晶化実験も並行して行なっている。阻害剤との結晶構造は本研究の目的ではないが、強い結合定数を持つ化合物となれば複合体結晶が得られたならば、実験に供した COMT タンパクの純度には問題がないことが確認できる。また、ニテカポン/COMT の結晶構造は未知であるので複合体構造解析には科学的な意義もある。薬学部で精製が終わったら、各種条件の酵素/化合物溶液を直ちに大阪大学へ持ち込み、大阪大学で濃縮を行い (dimer の発生を避けるため)、濃縮後速やかに結晶化実験へ持ち込んだところ、ニテカポンとの複合体と期待される結晶が析出した。現在、ビームタイム待ちをしている。

(5) その他の進捗:

(i) ラット COMT の精製を実施し、A00607 による賦活化を検証した。A00607 による賦活化はヒト、ラットの両方に有効である。



酵素画分中の monomer 比率と酵素活性

実施研究所名：薬学部薬学研究所

氏名：飯島 洋

研究結果（つづき）

(ii) Dimer の発生が酸化的なものであるかを確認するために、非還元状態で Cys をヨード酢酸でアルキル化処理し、その後、dithiothreitol(DTT)で還元したのち、ヨード酢酸アミドでアルキル化、トリプシン消化し、HPLC-質量分析を実施したところ、dimer は S-S 結合している fragment は検出されなかった。この実験だけでは十分条件ではないが、dimer は SS-dimer ではない可能性が高い（全てフリーの SH）。このことは、2mM DTT 共存化でも monomer から dimer が発生すること、化合物により短時間で dimer から monomer への以降が起こることとも矛盾しない。

(iii) 迂回路モデルにおいて、我々は enhancer 結合部位は第二基質（カテコール）結合ポケットではないかと想像している。エストロン、エストラジオール系の化合物には弱い賦活化や阻害活性が見られているからである。そこで、NE の構造類似化合物として、b-blocker の COMT 活性への影響を調べた。6 化合物を調べたが従来化合物よりも強い賦活化活性を示したものはなかったが、10%程度の弱い賦活化を示した。SAH 共存下での賦活化活性が 10-20%であり、SAH がない時よりも効果が大きかった。A00614(carvedilol), A00615(propranolol), A00616(atenolol), A00617(ceriprolol), A00618(metoprolol), A00619(labetalol)。

(iv) -80℃に 3 年保存してあった COMT は精製当時とほぼ同等の比活性を保持するが、精製後一ヶ月程度に間に二回凍結融解を繰り返した COMT は 50%以上失活することを確認した。

(v) COMT 活性を SAH 生成量で測定できないかを試みたところ、NE のメチル化生成物 NMN の定量値と SAM の脱メチル化物 SAH の定量値には高い相関があった。例：NMN で定量すると 7020 pmole であるが、SAH では 7551 pmole であり、7%程度の定量値のズレが生じた。反応溶液中での SAM の非酵素的な加水分解などがあるかもしれない。

通常、COMT の活性測定は ^{14}C -SAM による放射活性で測定されているが、SAH で定量できることから、NMN 以外の基質の反応速度も通常の実験環境で測定可能かもしれないと期待できる。

(vi) COMT の反応系に BSA（ウシ血清アルブミン）を共存させると COMT 活性が上昇することがわかった。通常の酵素反応系の組成は、COMT 0.16 μM , SAM 300 μM , SAH 30 μM , NE 1000 μM である。この系では賦活化化合物 30-100 μM を加えて 40%程度の活性上昇がある。この系に BSA を添加すると酵素活性が上昇し、実質的に賦活化化合物の効果が見られなくなった。BSA 濃度が 2.5 μM （COMT の 15 倍濃度）の状態でも賦活化化合物を加えても活性化率は数%であり、誤差の範囲である。なお、この状況でも SAH を加えると活性は低下する。しかし、化合物を加えても賦活化の程度は数%でしかない。BSA があたかも賦活化化合物と同じ振る舞いを示していると考えられる。生理条件でも同じであるならば、賦活化化合物の働きはすでに生体に含まれている可能性を示唆する。今後の検討では常に念頭に置いておくべき結果である。

課題番号	総 17-027
------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成 29 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 30 年 5 月 23 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 福田 昇



所属・資格 総合科学研究所・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 総合科学研究所

1 研究課題 日本大学方式 iPS 細胞誘導法と疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝疾患診断法の開発					
2 研究組織					
氏 名	所属部科校・資格	役割分担			
○研究代表者名 福田 昇	総合科学研究所・教授	研究の総括、疾患特異的 iPS 細胞を用いた腎疾患診断法の臨床試験			
○研究分担者 舩廣善和	生物資源科学部応用生物科学科・准教授	スタビロンによる iPS 細胞誘導			
阿部雅紀	医学部腎臓高血圧内分泌内科・教授	TGF-β1PI ポリアミドによる高効率 iPS 細胞誘導法の確立			
合計 3 名					
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況					
制 度 名	研 究 課 題 名	研究者	研 究 費	申 請 年 度	採・否
科学研究費新学術領域研究	生活習慣病への PIP の創薬開発研究	福田昇（代表）	3,000 万円/年	平成 30-34 年度	申請中
科学研究費基盤研究 (B)	腎線維化因子 Gli 及び TWIST を抑制する新規バイオ医薬 PI ポリアミドの開発	福田昇（代表）	600 万円/年	平成 30-32 年度	不採択
科学研究費基盤研究 (C)	多発性嚢胞腎の疾患特異的 iPS 細胞由来腎集合管細胞の機能解析と治療薬の探索	福田昇（分担） 阿部雅紀（分担）	150 万円/年	平成 30-32 年度	採択

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (可・否) いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：総合科学研究所

氏名：福田 昇

4 研究目的

今回の総合研究では総合科学研究所、医学部、生物資源科学部の共同でこれまで行って来た安全な日本大学独自のiPS細胞誘導法の開発の研究を更に進め、加えて疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝性疾患の診断法の確立を行い、これらの成果を基に日本大学にiPS医療の研究拠点を確立することを目的とする。

1. 日本大学方式のiPS誘導法開発

iPS細胞の再生医療としての臨床応用に大いに期待が高まっているが、現在のiPS細胞誘導法はレトロまたはセンダイウイルスベクターを用いて、山中4因子プラスミドにより皮膚線維芽細胞から誘導するものであるが、ウイルスやプラスミドによる移植細胞の発癌性、安全性の問題が残っている。最近、山中4因子による初期化のメカニズムは間葉系細胞の上皮化であることが判明し、そこにはTGF- β 1抑制とE-カドヘリンの増加が必須であることが分かる。ウイルスベクターやプラスミドを用いなくとも、化合物でTGF- β 1抑制とE-カドヘリンの増加が出来ると考えられ、我々はTGF- β に対するPIポリアミドとスタビロンを用いて山中4因子蛋白を細胞に導入する事により、ヒトiPS細胞を誘導する日本大学方式を計画し、今回ウイルスやプラスミドを用いない日本大学独自の方法でヒトのiPS細胞を確立する事を目的にした。

2. 疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝疾患診断法の開発

遺伝性疾患患者末梢血からのiPS細胞を目的の臓器に分化させ、その機能を評価する疾患特異的iPS細胞を用いた診断法が臨床応用されつつあり、臨床で患者さんの体での診断では不正確であった目的組織のみの診断法の確立が今後、新しい診断法や創薬開発などで期待されている。しかしiPS細胞を目的の臓器に分化させても、その細胞が完全に目的細胞に分化してない場合、疾患特異的iPS細胞を用いた診断法の正確性に問題がある。そこで今回はiPS細胞を尿細管細胞に分化させ、その分化度を尿細管由来21の分子mRNA発現で評価する事は独創的で大いに意義がある。iPSからの培養尿細管細胞でPTH負荷によるcAMP増加と 32 P-リン酸の細胞内取り込みにて、Ellsworth-Howard試験をin vitroで行う事により、遺伝性尿細管疾患の正確な診断法が確立する事を目的にした。

5 研究概要

1. 日本大学方式iPS細胞誘導法開発

iPS細胞はウイルスとプラスミド遺伝子にて誘導される為、生体に対する安全性、発癌の問題が解決出来ていない。我々はこれまでウイルスとプラスミド遺伝子を用いない安全なiPS細胞誘導法を医学部と生物資源科学部との共同研究を行っており、福田が特許化したTGF- β 1に対するピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドにて高効率iPS細胞誘導に成功した(Saito K, Fukuda N et al. Int J Biochem Cell Biol 2015に掲載)。

また舩廣らが開発した高効率蛋白導入因子スタビロンにてiPS誘導山中4因子を蛋白としてヒト線維芽細胞に導入し、iPS化を検討しマウスのiPS細胞化に成功した。これらの背景から今回、この総合研究ではTGF- β 1に対するPIポリアミドにより高効率iPS細胞化を誘導し、舩廣らが開発したスタビロンを用いてiPS細胞の初期化因子を細胞内に蛋白で導入する事により、より安全な日本大学方式のヒトiPS細胞誘導法の確立を試みた。今後は進行性腎障害への再生医療に繋げていく。

2. 疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝疾患診断法の開発

遺伝性疾患の患者からのiPS細胞は遺伝子異常を保ったまま目的の細胞に分化出来る。我々は遺伝性尿細管疾患患者から疾患特異的iPS細胞から尿細管上皮細胞に分化させ、その機能を検討する診断法の確立を目的に、医学部附属臨床研究審査委員会に「腎尿細管疾患患者末梢血T細胞から樹立したiPS細胞由来腎尿細管細胞の機能解析研究」で申請し、患者のiPS細胞由来腎尿細管細胞の確立を行っているが、問題は未分化iPS細胞が残っている。今回の総合研究では分化尿細管上皮細胞で特異的糖鎖を指標に未分化iPS細胞除去を確立し、偽性副甲状腺機能低下症患者から誘導したiPS細胞を尿細管細胞に分化させ、PTH負荷でのcAMP増加とリン酸の細胞内取り込みを検討し、その上昇を認めた。これを基に実際に疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝疾患診断法の臨床応用出来ることが評価できた。さらにBartter症候群、Gitelman症候群患者からのiPS細胞を尿細管細胞に分化させ、総合的にヒト疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝性尿細管疾患診断法を確立を試みている。

実施研究所：総合科学研究所

氏名：福田 昇

6 研究結果 (4,000 字以上記入してください。)

1. スタビロンと PI ポリアミドによる日本大学方式 iPS 細胞誘導法開発

1) ヒト TGF-β1 に対する PI ポリアミド(GB1101)によるヒト iPS 細胞誘導効率の検討 (福田、阿部)

既存のヒト iPS 誘導法は、マウスエコトロピックレセプターをあらかじめレンチウイルスを用いてヒト線維芽細胞に導入しておき、そこにレトロウイルスで初期化因子を導入、またはセンダイウイルス (SeV) ベクターキット CytoTuneR-iPS (DNAVEC, DV-0301) を使用し、30%以上の高いベクターの導入効率にて初期化因子 (Sox2, Klf4, Oct4, c-Myc) を細胞に導入できた。PI ポリアミドを投与するタイミングを初期化因子 (Sox2, Klf4, Oct4, c-Myc または Sox2, Klf4, Oct4 の 3 因子のみ) 導入時、ヒト iPS 誘導培地添加時の 2 点に分けて、10nM から 1μM の濃度で投与し、それぞれの PI ポリアミドの投与時と濃度におけるヒト iPS 細胞誘導効率を iPS 細胞様コロニーの割合、遺伝子発現解析、免疫組織化学により評価し、比較検討し、結果として初期化因子を入れる前に充分内因性 TGF-β1 を抑制することにより、アルカリホスファターゼ染色での iPS 細胞化効率が約 2 倍に改善した。

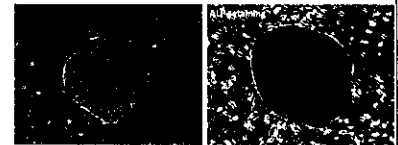
2) MTM-Stabilon-初期化因子のタンパク質発現系とヒト TGF-β1 プロモーター特異的 PI ポリアミドを用いたヒト iPS 細胞誘導法の確立

舩廣との共同で、MTM-Stabilon-初期化因子 (Glis1, Sox2, Oct4, Klf4) の融合タンパク質発現系を確立する為、精製した融合タンパク質とヒト TGF-β1 プロモーターに特異的な PI ポリアミドを直接細胞に投与し、導入しヒト iPS 細胞を誘導し、得られた iPS 細胞様コロニーの割合をコロニーの作製率、遺伝子発現解析、免疫細胞化学により評価し、既存のヒト iPS 誘導法によるヒト iPS 細胞と比較検討し MTM-Stabilon-初期化因子による iPS 細胞コロニー形成率の向上を確認した。さらに誘導法において、投与するヒト TGF-β1 シグナリング関連分子特異的 PI ポリアミドの使用濃度や投与のタイミングを検討した結果、事前の PI ポリアミドの投与にて内因性 TGF-β1 を抑制する事による iPS 細胞コロニー形成率の向上を確認した。さらに作成できたヒト iPS 細胞を何代か継代しつづけ、自己増殖能の維持を確認した。

2. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝疾患診断法の開発

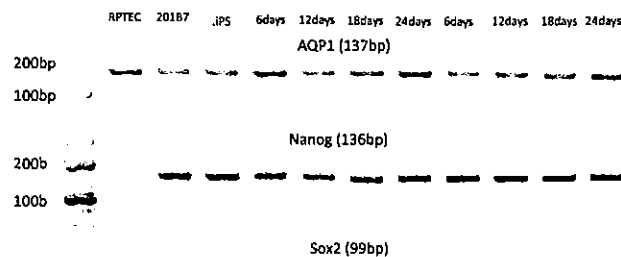
1) ヒト iPS 細胞からの尿細管細胞への分化度の評価

ヒト末梢血単核球細胞から iPS 細胞の樹立として、末梢血から単核球を分離し、PBMC CM 培地に播種、培養し、翌日山中 4 因子センダイウイルスベクター(CytoTuneR-iPS)を感染させた。その後毎日、ベクターの感染/細胞数のカウントを行った。21 日目までに ES 培地を添加しアルカリホスファターゼ染色で iPS 形成の評価を行い、iPS 細胞コロニー形成能を確認した。



2) ヒト iPS 細胞株からの尿細管細胞誘導の確立

Narayana et al. Kidney Int 2013; 83:593 の ES 細胞からの尿細管細胞への分化誘導法を基に行った。すなわちマトリゲルを氷冷 DMEM と 1:50 で混合する。1) 培養液(REGM)と 0.5% FBS。2) BMP2 (10 ng/ml)、BMP7 (2.5 ng/ml)。3) activin-A (10 ng/ml) 、retinoic acid (0.1 mmol/l) 4) 培養 10 日目：尿細管細胞への分化確認 Aquaporin 1 mRNA の real time PCR にて分化を確認した (下の図)。



この図にあるよう、Aquaporin 1 は経時的に発現が増加しており、ヒト末梢血から樹立した iPS 細胞から、尿細管細胞が誘導された事が分かる。問題は Aquaporin 1 の発現にて尿細管に分化しているが、未分化マーカーである Nanog の発現が消失していないことであった。これは分化尿細管細胞に未分化 iPS 細胞が残っている可能性を示唆し、次に未分化 iPS 細胞の除去を試みた。

実施研究所名：総合科学研究所

氏名：福田 昇

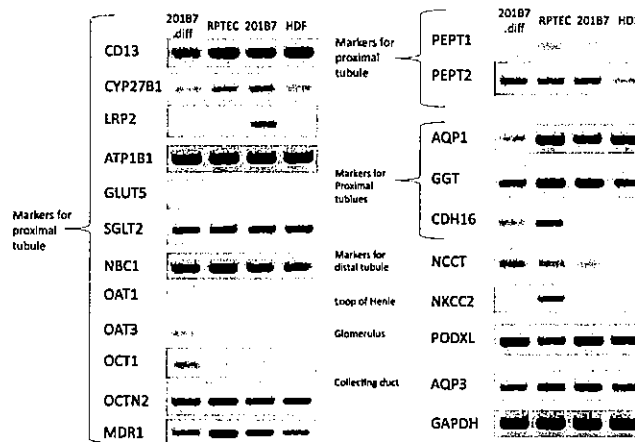
研究結果（つづき）

3) 最終的に腎尿管上皮細胞への未分化 iPS 細胞の混入を除去するため、

産総研が開発した、iPS 特異的細胞表面糖鎖を認識する rBC2LCN (Stem Cell Report 2016)に細胞毒 (PE23) を結合した試薬を添加して iPS 細胞を死滅し、Nanog 発現して iPS 細胞の除去を確認したが、Nanog 発現は iPS に特異的でなく、発現が上図の如く残った。そこで分化誘導腎尿管上皮細胞に rBC2LCN で処理し、その後 rBC2LCN-FITC で染色し、染色性の消失にて未分化 iPS 細胞の混入を除去を確認した。その結果、Nanog 発現とは違い、rBC2LCN-FITC で染色が消失したので未分化 iPS 細胞の混入を除去が確認された。

4) 誘導尿管細胞の機能解析

コントロール細胞としてヒト近位尿管細胞(LONZA)を用い、iPS細胞から分化誘導した尿管細胞について培養10日目にmRNA抽出し、尿管分化マーカーのreal time PCRにてCD13の増加が確認、SGLT2の増加、GGT, PEPT1, PEPT2, GLUT5, OAT1, OAT3は発現が確認できなかった。OCT1, AQP1, Na⁺/K⁺ ATPase, NBC1, MDR1, Vit D3 の発現増加を確認。Hydr, AQP3, NCCT, PODXL, OCTN2, KSP-CAD, MEGALIN (Narayana et al. Kidney Int 2013; 83:593-603)の発現を確認した（下図）。

5) 既製の近位尿管培養細胞にPTH負荷を行い、cAMP増加と³²P-リン酸の細胞内取り込みにて適切な条件を検討した。

①cAMP 産生の測定

24Well プレートに尿管細胞を 10%FBS/DMEM で播種し培養し 80%Confluent にし、DMEM 1 ml (IBMX 1mM, FBS 0.5 %濃度添加)に交換する。PTH(0,10, 50, 100 nM)を添加し各 30, 60, 120 分刺激する。DMEM を吸引し PTH による反応を停止する。5 % TCA 1 ml を加え氷上でホモジナイズし吸引する。検体に 1.5~3 ml(TCA の 3 倍量)の水飽和エーテルを加え、遠心分離しエーテル層を除去する。水層の cAMP の濃度を測定した。PTH は時間依存性に cAMP 濃度を増加した。

② 近位尿管培養細胞へのリン酸の取り込み

培養細胞の培地吸引し、Pi Free Medium 0.8 ml を添加する。medium 吸引後、Pi uptake sol.を添加する。30 sec または 1 min で次の well に移り、反応を停止させる。完全に medium を除いた状態で次に 0.1N NaOH を 400 μl 添加。20 μl をタンパク測定用に 96 well dish. 残りは AQUASOL 2.5 ml を入れたチューブに移し、液体シンチレーションにセットする。測定終了後、タンパク濃度測定した。

PTH 負荷にて、近位尿管培養細胞で時間依存性、濃度依存性の cAMP 増加と ³²P-リン酸の取り込みを確認した。以上により遺伝性尿管疾患の患者の末梢血から iPS 細胞を樹立する事が出来、さらに遺伝子異常を伴ったまま尿管細胞に分化し、未分化 iPS 細胞も除去できたので、今後は実際の臨床試験に移行する。現在、日大板橋病院には偽性副甲状腺機能低下症の患者は 2 名、腎性尿崩症の患者も 2 名おり、この疾患的 iPS 細胞からの尿管細胞への誘導が確立されたら、臨床試験を平成 30 年度内に開始する。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。