

平成 27 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28 年 5 月 6 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 齋藤 稔



所属・資格 文理学部生命科学科（物理生命システム科学科）・教授

下記のとおり報告いたします。

退職,転出の場合は, ( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 数理物理学に基づいた生命システム動態の解明とその工学的再構築		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 齋藤 稔	文理学部・生命科学科（物理生命システム科学科）・教授	神経科学実験、脳の数理モデルの構築・シミュレーション、研究の統括
○研究分担者 佐伯 勝敏	理工学部・電子工学科・教授	脳のハードウェアモデルの構築、脳機能の工学的応用
内木場 文男	理工学部・精密機械工学科・教授	脳のハードウェアモデルの構築、脳機能の工学的応用
齊藤 健	理工学部・精密機械工学科・助教	脳のハードウェアモデルの構築、脳機能の工学的応用
保谷 哲也	理工学部・数学科・准教授	脳の数理モデルの構築・シミュレーション
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>基盤研究（C）平成 28 年度～平成 30 年度「脳疾病のテーラーメイド医療に向けた基盤技術の確立」（代表者：齋藤稔，5,000 千円），不採択</p> <p>基盤研究（C）平成 28 年度～平成 30 年度「知的情報処理を行うニューロモフィックデバイスの開発」（代表者：佐伯勝敏，4,998 千円），不採択</p> <p>2015 年度積水化学自然に学ぶものづくり研究助成プログラム「ナメクジ嗅覚系に学ぶ爆発物を検知する匂いセンシングロボットの開発」（代表者：齊藤健，5,000 千円），不採択</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。

部科校名：文理学部

氏名：斎藤 稔

## 4 研究目的

生命体では分子－細胞－個体－生態系といったように、スケールの異なる階層間の相補的な循環を持ち、そのダイナミクスの中からミクローマクロ間の整合的な関係が生まれ、その機能が発現している。このような観点から重要になるのは、非線形力学・複雑系科学・自己組織化理論といった数理物理学を基盤として、複雑な動的システムとしての生命体の作動原理を明らかにする研究であり、研究代表者・斎藤の研究室ではそのような観点から脳機能の解明を目指した研究を行ってきた。

このような研究の重要性は文部科学省でも認識されており、生命動態システム科学戦略作業部会の報告書には「細胞の構成要素の解明がゲノム解読等を通して進んだ現在、多様な分子の複合体、細胞や多細胞が構成する生命現象の複雑制御システムの本質を理解し、それらを操作するため、数理科学と生命科学との融合という新たな手法による「生命動態システム科学」の研究基盤の構築と推進が強く望まれる。(中略) そのためには実験生物学、数理理論、in silico シミュレーション、工学的手法までの融合的な教育が求められる。(中略) 学部や大学院の時期に、数理・生命科学のどちらにも深く接する機会を用意するとともに両者を連携させて問題解決を図る経験をさせる必要があり、実験系と理論系等の複数の教員が学生を指導するだけでなく、実験科学・計算科学の2つの柱を理解して、両者を横糸で連携する発想の下で初めて解決できる問題を自身で提起し、自身で解決できる「 $\pi$ 型人才」の育成が求められる」と記載されている。本研究代表者・斎藤が所属している文理学部・物理生命システム科学科は、以上のような生命科学の教育・研究の潮流をいち早く予見した学科であり、これまで「 $\pi$ 型人才」として卒業生を社会に送り出し、当研究室でも6名の学位取得者(他大学大学院を含む)を輩出している。研究分担者(平成26年度)・小山内はその1人である。また、研究分担者(平成26年度)・小松崎、研究分担者・齊藤(健)は当学科において助手として勤務し、当学科の教育・研究理念を取り入れ在職中に学位を取得した。本研究では、以上のような当学科設立後10年間の当研究室の教育・研究実績をもとに、数理物理学を基盤として複雑な動的システムとしての生命体の作動原理を明らかにすることを目的とする。

## 5 研究概要

生命体の中で最も典型的な複雑な動的システムは脳である。脳機能を解明することは、生命システム動態の理解につながる。脳では多数の神経細胞が網目状に結びついて複雑な神経回路(ニューラルネットワーク)が構築されている。そのようなニューラルネットワークがどのように演算し、情報を処理しているかはよく分かっていない。また、そのシステムは巧妙かつ精密に制御され、環境や老化・ストレス応答などによるそこから逸脱は疾病の要因となる。

本研究では、研究代表者・斎藤、研究分担者(平成26年度)・小松崎、小山内がこれまで開発してきた高速・高分解能イメージング技術といった実験神経科学的手法を用いて脳の時空間活動状態を測定する。そして、得られた実験的知見をもとにニューラルネットワークの数理モデルを構築・計算機シミュレーションし、それを検証して実験にフィードバックする。このような研究は、脳をはじめとする生命システムの動態を時間軸・空間軸から統合的に理解する技術の確立につながり、その技術は疾病の原因解明や医療・創薬分野へ貢献することが期待される。

本研究の特色・独創的な点の1つは、非線形力学・複雑系科学・自己組織化理論といった数理物理学を基盤として数理モデルの構築を行うことである。実験神経科学者の多くは生命系学科の出身者であるが、斎藤は物理学科の出身であり、実験神経科学と数理物理学を融合した新しい視点から脳機能に迫ることができる。また、研究分担者・保谷が提案してきた人間の言語獲得機構を模倣したニューラルネットワークモデルも本研究に有用である。もう1つの独創的な点は、研究分担者・佐伯、内木場、齊藤(健)がこれまで開発してきたニューラルネットワークのハードウェアモデルを用いて数理モデルの妥当性を検証することである。上記の通り、脳は極めて複雑な非線形システムである。そのモデル構築には極めて大規模なモデルが必要であり、モデルの妥当性の検証には高速な非線形演算が必要となる。本研究では、構築した数理モデルの妥当性をコンピュータシミュレーションで検証するのみならず、そのハードウェアモデルを構築し、それを用いた検証も行う。ハードウェアモデルの方がより高速な非線形演算が可能であるからである。このような研究の成果は、生命体を模倣したロボットの開発といった工学的な応用展開にもつながる。また、人工物と生命体を比較することにより、生命システムの作動原理の解明につながることを期待される。

部科校名：文理学部

氏名：斎藤 稔

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

脳においては、カルシウム動態が神経可塑性に関与しており、その異常は脳疾病の要因の1つである。そこで平成26年度は、脳におけるカルシウム動態を調べるため、カルシウムイメージング法や機能的多ニューロン画像法 (functional multineuron calcium imaging; fMCI 法) を確立した。特に、fMCI 法はレーザー共焦点顕微鏡を用いて単一細胞レベルの解像度を保ちながら多数のニューロンにおけるカルシウム動態を同時に観察できる手法である。さらに平成26年度は、多電極基板を用いて、多数のニューロンの電氣的神経活動を測定する実験系を確立し、カルシウム動態と同時測定を行うことを可能にした。その際、電極材料を通して良好なカルシウム信号を得ることができるようになるため、従来用いられてきたカルシウム感受性蛍光色素 (Oregon green) に比べて、より蛍光強度変化が大きく、高いSN比を有する蛍光色素を探索し、新規な蛍光色素 Cal-520 を見出し、この蛍光色素を用いるようにした。そして、このように確立した技術を用いて、マウスの急性海馬スライスにおける自発的な神経活動状態に対するステロイドホルモンの作用を調べた。ステロイドホルモン (ストレスホルモン、性ホルモンなど) は新しいタイプの神経モジュレータであり、グルタミン酸受容体に作用し記憶学習機能に影響することが示唆されており、性ホルモン補充療法は認知症やアルツハイマー病の有効な治療法の1つとして知られている。しかしながら、それらのメカニズムはよく分かっていない。結果として、ストレスホルモンは海馬において電氣的神経活動とカルシウム動態の両方に抑制的に作用し、女性ホルモンはそれらに対して増強的に作用することが分かった。また、海馬に見られるてんかん様状態の発生機構を調べた。その結果、GABA 受容体を阻害することによって、多数のニューロンの電氣的神経活動が極めて同期したてんかん様状態が引き起こされることを見出し、またこのときカルシウム動態にも同期性が見られた。

平成27年度は、ニューロンの電氣的神経活動を測定するためのシステムを32ch増設して64chシステムとし、より詳細な測定を行うことを可能にした。そして、マウスの急性海馬スライスにおいて記憶学習過程を模倣した電気刺激 (高頻度刺激や $\theta$ バースト刺激) や薬理刺激 (NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) 刺激) を行い、それによって生じる電氣的神経活動やカルシウム動態の変化にステロイドホルモンがどのように作用するかを調べた。その結果、自発的な神経活動状態に対する作用と同様に、ストレスホルモンは抑制的に作用し、女性ホルモンは増強的に作用することが分かった。このことは、海馬の記憶学習機能に対するステロイドホルモンの影響を示唆するものである。

平成27年度はさらに、ガラスキャピラリー型バイオセンサを用いて、ニューロンの電氣的神経活動とカルシウム動態の測定と同時に、シナプスからの神経伝達物質の放出過程を測定できる実験系を確立した。そして、海馬に対して電気刺激を行った際のグルタミン酸の放出過程を測定できることを確認した。グルタミン酸は海馬における主要な神経伝達物質であり、その記憶学習機能に深く関わることが知られている。

脳機能はシナプスからの神経伝達物質の放出と、そこから誘導されるカルシウム信号・電気信号が複雑に相互作用して発現するものであり、このように多数のニューロンの電氣的神経活動とカルシウム動態、さらには神経伝達物質の放出過程を同時に測定できる実験系を確立したことは、脳機能の解明につながるものである。平成27年度はまた、このような実験系により培養海馬スライスや培養ニューロンの神経活動状態を測定することも確認した。培養ニューロンとしてヒトiPS細胞由来ニューロンを用いることも可能であることを確認しており、このような技術は脳疾病の個々人の原因や状態を把握し、個々人に対する治療法やその効果を明らかにするテーラーメイド医療に向けた基盤技術にもなり得る。

以上のような脳機能に関わる実験神経科学的データおよびそれらに対する数理解析から得られた知見に基づき、それぞれの機能に対する数理モデルを構築することを試みた。その結果、このような数理モデルとして、古くから用いられてきた階層型パーセプトロン・ニューラルネットワークモデルのいくつかの限界を克服した新しいタイプのニューラルネットワークモデル (カーネルメモリー) が有効であることが分かった。また、大規模ニューラルネットワークに対しては integrate-and-fire モデルが効率のよい、かつ正確なコンピュータシミュレーションを可能にすることを見出し、これを用いてナメクジの嗅覚中枢神経系の数理モデルの構築を行い、その匂い認識機能に重要な役割をもつ自発的な神経活動の伝搬現象を再現することができた。今後は、海馬のようなさらに大規模ニューラルネットワークにも適用できるかを検討する。このような脳機能の数理モデルを構築することは、従来は膨大な実験が必要であった脳機能の解明や、脳疾病の原因解明・新薬設計を短時間に行うことを可能とする「ニューロインフォマティクス」の確立につながる。

部科校名：文理学部

氏名：斎藤 稔

## 研究結果（つづき）

また、数理モデルのコンピュータシミュレーションに比べて高速な非線形演算が可能であるので、脳機能をハードウェアモデルで再現することを試みた。このようなハードウェアモデルを構築することは工学的な応用展開にもつながる。これまでに開発してきたパルス形ハードウェアニューロンモデルの実装回路モデルおよび集積回路モデルを用い、ニューラルネットワークのハードウェアモデルを構築した。その1つとして、ナメクジ嗅覚中枢神経系の数理モデルに基づいて4つの細胞体モデルを抑制性シナプスモデルで全結合したハードウェアモデルを構築し、ナメクジ嗅覚中枢神経系と同様な動作をするを見出した。そして、そのようなハードウェアモデルを実装した10 cm程度の4足歩行型ロボットおよび5 mm程度の6足歩行型ロボットのプロトタイプを作製した。4足歩行型ロボットについては、一般的にそのようなロボットには関節毎にアクチュエータが必要であるが、リンク機構を用いることで、アクチュエータ4個での4足歩行を実現した。平成27年度には、これまでの形状記憶合金を用いたアクチュエータとは別に、圧電素子を用いたアクチュエータを新たに提案した。形状記憶合金は、変位は大きい消費電力が多いため、電源の搭載が困難である。一方で圧電素子は、変位は小さい消費電力が少ないため、小型の電池でも駆動が可能である。6足歩行型ロボットについては、通常の機械加工では部品の作製が困難であるため、シリコンウェハに微細加工技術を用いて、ロボットの部品を作製した。5 mm以下のサイズでの6足歩行ロボットの実現は世界初である。このようなプロトタイプロボットを駆動するハードウェアニューラルネットワークについては、4足歩行型ロボット用に対しては、10 cm程度のFR4基板上に表面実装し、4足歩行型ロボットに搭載可能なサイズで開発した。生物の神経回路と同様に、神経細胞の相互作用により歩行パターンを生成するため、コンピュータプログラム無しで4足歩行が可能になった。また、外部入力による歩行パターンの切り替えに成功した。6足歩行型ロボット用に対しては、2 mm程度のICベアチップで実現し、大幅な回路面積の削減に成功した。

このようなロボット開発の至近の目標としては、匂いセンシングロボットがある。これに用いる匂いセンサの開発も行い、これまで楡形電極上やSAWデバイス上に有機感応膜を成膜したセンサが様々な匂い物質を検出できることを見出してきた。いずれのセンサも1 cm角程度であり、上記のようなマイクロロボットに搭載可能である。平成26年度は特に揮発性有機化合物に着目し、その代表的な気体としてホルムアルデヒドの低濃度測定を試みた。室内温度が上昇する夏場ではシックハウス症候群の原因となるホルムアルデヒドが発生する。主に建築物に多用される接着剤、防蟻剤、防腐剤などの合成物質に使用されており、呼吸器系、目、喉などに炎症を及ぼす。厚生労働省のガイドラインでは0.08 ppmの濃度をホルムアルデヒドの室内濃度指針値としている。低濃度でも人体に悪影響があるため、常時測定を行い適切な換気が必要となってくる。そこで、SAW型センサを用いてホルムアルデヒドの濃度測定を行った。測定濃度としては0.06 ppm～1.0 ppmの範囲とした。感応膜としては、中心金属が銅、鉄、亜鉛、無金属の4種類のフタロシアニンをそれぞれ膜厚100 nmで真空蒸着法を用いて成膜し、最も適切な感応膜を選定した。その結果、亜鉛>銅>鉄>無金属の順番で変化量が高く、亜鉛フタロシアニン感応膜を用いたセンサが最も適していることを明らかにした。

平成27年度は、ホルムアルデヒドと二酸化窒素、二酸化硫黄の判別を可能とするセンサの開発を行った。二酸化窒素は燃料の燃焼によって発生し、低濃度でも呼吸器疾患やアレルギー発生の原因となる。二酸化硫黄は自然発生的には火山などから、人為的には燃料の燃焼により発生し、やはり低濃度でもせき、ぜんそく、気管支炎などの障害を引き起こす。これまでのセンサは予め発生している気体が決まっている状況での濃度測定が可能なセンサであったが、実際には様々な気体が発生しており、その中で測定対象の気体だけを測定できるセンサが要求される。結果として、亜鉛フタロシアニン感応膜を用いたSAW型センサでは、ホルムアルデヒドと二酸化窒素の判別が可能であることを明らかにした。また、鉄フタロシアニン感応膜を用いたSAWセンサでは、ホルムアルデヒド、二酸化窒素、二酸化硫黄の判別が可能であることを明らかにした。

匂いセンシングロボットのような生命体を模倣したロボットの開発は、工学的な応用展開につながるのみならず、人工物と生命体を比較することにより、生命システムの作動原理の解明につながることを期待される。

課題番号	総 15-003 継続 総 14-004
------	----------------------------

## 平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績

## 報告書

平成 28 年 4 月 30 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 井上葉子



所属・資格 商学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 観光ビジネスに関する国際比較研究		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 井上葉子	商学部・准教授	研究全体の統括、 観光ビジネスのマーケティング研究。 北米、中国
○研究分担者 曾根康雄	経済学部・教授	海外から見た日本の観光ビジネス。香港、北米
濱本明	商学部・准教授	観光ビジネス事業の継続性分析および事業再生 のための会計。シンガポール
松原聖	商学部・准教授	経済学による分析・観光政策の国際比較。日本、 クロス・カントリー
劉慕和	商学部・准教授	観光ビジネスの経済効果を検証するモデル。ヨー ロッパ
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		
文科省平成28年度科学研究費助成事業 科研費 基盤研究(A)へ応募した。不採択になり、 29年度再応募する予定。		

※「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。

部科校名：商学部

氏名：井上葉子

4 研究目的

研究目的：我が国の観光ビジネスが経済的・社会的・環境的に持続的に発展できるような長期戦略を策定するための政策、経営および財務会計からなる3元フレームワークを構築することである。

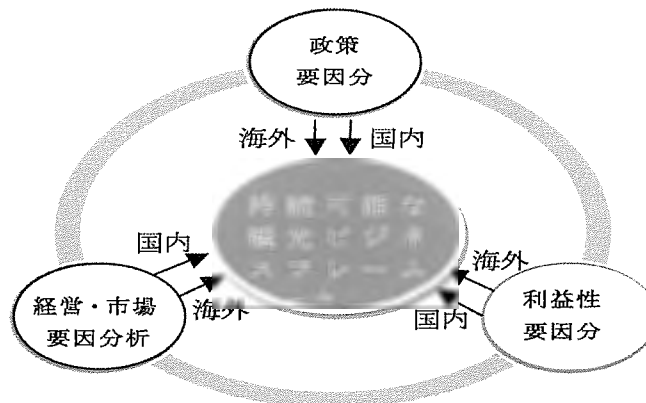
約40年前、アメリカの未来研究者ハーマン・カーンは「観光が21世紀の基幹産業の1つになる」と予測した。我が国では民族学者の梅棹忠夫が、かつて高度成長期において、いち早く「文化立国」の必要性を提唱し、民俗学の視点から観光について国際的な分析を行った。そして半世紀の時が流れ、ようやく我が国では「鉄は国になり」から「観光立国」へと、「おもてなし」をもって光輝き、世界に観せるグローバル観光ビジネスが柱となる新時代が築かれようとしている。

高齢社会を迎えた我が国において経済成長を促すためには、国内消費者の新規需要を掘り起こし、喚起する必要がある。同時に、海外消費者の新規獲得も不可欠である。この意味で、観光ビジネスは内需・外需双方を同時に喚起できる産業であり、今後の我が国の国家戦略において重要な位置づけがなされるであろう。もっか「観光産業」という特定の産業分類がないことからわかるように、観光ビジネスは社会全体に広く関わりを持ち、多種多様な業種から構成されており、その裾野の広さは計り知れない。観光ビジネス研究会でまとめた観光ビジネスの関連ビジネスの調査によると、観光ビジネスの発展は伝統的な旅行関連ビジネスの範疇を超えて、教育、ファッション、飲食、イベントなど、少なくとも77分野のビジネスを牽引できるとしている。さらに、今後ハイテクやハイサービスなど高付加価値ビジネスの創出にとっても、観光ビジネスの牽引力・集客力は一層重要度が増してくるであろう。

したがって観光ビジネスは、国内・国際的環境、文化、政治、経済の変化に対応できるよう多元的な影響力を考慮した持続可能な長期戦略のもとで発展させていくことが必要となる。バランスの取れた観光ビジネス戦略があつてこそ、国内の人的移動を促し、多岐にわたる新規の需要が創出される。

5 研究概要

2年間にわたって、一貫して観光ビジネスの国際比較検証を通じて、政策面、経営面、会計面でデータ情報に定量分析を行う。よって、戦略立案にあたっての決定要因を定性的に析出することである。その検証結果に基づき、長期的かつ持続可能な観光ビジネス戦略の構築フレームワークを確立させることを最終目的とするものである。26,27年度の国際比較研究を通じて、①サービス貿易の1つとしての「海外旅行」経済理論モデル、②観光政策の経済効果、③インバウンド・マーケティング、④観光ビジネスにおけるビジネス再生の経済効果、④政策と観光ビジネスの関連性、⑤観光ビジネスにおける新規事業のビジネスモデルという5つの点から持続可能性の持つ観光ビジネスの戦略との関連性を明らかにしたい。観光ビジネスの国際比較を通じて、2つの立場から可能性を見出していく。1つは内からの可能性である。ホスト国としての我が国における観光資源の可能性を生かした誘致戦略などの全体的な観光ビジネスの内生的戦略を構築する。もう1つは外からの可能性である。すなわちゲスト側に他国を凌いで我が国を旅行先として選択してもらうための強いインセンティブを与えるために、詳細な国際調査を行い、外因的戦略要因を分析する。こうして内・外という2つの分析視点と3つ（政策、経営、会計）の分析軸を使って、牽引力の強く、持続可能な観光ビジネスの長期戦略を策定するフレームワークを構築する。



部科校名：商学部

氏名：井上葉子

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

国際比較研究に照準を合わせ、現地調査による信頼性の高い1次データに基づき、各分野における専門的な実証分析を行った上で、我が国にとって合理的かつ持続可能な観光ビジネスモデルを構築する実用的な研究を行ってきた。今後、我が国の観光ビジネスはいっそう重要性が増してくることが予想されるため、本研究のような目的が明確で総合的な国際比較研究は、非常にタイムリーな研究として進めてきた。また製造業のイメージが強い我が国において、「おもてなし」を重んじるサービス産業の比重がさらに増大するにつれ、本研究により有意義な戦略構築モデルを提供できるという点においても、研究途上ではあるものの非常に有意義な成果を得ることができた。

我が国における観光研究は、これまで観光学、観光地理学、観光人類学などの分野で行なわれてきた。一方、ビジネス研究の分野では、観光ビジネスが多種多様な産業と関連を持つという性質上、曖昧さを払拭しきれないまま研究がなされてきたきらいがある。そこで本研究では、観光ビジネスを総合的に捉える必要があると考え、従来の「ツーリズム」の枠組みを超え多元的な視点から統合した「Kanko Business」を提唱した。本研究の意義の1つは、この両者のギャップに架橋することにある。また、国内・海外双方の立場を統合し、3つの分野から観光ビジネスに関する理論研究を始めることで、当該分野の理論構築の草分けとなることにも大きな意義がある。結果として、本研究を通じて、下図で示した観光ビジネス戦略立案フレームワークを構築することができるのである。このように、分断的な既存研究を踏まえた上で、本研究では我が国の長期成長戦略モデルとして、グローバル環境の中で、従来のツーリズムを超えて、多元的な見地から統合的な実証研究を行うものである。国別の実証研究にあたっては比較研究の手法を用い、当該ビジネスの本質を浮き彫りにすることにより、理論の形成に必要なフレームワークを構築していく。

研究成果として、以下のような課題を見出し、研究に先鞭をつけることができた。

観光産業における昨今の日本の成長ぶりは、世界的に見て特出した「優等生」といって過言ではない。国土交通省の統計によると、我が国のインバウンド観光者数は、2013年は前年比約24%増で、2014年は前年比約29%増となっており、2015年も前年比2桁の増加が見込まれている。一方で世界の平均増加率は4%台である。

急成長の背景には、いくつかの要因がある。国内要因としては、政府による観光産業の振興、ビザ発給要件の簡素化が挙げられる。一方、海外要因としては、2012年後半以降の急激な円安、先進国（特にアメリカとドイツ）の好景気によるアウトバウンド旅行者の急増、新興国（特に中国）からのアウトバウンド旅行者の急増などが指摘できる。当然、後者の方がその影響力は大きくなる。

そして海外要因に注目すれば、次のように指摘できよう。

もし(ii) 我が国の観光ビジネスの成長が現状のまま、今後も海外要因に一方的に依存するとすれば、そうしたら(Then)、海外要因の変化に非常に脆弱な産業でしかなく、国家の成長を支える基幹産業にはなり得ないのではないかと。

海外要因は、今後もペースを維持したまま国内観光産業の追い風になりつづけていくとは考えにくい。各国の要人発言によれば、これ以上の円安はグローバル金融市場において望まれていないことが明らかである。また、アメリカとドイツに代表される先進国からのアウトバウンド旅行者は緩やかな増加から横ばいへと転じつつある。同様に、中国などの新興国のアウトバウンド旅行者の増加は続くであろうが、ペースはかなり緩やかになっていくことが予測されている（国連世界観光機関の統計によると、中国からのアウトバウンド観光客数は、2016年をピークに年5%台以下の低成長となることが見込まれている）。つまり、足元の2~3年の我が国の観光産業の成長要因の多くは特殊要因で、マイケル・ポーターが指摘するいわゆる「チャンス」であったといえる。一方、国内要因においては、政府が観光産業を今後成長産業にするという戦略ビジョンを掲げたものの、観光産業の競争力を根本から強靱化するための具体的な産業政策と産業戦略は見られない。それは、まさに観光産業の優位性を構築するための理論的フレームワークの欠如に由来していると考えられる。

部科枝名：商学部

氏名：井上葉子

研究結果（つづき）

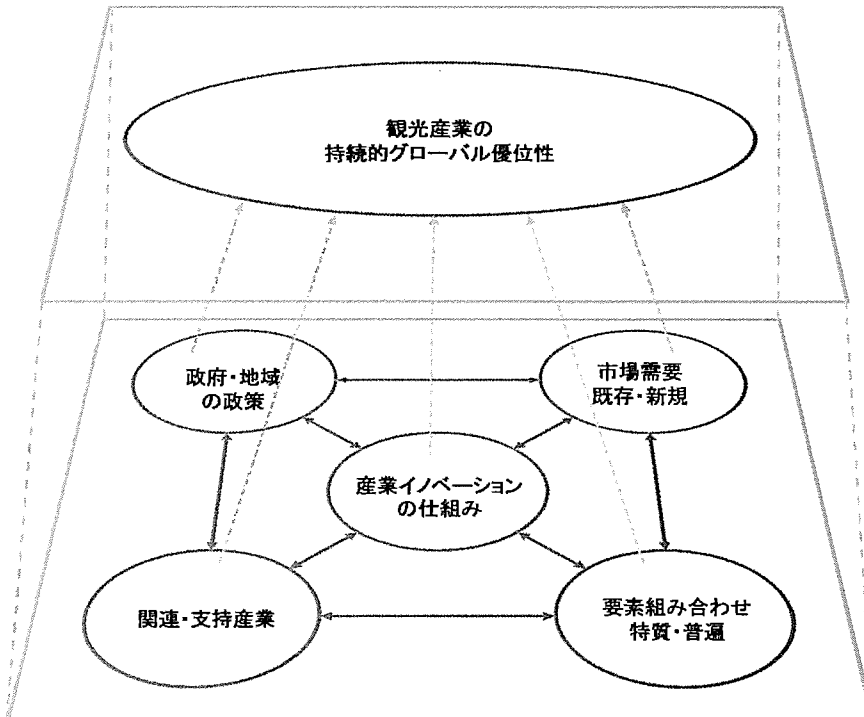
具体的な産業政策と産業戦略は見られない。それは、まさに観光産業の優位性を構築するための理論的フレームワークの欠如に由来していると考えられる。

観光産業が国家の基幹産業となるためには、目下の助走期から、いよいよ体力のある産業にするための長期戦略が必要であろう。その中心課題は「いかにしてグローバル競争優位を勝ち取れるか」という問いに帰着する。

観光産業が一過性の特殊要因に依存しない、持続的な戦略優位性を有するグローバル競争産業になることが、緩やかな拡大を続ける時代のグローバル観光産業で大きな利益を確保するための唯一の方法であろう。

そのために、本研究では実践から離れることなく、有用なフレームワークを提供することを出発点として、国際比較研究のアプローチを採用し「相手を知れば、己が見える」という客観的分析に努め、成果を出している。

本研究を通じて、さらなるグローバル優位性を構築していくことを課題に、以下のような研究のフレームワーク（仮説）を構築した。



今後、研究成果をまとめるにあたり、仮説検証の過程において優位性を獲得する5つの要因の相関性を検証し、さらに各要因を構成する決定要因をそれぞれ析出していく。

国際経営領域において国内及び海外の理論研究では、これまで製造業を中心として行われてきた。サービス業とりわけ輸出産業に該当する観光業を対象とする分析は見られない。その一因はサービス産業に関わる文化要因の多様性が考えられる。本研究では異文化要因を定型化できればフレームワークをさらに精緻化できると考えている。

今後、フィールドワークで得たデータの整理と分析を行い、理論構築を成果として発表していく予定である。外から日本を分析する視点を持ち、これまでの Unknown（産業優位要因）を明らかにし、Why（理論ロジック）を詮索した上で、How to（日本でいかに競争優位を構築するか）を提供する理論的フレームワークの構築に努めていく。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。



## 平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28年 4月 9日

日本大学学長 殿

氏 名 安田武彦



所属・資格 商学部・教授

下記のとおり報告いたします。

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 アート&デザインイノベーションに関する学際的研究 - 「知識創造理論」と「間と場の理論」の視点からの分析と考察		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 安田武彦	商学部・教授	研究全般の総括
○研究分担者 平澤克彦	商学部・教授	人材イノベーションモデルの構築
所伸之	商学部・教授	環境経営イノベーションモデルの構築
長谷川勉	商学部・教授	金融ネットワークモデルの構築
穴澤万里子	芸術学部・教授	演劇のアートイノベーションモデルの構築
本杉省三	理工学部・教授 (H28.3.31 退職)	劇場のイノベーションモデルの構築
浦部智義	工学部・准教授	地域のアートイノベーションモデルの構築
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		

※「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。

部科校名：商学部

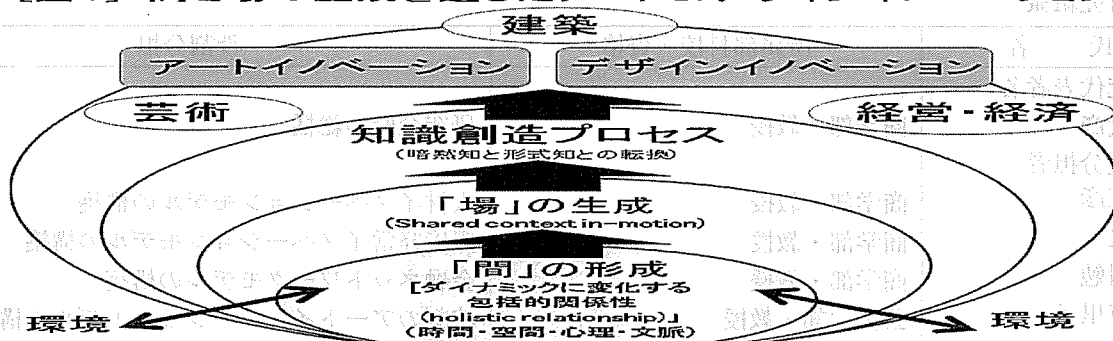
氏名：安田武彦

4 研究目的

本研究は芸術学や建築学を中心とし、さらには経営学や経済学の領域における「アートイノベーション」や「デザインイノベーション」に関して、経営学の「知識創造理論」と哲学の「間と場の理論」の切り口から、理論研究と実証研究を目指すものである。「アートイノベーション」とは主に芸術学分野における新たな創作活動による「革新(イノベーション)」を意味しており、また「デザインイノベーション」とは主に建築学分野を代表として広く工学領域における(製品)開発(Product Innovation)という「革新」(e.g., Brown and Eisenhardt, 1995)、さらによりマクロ的にはクラスター概念(e.g., Porter, 1998)に代表される企業間・産業間を横断した集積ネットワークという新たなデザイン思考によるイノベーションも含んでいる。

図1にあるように、本研究は芸術学や建築学を中心とし、さらには経営学や経済学の知見を横断して、世界におけるアクターたちの有する「創造性(creativity)」に着目し、「暗黙知と形式知の創造プロセス」という知識創造理論と哲学的概念を中心とした「間と場の生成プロセス」という分析フレームワークから、「アートイノベーション」と「デザインイノベーション」に関する理論研究と実証研究を推し進めるものである。これに関する国内外の学術研究の報告は極めて少なく、この成果を世界に向けて発信していくことこそ大きな意義があり、そしてさらなる学術的特色として、「間の理論」に関しては世界的に見ても学術的な蓄積はほとんどなく、これらを解明していくことが本研究の目的となる。

【図1】 間と場の生成を通じたアート&デザインイノベーション



5 研究概要

本研究は2年計画とし、芸術学・建築学・経営学・経済学分野における「アート&デザインイノベーション」に関する質的・量的方法論による事例研究と定量研究を中心とした理論的・実証的研究である。図2に研究計画と方法の流れを示す。平成27年度は文献レビューと新たな命題・仮説の導出に取り組む。主に5つの研究ストリーム(「アートイノベーション」、「デザインイノベーション」、「知識創造プロセス」、「間の生成プロセス」、「場の生成プロセス」に関わる先行研究)からの分析とこれらの関連性について考察する。「知識創造プロセス」、「間の生成プロセス」、「場の生成プロセス」の促進(ならびにこれらの要素間での相互作用による促進)が、「アート&デザインイノベーション」を加速するという理論的命題・仮説の精緻化を行い、新たなオリジナルな理論化を試みる。そして導出された命題・仮説など理論的フレームワークの精緻化と事例研究ならびに定量研究に取り組む。さらに、理論の精緻化を図るため、さらなる文献研究とインタビュー調査やアンケート調査を実施し、定性的かつ定量的分析からの実証研究を深める。平成28年度は研究全般の分析・考察と新たなインプリケーションを導出する。また同時に主に海外での発表に向けての学術論文および学術書の執筆とそのための補足調査を行うと同時に国際学会などでも発表することで研究成果の普及を図る。

【図2】研究計画・方法の流れ

【平成27年度】

【平成28年度】

文献レビューと新たな理論的命題・仮説の導出・精緻化

主に5つの研究ストリーム(「アートイノベーション」、「デザインイノベーション」、「知識創造プロセス」、「間の生成プロセス」、「場の生成プロセス」に関わる先行研究)からの分析とこれらの関連性について考察する。

フィールド調査と事例研究

芸術学、建築学、経営学、経済学における事例を取り上げ、詳細なケース作成に向けた資料収集やインタビューなどを集中的に行う。そして導出された命題・仮説など理論的フレームワークの精緻化と事例研究に取り組む。

【新たな理論構築と実証研究】  
①「アート&デザインイノベーション」の理論モデルの構築  
②「間と場」の理論モデルの構築

研究内容の精緻化と総括  
および対外発表への準備

- ③ 新たな理論構築と実証研究の総括  
⇒ 定性研究のさらなる精緻化
- ④ 「包括的テーマ」と「個別的テーマ」  
毎の研究成果の取りまとめと  
対外発表(学術論文及び書籍)に  
向けた取りまとめ

部科校名：商学部

氏名：安田武彦

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

## 平成27年度 研究結果

## 文献レビューと新たな理論的命題・仮説の導出・精緻化およびフィールド調査と事例研究]

文献レビューは主に5つの研究ストリーム(「アートイノベーション」、「デザインイノベーション」、「知識創造プロセス」、「間の生成プロセス」、「場の生成プロセス」)に関わる先行研究)からの分析・考察とこれらの関連性について考察した。つまり「間と場の生成プロセス」の促進が、人・集団・組織・企業更には産業の「知識創造プロセス」を加速し、新たな「アート&デザインイノベーション」を実現するという命題・仮説の精緻化にある。

1点目には「アート&デザインイノベーション」がいかなる条件で生じるかの命題・仮説の導出である。2点目が「アート&デザインイノベーション」における知識創造プロセスの理論モデルの導出にある。3点目はどのような「間と場の生成プロセス」が、芸術・建築・経営・経済など諸分野における「知識創造プロセス」を加速し、新たな「アート&デザインイノベーション」を実現する要因になるかの命題・仮説の導出である。

文献レビューにおいて、レビューの対象とする論文は、次の3段階のプロセスを通じて特定した。最初に、ISI Web of Knowledge (Social Science Citations Index) のブール検索を実施した。表題、摘要、キーワードを検索範囲とし、「アートイノベーション」、「デザインイノベーション」、「知識創造プロセス」、「間の生成プロセス」、「場の生成プロセス」などを適宜組み合わせ検索した。

そして第1段階では、レビューに関連性の深い学術論文のチェックを行った。第2段階では、Google Scholar を使用して、第1段階と同様なブール検索を行った。Google Scholar の検索結果は極めて大量になるので、査読付英語ジャーナル論文(グローバル&ローカル)と英語による学術書(主要な学術出版社からの発行)およびレバンドな国際雑誌の論考(査読なし)に限定し、また、検索範囲を指定して、経営や経済の社会科学、建築分野、芸術分野に限定した。第3段階では、前の2段階を通じて特定した論文や書籍の参考文献、および、レビュー以前の、申請者にとって既知の重要な論文を手作業で調べた。この第3段階では、前述の検索手順で文献の見落としがないことを確認し、さらに重要な文献を追加していった。

以上のような文献レビューの手法により上述した3項目(「3つの仮説・命題」)に関する命題・仮説の導出を開始した。そして先行研究では十分に考察・議論されてこなかった新たな理論化を今後行っていく予定である。この文献レビューと新たな命題・仮説の導出・精緻化のプロセスは極めて重要である。そして既存の研究蓄積に対して新たな学術的貢献に向けて、理論的フレームワークをグローバルレベルの水準まで引き上げていくことを研究目標としている。

次に、資料収集やインタビューなどフィールド調査による質的研究に向けたデータ収集とこれらの分析と考察の作業を行った。研究代表者と分担者が芸術、建築、経営、経済分野における代表的事例を取り上げ、これら事例研究に必要な資料収集やインタビューを集中的に行った。ケース作成に当たっては、前年度の「5つの研究ストリーム」と「3つの仮説・命題」の内容に関して、詳細な分析と考察を反映していくよう努力した。そして今後、複数の事例研究のクロスケース分析を通じて共通的な知見を導出し、導出された理論的フレームワークの精緻化に取り組む。具体的な研究手法として Grounded Theory (例えば Glaser & Strauss, 1967) と Case study アプローチ (例えば Eisenhardt, 1989) を併用し、raw data からコアとなるカテゴリーを抽出し、これらデータと先行理論を元に新たな理論を導出。

今後、個別の事例研究で先行研究に対して新たな知見を提供できる研究成果が得られた場合は、学会発表のみならず先行して国際レフリージャーナルに投稿していく予定である。

## 代表者と分担者の個別の事例研究

## 研究代表者：安田武彦

研究全般にわたる総括を行った。平成27年度は、主に文献研究を中心として理論化への準備を進めた。また香港のクリエイティブ産業におけるイノベーション・システムの現地調査を行った。文化産業の社会的基盤と埋め込み概念について理論化を行い、クリエイティブ産業におけるリスク、信頼、ネットワークの現地調査を行った。クリエイティブ産業の経済行為は、社会的に構築され文化的に定義されたネットワークと制度に埋め込まれている。そこで産業の社会的基盤について、ネットワーク特性の観点から研究した。あわせて香港におけるクリエイティブ産業の社会的基盤と文化産業政策の関係性を分析した。

部科校名：商学部

氏名：安田武彦

## 研究結果（つづき）

研究分担者：平澤克彦

平成27年度は、創造の行われる場の重要性を分業の視点から検討した。考察の対象として、日本の映画産業を取り上げ、社会の発展には社会的分業の発展が不可欠であるとはいえ、創造の行われる場の意義を考察した。考察の結果は、東アジア経営学会国際連合、第13回モンゴル大会において、Developing Division of Labor and Creativityというタイトルで、中国・河海大学 于金教授と合同で報告した。この論考は、アメリカの雑誌、Journal of Business and Economicに掲載が決定している(Vol. 7, No. 2, 2016)。

この論文では、まず、社会・経済の発展における分業の役割について検討した。つまり社会・経済が発展するにあたって、分業の役割が重要であることを指摘したのが、アダム・スミスであった。けれども、多くの論者が指摘してきたように、アダム・スミスは、社会的分業と企業内分業の区分を行うことはなかった。この社会的分業と企業内分業の関連を明らかにしたのが、カール・マルクスであった。マルクスは、企業内分業の展開が社会的分業の発展を促し、社会的分業の展開が企業内分業を促進するという関係を明らかにした。実際、日本映画でも職場内の分業の発展が社会的な分業の発展につながっていくという関係がみられるのであり、分業の発展が映画産業の発展を支えてきたといえる。だが、独立プロに象徴されるような社会的分業の展開は、黒澤明や溝口健二など著名な監督たちを中心に構築されてきた貴重な才能の共同体を崩壊させてしまう結果となってしまった。それはまた日本映画衰退の要因でもあったことがわかった。

研究分担者：所伸之

平成27年度は、都市空間をグリーン・イノベーションの観点からデザインするスマートシティのプロジェクトに注目し、文献サーベイとフィールド調査を行った。スマートシティはICTを活用することで、都市の抱える環境問題等の解決を目指すもので現在、世界各地で建設プロジェクトが進行している。本研究では、パナソニックが神奈川県藤沢市で建設を進めている Fujisawa Sustainable Smart Town(Fujisawa SST)や経済産業省が主導して進めている「次世代エネルギー・社会システム実証実験」プロジェクトの1つとして実施されている「横浜スマートシティプロジェクト(YSCP)」などに着目し、精力的な調査研究を行った。その際、企業間の知の共創により新しい価値が創造されるメカニズムに分析のフォーカスを当て、「場」の構築、「創発」、「シンセシス」といった知識創造理論のエッセンスをもとに理論的フレームワークを構築し、理論と実践の往復運動を繰り返しながらインプリケーションの導出を試みた。研究成果については、中間報告も含めてすでいくつかの会議やシンポジウムで発表している。

研究分担者：長谷川勉

平成27年度は、「間」を三つの局面から考察した。第一は人間関係の間である。人と人との関係あるいは組織と組織とのつながりを示し、場合によっては間柄という表現に置き換えることができる。強弱によってそのつながりの強度を測定、ないしは人と人との接点によって形状を観察することができる。以下このことを関係の間と呼ぶことにする。第二は時間の間であり、歴史的に形成された時間感覚を指す。期間あるいは瞬間的機会に関わるものである。そして第三として空間の間であり、実存空間ないしはいきられた空間として規定される。

本研究の焦点である日本の協同組織金融機関は、明治期にドイツから移植されたものであるが、日本においてはそのままコピーされたわけではない。研究では、受容を認める日本の存立条件に合致する形で、変容し、定着したことが明らかになり、その成立条件の一部が「間」であった。間は海外に対して差別化し、存立、そして発展させる一要因となった。しかも、間を含むソーシャルキャピタルは、協同組織金融によって利用され、また逆にそれらを蓄積していることが解明された。こうして、日本の協同組織金融機関は、オリジナリティーを獲得したことがわかった。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：商学部

氏名：安田武彦

## 研究結果（つづき）

## 研究分担者：本杉省三

平成27年度は公共建築物における「間」の研究を行い、実態調査を行った。これらの研究成果の一部を以下の論文で発表した。

- 1) 本杉省三「公共建築物の設計者選定方法に関する研究—県・市を対象とした実態調査—」、文化経済学会<日本>研究大会(東京)論文集、2015年7月5日、P.1-9。
- 2) 鎌田泰誠、本杉省三、「人の配置から算出する快適性に関する一考察—横臥時、着席時を対象とした事例研究—」、日本建築学会大会(関東)学術梗概集、2015年9月、P.733-734。
- 3) 本杉省三「生き続ける劇場であるために」、JATET創立25周年記念・JATET劇場演出空間技術展2016セミナー資料、公益社団法人劇場演出空間技術協会、P.建築-1～建築-7、2016年1月26日。
- 4) 本杉省三「サントミューゼ上田のプロジェクト・」マネジメント—審査委員会からオープンまでの施設計画に参加して」、JATET Journal 2015 vol.8、P.11～P.16、2015年7月

[http://www.jatet.or.jp/journal/data/jatet\\_journal\\_2015\\_vol8.pdf](http://www.jatet.or.jp/journal/data/jatet_journal_2015_vol8.pdf)

- 5) 本杉省三「劇場演出空間技術のこれから」、JATET第77号、公益社団法人劇場演出空間技術協会、P.15、2015年8月31日。

## 研究分担者：穴澤万里子

平成27年度はパリ第3大学大学院で、ベルギー人のノーベル賞受賞作家、モーリス・メーテルリンクの象徴派の初期の戯曲にみる4元素（水、火、土、空気）の研究を行った。日本に戻ってからはその中の「水」を取り上げて研究し、論文を作成した。日本で文献資料を調べているうちに作家の日本への影響が想像以上に多かったこともあり、テーマを一部変更してさらに研究し論文を執筆した。

この日本大学の共同研究の為に昨年度執筆した「メーテルリンクの『間』、日本のメーテルランキアンの『間』」も今回の研究の発展には大いに役立った。

## 研究分担者：浦部智義

平成27年度は、地方における一般開放性を重視している施設や歴史を持った文化施設の日常性を中心に、従来から継続して調査していたデータをもとに分析し、それらの研究報告を行った。

一方で、建築の計画的実践として、中山間過疎地域において古民家を改修した文化的拠点施設の整備や集落の拠点となる同種施設における野外舞台の設置などを行った。同時に、それらの効果の検証を、施設の管理・運営者へのヒアリング調査、利用者の使われ方の観察調査、施設のある集落住民への意識調査のデータをもとに分析を行い、日常利用を高める要因や周到に準備されたイベントの重要性などを明らかにした。

課題番号	総 15-006
------	----------

平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28 年 4 月 11 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 景 山 一 郎



所属・資格 生 産 工 学 部 ・ 教 授

下記のとおり報告いたします。

退職,転出の場合は, ( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 次世代自動車用高度運転支援システムに向けた基盤技術構築に関する研究		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 景山 一郎	生産工学部・教授	研究全般のとりまとめおよびドライバ制御動作モデル構築
○研究分担者 青木和夫	理工学部・教授	高齢者の特性計測・解析全般
鳥居塚 崇	生産工学部・教授	ドライバの視覚能力の計測および評価
石橋 基範	生産工学部・准教授	ドライバの行動解析と聴覚情報等の計測および評価
栗谷川 幸代	生産工学部・准教授	ドライバの運転動作解析および各種生体情報による評価
時田 学	商学部・准教授	ドライバ(特に高齢者等)の心理学的評価
山内 ゆかり	生産工学部・助教	認知・記憶・認識等を考慮した 知的情報処理モデル構築と 評価
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		
平成28年度科研費基盤研究(B)にテーマ「高齢者の移動支援と行動モデル構築に関する研究」(研究代表者:景山一郎)で申請。不採択が決定。		

※「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。

部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

#### 4 研究目的

今後の高齢者の生活支援の重要度が増し、これら高齢者の移動手段としての自動車社会を対象とすると、ドライバの身体能力や趣向等の多様化が予測される。そこで、これらはユニバーサル化とは別な個別対応化の方向(パーソナライゼーション)の重要性を示している。しかし、これらすべてのドライバに対し個別対応可能な車両開発は、少量オーダーメイド生産方式を採用する必要がある、現在行われている自動車の大量生産方式を見直す必要が生じ、個々の車両価格を高騰させるなど、現状では製品として成立しない。

これらを考慮すると、次世代の高度運転支援(自律走行車両を含め)として分類することができる。現在のこれら研究の多くはユニバーサル化に向かっており、個別ドライバの趣向等に対応するテーラメイド方式はほとんど検討されていない。特に国内外における研究の多くは、完全自律走行車両によるユニバーサル化に向かっており、しかし、前述の通り今後さらに顕著になる少子高齢化に伴いドライバの多様化が進むことは明確な現実であり、これに対する対応は急務となっている。しかし、これらの基盤技術は模索段階であり、未だ確立されておらず早急に対応が必要な分野となる。そこで、本研究はドライバを前提とする高度運転支援\*個別ドライバ対応化のシステム構築に向けた基盤技術確立を目的とする。これら基盤技術を構築するためには、支援の方向性を明確にする必要がある。そこで、これら重要項目をレーダチャートしてドライバの運転を運転動作・情報処理の面から8つに分類している。本研究では個々のドライバの能力を、計測評価し、問題となる部分のみを支援するという考えに立ち高度支援システムを実現することを目的としている。これら個別の能力は、ドライバの状態監視と動作モデル等の連携から求められるため、本研究ではこれら基盤技術構築を行う。

#### 5 研究概要

本研究は2年度間で結論付けるように計画された。本年度は、ドライバ・自動車・環境系の情報の流れに関する検討を行い、本研究で使用する仮説を明確にする。次にその評価基準について検討を行い、レーダチャートの各軸が持つ意味と計測・評価方法の検討を行う。これを受けて、計測・評価手法の検討実験にはいる。この段階では人間を対象とした実験になるため、本学部に設置されている人を対象とする研究倫理審査委員会の審査を受け、倫理上の問題を回避した上で実験を行う。実験には内容に応じてドライビングシミュレータまたはドライバモニタリングカーを使用し、被験者として20名程度の実験を実施を予定する。また、対象ドライバの多様化に対応するため、高齢者等のドライバだけではなく、通常のドライバの視覚能力の計測を行い、これらが実験条件によりどの程度変化するかを検証を行う。この計測には、この年度導入するオージオメータならびに Tobii グラス2を使用する。

これらの検証と並行して、ドライバモニタリングカーを用いた走行実験を予定する。テストコース(日本大学理工学部交通総合試験路)を使用し、ドライバの知的情報処理モデル構築のためのデータ取得を行う。この結果を用いて、モデル構築の可能性について検討を行う。なお、上記成果に応じて、年度後半の学会において成果公表を計画する。この年度で使用する実験装置ならびに計測機器を下記に示す。

- ・ 実験装置:ドライビングシミュレータ, ドライバモニタリングカー(実験車両)
- ・ 計測機器:生体情報計測装置(心電図, 筋電図, 呼吸, 眼電位他の計測)  
 視覚特性評価装置(静視力, 動体視力, SP, OMS, EH 他の計測)  
 本年度導入機器 オージオメータ(聴覚計測), Tobii グラス2(視覚特性計測)

部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

## 6-1 ドライバモデルを用いたドライバ評価に関する研究：

本研究ではドライバの運転動作実験を行うが、実験に使用する車両の特性により、ドライバ特性に影響を与える可能性がある。そこで当研究室が有する実験車両の特性計測を行い、車両が平均的な特性を持つ車両であることを確認するために実験を行う。続いてその結果を受け、ドライバ特性解析のための実験結果を求めた。

実験車両の特性把握ではステア特性等の定常円旋回特性が重要となる。そこで、本学理工学部の交通総合試験路を用い、部分定常円旋回試験を行った。実験は再現性の面から、操舵角および走行速度一定の舵角一定定常円旋回試験を実施した。主要計測データとして、操舵角、前後方向速度、横方向速度、ヨーレイトを計測し、この結果より旋回半径および横すべり角を算出して特性解析に用いた。その結果、ステア特性および横すべり特性を計測した。その結果、この車両はスタリビティファクタが $1.4 \times 10^{-3}$  ( $s^2/m^2$ )であり、また横すべり特性が $-3.5 \times 10^{-3}$  ( $s^2/m^2$ )となり、弱アンダーステア特性を有する平均的な車両であることを確認した。そこで、ドライバ特性計測に使用する上で問題のないこの車両を用いて以後の実験を行う。なお、横すべり特性の解析では、スタリビティファクタを用いて半径一定定常円旋回特性に変換して横すべり特性を求めた。

本研究では一般ドライバの挙動表現を中心に考えていることから、比較的交通量の少ない一般路を用いた実験を行った。このコースはRTK-GPSで計測したコース路肩の形状から道路センターの位置として示した。なお、本コースは6~8m程度の道路幅を持つ、センターラインが記載されていないコースである。ここで示す例は、自動車の運転頻度が高い運転歴3年以上のドライバであり、実験の詳細を説明した上でインフォームドコンセントを得て実施した。実験では数回の完熟走行を行った上で計測を行った。また前走車両を走行させ、前方環境の安全性を確認するなどの対策を行なった。道路形状は、事前にRTK-GPSを用いて計測し、また実験車両にこのRTK-GPSを搭載し、車両の位置計測に用いた。コースは全長約5km程度であったが、木立等が覆い被さり十分な衛星情報がとれないため精度の高い位置情報が行えなかった後半部分を削除して、前半の約3kmの走行を対象とした。なお、本研究を行うにあたり、日本大学生産工学部の人を対象とする研究倫理審査委員会の承認を得た。

本研究ではドライバの制御動作を表現するため、これまでに過去本研究メンバの一人が提案したドライバモデルを構築した。このモデル構築の中心に据えたのは、実際のドライバの運転挙動をもとに統計処理によりその制御動作要因をきめたことにある。このモデル構築段階で、ドライバ(特に熟練ドライバ)の制御動作の中心がフィードフォワード項であることを示した。また、このフィードフォワード項で発生する運動誤差(特に軌跡)をフィードバック項で補正するという制御動作で、ドライバの操縦動作を概ね表現できることを示した。そこで、これまで、このモデルを中心にドライバ特性解析を行ってきたが、このモデルは制御パラメータが多く、ドライバの特性評価等の段階で、運転行動と現象の関連説明が行い難いことが課題となっていた。そこで、本研究ではこれらの問題点を解消し、できるだけドライバの行動を説明し易いパラメータで評価を試みる。なお、本研究で構築するドライバモデルはこの基本的な制御動作構造を継承し、フィードフォワード項とフィードバック項で構成する。

まず、前述の操縦動作の中心となるフィードフォワード項の解析を行う。過去の知見では、このフィードフォワード制御の情報として、前方の道路形状として、曲率および道路接線角の微分値が適当であることを示した。そこで、本研究でもこの両データを検証して、道路曲率が操舵角とより高い相関を持つことを確認した。この場合前方の曲率をドライバが読み取り操舵角を決めているものと考えられる。実際には前方視野から曲率を判断し、適切と思われる時点で操舵を行っているものと考えられる。そこで、ドライバは広く前方を見ていることから、前方注視時間を決定し辛いことになる。そこで、前方の曲率と操舵角の関係を求め、最も相関の高い点を前方注視点とし、この時のリード時間を予見時間(前方注視時間)と定義する。操舵角と道路曲率との関係から相関係数を求め、予見時間を変更



部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

## 研究結果（つづき）

して相関係数が最大となる点を予見時間として採用した。この結果、前方注視時間（予見時間）が0.98秒となり、またこの時の相関係数は0.96と非常に高い値をしめした。そこで、この結果の傾きと予見時間を用いフィードフォワード操舵を求め、ドライバが行った操舵との関係を求めた。この結果旋回半径が小さい部分（曲率が大きい部分）では若干違いが出ていているものの、それ以外では非常に良い一致をしていることが明らかとなった。また、ここまでの解析ではコース全体を同一注視時間により同定しているが、以前筆者らが行った実験でのアイマークの値は曲率の大きさに応じて変化しているとの知見を得ている。そこで、次に注視時間の変化を導入するため、コース走行データを5秒ごとに同定して解析を試みた。ここで5秒を採用したのは、道路に由来する操舵が比較的低い点（0.2Hz以下）であり、表現周波数がこの1/2となることが懸念されるが、曲率変動によりこれら周波数は表現できる点および人間自体の特性変化がそれほど大きくないと判断し、試行錯誤の結果この値を採用した。この解析結果では走行初期に低い相関関数となったが、それ以外の部分では0.8～1.0弱の非常に高い相関を示した。またこの結果、前方注視時間が概ね1秒程度の値を維持していることがわかった。また、曲率が大きな（旋回半径が小さい）部分で良い一致が見られなかったが、その問題点を解消されていることが明らかとなった。また、この解消のためには速度変化による対応だけではなく、曲率の大きな部分では注視時間を短くして対応をしていることがわかる。このような結果より、運転に慣れたドライバの場合、フィードフォワード操舵が操舵角の主要要素となっていることが示された。

次にフィードバック操舵について検討を行なった。本来ドライバはコース形状に応じて追従動作を行っているが、それ以外にコース形状とは異なる障害物回避動作、ディストラクションや覚醒度低下等前方情報を適確に獲得していない場合や、また呼吸や姿勢変化等の体動の影響を受ける。さらに、本研究で使用している実験結果では障害物回避等が入らないため、前述のフィードフォワード操舵がドライバの操舵の主要要素となっている。このためフィードバックによる操舵項は比較的小さく、その他のノイズの影響を大きく受けるため、分離が非常に難しいことが想像される。そこで、本研究ではドライバの操舵角からこれらフィードフォワード操舵角部分を差し引き、求めた操舵誤差について検討を行う。本研究では、解析結果からドライバの運転動作変化の説明および評価を目的としている。そこでどのようなアルゴリズムを構築するかが問題となるが、フィードフォワード操舵が前方注視時間（距離）を有していることから、前方注視モデルによるフィードバック部を検討する。通常、前方注視二次予測モデル以上では、積分操舵とする必要がある。これは曲線部分の操舵角固定動作が表現できないためである。しかし、本研究で構築するモデルでは、基本的なコース追従部分はフィードフォワード部分が受け持つため、積分操舵にとらわれずこれを含め種々の操舵検討を行必要がある。そこで、本研究ではフィードフォワードで求めた注視時間を採用し、さらに現在位置とその時点のコースデータから偏差を求めた。

次にコース偏差とフィードバック操舵項との相関および積分操舵を意識した操舵角速度（積分操舵項の検討）との相関を検討する。その結果、積分操舵を用いた一般的な前方注視モデルの検討では相関係数が0.2以下でほぼ無相関となることから採用不適と判断した。そこで、積分項を含まない解析結果を示す。この解析では、フィードフォワード同様5秒間ごとのデータを使用した解析を行った。その結果、相関係数が非常に減少している部分が存在するものの、他の操舵要因を加味すると比較的良く表現されていると判断される。以上の結果より、図1に示すように本研究で構築したドライバモデルがある程度フィードバック操舵を表現しているものと考えられる。

ここまでにおいて解析した結果から、フィードフォワードを含む前方注視三次予測モデルを構築した。これまでの解析結果より求めたドライバモデルを構築した。このモデルで構成された解析結果と、ドライバの操舵角の比較を行ったところ、実験結果と解析結果の相関係数は0.989と非常に高いことが分かり、このモデルがドライバの応答特性を良く表現していることを示した。そこで実ドライバの特性を同定するモデルとして、十分に所期の目的を達しうるモデルが構築されたと考えることができる。なお、前方注視モデルでは積分型式の操舵部分を含んでおらず、操舵の基本部分はフィードフォワードから構成されるこ

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

## 研究結果（つづき）

とがわかる。しかし、この場合、定常偏差等の修正が行なえないことになり、ロバスト性にかけることが分かる。そこで、今後別途積分要素による定常偏差等の検討を行う必要がある。今後の課題として、この研究テーマの結果が道路環境における障害物の考慮、定常偏差等に対する積分項等ロバスト性に関する考慮を必要とする。また、このモデルは実際のドライバの運転行動を同定することにより得られるため、ドライバ個別の動作の違いを表現できる可能性を持ち、さらに各種パラメータ（操舵ゲイン、前方注視時間、操舵応答遅れ、フィードフォワード項とフィードバック項の比率等々）により、ドライバの違い、ドライバ状態変化等の評価につなげられる可能性がある。次年度の研究でこれらに対する検討を行う。

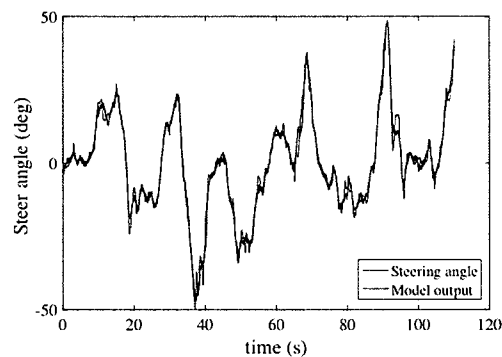


図1 ドライバによる操舵とモデル出力との比較

## 6-2 ドライビング・シミュレータの構築

本研究では、個々のドライバの運転能力を計測評価して問題となる部分のみを支援するという考え方に立ち、高度運転支援システムの構築に向けた研究を行おうとしている。運転能力の計測評価にあたり、初心者から熟練者、若年者から高齢者といった様々なドライバが対象となるため、運転能力も多様なものとなる。また、市街地、高速道路といった道路交通環境への対応力も考慮する必要があるため、様々な場面でデータ精度を確保できる（すなわち条件統制できる）実験環境が望まれる。こういった、実験時の安全確保、条件統制といった要求に応じて効率的に実験を進めるために、運転環境を模擬できるドライビング・シミュレータ（DS）は不可欠である。

こと日本では、交通事故を事故類型別に見ると「追突」「出会い頭衝突」が多くの割合を占める。警察庁交通局が発行する「平成26年中の交通事故の発生状況」によると、追突の構成率が36.2%、出会い頭衝突の構成率が24.5%で、この2つの事故類型だけで全体の6割を占める。追突は単路のみならず、交差点での信号待ち車両への追突といった場面も考えられる。出会い頭衝突は、信号のある交差点のみならず、無信号交差点における非優先道路との衝突といった場面もある。このような場面ではドライバの視覚探索や注意の割り当てといった認知能力が事故に影響すると考えられ、運転能力が問題視される場面の一つと言えよう。そこで、交差点のある市街地の運転環境を模擬するために、以下の考え方でDSの機能を増強することとした。

市街地には多くの交通参加者がおり、運転中、ドライバの視認箇所も多岐に渡る。そのため、本来であれば360度の視野を持つDSが望ましい。また、右左折のある交差点では動揺装置（特にターンテーブル）があると模擬性能が高まる。しかし、それらを備えようとするとな大規模なDSとなり、模擬の質感は上がる一方で、時間的、費用的には不利である。本研究の趣旨である運転能力、特に追突や出会い頭衝突で問題視されるような前方・側方の視覚探索や注意等を調べるという実験内容や、そのための導入の費用対効果を考えると、必ずしも動揺装置は必要でない。また、360度でなくても良く、180度～270度の視野角でも問題ないと見積もられる。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

## 研究結果（つづき）

## 6-3 運転能力の全体像の明確化と自覚症状の調査

個々のドライバの運転能力を計測評価するにあたり、そもそも運転能力とはどういった要素で構成されるのか全体像を明らかにした。人間機械系および人間工学を専門とする4名の研究者によるブレーストーミングと議論により、能力の構成要素71項目（後述）、運転・能力への影響要因23項目を整理・抽出した。

次に、各「能力の構成要素」、例えば視野、可聴域、速度知覚、注意配分、車間距離調整といった各要素の能力不足が問題となる場面や運転操作・行動を検討し、質問文に落とし込み、一般ドライバを対象として質問票を用いて自覚症状の程度を調査した。

## 6-3-1 調査対象者の設定

日頃から週1日程度は自動車を運転する一般ドライバ8000名（男女、25歳以上の方）へのインターネット調査を計画した。

人数の根拠であるが、今回、運転能力に関する自覚症状を様々な面から質問するが、自覚症状があるとする該当率が必ずしも高くないケースもある。加齢影響や性別、普段から運転している地域（居住地）等の影響を統計的に検討するために、 $\chi^2$ 適合度検定や $\chi^2$ 独立性検定を用いた分析を実施する計画としたが、該当率が低い場合、年齢・性別・地域等で群分割したときに1群あたりの対象者数が少なくなることが想定される。すると、分析の信頼性に影響する可能性がある。そこで、該当率5%、群分割が4（適合度検定であれば4群、独立性検定であれば $2 \times 2$ の4セルの集計表）と仮定したとき、1群の期待値が100名（質問票調査での信頼性を確保するための経験的な値）となるような対象者数を設定するためには8000名が必要であると試算された。

調査では54のセルを設定し、対象者を割り付けた（割付のないセルもある）。セル設定の条件は以下の通りである。

- ①性別（2群）： 男性，女性
- ②年齢層（3群）： 25～39歳，40～59歳，60歳以上
- ③居住地（3群）： 東京23区・近郊，地方の中核都市，地方都市
- ④自宅周辺の交通環境（3群）： 公共交通が便利であり車がなくても問題なし，公共交通はあるが車を使いがち，移動手段は車が主体

## 6-3-2 調査結果

自動車運転を「認知」「判断」「操作・行動」のフェーズに分けて各フェーズで求められる能力を整理した結果と、各能力の不足に関する自覚症状の調査結果を示す。まず、表1は「認知」に関わる能力である。質問に「わりとあてはまる」「少しは身に覚えがある」と回答した場合を「各質問への該当者」と仮定し、その比率、つまり該当率が30%以上の質問に着目した。その結果、「認知」に関しては、静止視力やスポーツビジョンといった視知能力や、注意、知覚反応といった情報処理能力の不足を感じているドライバが相応数いることが分かった。

次に、「判断」「操作・行動」に関わる能力の調査結果をそれぞれ表2、表3に示す。これより、学習や記憶、曲がるときの判断に能力不足の自覚症状があるものの、操作・行動には現れていない様子が分かった。人間は能力の低下・不足を感じると、「できる範囲で安全にやる」といった補償行動を取ることが知られている。特に高齢者は、自身の能力低下を自覚することで、慣れた道しか普段は運転しない、夜間は運転しないといった補償行動で事故リスクを低減することも指摘されている。

## 6-3-3 今後の計画

今回、対象者の割付を緻密に行っており、その特長を活かして年齢層、性別、居住地と自覚症状との関係を分析していく。同時に、運転負担感受性の個人特性データも取得している。これは、年齢や性別には依存せず「そもそもどういう運転に負担を感じるか」といった特性である。運転負担感受性との関係も調べることで、年齢・性別といった生物学的な部分と、負担感受性や居住地（運転環境）といった後天的に形成された部分との切り分けも検討する必要がある。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

研究結果（つづき）

表1 「認知」に関わる能力の構成要素と自覚症状

大項目	運転能力の構成要素		質問文	回答人数の比率 (%)			該当率 ≥30%	
	中項目	個別項目		わりとあ てはまる	少しは身 に覚えが ある	あてはま らない		
1	認知	視覚	静止視力	遠くの看板や標識の文字が見えにくい。	11.5	38.9	49.5	○
2			視野(静的)	視野の端の方に歩行者がいるとき、気づきにくいことがある。	4.6	38.1	57.3	○
3			調節力(ディオプター)	メータやカーナビの小さな文字に、焦点を合わせにくい。	5.1	22.3	72.7	
4			有効視野	(2と兼用)				
5			周辺視での気づきやすさ	(2と兼用)				
6			動体視力(奥行き:KVA)	運転中、近づいてくる看板や標識の文字が速くて、読めないことがある。	6.1	33.2	60.7	○
7			動体視力(左右:DVA)	交差点等で、横から飛び出してきたバイクや自転車に気づきにくいことがある。	4.0	39.0	57.0	○
8			コントラスト感度	夜、街灯が暗い道で、少し先の方の道路上の白線が見えにくい。	11.1	43.4	45.5	○
9			眼球運動の正確さ	看板や標識を見るとき、目をきちんと向けず、だいたいの内容を見て済ませている感じがする。	8.9	44.7	46.4	○
10			深視力(奥行き知覚の正確さ)	停止線で止まるとき、距離感がよくつかめなくて、止まる位置がまちまちな気がする。	3.0	17.9	79.1	
11			瞬間視能力	行先標識の中に地名が3つも4つもあると、パッと見て、探している行先を見つけれないことがある。	9.5	42.5	48.0	○
12			目と手の協応運動	エアコン等のスイッチを見ながら手を伸ばしたとき、めざすスイッチに一発でさわれないことがある。	6.0	32.6	61.4	○
13			(裸眼)立体視	(設定なし)				
14			色覚	(設定なし)				
15			鏡映描写の能力	バック駐車や縦列駐車で、左右どちらかにハンドルを切ればよいが、つい迷ってしまう。	6.6	23.6	69.9	○
16			空間内の注意配分(トップダウン)	(29と兼用)				
17	聴覚	可聴域(周波数)	走行中、同乗者と普通に話していても、声が聞き取りにくい。	4.4	24.0	71.6		
18		可聴域における知覚閾値(音量)	(17と兼用)					
19		音の空間定位の知覚	救急車が近づいてくるとき、サイレンの方向や距離感を正しく把握しにくいことがある。	6.7	37.3	56.0	○	
20		音による距離の知覚	(19と兼用)					
21	皮膚感覚	触覚(機械的刺激)の知覚閾値	(22と兼用)					
22		反力の知覚閾値	わだち等でハンドルを取られたときに、気づくのが遅い感じがする。	2.3	17.1	80.6		
23	前庭機能	直線的な加速度の知覚閾値	発進時に、ゆっくりアクセルを踏んだつもりが、思った以上に加速してしまっていることがある。	3.2	19.6	77.2		
24		直線的な加速度の知覚分解能	(23と兼用)					
25		回転運動の知覚閾値	まっすぐな道でも「車が左右にフラフラ揺れる」と、同乗者から言われることがある。	2.0	9.9	88.1		
26		回転運動の知覚分解能	(25と兼用)					
27		速度の知覚	ふと速度計を見ると、自分が思っている以上に車の速度が出ていることがある。	6.5	37.0	56.4	○	
28	注意	注意転導の生じやすさ(ボトムアップ)	目立つ看板・歩行者やラジオの音楽等にひかれて、ついそちらに注意が向いてしまう。	3.8	30.8	65.5	○	
29		タスク間の注意配分	カーナビや同乗者の音声案内に注意を向けていると、前への注意がおろそかになることがある。	4.4	32.0	63.6	○	
30		業中力の制御	同乗者と会話したり考え事をしたりすると、運転に集中できなくなる。	6.3	34.8	58.8	○	
31	知覚反応	反応の速さ	他の車の割り込みや急ブレーキなど、急な動きに対して、自分の反応が一瞬遅れている気がする。	3.7	26.7	69.6	○	

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

研究結果（つづき）

表2 「判断」に関わる能力の構成要素と自覚症状

	運転能力の構成要素			質問文	回答人数の比率 (%)			該当率 ≥30%
	大項目	中項目	個別項目		よくある	ときどきある	ほとんどない	
32	判断	学習	リスク見積り(危険の判断)	黄信号では、止まらずにそのまま進むことが多い。	11.6	52.3	36.0	○
33			運動の技能の学習(≒小脳)	レンタカーや他人の車といった乗り慣れない車だと、アクセル/ブレーキやハンドルの操作になかなか慣れない。	10.0	36.1	53.9	○
34	記憶		短期記憶の容量	カーナビや同乗者の道案内があっても、右左折の交差点を時々まちがえてしまう。	3.5	25.7	70.8	
35			長期記憶の引き出しやすさ	昔よく運転していた地域でも久しぶりだと、地図やカーナビ等の案内なしで運転するのは難しい。	5.5	27.0	67.5	○
36	周囲との関わり方		過信傾向の強さ	(37と兼用)				
37			依存傾向の強さ	わりと知っている道でも、目的地まで行くのに、つい行先標識やカーナビに頼ってしまう。	6.5	20.6	72.8	
38			思い込み	ふだん、目の前を横切る車がまずい交差点だと、つい「車が来るはずない」と思ってしまう。	2.9	24.2	72.9	
39			ステレオタイプ	(設定なし)				
40	減速・停止時		ブレーキタイミング	ブレーキを踏むべきか、踏まざるべきか、すぐに判断がつかないことがある。	2.4	20.0	77.5	
41			主観的停止速度の大きさ	一時停止の交差点で、自分では止まったつもりなのに「止まってない」と言われることがある。	2.0	16.6	81.4	
42	曲がるとき		カーブ進入速度の適切さ	カーブで速度が出すぎていて、曲がりながら、ついブレーキを踏むことがある。	3.3	33.4	63.4	○
43			交差点進入速度の適切さ	(42と兼用)				
44			操舵タイミングの適切さ	曲がるときにハンドルの切り始め/切り戻しが遅れることがある。	2.0	16.1	81.9	
45			視認場所の適切さ	カーブや右左折で、曲がった先に対向車や歩行者がいてヒヤッとすることがある。	3.3	41.4	55.3	○

6-4 Recurrent-SOM を用いたドライバモデルの構築と可視化に関する研究

近年、交通事故死及び事故件数は減少している。それは、ブレーキアシストシステムや自動追尾システムなど高度運転支援システムの技術が上がっているためである。現在、事故データの統計解析による事故発生要因の分類、事例解析による事故発生過程の明確化等が行われている。事故発生件数を減らすためには、事故発生要因の定性的な分類だけではなく、ドライバの認知、判断、操舵特性が事故発生に及ぼす影響度の解析も重要となってくる。本研究では、複雑かつ膨大なデータのクラスタリングができる自己組織化マップ(Self-Organizing Map: SOM)[1]を適用し、ドライバ自身の認知、判断を取り入れたドライバモデルの構築を提案する。さらに、SOMに Recurrent 構造を適用した Recurrent-SOM(RSOM)を用いることで、高次元データの可視化を行い、高次元時系列データである実走行における実データの解析を行った。

従来研究では、交通事故発生に及ぼす影響としてドライバモデルに使用した実データは、操舵特性と車両状態量及び道路環境情報であった。本研究では、ドライバの認知、判断を取り入れたドライバモデルの構築を目指し、従来研究で用いられた実データに加えて、生体情報を取り入れ、高次元時系列データの取り扱いに適した RSOM を用いて非線形ドライバモデルを構築する。

SOM)を適用し、ドライバ自身の認知、判断を取り入れたドライバモデルの構築を提案する。さらに、SOMに Recurrent 構造を適用した Recurrent-SOM(RSOM)を用いることで、高次元データの可視化を行い、高次元時系列データである実走行における実データの解析を行った。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

研究結果（つづき）

表3 「操作・行動」に関わる能力の構成要素と自覚症状

	運転能力の構成要素			質問文	回答人数の比率 (%)			該当率 ≥30%	
	大項目	中項目	個別項目		よくある	ときどきある	ほとんどない		
46	操作・行動	「走る」	直進時の車速調整	まっすぐ走っていても、速度調整をどうも思うようにできないことがある。	1.7	12.6	85.7		
47			発進時の車間距離の調整	前の車との車間距離が、開きすぎたり詰まりすぎたりすることがある。	3.2	28.6	68.2	○	
48			定速時の車間距離の調整	(47と兼用)					
49			安全確認の行動	ルームミラーやサイドミラーでの後方確認が、他の人よりおろそかのような気がする。	2.8	19.7	77.4		
50			白線内位置の適切さ	気がつく、道路の白線を右や左に寄り過ぎていることがある。	2.1	19.5	78.4		
51			アクセルペダル操作の正確さ	(46, 47と兼用)					
52			シフト操作の速さ・正確さ	(設定なし)					
53			シフト選択の適切さ	(設定なし)					
54			クラッチ操作の正確さ	(設定なし)					
55			「止まる」	減速時の車速調整	止まるとき、減速しすぎたり不十分だったりして、思うように止められないことがある。	1.8	14.9	83.3	
56		減速時の車間距離の調整		(55と兼用)					
57		A/Bペダル踏み換えの速さ		赤信号には気づいても、ブレーキを踏むのがつい遅れることがある。	1.7	18.3	80.0		
58		ブレーキペダル操作の正確さ		(55と兼用)					
59		シフト操作の速さ・正確さ		(設定なし)					
60		シフト選択の適切さ		(設定なし)					
61		クラッチ操作の正確さ		(設定なし)					
62		「曲がる」		カーブでの車速調整	(42と兼用)				
63				右左折時の車速調整	(43と兼用)				
64				車線トレースの正確さ	カーブを曲がっているときに、ハンドルの「切り増し」や「切り戻し」をしがちである。	2.2	16.4	81.4	
65			操舵量の適切さ	(64と兼用)					
66	アクセルペダル操作の正確さ		(42と兼用)						
67	シフト選択の適切さ	(設定なし)							
68	身体特性	運転姿勢の適切さ	運転中、ハンドルやペダルの位置が近すぎたり遠すぎたりして、しっかり感じないことがある。	1.8	16.4	81.8			
69		関節可動域	ハンドルを切るとき、腕の動きがどうも「ぎこちない」ような気がする。	2.3	12.8	84.9			
70		発揮力	ハンドルやペダルが、自分にとっては「操作していて重い」感じがする。	1.9	10.7	87.5			
71		四肢の欠損・障がい	(設定なし)						

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

研究結果（つづき）

従来研究では、交通事故発生に及ぼす影響としてドライバモデルに使用した実データは、操舵特性と車両状態量及び道路環境情報であった。本研究では、ドライバの認知、判断を取り入れたドライバモデルの構築を目指し、従来研究で用いられた実データに加えて、生体情報を取り入れ、高次元時系列データの取り扱いに適したRSOMを用いて非線形ドライバモデルを構築する。

SOMはデータの可視化に適しており、不完全な情報から柔軟かつ迅速な判断を行うのに適している。また、現象(データ)から形成し得る認識モデルの様々なバリエーションを作り出すことができる。さらに、SOMにRecurrent層を取り入れることで、入力データに時系列の概念を取り入れ、データの時系列変化を表現することが可能になる。これらの特徴から、本研究で構築するドライバモデルは、複雑で高次元な時系列データを視覚的かつ客観的に比較し解析することが可能になるモデルであると考えられる。

RSOMで使用する勝者判定、学習の式は(2)~(5)に表す。

$$y_i(t) = (1 - \beta)y_i(t - 1) + \beta(x(t) - w_i(t)) \quad (1)$$

$$\text{勝者判定} : y_d = \min\{\|y_i(t)\|\} \quad (2)$$

$$\text{学習} : w_i(t + 1) = w_i(t) + hci(t)y_i(t) \quad (3)$$

$$\text{近傍関数} : hci(t) = \alpha(t) \cdot \exp\left(-\frac{\|r_c - r_{i1}\|^2}{2\sigma^2(t)}\right) \quad (4)$$

ここで $\beta$ はリカレント係数、 $x(t)$ は入力データ、 $w_i(t)$ は参照ベクトル、 $\alpha(t)$ は学習率、 $r_c$ と $r_i$ は勝者ノード $c$ とノード $i$ の位置ベクトル、 $\sigma$ はパラメータである。

本研究で用いる実験データは、高速道路の往復走行を計4回行った際の車両データと生体データである。また、1回走行を行う毎に休憩を取り、休憩時に計測した生体情報を基に、ドライバの状態を解析する。生体情報は、客観的評価である心拍、腹部呼吸、胸部呼吸といったものと主観的評価であるドライバへのアンケートである。今回実験で使用する生体データは客観的評価のものを使用した。車両データとして{操舵角、操舵トルク}{前方向速度、横方向速度}{前後方向加速度、横方向加速度、上下方向加速度}{ロールレイト、ピッチレイト、ヨーレイト}{ロール角、ピッチ角、ヨー角}といった時系列データを用い、4本の走行データのうち2本目、3本目、4本目を使用した。

データの次元数は13個の車両データと3個の生体データを合わせた16次元である。車両データの種類が多いので、ドライバモデルへの影響が強くなってしまおうと考え重みづけをした。重みは前述の順に、{0.5,0.5}{0.5,0.5}{0.3,0.3,0.3}{0.3,0.3,0.3}{0.3,0.3,0.3}と設定した。RSOMの学習後に、各回の走行時の時系列データを色分けして競合層上に軌跡として表示した。RSOMのパラメータは、競合層のノード数は400、学習率 $\alpha$ を0.7、リカレント係数 $\beta$ を0.7、学習回数を10000にした。

実験は車両データのみ重み有り、車両データ+生体データの重み有り、車両データ+生体データの重み無しとの3つの環境で行った。それぞれの実験での競合層及びデータ空間を図2、図3、図4に示す。各回の走行は同一区間を同条件で走行したものであるが、2本目と3本目は軌跡に重複が多く、4本目とは区別される結果となった。

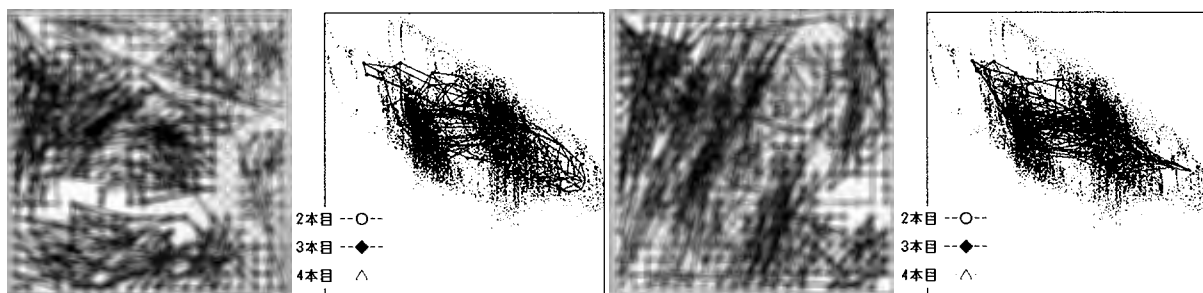


図2.車両データのみ重み有

図3.車両+生体データ重み有

部科校名：生産工学部

氏名：景山一郎

## 研究結果（つづき）

各回の走行は同一区間を同条件で走行したものであるが、2本目と3本目は軌跡に重複が多く、4本目とは区別される結果となった。車両データのみで解析を行った図1に対して、生体データを加味したモデルによる解析結果である図3では、ドライバの疲労度や注視点の違いによる景況か、各回の軌跡が別々の領域に分離され、区別可能な結果となった。

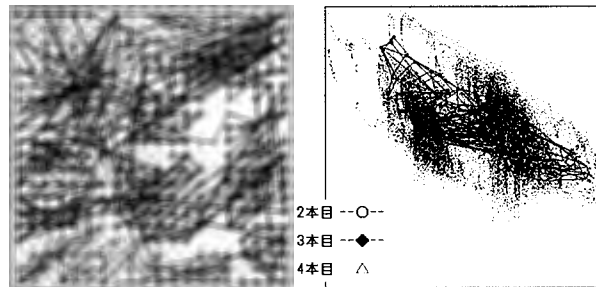


図4.車両+生体データ重み無

図4は重みをなくした実験である。図3と比較して、軌跡が重複する箇所が増えている。重みをなくしたことにより生体データの影響が薄れ、ドライバの状態があまり反映されていないと考えられる。本研究では、生体データを取り入れたドライバモデルの構築を行い、Recurrent-SOMでの高次元時系列データである車両走行時の実データの可視化、解析を行った。高次元（16次元）の車両データ及び生体データによるドライバモデルの構築において、各属性に重みを付与したことで、ドライバの認知、状態の影響を反映したモデルとなることが確認できた。

## 6-5 外部学会への報告

- 1) 景山，栗谷川，山内，石橋，鳥居塚，山田，青木，時田：高度運転支援システムに向けたドライバモデル構築に関する研究，自動車技術会平成27年度春季学術講演会にて講演（2015/10）
- 2) 景山，栗谷川，山内，石橋，鳥居塚，山田，青木，時田：高度運転支援システムに向けたドライバモデル構築に関する研究第2報，自動車技術会平成28年度春季学術講演会にて講演予定（2016/5）



課題番号	総 15-007
------	----------

平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28 年 5 月 10 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 佐々木 直栄



所属・資格 工学部・教授

下記のとおり報告いたします。

退職,転出の場合は, ( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題		
二酸化炭素とイオン液体を用いた新しい発電サイクルの開発		
2 研究組織		
氏 名	所属部科枝・資格	役割分担
○研究代表者名 佐々木 直栄	工学部機械工学科・教授	研究統括、熱交換器の開発および熱伝達特性の評価
○研究分担者 栗原 清文	理工学部物質応用化学科・教授	二酸化炭素＋イオン液体混合媒体の熱物性測定およびサイクル評価
児玉 大輔	工学部生命応用化学科・准教授	二酸化炭素＋イオン液体混合媒体の熱物性測定およびサイクル評価
松田 弘幸	理工学部物質応用化学科・准教授	二酸化炭素＋イオン液体混合媒体の熱物性測定およびサイクル評価
田中 三郎	工学部機械工学科・助教	熱電変換による熱回収器の開発および熱回収量評価
田中 勝之	理工学部精密機械工学科・准教授	発電サイクルの開発および発電性能評価
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. 研究費名：財団法人前川報恩会 学術研究助成 研究課題名：高沸点作動流体の定圧比熱測定による熱力学データベースの高精度化 採否など状況：採択		
2. 研究費名：科研費 基盤研究 (C) 研究課題名：オーガニックランキンサイクル用作動流体の臨界点測定と熱力学表データベースの作成 採否など状況：否		
3. 研究費名：科研費・挑戦的萌芽研究 研究課題名：イオン液体の溶液構造変化の解明とガス分離回収技術への展開 採否など状況：否		
4. 研究費名：JST 平成 28 年度マッチングプランナープログラム企業ニーズ解決試験 研究課題名：ハイブリッドイオン液体を利用した二酸化炭素吸収分離再生プロセスの開発 採否など状況：申請中		

※「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。

部科枝名：工学部機械工学科

氏名：佐々木 直栄

## 4 研究目的

## (1) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

本研究は、再生可能エネルギーの開発を推進すべく、100℃以下の低品位熱源を有効利用するために二酸化炭素とイオン液体を用いた新しい発電サイクルを提案し、熱力学物性を含めたサイクルの特性評価、要素機器の開発、発電機の試作および発電性能の評価をおこなう。また、これらの評価を基に発電サイクルの特許出願もおこなう。

新しい発電サイクルは、高圧の二酸化炭素がイオン液体へ吸収される特性および二酸化炭素とイオン液体との混合物が減圧によって二酸化炭素を放出してイオン液体が再生する特性を応用する。また、これらの吸収および再生過程において、二酸化炭素が移動する際のエネルギーをタービンで軸動力として取り出し、発電機で電力に変換するものである。吸収過程で必要な高圧の二酸化炭素を得るためには、二酸化炭素サーバーに取り付けた熱交換器を介して高温熱源から二酸化炭素が受熱することで二酸化炭素の温度を上昇させて高圧化する。また、再生過程で必要な減圧操作は、二酸化炭素サーバーの熱交換器を介して低温熱源から二酸化炭素が放熱することで二酸化炭素の温度を低下させることで二酸化炭素サーバー内を減圧する。二酸化炭素を加熱・冷却を繰り返したサイクルとするため、実用的には吸収と放出の過程は、タービンの向きは固定し、切換弁で二酸化炭素の移動する向きを変えてタービンに導入する。また、吸収および再生過程における発熱・吸熱を利用した熱電変換によるハイブリッド発電とし、総合的なエネルギー変換効率の向上も目指す。

新しい発電サイクルを実現するために、各研究者が以下のテーマを分担し、明らかにする。

- ・二酸化炭素とイオン液体の 100℃以下における熱力学物性（温度—圧力—密度の関係、混合熱、溶解度）を測定し、サイクル計算のための状態図、物性値表を作成する。
- ・二酸化炭素を熱源から加熱・冷却するための熱交換器の開発および性能評価（加熱・冷却に対する圧力応答と熱伝達特性の測定）をおこなう。
- ・二酸化炭素とイオン液体の混合容器一体型の蓄熱式熱電変換器を開発し、発熱・吸熱に対する出力電圧、電流、電力の測定による発電評価をおこなう。
- ・発電サイクルから軸動力を取り出すためのタービンと発電機からなるシステムを構築し、それらの動作確認と新しい発電サイクルによる発電性能評価をおこなう。

## (2) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

東日本大震災における原子力発電所事故を受けて、より一層、再生可能エネルギーの技術開発が求められており、また、震災当初の停電により分散型電源への転換も注目を集めている。そのような中、風力発電や太陽光発電などの従来からある再生可能エネルギー技術の改良は進んでいるものの、まったくの新しい試みの研究例は少なく、再生可能エネルギーのブレークスルーは期待できないのが現状である。

本研究は、新しい発電方式を提案するものであり、太陽熱や温泉熱、生活排熱など 100℃以下の低品位熱源を利用した分散型電源の一つとすることを想定している。本研究の特徴は、近年、不揮発性を有した環境調和型溶媒として広く国内外で注目を集めているイオン液体を活用したものである。特に二酸化炭素のイオン液体への吸着性と圧力による制御のし易さに着目したほか、不燃性や低環境負荷、低コストの面でメリットがある。二酸化炭素とイオン液体の系に関する研究は、二酸化炭素の分離回収・隔離貯留プロセスに利用することを目的として盛んに行われているが、国内外においても、二酸化炭素+イオン液体を発電サイクルの作動流体として使用した例は皆無であり、日本発のみならず、日大発の革新的な技術となりうる。本研究を遂行できれば、知見が不足している二酸化炭素+イオン液体系の発熱メカニズムを解明できるだけでなく、小型で安全な発電機を幅広く普及できることになる。これまでの原子力発電所や火力発電所等の大型な一極集中型発電所の時代が終わり、地域もしくは各家庭で小型発電機を所有し、太陽熱や生活排熱を用いて発電が可能となり、エネルギーの地産地消が実現できると考えている。

したがって、本研究は、地球温暖化防止対策の視点から非常に独創的で学術的に高い意味を持つと考えられ、グリーン・イノベーション推進に寄与できるだけでなく、我が国の産業界の技術競争力を高め、社会的に大きな意味を持つ。

## (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）

タービンを用いた発電方式は、原子力発電や火力発電で水を作動流体としたランキンサイクルが代表的であり、地熱発電では水の代わりに沸点の低いフロンやアンモニア、ペンタン等の炭化水素を用いたオーガニックランキンサイクルの開発が進められている。水を作動流体としたランキンサイクルは、効率を上げるために超高温化しており、大型で一極集中型電源に特化しており、小型の分散型電源には向いていない。オー

部科校名：工学部機械工学科

氏名：佐々木 直栄

ガニックランキンサイクルにおいては、比較的低温の熱源を用いることができ、小型発電機の開発は進められているが、基本はランキンサイクルであり、学術的な新規性は特になく、フロンやアンモニア、ペンタンなどの環境負荷や毒性、可燃性などの問題点を解決する代替フロンの開発が研究テーマとして盛んに行われている。また、海洋温度差発電では、アンモニア水溶液の吸着性を利用したカーリーナサイクルや上原サイクルが提案されているが、アンモニアの毒性と腐食性による取り扱いの難しさやプロセスの複雑さも伴い、普及が進んでいない。

不燃性で毒性も低い二酸化炭素などの自然冷媒は、ヒートポンプ給湯機の冷媒として使用されているが、成績係数(COP: Coefficient Of Performance)が低く、寒冷地における COP 低下や電力消費も含めた機器全体での温暖化防止という点で課題が残る。さらなる COP 向上や機器全体での温暖化防止のため、二酸化炭素などの自然冷媒の機能特性向上が望まれている。

## 5 研究概要

### (1) 二酸化炭素+イオン液体混合媒体の熱物性測定

二酸化炭素とイオン液体の 100℃以下における熱力学物性（温度—圧力—密度の関係、混合熱、溶解度）を測定し、サイクル計算のための状態図、物性値表を作成する。具体的には、イミダゾリウム系カチオンとトリフロオロメタンスルホニルアミド(TFSA)などフッ素系アニオンからなる安価で化学的及び熱安定性に優れたイオン液体を主な対象に、二酸化炭素共存下におけるエンタルピーや溶解熱など熱量データを測定する。

また、二酸化炭素に対するイオン液体の添加効果や溶解性について考察し、イオン液体の二酸化炭素共存下におけるガス膨張率やガス吸収量を測定する。

さらに、イオン液体の構造の相違がガス吸収量や体積膨張率に及ぼす影響を考察し、混合熱量も含めた熱力学物性を総合的に評価する。

### (2) 熱交換器の開発および熱伝達特性の評価

高温・低温熱源を用いて二酸化炭素を加熱・冷却するための熱交換器の開発ならびに性能評価（加熱・冷却に対する圧力応答と熱伝達特性の測定）を、二酸化炭素サーバーを設計・製作して、実施する。性能試験では、高温・低温熱源として循環式恒温槽を高温用と低温用の 2 台準備して、切替弁により二酸化炭素サーバーの熱交換器流路を切替え、熱交換器出入口に取り付けた温度計と流量計により熱移動量を測定する。同時に、二酸化炭素サーバー内に設置した温度計と圧力計により二酸化炭素の受熱量および圧力の変化を観察することにより性能を評価する。

### (3) 熱電素子を備えた二酸化炭素吸収器の開発および熱回収量評価

二酸化炭素とイオン液体の混合容器一体型の蓄熱式熱電変換器を開発し、発熱・吸熱に対する出力電圧、電流および電力を測定して発電評価を行う。具体的には、熱電素子ならびに蓄熱槽を壁面設置可能なイオン液体を封入する吸収・再生容器を設計・製作する。熱電素子のみで温度差に対する出力の関係をあらかじめ測定し、次に蓄熱槽と組み合わせて蓄熱槽の温度に対する熱電素子からの出力特性を明らかにし、最後に性能評価用の二酸化炭素容器を設置し、二酸化炭素の吸収・再生における混合熱と吸収熱を熱電素子の出力測定によって評価する。

### (4) 発電サイクルの開発および発電性能評価

吸収および放出過程からなる発電サイクルを連続的に行う切換えシステムと軸動力を取り出すタービンの開発および動作確認と動力測定による性能評価を行う。また、軸動力を用いた発電機ならびに蓄電システムの開発および発電量の測定による発電評価を行う。具体的には、タービンには小型ランキンサイクル発電機などで実績のある容積式膨張器を採用し、性能評価用の二酸化炭素容器を設置して任意の温度・圧力における動力試験を行う。動力試験は、トルク計によって回転数に対する出力特性を明らかにする。また、開発する二酸化炭素サーバーと吸収容器の性能試験が終了次第、二酸化炭素がイオン液体に吸収・再生される際の状態で動作試験を行う。このとき、タービンからの軸動力を発電用モーターに伝達し、出力電圧、電流、電力の測定による発電性能評価を行う。

部科校名：工学部機械工学科

氏名：佐々木 直栄

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

(1) 二酸化炭素+イオン液体混合媒体の熱物性測定

イミダゾリウム系イオン液体[Bmim][TFSA] (1)および[Bmim][PF<sub>6</sub>]  
(2)を対象に、イオン液体を混合 (モル分率  $x_1 = 0.25, 0.50, 0.75$ )  
した場合の密度・粘度を 273.15~363.15 K において、等モルで混合 ( $x_1$   
= 0.50) したイオン液体の二酸化炭素 (以下、CO<sub>2</sub>) 溶解度および飽和  
密度を 313.15 K において、それぞれ測定した。

[Bmim][TFSA]に[Bmim][PF<sub>6</sub>]を添加すると、[Bmim][PF<sub>6</sub>]組成 (モル  
分率) の増加に伴って密度は低下し、負の温度依存性を示した。

一方、粘度は、[Bmim][PF<sub>6</sub>]組成 (モル分率) の増加に伴って上昇し  
ただけでなく、温度低下に伴って著しく増加した。

図 1 にイオン液体の CO<sub>2</sub> 溶解度および飽和密度の測定結果を示す。  
[PF<sub>6</sub>]-は[TFSA]-よりアニオンサイズが小さいことから CO<sub>2</sub> の入り込む  
空隙が僅かなため、等モルで混合したイオン液体の CO<sub>2</sub> 溶解度は、  
[Bmim][TFSA]より低下した。同時に測定した飽和液密度は、圧力上昇  
に伴い僅かに減少した一方、気相密度は、同圧下での CO<sub>2</sub> 密度と一致  
したため、純イオン液体および等モルで混合したイオン液体ともに揮  
発していないことを確認した。

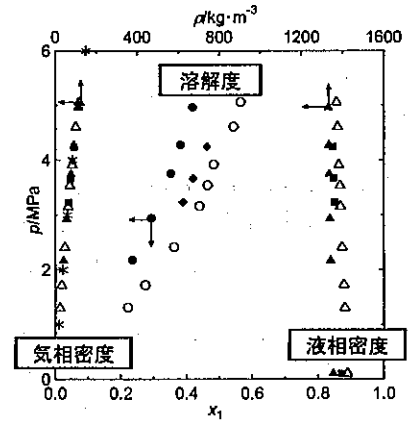


図 1 イオン液体の二酸化炭素溶解度と飽和密度 (313.15 K)

●, ▲: [Bmim][PF<sub>6</sub>],  
◆, ■: Equimolar mixture,  
○, △: [Bmim][TFSA], \*: CO<sub>2</sub>

(2) 熱交換器の開発および熱伝達特性の評価

高温・低温熱源を用いて CO<sub>2</sub> を加熱・冷却するための熱交換器の開発  
および性能評価を目的として、CO<sub>2</sub> サーバー内の CO<sub>2</sub> の対流の可視化を  
熱流体解析ソフト (SCRYU/Tetra Ver. 12) により行った。本研究で  
用いる熱交換器の伝熱性能評価装置の概略図を図 2 に示す。数値計算  
は、図 2 の CO<sub>2</sub> サーバー内の CO<sub>2</sub> の対流の可視化を目的に実施した。数  
値計算に用いた

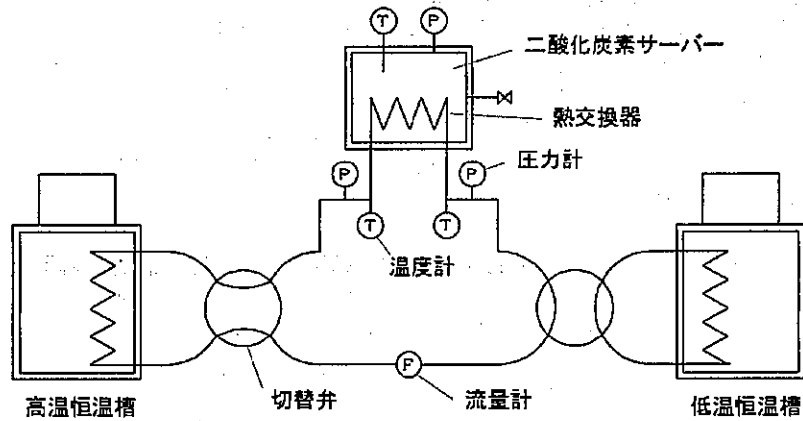


図 2 熱交換器の熱伝達性能評価装置概略図

CO<sub>2</sub> サーバーのモデルを図 3 に示す。CO<sub>2</sub> サーバーのサイズは直径 40

mm、長さ 280 mm を、伝熱管のサイズは内径 5.6 mm、外径 8.4 mm、コイル巻き数 10 巻きとした。数値計算の基礎方程式は運動量方程式および質量保存式を、乱流モデルは  $k-\epsilon$  モデルを、温度についてはエネルギー保存式を用いた。初期温度は 0°C、CO<sub>2</sub> サーバーの外壁は 20°C 一定、伝熱管内には一定温度 (30°C) および流量 (2 L/min) の水が流れているものと仮定し、非定常計算を行った。図 3 の断面 A-A の CO<sub>2</sub> サーバー内の CO<sub>2</sub> の流速ベクトルを図 4 に示す。図 4 は実時間 23.8 s 後の計算結果である。矢印は流速の大きさおよび方向を、伝熱管コイルの色は表面の温度分布を示している。伝熱管コイルの螺旋軸上は上昇流が発生し、流速が速いことが確認できる。一方、CO<sub>2</sub> サーバー壁面付近は温度を 20°C 一定にしている影響から下降流が発生し、螺旋軸上の上昇流と比較して流速が遅いことが確認できる。図 4 より、CO<sub>2</sub> サーバーと伝熱管とのサイズや設置位置の関係により、CO<sub>2</sub> サーバー内に起こる対流の状況が大きく変化すると考えられ、熱交換器性能の最適化をおこなうためには、本計算に用いたモデル以外に、外面コイルや多重管などのモデルによる検討をおこなう必要があると考えられる。

研究結果 (つづき)

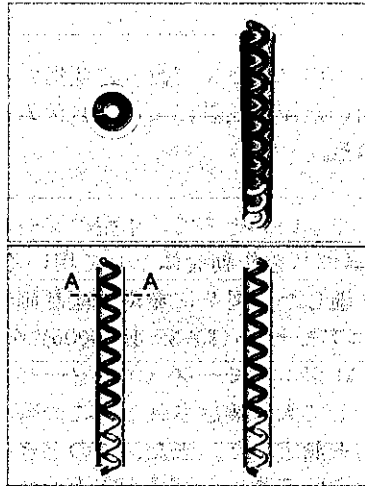


図3 解析モデル

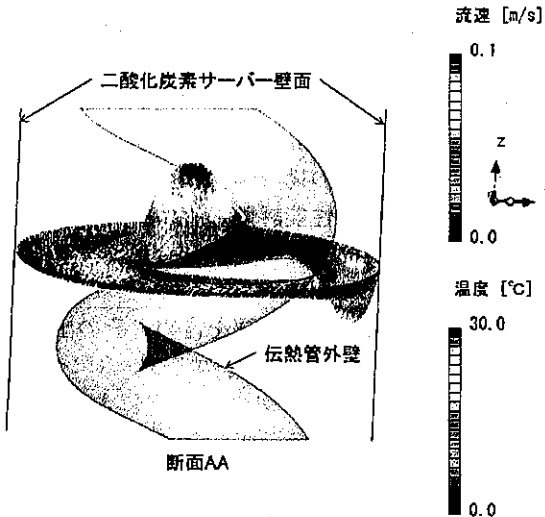


図4 伝熱管周りの流速分布 (図3の断面AA)

(3) 熱電素子を備えた二酸化炭素吸収器の開発および熱回収量評価

二酸化炭素とイオン液体との混合容器一体型の蓄熱式熱電変換器を開発し、発熱・吸熱に対する出力電圧、電流および電力の測定による発電評価をおこなうことを目的として、既存の熱電素子の出力電圧および出力電圧を測定した。出力電圧および出力電力をリアルタイムで測定するために、システム開発用ソフトウェア (LabVIEW®) を用いて測定システムを構築した。測定システムのフローを図5に示す。破線で囲まれている部分は熱電素子の高温部と低温部との温度差データを、一点鎖線で囲まれている部分は熱電素子から出力される電圧データおよび閉回路に流れる電流データを収集する。収集したデータをシステム内で演算することで、熱電素子の出力電力と温度差との関係が得られる。

本システムを用いて測定した熱電素子単体の出力電圧および出力電力と温度差との関係を図6に示す。図6より、出力電圧は温度差の増加とともに直線的に上昇する傾向を示し、温度差約50 Kにおいて1.3 V程度の出力電圧が得られることがわかった。出力電力は温度差の増加とともに上昇する傾向を示し、温度差約50 Kにおいて100 mW程度の出力電力が得られることがわかった。この結果から、熱電素子単体の出力電力は微量であることがわかる。したがって、熱電素子単体の出力電力を動力として直接利用することは困難であると考えられる。出力電力を増加させるためには、複数の熱電素子を直列に接続し、得られた電気エネルギーをバッテリーに貯蔵することで必要な時に必要な電力を使用することが可能になると考えられる。今後の展開としては、本研究に用いる吸収器のイオン液体の加熱および放熱の周期とその熱容量を考慮して熱電素子の使用数を選定し、最適な出力電力を評価する。

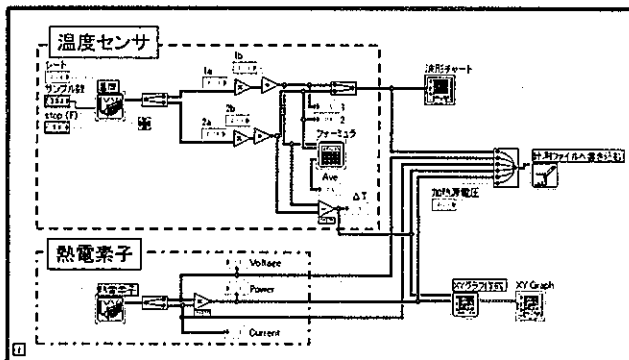


図5 出力電圧および電力の測定システムフロー

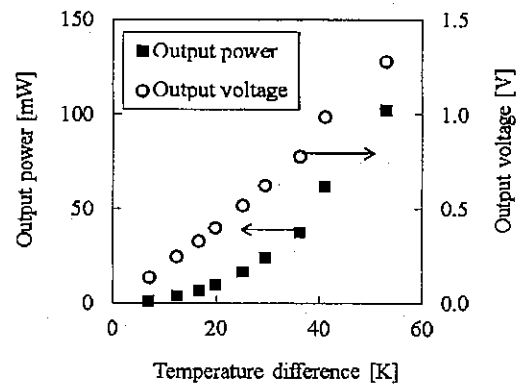


図6 出力電圧および出力電力と温度差との関係

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：工学部機械工学科

氏名：佐々木 直栄

研究結果 (つづき)

(4) 発電サイクルの開発および発電性能評価

1) 発電サイクルの提案

イオン液体への CO<sub>2</sub> 吸収・放出過程における移動エネルギーを一つのタービンで動力に変換するサイクルを可能とするために、切換弁を適用する当初の案の他、逆止弁を用いた流路設計によるシステムを提案し、特許に出願した。それらの構成図については、出願特許情報に委ねる。

2) 小型タービンの発電性能評価

身近な廃熱源を利用する上で発電システムは小型であることが望ましい。そこで、小型のタービンとして市販のベーン型エアモータを採用した。このエアタービンは、窒素ガスを作動流体として用いるため、CO<sub>2</sub> を作動流体とした場合の動作確認を含め、その出力を発電性能で評価した。図7に発電性能評価装置の概略図を、図8に製作した実機を示す。エアタービンには、TAIYO 社製エアモータ (TAV3S-10FG005) を採用した。CO<sub>2</sub> ポンプからエアコントロールユニットにより圧力が調整された CO<sub>2</sub> がエアモータ (エアタービンとして使用) に導かれ、タービン内で膨張した CO<sub>2</sub> はマッフルクリーナを介して大気開放される。この時のエアモータの回転力を発電機にダイレクトに伝達し、発電機からの出力電力を測定した。また、このときの回転数をタコメータにより測定した。CO<sub>2</sub> を 0.2 MPa の差圧で膨張させたときの回転数および最大電力と負荷抵抗との結果を図9に示す。最大回転数および最大電力は負荷抵抗の増加に伴って直線的に上昇する傾向を示し、CO<sub>2</sub> の差圧 0.2 MPa に対し、200 rpm で 2 W の出力が得られることがわかった。

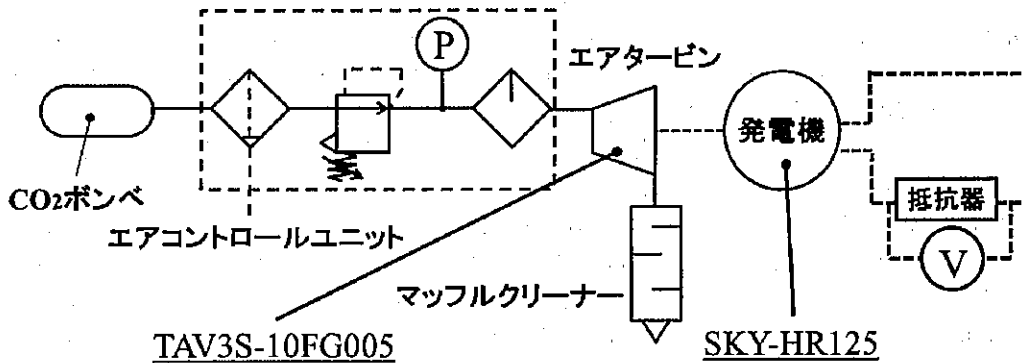


図7 発電性能評価装置の概略図

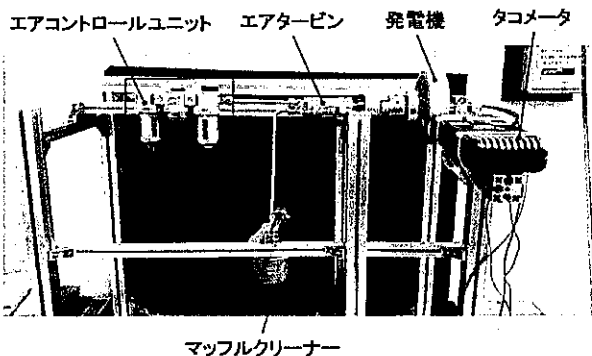


図8 製作した発電性能評価装置

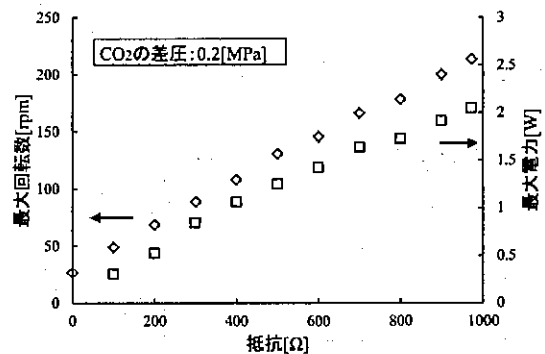


図9 エアタービンによる発電性能

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

研究結果 (つづき)

3) CO<sub>2</sub> 吸収特性予備実験

本サイクルでは、CO<sub>2</sub>が瞬時にイオン液体へ吸収されることを前提に考えられているが、実際には、有限な吸収速度があることを考慮するため、図 10 に示すように吸収過程のみの基礎実験をおこなった。当初は、図 10 左図のような単純な構造を提案したが、吸収容器内の減圧速度が遅く、イオン液体の CO<sub>2</sub> の吸収時間が長いことを確認した。これは、図 10 左図の場合は CO<sub>2</sub> とイオン液体との接触面積が小さいことが原因と考え、図 10 右図の構造においても試験した。これは、イオン液体内に CO<sub>2</sub> を放出することで CO<sub>2</sub> の泡が生成され、表面積を大きくすることを期待したからである。図 11 に 0.5 MPa の CO<sub>2</sub> を図 10 の両図において膨張させた時の圧力の経時変化を示す。イオン液体を入れない場合を含め、加圧 (◇プロット) が図 10 の左図の場合で、バブリング (□プロット) が図 10 の右図の場合の結果である。この結果より、吸収速度に及ぼすバブリングの影響が小さいことが示されたが、イオン液体を入れない場合よりも圧力が下がることから、イオン液体が圧力差に影響を及ぼすことを確認した。

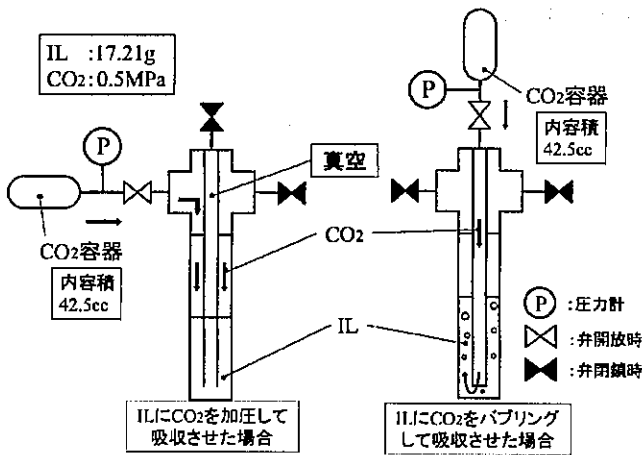


図 10 吸収過程基礎実験概略図

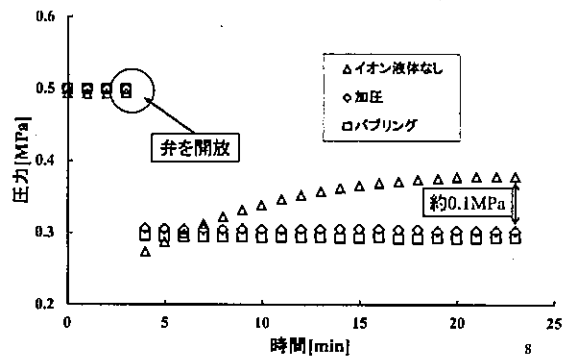


図 11 二酸化炭素吸収実験結果

4) 小型発電システムの製作と性能評価

二酸化炭素の吸収・放出の一連のサイクル実験をおこなうため、図 12 左図に示すような発電サイクル装置を構成した。図 12 右図に実際に製作した装置の外観を示す。吸収過程と放出過程とで、CO<sub>2</sub> 側とイオン液体側とで熱源を高温と低温に切り替えるため、その操作に 4 方向の流路切換弁を用いている。試料容器は二重配管となっており外側を 1 インチのステンレス管、内側を 1/4 インチの銅管を使用して銅管と熱源とを繋ぐことにより熱交換を行う。CO<sub>2</sub> 側を試料容器 A、イオン液体 (IL) 側を試料容器 B としている。図 12 左図では吸収過程を示しており、CO<sub>2</sub> 側の試料容器 A が高温状態、イオン液体 (IL) 側の試料容器 B が低温の状態となっている。初期状態は、CO<sub>2</sub> の充填圧力を 0.5 MPa、IL の充填量を試料容器の半分になるように 144.56 g に設定した。試料容器 A を加熱し CO<sub>2</sub> が膨張することで圧力が上がり、試料容器 B を冷却することで圧力が下がり、熱平衡後に真ん中の二つの弁を開放し、試料容器 A、B の圧力差と IL の CO<sub>2</sub> 吸収によりタービンが回転し発電することを想定していたが、タービンから大気中への漏れが多く、発電には至らなかった。容器が小さく、二酸化炭素の量が少ないため、漏れを防ぐ必要があるが、本年度は基礎実験と装置の製作に時間を費やしたため、今後の課題とした。

部科校名：工学部機械工学科

氏名：佐々木 直栄

研究結果 (つづき)

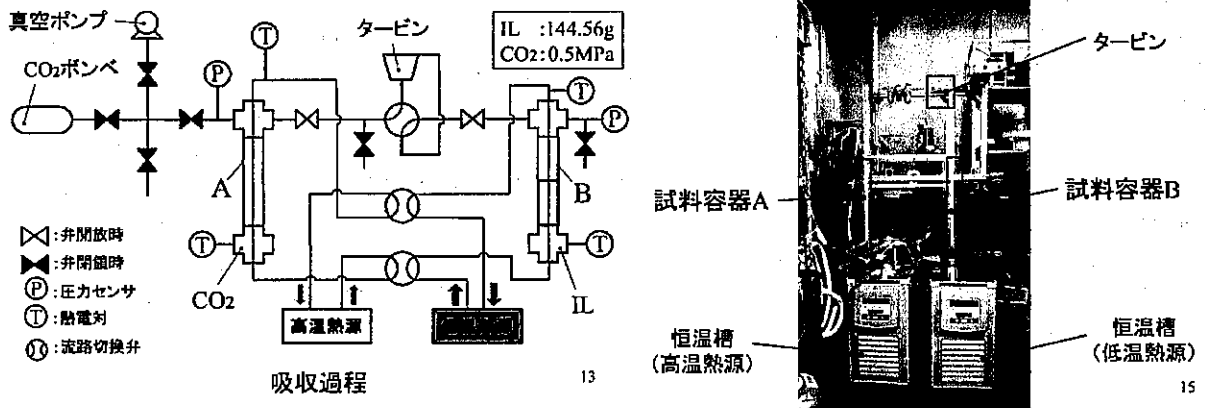


図12 発電サイクル装置

5) まとめおよび今後の課題

発電サイクルの構成およびイオン液体が二酸化炭素を吸収することによる効果を理論的に明らかにし、特許の出願をおこなった。また、実験的に発電サイクルの動作を確認し、二つの問題点(解決すべき課題)を挙げることができた。一つ目は、二酸化炭素がイオン液体に吸収される速度が遅く、単純なバブリングでは効果がないため、気泡の微細化および高密度化による吸収速度の促進技術を開拓する必要がある。もう一つは、市販のタービンでは漏れが大きいということである。本システムは、利用する熱源のターゲットが比較的低温であり、家庭用も想定しているため、小型であることは必要であり、市販のエアモータに代わる漏れない新しいタイプの膨張器を開発する必要がある、来年度の課題とする。



## 平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28 年 5 月 6 日

日本大学学長 殿

氏 名 岡山 吉道



所属・資格 医学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

退職,転出の場合は, ( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 疾患特異的ヒトマスト細胞のフェノタイプの解析とフェノタイプの変化の機序の解明		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 岡山吉道	医学部・准教授	マスト細胞実験
○研究分担者 照井正	医学部・教授	慢性蕁麻疹実験指導
山本樹生	医学部・教授 (平成28年3月31日退職)	ヒト絨毛細胞実験
斎藤修	医学部・准教授	ヒト滑膜細胞実験
高橋恭子	生物資源科学部・准教授	動物実験指導、皮膚マスト細胞実験
下川敏文	医学部・助教	分子生物学実験
布村聡	医学部・助教 (平成27年11月30日退職)	動物実験、マスト細胞実験
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		
平成27年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 プロジェクト名：難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発 (研究代表者 照井正、研究分担者 岡山吉道、山本樹生、斎藤修、高橋恭子、布村聡、千島史尚) 採択		
平成27年度科学研究費助成事業 基盤研究C 研究課題名：ヒトマスト細胞に発現する MrgX2 を標的としたアレルギー免疫疾患の治療戦略 (研究代表者 岡山吉道) 採択		
平成28年度科学研究費助成事業 基盤研究C 研究課題名：C/EBP $\alpha$ の新規C末端機能領域を介した顆粒球系細胞分化経路の分子機構の解明 (研究代表者 下川敏文) 採択		
平成28年度科学研究費助成事業 基盤研究C 研究課題名：Periostin によるマスト細胞の活性化とその制御機構の解明 (研究代表者 布村聡) 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。

部科校名：医学部

氏名：岡山吉道

## 4 研究目的

我々は、ヒト関節滑膜のマスト細胞が IgG 受容体を発現し、関節リウマチ患者では、免疫複合体の刺激によってマスト細胞が多量の TNF- $\alpha$ を産生すること、重症の慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞が G タンパク共役型受容体のひとつである Mas-related gene X2 (MrgX2) を高く発現しており、神経ペプチドや好酸球顆粒タンパクをリガンドとしてヒスタミンを遊離することを報告した。すなわち、マスト細胞は IgE 受容体のみならず他の受容体を介して活性化される。IgG 受容体や MrgX2 の発現はマスト細胞の存在する微小環境によって影響を受けていると考えられることから、今回我々は、疾患特異的マスト細胞のフェノタイプの解析としてアトピー性皮膚炎と流産した患者の絨毛組織マスト細胞を加え、関節リウマチ、慢性蕁麻疹、アトピー性皮膚炎と流産した患者の脱落膜マスト細胞のフェノタイプの変化の機序と病態への関与を明らかにし、新規治療薬の開発に資する研究を行うことを目的とする。

目的 1. 疾患特異的マスト細胞のフェノタイプを同定する。

慢性蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ病変部におけるマスト細胞および流産の子宮脱落膜マスト細胞のフェノタイプを同定し、その性状を解析する。

目的 2. 疾患特異的にマスト細胞がフェノタイプを変える機序の解明を行う。

- 1) 重症慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞における MrgX2 の強発現の機序の解明。
- 2) アトピー性皮膚炎の皮膚マスト細胞における Fc $\epsilon$ RI  $\beta$ 鎖の強発現の機序の解明。
- 3) 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞における *COX1*, *COX2*, *LTC4S*, *TBXAS1* の強発現の機序の解明。

目的 3. 疾患特異的にマスト細胞に発現している分子の病態への関与を解析する。

慢性蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ病変部におけるマスト細胞および流産の子宮脱落膜マスト細胞において疾患特異的に発現している分子の病態への関与を解析する。

## 5 研究概要

目的 1. 疾患特異的マスト細胞のフェノタイプを同定する。

- 1) 慢性蕁麻疹: 皮膚マスト細胞を線維芽細胞と共培養することによって発現を増強する MrgX2 以外の遺伝子を DNA チップで同定し、蕁麻疹の病態に関連する分子を選出し、実際の慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞で発現しているかを免疫組織化学染色で確認する。
- 2) アトピー性皮膚炎: アトピー性皮膚炎の 95%のマスト細胞は Fc $\epsilon$ RI  $\beta$ 鎖を発現しており、乾癬ではわずか 8%のマスト細胞が Fc $\epsilon$ RI  $\beta$ 鎖を発現していた (未発表)。さらに患者数を増やし確認を行う。
- 3) 関節リウマチ: 関節リウマチ患者と変形性膝関節症の病変滑膜マスト細胞に発現している遺伝子を DNA チップで比較する。
- 4) 流産の脱落膜マスト細胞: ヒト脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立する。妊娠中絶と流産の脱落膜由来マスト細胞間に差があるかどうか DNA chip で比較する。発現差を認めた分子のなかで妊娠の維持に関係のある分子を同定する。

目的 2. 疾患特異的にマスト細胞がフェノタイプを変える機序の解明を行う。

- 1) 重症慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞における MrgX2 の高発現の機序: 皮膚マスト細胞を線維芽細胞と共培養し、MrgX2 の発現がさらに上昇するのかを検討する。
- 2) アトピー性皮膚炎の皮膚マスト細胞における Fc $\epsilon$ RI  $\beta$ 鎖の高発現の機序: 上皮細胞からの IL-33 や TSLP による成熟が Fc $\epsilon$ RI  $\beta$ 鎖の高発現に関与していると仮説を立て研究を行う
- 3) 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞における *COX1*, *COX2*, *LTC4S*, *TBXAS1* の強発現の機序の解明: 変形性膝関節症の滑膜マスト細胞を関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞と共培養し、そのフェノタイプの変化を検討する。

目的 3. 疾患特異的にマスト細胞で発現している分子の疾患の病態への関与を解析する。

- 1) 重症慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞の MrgX2 の病態への関与の解析。
- 2) アトピー性皮膚炎の皮膚マスト細胞に高発現している Fc $\epsilon$ RI  $\beta$ 鎖の病態への関与の解析。
- 3) 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞における *COX1*, *COX2*, *LTC4S*, *TBXAS1* の病態への関与の解析。
- 4) 流産の脱落膜由来マスト細胞に特異的に発現している分子と妊娠の維持との関係を調べる。

部科校名：医学部	氏名：岡山吉道
----------	---------

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

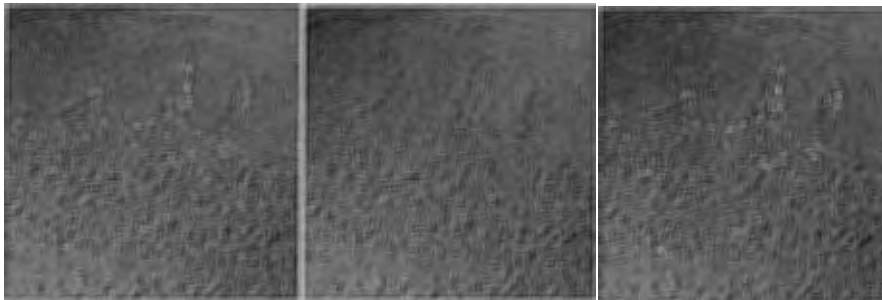
結果 1. 疾患特異的マスト細胞のフェノタイプを同定する。

1) 慢性蕁麻疹:

皮膚マスト細胞を皮膚線維芽細胞と共培養する実験準備としてヒトの皮膚線維芽細胞の培養系を確立した。皮膚マスト細胞は、入手数が少ないため、臍帯血由来培養マスト細胞と皮膚線維芽細胞の培養実験を開始した。

2) アトピー性皮膚炎:

下図はアトピー性皮膚炎(AD)患者病変部位の免疫染色である。



FcεRIβ (緑色)                      Tryptase (赤色:マスト細胞)                      merged (黄色)

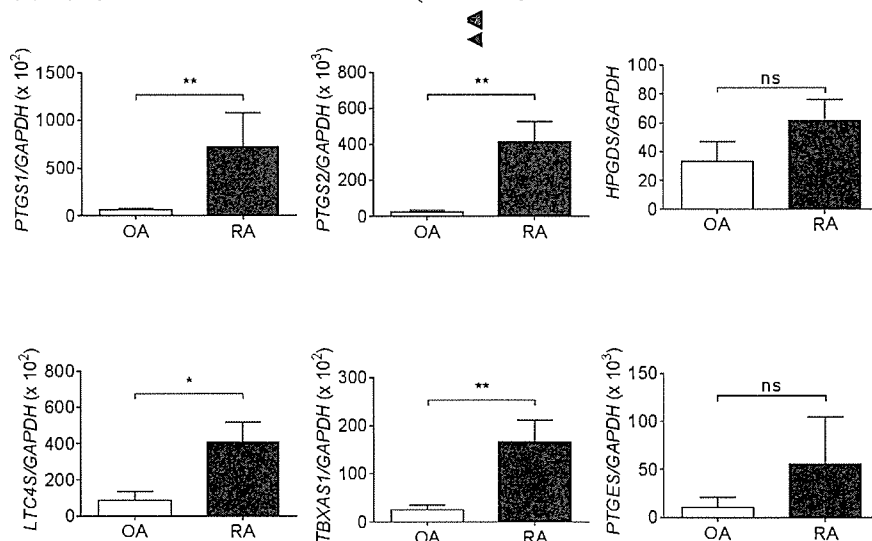
	FcεRIβ <sup>+</sup> cells (/mm <sup>2</sup> , mean±SD)	tryptase <sup>+</sup> cells (/mm <sup>2</sup> , mean±SD)	Ratio of FcεRIβ <sup>+</sup> cells to tryptase <sup>+</sup> cells
AD (n=6)	66.0 ± 21.1*	69.3 ± 22.0*	0.95 *
Psoriasis (n=4)	1.3 ± 2.3	20.2 ± 12.0	0.08

\*P = 0.02 compared with psoriasis (Mann-Whitney U-test)

アトピー性皮膚炎と疾患コントロールである乾癬患者の皮膚組織の FcεRIβ鎖の発現を免疫組織化学染色にて調べたところ、アトピー性皮膚炎患者ではマスト細胞数が有意に増加しているのみならず、FcεRIβ鎖の発現が有意に増加していた。

3) 関節リウマチ:

関節リウマチ患者と変形性膝関節症の病変滑膜マスト細胞に発現している遺伝子を DNA チップで比較した。関節リウマチ患者マスト細胞は COX1, COX2, LTC4S, TBXAS1 を変形性膝関節症のマスト細胞と比較して有意に高く発現していることを発見した(未発表)。Real-Time RT-PCR にてその結果を確認した(下図)。



部科校名：医学部

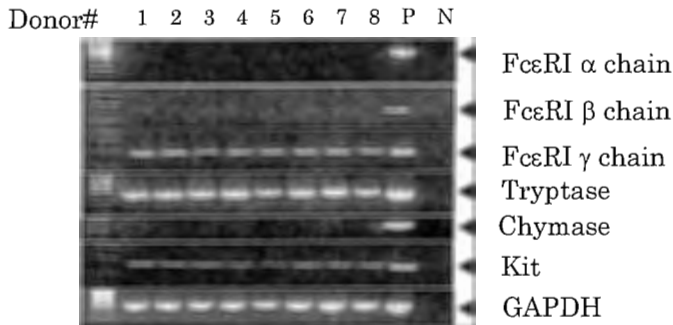
氏名：岡山吉道

## 研究結果 (つづき)

## 4) 脱落膜組織マスト細胞：

ヒト脱落膜マスト細胞を酵素的に分散させる方法を確立した。ヒト脱落膜マスト細胞のフェノタイプは tryptase のみを持つ MCT type であった。ヒト脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立した。

下図は 8 ドナーからの脱落膜組織マスト細胞の RT-PCR 解析である。FcεRIα鎖の発現がみられなかった。



## 結果 2. 疾患特異的にマスト細胞がフェノタイプを変える機序の解明を行う。

## 1) 重症慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞における MrgX2 の高発現の機序の解明:

ヒト上皮細胞由来サイトカインである thymic stromal lymphopoietin (TSLP) および IL-33 は慢性蕁麻疹の上皮細胞で発現が上昇しているという報告(Br J Dermatol. 2015;172(5):1294-302)があるが、これらサイトカインは MrgX2 の発現を増強しなかった。現在、マスト細胞と皮膚線維芽細胞との共培養実験にて MrgX2 の発現変化を検討している。

## 2) アトピー性皮膚炎の皮膚マスト細胞における FcεRI β鎖の高発現の機序の解明:

アトピー性皮膚炎の上皮細胞においては TSLP が高発現していることが知られている。そこで、TSLP がヒトのマスト細胞の FcεRIβ鎖発現を増強するかどうかを調べた。TSLP をマスト細胞に添加し、5 日間で FcεRIβ鎖タンパクの発現が増強された。しかしながら TSLP mRNA の有意な発現増強はみられなかった。

## 3) 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞における COX1, COX2, LTC4S, TBXAS1 の強発現の機序の解明:

変形性膝関節症の滑膜マスト細胞を関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞と共培養し滑膜マスト細胞における COX1, COX2, LTC4S, TBXAS1 の発現を Real Time RT-PCR で検討したがこれら遺伝子発現には関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞は、何ら影響を及ぼさなかった。

## 結果 3. 疾患特異的にマスト細胞で発現している分子の疾患の病態への関与を解析する。

## 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞における COX1, COX2, LTC4S, TBXAS1 の病態への関与の解析:

Fc 受容体を介する刺激で関節リウマチ患者の滑膜マスト細胞がより多量の PGD<sub>2</sub> を産生することが関節リウマチに病態にどのように関与しているのかを検討している。

FcεRI 架橋および FcγRI 架橋の刺激による変形性膝関節症(OA)および関節リウマチ患者(RA)の滑膜マスト細胞からの PGD<sub>2</sub> 産生量を比較したところ関節リウマチ患者(RA)の滑膜マスト細胞からの PGD<sub>2</sub> 産生量が有意に高いことが分かった。関節リウマチ患者の滑膜組織での PGD<sub>2</sub> 産生細胞はマスト細胞のみでなく滑膜線維芽細胞やマクロファージも産生細胞である。実際に関節滑液中の PGD<sub>2</sub> 量を測定すると、関節リウマチ患者で有意に高いことが分かった。

そこで変形性膝関節症および関節リウマチ患者のマスト細胞と滑膜線維芽細胞の共培養の系において免疫複合体刺激、TNF-αや IL-1β刺激後の PGD<sub>2</sub> 産生量を比較する予定である。

## 平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成28年 3月 31日

日本大学学長 殿

氏 名 田邊 奈津子



所属・資格 歯学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 歯周病とメタボリックシンドロームとの関連性を解明する総合的研究		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 田邊奈津子	歯学部・准教授	研究の総括, 細胞生物学領域の検討
○研究分担者(学内) 前野 正夫	歯学部・教授	疫学研究領域の検討 タンパク化学領域の検討
小方 頼昌	松戸歯学部・教授	細胞・分子生物学研究領域の検討
落合 邦康	歯学部・教授	微生物学領域の検討
川戸 貴行	歯学部・准教授	動物モデル研究領域の検討 疫学研究領域の検討
中山 洋平	松戸歯学部・専任講師	細胞・分子生物学研究領域の検討
田中 秀樹	歯学部・助教	動物モデル研究領域の検討 タンパク化学領域の検討
中井久美子	歯学部・助教	動物モデル研究領域の検討 細胞・分子生物学研究領域の検討
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>本総合研究では、歯周病が軽微な慢性炎症としてメタボリックシンドロームを発症・増悪させるメカニズムの詳細が明らかとなり、歯周病の予防・治療を介したメタボリックシンドローム予防のエビデンスを高める多くの知見が得られた。そこで、研究代表者の田邊奈津子を中心として、歯科からのメタボリックシンドロームの予防の実践を視野に入れ、薬剤に依存しない歯周組織の消炎と歯周組織の再生をテーマとした研究を新規に計画し、本総合研究の終了後に科学研究費助成事業基盤研究Bへ申請する予定である。</p>		

※「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。

部科校名：歯学部

氏名：田邊 奈津子

## 4 研究目的

メタボリックシンドローム (メタボ) は、内臓脂肪型の肥満を基盤として、高血圧、高血糖および脂質代謝異常を併せもつ状態であり、これらの合併は動脈硬化性疾患の発症頻度を高めることから、その予防は quality of life の向上と健康寿命の延伸のためにきわめて重要である。一方、近年、歯周病と全身疾患との関連性が注目されており、メタボと歯周病との関連性についても疫学研究で指摘されている。歯周病は、歯周病原菌の感染によって歯肉や歯根膜が破壊され歯周ポケットが形成されるとともに、歯槽骨の吸収を認める炎症性疾患であり、歯周病由来の炎症性因子が血流を介して全身に影響する可能性が指摘されている。本研究の共同研究者らは、これまでに、歯周病とメタボとの関連性を横断ならびに追跡コホート研究で調べ、歯周ポケット保有者にはメタボ指標の陽性者が多く、また、メタボ指標の陰性者であっても歯周病に罹患していると、将来メタボの発症リスクが高いことを明らかにした。これらの背景をもとに本研究代表者らは、従来から行われている食事療法や運動療法に加え、歯科領域からのアプローチによるメタボ予防のエビデンスを確立するための総合研究を実施した。すなわち、長期コホートおよび介入疫学研究、細胞・分子生物学研究、および動物モデル研究によって、歯周病がメタボの発症・増悪に及ぼす影響とそのメカニズムを詳細に検討した。

## 5 研究概要

## 疫学研究

歯周病が将来のメタボ発症のリスクになることを明確にする長期コホート研究と、歯科保健指導によるメタボの改善効果を検討する介入研究を実施した。

長期コホート研究では、2003～2012年に健康診断を受診し、2003年にメタボ指標が全て基準値内の592名を対象とし、歯周ポケットの累積保有年数と9年後のメタボ陽性化の関連性を分析した。

介入研究では、2012年と2013年の健康診断でメタボ指標が陽性かつ歯周ポケットを保有する21名を歯科保健介入群に、また、介入群と年齢、肥満、歯周ポケット保有でマッチングした21名を非介入群として、歯周ポケット保有と診査時の歯肉からの出血、およびメタボ指標の改善程度を比較した。

## 細胞・分子生物学研究

歯周病由来の炎症性物質が、肝臓の C-reactive protein (CRP) 産生増加を介して内臓脂肪に影響することを想定し、CRPで脂肪細胞を刺激する実験、ならびに創傷治癒効果が知られている低出力超音波 (LIPUS) が、肥大化した脂肪組織または歯周病に罹患した歯槽骨の炎症状態を改善する効果を検討するために、脂肪細胞と骨芽細胞を LIPUS で刺激する実験を行った。

CRPによる脂肪細胞の刺激実験では、脂肪組織の肥大化に影響する細胞外マトリックスタンパク代謝に着目し、CRPで脂肪細胞 (3T3-L1細胞) を刺激してタンパク分解酵素とその内因性阻害剤の発現を検討した。

脂肪細胞と骨芽細胞への LIPUS 刺激実験では、3T3-L1細胞に炎症性サイトカインを、また、骨芽細胞 (MC3T3-E1細胞) に歯周病原菌の菌体内毒素をそれぞれ負荷して LIPUS で刺激し、脂肪細胞のアディポカイン発現、ならびに骨芽細胞の炎症性サイトカインと骨吸収関連因子の発現を検討した。

## 動物モデル研究

遺伝的にメタボを自然発症する SHR/ND 系ラットと、遺伝的な素因を持たない Wistar 系ラットの臼歯に絹糸を結紮して実験的に歯周病を発症させ、各種メタボ指標を調べた。

SHR/ND 系ラットによる実験では、糸結紮群 (歯周病群) と非結紮群 (コントロール群) の内臓脂肪の蓄積、体重、血圧、血清中の LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリドおよびグルコースのレベルを調べた。

Wistar 系ラットによる実験では、高脂肪食または普通食条件下における歯周病群とコントロール群の体重、血清中の LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリド、グルコース、インスリンおよび各種炎症性サイトカイン、および肝臓中のトリグリセリドのレベルを調べた。さらに、肝臓組織から RNA を抽出してマイクロアレイによる解析を行った。

部科校名：歯学部

氏名：田邊 奈津子

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

## 疫学研究

歯周病は、静止期と増悪期を繰り返し慢性に経過する。適切な治療と歯口清掃は炎症を沈静化し、歯周ポケットは解消される一方で、歯口清掃不良による口腔環境の悪化や宿主の抵抗力の低下は炎症の再発を誘引し、歯周組織は破壊され再び歯周ポケットが形成される。すなわち観察期間を4年から9年に延長した本研究では、対象者の歯周ポケットの保有状況が大きく変化し、分析結果に影響することが予想された。そこで、本研究では、飲酒や喫煙習慣の影響の分析で用いられる累積暴露の概念を用いて、対象者を9年間継続的に歯周ポケット無しの群、歯周ポケット保有5年以下の群、および歯周ポケット保有6年以上の群の3群に分けて、歯周ポケットの累積保有年数とメタボ指標の陽性化との関連性を分析した。その結果、4つのメタボ指標のうち1つが陽性化するオッズ比は、9年間歯周ポケット無しの群に比べて歯周ポケット保有5年以下の群で1.8倍、6年以上の群で2.1倍、また2つ以上のメタボ指標が陽性化するオッズ比は歯周ポケット保有5年以下の群で1.5倍、6年以上の群で4.0倍と、いずれも有意に高かった。なお、観察開始時点での歯周ポケットの有無だけで分析すると、歯周ポケット保有と9年後のメタボ指標の陽性化に有意な関連性は認められなかった。これらの結果から、観察期間を長期とした場合では、歯周ポケットの保有状況の累積的な評価が必要であることが、また、慢性的な歯周病の罹患が将来のメタボ発症のリスク因子となり、長期の歯周病の罹患はそのリスクをさらに増加させる可能性が考えられた。

次に、各メタボ指標を個別に分析したところ、高血糖、肥満および高血圧の陽性化のオッズ比は、9年間継続的に歯周ポケット無しの群に比べて、歯周ポケット保有5年以下の群あるいは歯周ポケット保有6年以上の群で有意に高かった。先の4年間のコホート研究では、観察開始時における歯周ポケットの有無と高血糖および肥満の陽性化は、ともに関連する傾向が認められるものの統計学的に有意ではなかった。しかし、今回、観察期間を9年間とし、さらに歯周ポケットの保有を累積的に評価することで、慢性的な歯周病の罹患と高血糖および肥満の陽性化との間に有意な関連性が証明された。また、歯周ポケットの保有と高血圧の陽性化は、先の4年間のコホート研究と今回の9年間のコホート研究の両方において有意な関連性が認められた。本結果から、血圧は他のメタボ指標に比べて、歯周病の影響が比較的早期から顕在化し継続する可能性が考えられた。一方で、4年間のコホート研究では、歯周ポケットの保有と脂質代謝異常の陽性化に有意な関連性が認められていたが、本長期コホート研究では、9年間継続的に歯周ポケット無しの群に比べて、歯周ポケット保有5年以下の群あるいは歯周ポケット保有6年以上の群で脂質代謝異常の陽性化のオッズ比が高いものの、有意差は認められなかった。厚生労働省が発表した平成18年国民健康・栄養調査では、脂質異常症が疑われる者は約1,410万人、そのうち10.5%が脂質代謝異常の改善薬を服用していると推定している。今回の長期コホート研究の観察期間中も薬の服用がさらに一般化し、脂質代謝異常と歯周病との関連性に影響した可能性が考えられた。

歯周病もメタボも生活習慣を含めて複数の因子の影響を強く受けることが知られている。9年間のコホート解析では、歯周病とメタボの両方に影響する因子として報告されている、性別、年齢、喫煙、および適正体重の認知を調整因子として分析したが、前述の脂質代謝異常への投薬の影響も含め、明らかにされていない因子が結果に影響している可能性が考えられる。そこで、本総合研究ではコホート研究とは別のアプローチによる疫学研究を実施した。すなわち、すでに歯周病を発症し且つメタボ指標が陽性化している者に、歯周病の改善を目的とした歯科保健介入を実施して、歯周病とメタボの改善状況を検討した。

慢性に経過する歯周病の改善には、歯科医師および歯科衛生士による歯周治療に加えて、本人によるセルフケアが重要である。歯肉が退縮して生じる歯間空隙の清掃には、歯ブラシに加えて歯間ブラシが有効であるが、目視が難しい臼歯部への歯間ブラシの適応は困難であり、適切な歯間ブラシの使用の習慣化には指導が必要である。そこで、本介入研究では、歯間ブラシの使用に重点を置いた歯科保健指導を、介入群に9ヶ月間で5回実施した。その結果、介入群における歯間ブラシの使用頻度は、保健指導の実施前に比べて実施後で有意に増加した。また、歯周ポケットを保有する者の割合と歯周ポケット測定時に出血が認められる者の割合は、保健指導の実施前に比べて保健指導の実施後で有意に低下した。これらの結果から、介入群では保健指導の実施による歯間ブラシ使用が習慣化することで、歯周組織の炎症が緩和された可能性が考えられ

部科校名：歯学部

氏名：田邊 奈津子

## 研究結果（つづき）

た。さらに、内臓脂肪の蓄積程度を反映する腹囲は、介入群において保健指導の実施前に比べて実施後で有意に減少した。また、保健指導の実施後の介入群の血圧値は、保健指導を実施しなかった非介入群に比較して有意に低下した。これらの結果から、積極的な歯科保健の介入は、歯周病だけでなく、内臓脂肪の蓄積と血圧の改善に繋がる可能性が示唆された。

## 細胞・分子生物学研究

脂肪組織は、脂肪滴を有する成熟脂肪細胞と、細胞間質のコラーゲン性および非コラーゲン性の細胞外マトリックスタンパクで構成される。脂肪組織は余剰のエネルギーを脂肪滴として蓄えると同時に、様々なアディポカインを産生する内分泌器官としても機能することが知られている。生活習慣や運動習慣の不良で肥大化した内臓脂肪では、過度な脂肪滴の蓄積により壊死した脂肪細胞や、マクロファージおよびリンパ球の細胞間質への浸潤が認められる。そのため、メタボ発症者の内臓脂肪は慢性的に軽微な炎症状態にあり、インスリン抵抗性を高める TNF- $\alpha$  や、血圧上昇因子のアンジオテンノーゲンなどの悪玉アディポカイン産生増加を介して、高血圧、高血糖及び脂質代謝異常を誘引すると考えられている。一方、歯周病もまた、歯周病原菌感染による慢性炎症性疾患であり、グラム陰性桿菌である歯周病原菌が有する菌体内毒素 (lipopolysaccharide; LPS) や歯周病局所で産生される炎症性物質は、血流を介して肝臓の IL-6 産生を誘導し、さらに IL-6 は autocrine に作用して CRP などの炎症性物質の産生を促進して、全身を軽微な慢性炎症状態にすると考えられている。これら肥大化脂肪組織と歯周病罹患組織に共通する慢性炎症としての特徴、ならびにコホート研究で歯周病がメタボのリスクを増加させた結果を背景として、歯周病由来の炎症性物質が脂肪組織の肥大化に及ぼす影響を調べる細胞・分子生物学研究を行った。

本研究では、脂肪組織の肥大化に影響する細胞外マトリックスタンパクのリモデリングと歯周病罹患者の肝臓で増加する CRP に着目した。すなわち、成熟脂肪細胞へと分化誘導した 3T3L-1 細胞を CRP で刺激し、タンパク分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) とその内因性阻害剤である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs) の発現を調べた。その結果、CRP 刺激によって MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11, MMP-13, MMP-14 および TIMP-1 の発現が有意に増加した。MMP-1 と MMP-13 はコラーゲナーゼとして、コラーゲン分子の三重らせん構造を N 末端から 4 分の 3 の位置で 2 つの断片に分解する。一方、MMP-2 および MMP-9 は、それぞれゼラチナーゼ A および B として、主にゼラチン化したコラーゲン断片を分解する。MMP-3 と MMP-11 はストロムライシンとして、また MMP-14 は細胞膜の表面上に発現する膜型 MMP としてそれぞれ幅広い基質特異性を有し、コラーゲン性タンパクだけでなく、ラミニンやフィブロネクチンなどの非コラーゲン性タンパクを分解する。また、TIMP-1 は、複数の活性型 MMPs に強く結合してそれらの酵素活性を阻害する。一方、脂肪組織が肥大化する過程では、脂肪滴の蓄積により脂肪細胞がその大きさを増すとともに、細胞間質における細胞外マトリックスタンパクのリモデリングも促進する。高脂肪食を負荷したマウスでは、脂肪組織が肥大化するとともに複数のサブタイプの MMPs と TIMPs の発現が増加することが知られており、さらに最近、MMPs によって分解された VI 型コラーゲン断片が、脂肪細胞の悪玉化の原因となる細胞間質へのマクロファージの浸潤と組織の線維化を誘導する可能性が指摘されている。これらの知見と本研究結果から、CRP 刺激は、成熟脂肪細胞の MMPs と TIMP-1 の産生増加を介して細胞外マトリックスタンパクリモデリングを誘導して脂肪組織を肥大化させるとともに、VI 型コラーゲンの断片化を介して脂肪細胞の悪玉化を促進する可能性が考えられた。

CRP は、細胞上に発現する Fc $\gamma$  受容体に結合してその作用を発揮する。そこで本研究では、Fc $\gamma$  のサブタイプの中で Fc $\gamma$ II および Fc $\gamma$ III をブロックする抗 CD16/CD32 が、CRP 刺激性の MMPs と TIMP-1 の発現変化に及ぼす影響を調べた。その結果、CRP 刺激で増加した MMP-2, MMP-9 および MMP-14 発現は、抗 CD16/CD32 抗体によって CRP 未刺激レベルまで低下した。また、CRP 誘導性の MMP-1, MMP-3, MMP-13, および TIMP-1 発現増加も CD16/CD32 抗体で抑制されたが、未刺激レベルまでは低下せず、その効果は MMP-2, MMP-9 および MMP-14 に比べて低かった。これらの結果から、CRP は、成熟脂肪細胞上に発現する Fc $\gamma$ II および Fc $\gamma$ III

注：必要に応じて、このページをご使用ください。



部科校名：歯学部

氏名：田邊 奈津子

## 研究結果（つづき）

を介して MMP-2, MMP-9 および MMP-14 の発現を誘導することが、さらに、CRP 刺激による MMP-1, MMP-3, MMP-13 および TIMP-1 の発現増加には、FcγII および FcγIII に加えて他のサブタイプの Fcγ が関与する可能性が考えられた。一方、CRP 刺激による MMP-11 発現誘導は、CD16/CD32 抗体の存在下でより強く認められた。本研究結果から、成熟脂肪細胞の FcγII および FcγIII は MMP-11 発現に全く関与しないと考えられた。すなわち、CRP と FcγII および FcγIII との結合が CD16/CD32 抗体で阻害されることで、MMP-11 発現に関与する他のサブタイプの Fcγ と CRP の結合が促進し、CRP 刺激による MMP-11 発現誘導が強まった可能性が考えられた。

以上の結果から、歯周病罹患者の肝臓で増加する CRP は、近接する内臓脂肪組織中の成熟脂肪細胞の複数の Fcγ 受容体を介してタンパク分解酵素とその内因性阻害剤の発現を誘導し、間質中の細胞外マトリックスタンパクのリモデリングを促進するとともにマクロファージの浸潤を促進し、脂肪組織を肥大化・悪玉化させる可能性が考えられた。

さらに、本総合研究では、肥大化した脂肪組織と歯周病に罹患した歯周組織の炎症状態を積極的に緩和する方法を検討することを目的として、医科において創傷の治癒促進の効果が知られている LIPUS が、成熟脂肪細胞と骨芽細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。まず、脂肪組織の細胞間質に浸潤したマクロファージ由来の TNF-α が成熟脂肪細胞に paracrine に作用することを想定し、成熟脂肪細胞に分化した 3T3-E1 細胞に TNF-α を負荷するとともに LIPUS で刺激し、3T3-E1 細胞の IL-6 とアディポネクチン発現を調べた。その結果、LIPUS は、TNF-α 誘導性のアディポネクチン発現低下を回復させる傾向が認められたがその効果は有意でなく、また、LIPUS は TNF-α 誘導性の IL-6 発現増加を抑制しなかった。脂肪細胞が産生するアディポネクチンは、高血糖や動脈硬化を抑制するアディポカインであり、一方、IL-6 は、脂肪組織や肝臓を慢性的な炎症状態にする。以上の結果から、LIPUS による成熟脂肪細胞の悪玉化の抑制効果は限定的かつ微弱と考えられた。

次に、歯周病に罹患した歯槽骨を想定して、骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞に歯周病原菌由来の LPS を負荷するとともに LIPUS で刺激し、炎症性サイトカインである IL-1α, IL-6, 破骨細胞分化促進因子である receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) の発現を調べた。その結果、LIPUS は、LPS 刺激で増加した IL-1α, IL-6 および RANKL 発現を LPS 未刺激レベルまで抑制した。次に、LPS の刺激を受けた細胞で促進する NF-κB の核内移行を調べた結果、LIPUS は LPS による NF-κB の核内移行を抑制した。一方、メカニカルストレスの受容体として機能する angiotensin II receptor type I (AT<sub>1</sub>) の阻害剤で AT<sub>1</sub> をブロックした細胞、または siRNA で AT<sub>1</sub> 発現を抑制した細胞において LIPUS は、LPS 誘導性の IL-1α 発現と NF-κB の核内移行を抑制しなかった。以上の結果から、LPS で誘導される骨芽細胞の IL-1α, IL-6 および RANKL 発現は、LIPUS で抑制されることが、さらに、LIPUS は、骨芽細胞の AT<sub>1</sub> を介して、LPS 誘導性の NF-κB の核内移行を抑制して IL-1α 産生を低下させる可能性が示唆された。すなわち、LIPUS は、歯周病罹患局所における炎症を沈静化し、歯槽骨吸収を抑制する可能性が示唆された。

また、関連する研究として、RANKL, IL-18 および IL-18 を中和する IL-18 binding protein (IL-18BP) を介した破骨細胞前駆細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞の細胞間相互作用が破骨細胞の分化に及ぼす影響、ならびにメカニカルストレスとしての牽引力が軟骨細胞の分化と軟骨基質の発現に及ぼす影響を検討した。IL-18 は、T 細胞の granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 産生を増加して破骨細胞分化を抑制することが知られている。そこで、RANKL で刺激した破骨細胞前駆細胞 (RAW264.7 細胞) が CD4<sup>+</sup>T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現に及ぼす影響を調べた。RANKL 刺激によって RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化が促進し、また、その培養上清中の IL-18BP レベルが増加した。さらに、この培養上清の存在下で CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-18 刺激しても、GM-CSF 産生は増加しなかった。以上の結果から、RANKL で刺激した RAW264.7 細胞は、IL-18BP 産生増加を介して CD4<sup>+</sup>T 細胞の IL-18 誘導性 GM-CSF 発現を抑制すると考えられた。さらに、未分化軟骨細胞株 ATDC5 細胞への牽引力の負荷は、静止軟骨細胞から増殖軟骨細胞への分化を促進するとともに、軟骨基質で主要なプロテオグリカンであるアグリカンの発現を誘導した。さらに、本研究では、牽引力がアグリ

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：歯学部

氏名：田邊 奈津子

## 研究結果（つづき）

カン発現を誘導するメカニズムとして、牽引力による ATP 産生増加と ATP の受容体である P2Y2 受容体 PLC $\gamma$  が関与することが明らかとなり、薬剤療法とは異なる、牽引力による軟骨基質の再生の可能性が示唆された。

## 動物モデル研究

メタボに至る過程には、食生活、喫煙、飲酒、運動などの生活習慣や遺伝的因子が複合的に関与する。本総合研究における動物モデル研究では、メタボの遺伝的因子を有する個体における歯周病の発症がメタボに及ぼす影響と、遺伝的因子を持たない個体における食事性因子の負荷と歯周病の罹患がメタボに及ぼす影響、ならびにそのメカニズムを in-vivo レベルで検討した。

まず、遺伝的因子を有する個体として SHR/ND 系ラットを用いて、歯周病の発症がメタボ発症・増悪に及ぼす影響を検討した。SHR/ND 系ラットは、食欲抑制とエネルギー代謝亢進に関与するレプチンの受容体遺伝子を欠損しており、肥満、高血圧、高血糖、および脂質代謝異常を自然発症する。本研究で腹部 CT 画像解析を行った結果、臼歯部に糸結紮を行った歯周病群は糸結紮を行わなかったコントロール群に比べて、皮下脂肪に対する内臓脂肪量の比率が高い傾向が認められたが、両群に有意差は認められなかった。さらに、血圧、血清中の LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリドおよびグルコースのレベルを調べた結果、いずれの項目もコントロール群と歯周病群の間に有意差は認められなかった。本研究結果から、レプチン受容体欠損による遺伝的リスクを有する個体では、歯周病がメタボ発症に及ぼす影響は少ないと考えられた。

次に、メタボリックシンドロームの遺伝的素因を有さない Wistar 系ラットを用いて、食事性因子と歯周病の発症の有無が、メタボリックシンドロームの発症・増悪に及ぼす影響を検討した。食事性因子として高脂肪食を与えた条件においては、体重と肝臓、腸間膜脂肪および副睾丸脂肪の重量に歯周病群とコントロール群で有意な差は無く、血清中のトリグリセリド、LDL-コレステロール、HDL-コレステロールおよびグルコースのレベルにも歯周病発症の影響は認められなかった。一方、普通食を与え食事性因子を負荷しない条件の歯周病群とコントロール群の間においても、体重と肝臓、腸間膜脂肪および副睾丸脂肪の重量、血清中の LDL-コレステロールおよび HDL-コレステロールのレベルに有意差は無かったが、血清中のインスリンとトリグリセリドのレベルがコントロール群に比べて歯周病群で有意に高く、グルコースのレベルも歯周病群で高い傾向が認められた。さらに、血清中のグルコースとインスリンの積により算出されるインスリン抵抗性を表す HOMA-IR レベルもコントロール群に比べて歯周病群で有意に高かった。これらの結果を踏まえ、歯周病の影響が強く認められた食事性因子を負荷しない条件について、歯周病がインスリン抵抗性とトリグリセリドレベルを高めるメカニズムを明らかにするための分析を行った。

まず、血清中の 21 種類のサイトカインレベルを調べた結果、コントロール群に比べて歯周病群では、単球走化性因子である MCP-1 レベルが有意に高く、また、インスリンシグナルを阻害する TNF- $\alpha$  レベルも歯周病群で高い傾向が認められた。さらに、インスリンの主要な標的臓器である肝臓におけるインスリンシグナル経路をマイクロアレイで分析した結果、コントロール群に比べて歯周病群で、5 種類の因子 (JNK, AKT, PP1, AMPK, GK) の低下と、1 種類 (G6PC) の因子の上昇が認められた。これらの結果から、歯周病に罹患した個体の肝臓では、インスリンがインスリン受容体に結合したのちの細胞内シグナル伝達が抑制されてインスリン抵抗性高まっている可能性が考えられた。また、歯周病の罹患が血清中の MCP-1 レベルを高めて単球の走化性を促進し、インスリン標的臓器におけるマクロファージの浸潤と TNF- $\alpha$  の産生を誘導し、インスリン抵抗性を高める一因となっている可能性が示唆された。さらに、マイクロアレイ解析では、コントロール群に比べて歯周病群で、脂肪酸合成に関連するシグナル経路のうち 3 種類の因子 (Hacd2, Scd1, Hacd2) の上昇が認められた。また、肝臓組織中のトリグリセリドレベルもコントロール群に比べて歯周病群で有意に高かった。これらの結果から、歯周病は肝臓における脂肪酸合成と脂肪の蓄積を促進する可能性が示唆された。

遺伝的因子や食事性因子で発症するメタボでは、エネルギー摂取と代謝系の先天的な異常と不正な食生活

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：歯学部

氏名：田邊 奈津子

研究結果（つづき）

によって糖質・脂肪が慢性的に過剰となり、内蔵脂肪の蓄積が促進する。さらに肥大化した内蔵脂肪における悪玉アディポカインの産生増加と善玉アディポカインの産生低下によって、脂質代謝異常やインスリン抵抗性による高血糖状態が引き起こされ、さらには肝臓など脂肪組織以外の臓器への脂肪沈着が誘引される。本研究では、食事性因子を負荷しない条件下で、歯周病がインスリン抵抗性と血清中のトリグリセリド、および肝臓中のトリグリセリドレベルの上昇を誘引し、内蔵脂肪の蓄積に歯周病の影響は認められなかった。また、メタボの遺伝的因子を持つ個体や食事性因子を負荷した個体では、歯周病の罹患でメタボ関連指標は悪化しなかった。すなわち、歯周病は、遺伝的因子や食事性因子、および内蔵脂肪の蓄積とは独立して、インスリン抵抗性と血清中のトリグリセリドのレベルを高め、肝臓への脂肪蓄積を促進する可能性が示唆された。

課題番号	総 15-013
	継続
	総 14-017

平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28年 3月 31日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 近藤 真啓



所属・資格 歯学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 神経損傷後の正常な軸索再生のための分子基盤		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 近藤 真啓	歯学部／専任講師	研究の立案・総括および神経損傷モデル作製
○研究分担者 岩田 幸一 坪井 美行 内藤 昌子 林 誠 清水 康平	歯学部／教授 歯学部／専任講師 歯学部／准教授 歯学部／准教授 歯学部／助教	免疫組織化学的解析 マウスの神経損傷モデル作製 分子生物学的解析 疼痛行動解析 イメージングと形態学的解析
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		
平成27年度 科学研究費基盤研究(C) (代表：近藤真啓)「神経損傷に伴う神経再生および神経障害性疼痛発症の分子機構」が採択された。		

※「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。

部科校名： 歯学部

氏名： 近藤真啓

## 4 研究目的

神経損傷動物モデルを用いた種々の先行研究により、損傷を受けた末梢神経の軸索は機能的に再生することが、電気生理学および行動学的に明らかにされている。しかし、どの程度正確に軸索再生が起こるのか、また、軸索再生を誘導する責任分子はなにかなど、いまだ不明な点も多い。

一方、外傷に伴う末梢神経の圧迫や断裂（神経軸索の損傷）後、障害神経が再生する過程において、感覚鈍麻や神経障害性疼痛が発症することが知られている。特に、智歯の抜歯時に三叉神経が損傷を受けて発症する神経障害性疼痛は歯科偶発症のひとつであり、歯科臨床において深刻な問題となっている。最近、三叉神経領域の神経障害性疼痛の発症時に、三叉神経節においてサテライトグリアの活性化および **extra cellular-signal regulated kinase (ERK)** のリン酸化が生じると報告されているが、神経の再生過程に起こる痛覚閾値低下の分子メカニズムは明らかにされていない。

そこで本研究では、感覚ニューロンが損傷を受けたのちに生じる軸索の再生過程について、形態学および行動学的に明らかにするとともに、軸索再生に関わる候補分子を探索することで神経損傷により生じる軸索再生の分子基盤を明らかにし、神経損傷後の機能回復や異常疼痛軽減のための基礎情報を得ることを目的とした。

## 5 研究概要

上述の研究目標を達成するため、以下の実験計画を立案、実施した。

- 1) ショウジョウバエの機械感覚受容ニューロンをモデルシステムとして、遺伝学的手法およびイメージング法を併用し、正確な軸索投射の決定に関わる分子を検索した。
- 2) ショウジョウバエの感覚ニューロンをターゲットに、神経障害（または過興奮）モデルを作製し、神経損傷（または神経興奮）に伴う神経突起の形態変化をイメージング法により解析した。
- 3) マウスおよびラットの三叉神経損傷モデルを作製して、(1) 口腔感覚情報の神経回路における細胞接着分子群および各種神経マーカーの発現様式の変化、(2) 各種感覚刺激を与えた際に生じる逃避閾値の変化について解析した。

部科校名： 歯学部

氏名： 近藤真啓

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

## 1. 感覚ニューロンの軸索投射（神経配線）を制御する機能分子の検索

ショウジョウバエの胸郭には左右 11 対の剛毛が規則的に配列し、これらの剛毛は単一の機械感覚受容ニューロンによって支配されている。また、個々の感覚ニューロンの軸索投射パターンはステレオタイプである (Chen et al., 2006) ことから、本研究では、剛毛のひとつの *posterior scutellar macrochaete* を支配する感覚ニューロン (pSc ニューロン) に焦点をあてた。

Gal4/UAS 遺伝子発現システムおよび RNA 干渉法を併用して、神経発達（神経回路形成）期に発現することが知られている各種機能分子を感覚ニューロンで特異的に抑制したトランスジェニック動物を作製し、神経突起の伸展様式を解析した。その結果、複数の細胞接着分子 (Dscam1, CadN, CadN2, Ecad) がそれぞれ異なるメカニズムにより、pSc ニューロンの正確な軸索投射に関与していることを見出した。また、異なるドライバー (455-Gal4: 感覚ニューロンで特異的に働く) を用いて RNAi を誘導しても、同様の軸索投射異常が観察された。これに対して、Ecad の発現を抑制した場合、異所性軸索分枝の形成および過剰伸展が観察されたが、表現型には個体差がみられたのと同時に、剛毛の出現パターンにも異常が生じることを見出した。この結果は、Ecad の発現は軸索投射のみならず、神経（感覚器）分化にも関与していることを示唆している。本研究の成果は、第 39 回日本分子生物学会年会（平成 28 年 11 月 30 日～12 月 2 日開催予定）において発表を予定している。

## 2. 単一ニューロンに対する神経損傷および過興奮状態の誘導に伴う神経突起形態の変化

神経損傷に伴う神経突起形態（神経配線）の変化を明らかにするため、単一ニューロンで神経損傷または過興奮を誘導する実験系を開発した。まず始めに、剛毛（感覚器）を除去した後、経時的に DiI を微量注入して単一 pSc ニューロンの神経突起を標識し、軸索の投射パターンを解析した。剛毛除去後 2 時間以上経過した場合、DiI 標識される頻度が有意に減少したが、標識された場合の投射パターンには異常がみられなかったことから、剛毛除去が軸索突起の形態に影響する可能性は低い（少なくとも、剛毛除去後 8 時間以内）と考えられた。

神経障害モデルラットを用いた解析から、感覚ニューロンが軸索損傷を受けると一過性にナトリウムチャネルの発現が増加して過興奮状態になる（痛覚過敏発症の一因）ことが明らかにされている。そこで、Gal4/UAS システムを用いて、神経系全般または pSc ニューロンで特異的に細菌性ナトリウムチャネル (NaChBac) を異所性過剰発現させたトランスジェニック動物を作製し、pSc ニューロンの軸索投射様式を解析した。その結果、pSc ニューロンの軸索突起の分枝数および伸展方向はいずれも野生型と比較して有意な差は認められなかったが、varicosity 様構造の出現頻度が個体ごとに変動する傾向を見出した。これはシナプス形成のダイナミクスを反映している可能性がある。現在の解析システムではライブイメージングによる観察は技術的に難しいため、今後代替となる実験法を検討し、この可能性について明らかにしていきたい。

一方、幼虫の感覚ニューロンをターゲットにしたモデルシステムの開発も行った。幼虫の体表面上には複数の感覚ニューロンがタイル上に存在し、外界情報を受容している。この感覚ニューロン群で特異的にはたらくドライバーを利用して GFP を発現させることで、生存下において個々の感覚ニューロンの神経突起形態を可視化し、単一ニューロンの形態変化を少なくとも 8 時間に渡り追跡観察することを可能にした。また、単一ニューロンの神経突起部へ限局性にレーザー照射をおこない、1 本の神経突起を損傷させる手法を確立した。障害を与えた神経突起の近位側断端はバルブ状に変形し、少なくとも一部の個体においては、3～4 時間後に微弱な神経突起の新生が観察された。一方、損傷部の遠位側神経突起は徐々に断裂していき、8 時間後には消失することが明らかになった。これは engulfment 機構による除去であると考えられる。さらに、損傷部周囲の（レーザー照射を受けていない）神経突起の形態も併せて解析を行ったが、損傷 8 時間以内においては顕著な形態変化は観察されなかった。本研究の成果は、以下の会議において発表した（口頭発表）。

近藤真啓、神経損傷により発症する感覚異常と神経突起再生の分子基盤 - 単一ニューロンにおける神経突起損傷モデルの構築、第 8 回高次脳研究会（金沢）、平成 27 年 8 月 17 日

部科校名： 歯学部

氏名： 近藤真啓

## 研究結果 (つづき)

## 3. 軸索投射制御分子の脳内発現様式と神経切断モデルマウスを用いた軸索再生過程の基礎解析

先に示した研究で、軸索形態形成に関連することが明らかになった分子に関して、マウスの神経系における発現様式を免疫組織化学的に解析し、研究初年度に E-cadherin および N-cadherin が感覚ニューロンの細胞体周囲の細胞膜上および軸索に強く発現していることを明らかにしてきた。また、比較的大型の感覚ニューロンを取り囲むグリア様細胞においても、免疫活性が確認されることを示した。さらに、三叉神経脊髄路核における両分子の発現は層によって異なり、N-cadherin は II/III 層全般（侵害性機械および熱刺激情報の到達部位）に強く、E-cadherin は II 層の isolectin B4 (IB4) 陽性領域（侵害性機械刺激情報の到達部位）により強く発現していることを見出し、感覚のモダリティ特異的な神経回路の形成過程に異なる細胞接着分子が関与している可能性を示した。

今年度は、モデル作製を開始したマウス三叉神経の軸索切断実験について、より詳細に形態学および行動学的解析を行った。左側のオトガイ神経および下歯槽神経とともに切断し、機械刺激に対する頭部逃避反射閾値の変化を解析した結果、軸索切断 1 週間後までは、損傷神経が支配する受容野の機械刺激（上限 80g の圧刺激）で逃避反射は起こらなかったが、切断 2 週間目以降、sham 群と比べて閾値は高いものの逃避反射が生じる（回復してくる）ことを明らかにした。一方、切断後 4 週間が経過すると、一部の個体において sham 群よりも逃避反射閾値が低下することを見出したが、その出現頻度は 10% 以下と極めて低いことが明らかになった。以上の結果より、神経切断後約 2 週間で神経軸索の機能的再生が生じること、また、切断後 4 週間ではごく一部の実験群で神経障害性疼痛が発症していることが明らかになった。

一方、神経切断後、経日的にマウスより三叉神経節および延髄を摘出し、細胞接着分子および痛覚関連分子群の発現の変化について解析を行った。軸索切断後 1 週間において、患側の三叉神経脊髄路核内の一部領域で E-cad および IB4 の免疫活性が有意に減少または消失すること、また、この現象は、切断 1 ヶ月後まで継続することが明らかになった。また、軸索切断 2 週間後、三叉神経節ニューロンにおいて、TrpV1 受容体の発現が有意に増加したのに対して、CGRP の発現が有意に減少することを見出した。さらに、軸索切断を行った感覚ニューロンの受容野（オトガイ部皮下）に DiI を微量注入して、神経再生過程を観察したところ、切断 2 週間後において、三叉神経節内のニューロンおよび延髄の三叉神経脊髄路核内において DiI シグナルが観察された。本研究の成果は、以下の研究会において発表した。

鈴木達郎、近藤真啓、菅野直之、佐藤秀一、岩田幸一、下歯槽神経の再生過程における細胞接着分子の発現変化、第 9 回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会（志賀島）、平成 27 年 11 月 29 日

## 4. 舌神経損傷により生じる感覚ニューロンの表現型変化

舌神経挫滅モデルラットを用いて、舌の神経障害性疼痛時の三叉神経節におけるニューロンとグリア細胞の機能連関について検討し、昨年度までに、舌神経損傷により、舌への機械および熱刺激に対する逃避閾値が低下して、三叉神経節における CGRP 陽性細胞数および活性化型サテライトグリア数がともに増加すること、また、リン酸化 ERK 陽性サテライトグリア細胞の数が増加することを明らかにしてきた。そしてまた、舌神経損傷ラットの三叉神経節への CGRP receptor antagonist および ERK kinase antagonist の投与により舌神経損傷による逃避閾値の低下が抑制されることを見出した。

一方、サテライトグリア細胞には ATP をリガンドとする purinergic receptor の 1 つである P2Y12 receptor (P2Y12R) が存在している。そこで、舌神経挫滅モデルラットの三叉神経節に P2Y12R の antagonist を投与するとリン酸化 ERK 陽性サテライトグリア細胞数の増加が抑制された。一方、naive ラットの三叉神経節に P2Y12R の agonist を投与するとリン酸化 ERK 陽性サテライトグリア細胞数が増加した。この結果より、サテライトグリア細胞における ERK のリン酸化に purinergic receptor が関与する可能性が示唆された。本研究の成果は、学術雑誌に投稿し、現在、リバイス中である。

Katagiri A et al., Satellite glial cell activation via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation, associated with phenotypic change in trigeminal ganglion neurons, is involved in lingual neuropathic pain.

平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28年 3月 30日

日本大学学長 殿

氏 名 浅野正岳



所属・資格 歯学部・教授

下記のとおり報告いたします。

退職,転出の場合は, ( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 創傷治癒を促進する電解酸性機能水の作用機序の解明		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 浅野正岳	歯学部/教授	研究の立案と総括
○研究分担者 白川哲夫 清水典佳 菅野直之 勝呂尚 砂川恵伸 尾曲大輔	歯学部/教授 歯学部/教授 歯学部/准教授 歯学部/助教 医学部/助教 歯学部/助教	臨床的事項の検討 臨床的事項の検討 動物実験とデータの解析 創傷実験とデータの解析 動物実験に係る病理的検討 分子生物学的実験の遂行
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		
平成27年度 科学研究費 基盤研究(C) 電解酸性機能水の創傷治癒の促進効果に関する研究(分担者: 尾曲大輔) 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。



部科校名：歯学部

氏名：浅野正岳

## 4 研究目的

食塩水を電気分解して得られる電解酸性機能水（以下 functional water; FW）は、pH 2.7、有効塩素濃度 20~30 ppm を呈する。FW を用いることにより、臨床的には「癌の増殖を抑制した」、「火傷の治りを早めた」などとする報告が多数存在する。申請者らは、FW の生理学的機能を何とかして突き止めたという考えから、培養上皮細胞に FW を作用させることで生じる変化について cytokine array という方法を用いて実験を行った。その結果、interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) の産生が増強されるという現象を見出した。文献的に検索した結果、IL-1 $\alpha$  は炎症反応に関与する以外に、創傷治癒促進効果があるという報告が数多くあることが解った。そこで、ヒト歯肉由来線維芽細胞を用いて実験を行ったところ、上皮細胞由来の IL-1 $\alpha$  は転写因子 PPAR $\beta/\delta$  の発現を介して interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) の産生を増強することが明らかとなった。これは皮膚で見られる創傷治癒促進効果と同じシグナル経路であり、FW は創傷治癒に貢献しているのではないだろうかとの着想を得た。これに基づき、マウスの皮膚に人為的に創傷を作成し、FW の傷口の治り具合に対する効果を観察したところ、生理食塩水などに比較して、約 20% の創傷治癒促進効果を示した。これらの背景を踏まえ、本研究では

- 1) FW による IL-1 $\alpha$  産生誘導メカニズムの解明
- 2) IL-1 $\alpha$  の創傷治癒促進効果の動物実験による検証を目的とした。

## 5 研究概要

1) FW による IL-1 $\alpha$  産生誘導メカニズムの解明

①FW のどの成分が IL-1 $\alpha$  産生に関与するのかという点について検討を加えた。これについては FW の供給元である三浦電子工業に依頼し、有効塩素濃度、pH、酸化還元電位を様々に変化させた FW を準備し、IL-1 $\alpha$  産生誘導能について検討した。口腔扁平上皮癌細胞 HSC3 に FW を 30 秒間作用させた後、10% FCS-RPMI1640 培地を添加することで反応を停止した。新しい培養液で 3 時間さらに培養し、培養上清中の IL-1 $\alpha$  量を ELISA キットを用いて測定した。

②FW は食塩水を電気分解することにより得られる。従って、その機能がナトリウムまたは塩素イオンによってもたらされている可能性が極めて高いと考えられる。そこで、これら 2 種類のイオンに対するイオンチャネルの阻害剤を OSCCs に作用させ、IL-1 $\alpha$  産生の変化について検索した。平成 27 年度は特に塩素イオンチャネルの阻害剤であるクロロトキシシンを用いて検討した。HSC3 細胞を阻害剤により 37 $^{\circ}$ C、1 時間前処理した後、FW を 30 秒間作用させ、①と同様の方法で IL-1 $\alpha$  産生量を測定した。

2) IL-1 $\alpha$  の創傷治癒促進効果の動物実験による検証

IL-1 $\alpha$  の産生は創傷治癒を促進させるという数々の報告に基づき、動物に人為的に作成した創傷の治癒過程を比較したところ、FW 作用群では生理食塩水作用群に比較して約 20% の治癒促進効果が観察された。そこでこの効果が FW によって誘導される IL-1 $\alpha$  に依存した効果であるか否かについて検証するため、IL-1 $\alpha$  KO mouse を用いて検討した。IL-1 $\alpha$  KO mouse の背部に皮膚トレパンを用いて創傷を作成し、FW または生理食塩水および 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を塗布した後、経時的に創傷の面積を測定し、その縮小について計測した。またこれと同時に、wild type マウスの皮膚に同様に創傷を作成し、マウスリコンビナント IL-1 $\alpha$  を作用させ、創傷治癒の促進効果があるかという点についても解析した。さらに、これら一連の実験でマウス皮膚における創傷の組織学的変化についてパラフィン切片を作成し、HE 染色等により観察を行った。

部科校名：歯学部

氏名：浅野正岳

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

1) FWによるIL-1 $\alpha$ 産生誘導メカニズムの解明

①FWのどの成分がIL-1 $\alpha$ 産生に関与するのか

FWの有効塩素濃度を20~200 ppm、pHを2.7~9.0、酸化還元電位を1,000~5,000 mVに段階的に変え、これら3要素を様々に組み合わせたFWを100種類程度作成した。これらを用いてIL-1 $\alpha$ 産生を指標に検討を加えた。すなわち、HSC3細胞にこれらのFWを30秒間作用させ、ELISAによりIL-1 $\alpha$ 濃度を測定した。その結果、有効塩素濃度は20~50 ppmの範囲、pHはより酸性領域で、また酸化還元電位は2,000 mV程度の組み合わせで最も効率的なIL-1 $\alpha$ 産生を検出することができた。この3要素はすべてが上記要件を満たすものでなくてはならず、FWの作用は極めて微妙にコントロールされているものであると結論した。

塩素イオンチャンネル阻害剤クロロトキシンを段階的に希釈し、HSC3細胞を1時間前処理した。その後、FWで30秒間刺激した。細胞をさらに3時間培養した後、上清中のIL-1 $\alpha$ 濃度を測定したが、クロロトキシンによってはIL-1 $\alpha$ 産生は阻害されないことが明らかとなった。この結果は、塩素イオンの細胞内流入はIL-1 $\alpha$ 産生には関係がないという事であり、ナトリウムイオンの関与についても検討する必要があると考えた。一方、Na-ATPaseの阻害剤であるbafilomycinを用いて同様に解析した。HSC3細胞を段階的に希釈したbafilomycinで1時間前培養した後、FWで30秒間刺激した。その結果、bafilomycinの濃度依存的にIL-1 $\alpha$ 産生が抑制された。これは、FW刺激によるIL-1 $\alpha$ 分泌がイオンポンプに依存している可能性を示すものであり、この点については今後さらに検討していきたいと考えている。

2) IL-1 $\alpha$ の創傷治癒促進効果の動物実験による検証

IL-1 $\alpha$  KO mouseの背部に皮膚トレパンを用いて人為的に作成した創傷に、FWまたは生理食塩水および3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を塗布した後、経時的に創傷の面積を測定し、その縮小について計測した。その結果、wild typeマウスではFW作用群で作用後1日目で約20%の創傷治癒促進が認められた。同様の実験をIL-1 $\alpha$  KO mouseで行ったところ、1日目に認められた治癒促進効果は効果が消失していた。また、すなわち、FWにより誘導されるIL-1 $\alpha$ は創傷治癒促進の主体的分子である可能性が示唆された。一方、wild typeおよびIL-1 $\alpha$  KO mouse間で比較すると、IL-1 $\alpha$  KO mouseではより創傷面積の縮小が早かった。この原因は不明であるが、極めて興味深く今後の検討課題であると考えている。さらに、IL-1 $\alpha$ の効果を検証するためにwild typeマウスの皮膚に同様に創傷を作成し、マウスリコンビナントIL-1 $\alpha$ を作用させた実験では、予想に反して創傷治癒促進効果が全く認められなかった。この結果は、上記と相反するものであり、考察が必要である。cytokine arrayの実験では、IL-1 $\alpha$ に加え、basic fibroblast growth factor (bFGF)やextracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)などの分泌も確認されており、これらの分子の創傷治癒に対する効果についても検討していきたいと考えている。特に、bFGFについては創傷治癒促進薬としてフィブラストスプレーが市販されており、FWとの比較は極めて重要であり、比較実験を行った。その結果、ではFW群ではフィブラストスプレーと比較して、創傷作成1日後の創傷面積の縮小が大きかった。また組織学的には、膠原線維の産生がFW群でより少なく、未だ統計処理を行っていないものの、FWはフィブラストスプレーよりも創傷治癒の観点からより優れた効果を発揮しうる可能性が考えられた。創傷領域の組織学的変化のHE染色による観察では、マウス皮膚における炎症は比較的軽度であり、好中球やマクロファージの浸潤は極めて軽微であった。炎症は創傷治癒のためには惹起されなければならない反応であることから、組織学的検索はより詳細に進める必要があると考えている。特に、IL-1 $\alpha$ がalarminであることから(以下に詳述)、浸潤する炎症性細胞の種類と程度については、免疫組織学的に検索する予定である。

上記のように予定していた実験が順調に進行したため、当初は平成28年度の計画としていた以下の実験についても進めることとなった。

1) FWにより誘導される遺伝子の網羅的解析

FWがOSCCsに作用することによりIL-1 $\alpha$ 産生が増強されるという結果は、real-time PCRの結果から転写レベルで調節されているということが明らかとなり、FWがIL-1 $\alpha$ 以外の遺伝子発現を調節する可能性を示唆するものであった。そこで、マウス皮膚における創傷モデルを用いて、FW作用後の遺伝子発現変化についてPCR array法を用いて網羅的に解析した。その結果、創傷治癒促進に関係する30種類以上の遺伝子が発現増強されることが分かった。この中にはこれまでの実験で注目してきたIL-1 $\alpha$ 遺伝子も含まれており、マウス生体においてもIL-1 $\alpha$ が誘導されることを確認した。また誘導の程度は、培養細胞を用

部科校名：歯学部

氏名：浅野正岳

## 研究結果 (つづき)

いた結果と比較してより高度 (~7 倍) であり IL-1 $\alpha$  の創傷治癒過程における重要性を改めて知ることとなった。ここで発現増強が明らかとなった分子については現在、免疫組織学的な検索を行っている。

2) FW の転写因子 NF- $\kappa$ B 抑制効果

これまでの研究から、FW が OSCC の自発的 IL-8 産生を抑制することを明らかにしてきた。IL-8 mRNA の発現は転写因子 NF- $\kappa$ B の活性に大きく依存することから、この点についてさらに検索したところ、FW が NF- $\kappa$ B の活性を何らかの形で抑制していることが明らかとなった。そこで、FW はどのようなメカニズムで NF- $\kappa$ B 活性を抑制しているのかという点についても検討した。この目的のために、HSC3 細胞を FW で 30 秒間刺激した後、1 時間培養し直ちにホルマリンで固定した。固定後の細胞を NF- $\kappa$ B p65 および p50 サブユニットに対する抗体を用いて蛍光染色した。その結果、無刺激の状態では、p65 は主に細胞質に、また p50 は主に細胞質に局在していたのに対し、FW 刺激後は、それぞれ細胞質および細胞核に移行することが明らかとなった。そこで、この結果をさらに確認するために、細胞分画法および Western blot 法により検討したところ上記と符合する結果を得た。すなわち、FW 刺激は細胞内の NF- $\kappa$ B サブユニットの局在を変化させることにより NF- $\kappa$ B 活性を抑制している可能性が考えられた。

3) IL-1 $\alpha$  の転写調節 (intrakine としての機能)

inflammatory cytokine である IL-1 $\alpha$  は 34 kDa の precursor form (pIL-1 $\alpha$ )として細胞内で産生され、カルパインによって N 末端が切断され 17 kDa の mature form (mIL-1 $\alpha$ )となる。しかし、pIL-1 $\alpha$  は mIL-1 $\alpha$  と同様に細胞外に分泌されるのみならず、mIL-1 $\alpha$  と同様の生物学的活性を持ち、その類縁因子である IL-1 $\beta$  とは異なった性質を有している。中でも pIL-1 $\alpha$  はその核移行シグナルにより細胞核内に存在し転写の制御に関与していることから、intrakine とも呼ばれている。我々はこの点に着目し実験を行っている。すなわち、HSC3 に IL-1 $\alpha$  を強制的に発現させ、培養上清中に分泌される IL-8 濃度を ELISA により測定し、mock transfectant との比較を行った。その結果、IL-1 $\alpha$  transfectant では有意な IL-8 産生増強が認められた。real-time PCR の結果、この現象が transcriptional に調整されていることが明らかとなっており、このメカニズムについても現在検討している。また、IL-1 $\alpha$  の N 末端または C 末端に GFP を標識し、IL-1 $\alpha$  の細胞内局在についても検討している。現在 C 末端を標識した IL-1 $\alpha$  の stable transfectant の作製は完了しており、培養上清中に IL-1 $\alpha$ -GFP が産生されることは確認している。この細胞を用いて、分泌された IL-1 $\alpha$  の近隣細胞における転写制御機構についてさらに検討したいと考えている。

## 3) EMMPRIN は alarmin の一種か?

細胞障害などに伴って分泌される分子は alarmin と呼ばれ着目されている。IL-1 $\alpha$  は代表的 alarmin であり、上述の EMMPRIN が FW の刺激に応じて IL-1 $\alpha$  とともに分泌されるという現象は EMMPRIN が alarmin の一種である可能性を示唆するものである。我々は、HSC3 に FW 以外の細胞障害刺激を加えて、その分泌変化について検討した。すなわち 40 $^{\circ}$ C、2 時間培養による heat shock および 10 mM H $_2$ O $_2$  刺激による酸化ストレスを加え、EMMPRIN 分子の分泌を IL-1 $\alpha$  と比較した。その結果、EMMPRIN の分泌は IL-1 $\alpha$  と同様の反応を示した。すなわち、FW 刺激では最大の分泌が確認され、heat shock および酸化ストレスではこれと比較して低い分泌が確認された。また、それぞれの刺激に対応した lactate dehydrogenase (LDH) の産生についても同様に観察したが、FW 刺激で最も多くの LDH の分泌が観察され、刺激の大小に応じた EMMPRIN および LDH 分泌を確認することができた。この結果は、EMMPRIN が alarmin の一種である可能性を示唆するものであり、今後さらに検討していきたいと考えている。

平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28年 3月 28日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 \_\_\_\_\_ 大 口 純 人 \_\_\_\_\_



所属・資格 \_\_\_\_\_ 松戸歯学部 ・ 准教授 \_\_\_\_\_

下記のとおり報告いたします。

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 歯周炎で誘導される炎症の慢性化機構解明と免疫学的制御機構の開発		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 大口 純人	松戸歯学部・准教授	研究の総括とマウス In vivo 実験、動脈硬化診断
○研究分担者 落合 智子 瀧澤 智美	松戸歯学部・准教授 松戸歯学部・助教	感染動物実験、酸化ストレス測定実験、WB 解析 ELISA 測定、定量 PCR、樹状細胞単離、 リンパ球解析
Bhawal Ujjal 小林 良喜	松戸歯学部・助教 松戸歯学部・助手（専任扱）	Gene chip 解析、In situ hybridization プロバイオティクス投与実験、口腔の炎症、 免疫担当細胞の解析
細野 朗 絹川 典子	生物資源学部・教授 医学部・講師（専任扱）	腸管リンパ組織解析、腸内細菌叢メタゲノム解析 免疫染色
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		
科学研究費		
落合智子	H27年度 基盤研究(C)	歯周炎で誘導されるインフラマソーム活性化が動脈硬化に及ぼす影響とその制御
瀧澤 智美	H27年度 基盤研究(C)	経口ワクチン接種時のパイエル板における粘膜免疫誘導機序の解明
Bhawal Ujjal	H27年度 基盤研究(C)	口腔扁平上皮癌の悪性度を規程する転写因子 DEC-Twist 分子制御機構の解明
細野 朗	H27年度 基盤研究(C)	大腸免疫系炎症制御の分子機構解明と腸内共生菌・食品機能分子による修飾
委託研究費		
落合 智子	H27年度	雪印メグミルク(株) 乳酸菌の歯周病予防効果に関する研究
落合 智子	H27年度	久光製薬(株) 歯周病ワクチンの有用性に関する研究

※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 (  〇・否 ) いずれかを〇で囲んでください。  
否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：松戸歯学部

氏名：大口 純人

## 4 研究目的

近年、歯周炎を始め動脈硬化やメタボリック症候群、心筋梗塞といった様々な疾患における慢性炎症の重要性が指摘されている。その慢性炎症病態には、インフラマゾームを介した「自然免疫系」の活性化メカニズムや IL-17 産生誘導による炎症誘発が重要な役割を演じている可能性が示唆されているが、歯周病で誘導される動脈硬化における自然炎症や IL-17 の役割はこれまで報告されていない。また、自己炎症性疾患および代謝性疾患の発生に腸内細菌叢が極めて重要な役割を果たすことが報告されているが、歯周病原菌感染における腸内細菌叢の変動や、腸管免疫担当細胞の働きについては全くわかっていない。そこで本研究では、1. 歯周病原菌感染によるインフラマゾームの活性化や IL-17 の産生誘導が慢性炎症病態を持続させ動脈硬化疾患の発症・進行・重症化に関与するメカニズムを明らかにし、2. 歯周病原菌感染による腸内細菌叢の変動、腸管免疫担当細胞の推移を明確にする。更に 3. 自己抗原刺激した寛容性樹状細胞による制御性 T 細胞の誘導や 4. プロバイオティクスの経口投与による腸内環境の改善が歯周病や動脈硬化の進展に及ぼす影響を検討し、慢性炎症性疾患の予防開発を目指す。

## 5 研究概要

①歯周病原性細菌感染による酸化ストレス亢進メカニズムや LDL の酸化変性機序の解明  
大動脈組織における酸化ストレス測定：マウス心臓からパラフィン切片を作成し、ox-LDL, LP-PLA2, 4HNE に対する蛋白発現を抗体を用いた免疫染色により解析する。更に酸化 LDL 関連因子である LOX-1, NADPH オキシダーゼ関連酵素に対する遺伝子発現を定量 PCR により解析する。In vitro 実験による酸化ストレスの測定：ヒト単球、血管内皮細胞を用い、歯周病原菌感作による活性酸素産生能、LDL 酸化能を測定する。更に LOX-1, NADPH オキシダーゼ関連酵素に対する遺伝子発現を定量 PCR により解析する。

②酸化 LDL で刺激した未熟樹状細胞による制御性 T 細胞の誘導：(1)樹状細胞の単離：骨髓前駆細胞は Inaba らの方法に準じて単離する。CD34+前駆細胞を単離し、GM-CSF 及び IL-4 存在下で培養する。7-10 日目に細胞を Histopaque-1077 により精製する。(2)表面分子の確認：CD11b, CD40, CD86, 及び MHC classII 陽性をフローサイトメーター(FCM)にて解析する。(3)マウスへの投与：樹状細胞を酸化 LDL と共に 2h 培養後、マウスに  $3 \times 10^6$  の濃度で皮下注射する。(4)T リンパ球の単離精製：脾臓より単核球を単離し、ネガティブセレクションにより単離する。(5)FCM での Treg 細胞の解析：細胞を抗マウス CD25-RPE, CD4-FITC 又は CD8-FITC 及び抗マウス Foxp3-Alexa647 又は CD127-Alexa647 にて染色する。

③プロバイオティクスによる口腔内環境の改善による動脈硬化予防：(1)自然発症 ApoE 欠損高脂血症 (SHL) マウスに乳酸菌を 5 週間に渡りゾンデを用いて経口投与後、代表的歯周病原菌を経口感染し、歯肉の炎症状態を HE 染色にて病理組織的に解析する。また歯槽骨吸収量をデジタル HD マイクロスコープにて計測する。

部科校名：松戸歯学部

氏名：大口 純人

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

## 1. 血管内皮細胞の活性化

血中の歯周病原菌は血液循環を介し、又は単球や好中球、血小板に侵入して心臓組織等に運ばれ、病態を形成する。ApoE<sup>sh1</sup> マウスへの *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) 感染は、動脈における intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), E-selectin, P-selectin, chemokine (C-C motif) ligand 19 (CCL19), CCL21 および C-C chemokine receptor-7 (CCR7) の発現を増加した。ヒト大動脈内皮細胞と *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) との共培養もまた線毛依存的な活性化メカニズムにより ICAM-1, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), MCP-1 及び E-selectin の発現を増加した。エンドサイトーシスの化学的阻害は MCP-1 の発現増加を阻害したことから、MCP-1 発現の為に細菌侵入の必要性が指摘された。一方、*P. g.* 由来の LPS や外膜タンパク、HSP60 での内皮細胞の刺激は ICAM-1 や VCAM-1 発現に対し僅かな促進効果しか認められなかった。

## 2. Toll 様受容体および Nod 様受容体を介した応答

内皮細胞への歯周病原体の暴露は Toll 用受容体 (TLRs) の発現や相互作用を増強する。ApoE<sup>sh1</sup> マウスへの *A. a.* 感染は動脈における TLR-2, TLR-4, TLR-9 および nucleotide binding oligomerization domain 1 (NOD-1) 発現を増強し、*A. a.* 加熱死菌体および LPS 処理もまた TLR-4, NOD-1 および NOD-2 発現を増強した。しかし、動脈硬化進展度は *A. a.* 生菌 > *A. a.* 死菌 > *A. a.* LPS の順に高く、更に動脈硬化病巣の有意な相違が *A. a.* 生菌グループと *A. a.* LPS グループ間で認められた。*P. g.* 投与した ApoE-KO マウスもまた動脈組織中に TLR-2 および TLR-4 を発現したが、侵入性の無い *P. g.* 線毛欠損変異株の投与は TLR 発現を増強出来なかったことから、侵入細菌による自然免疫認識が動脈硬化の促進には不可欠であることが示唆された。

## 3. 歯周病原性細菌感染による酸化ストレス亢進メカニズムや LDL の酸化変性機序の解明

脂質酸化は多くの疾患において重要な役割を果たしているが、特に LDL 酸化は動脈硬化の進展において重要なステップとなる。LDL 酸化はマクロファージ内でのその蓄積および泡沫細胞形成に必要不可欠であり、動脈硬化関連ケモカインや接着因子の発現を促進し、更に IL-6, TNF- $\alpha$ , C 反応性蛋白分泌を促進する。ApoE<sup>sh1</sup> マウスへの *A. a.* 感染は 4-hydroxynoneal や ox-LDL, phospholipase A2 の大動脈組織での発現増加、血清中の ox-LDL, 8-oxo-2'-deoxyguanosine および myeloperoxidase レベルの増加、NADPH オキシダーゼ、calveolin-1, receptor for advanced glycation endopducts の大動脈での遺伝子発現増加等の結果から、LDL 酸化を促進した。*P. g.* においてもまた LDL の酸化変性増強作用 (4HNE, ox-LDL, PLA2, MPO, CD36 の大動脈組織での発現増加や心臓組織における LOX-1 や NADPH オキシダーゼの発現増強) が認められた。In vitro 実験において、*P. g.* 及び *P. g.* LPS は菌数依存的に単球及び血管内皮細胞からの活性酸素 (ROS) 産生を増強した。更に、*P. g.* は抗 ox-LDL 抗体と反応することが確認され、この反応性はジンジパイン阻害剤やジンジパイン欠損株で有意に抑制された。従って、*P. g.* は ox-LDL と共通エピトープを有し、*P. g.* による直接の酸化作用のみならず、分子相同性による炎症増強にも関与している可能性が示唆された。

## 4. インフラマソーム構成成分欠損による歯周病原菌感染マウスからの炎症性サイトカイン産生、骨代謝及び歯周病誘発機序への影響

本年度は、NLRP3 以外のインフラマソーム構成成分 (ASC, Caspase-1 遺伝子) 欠損マウスを用いて歯周病原菌感染による炎症誘発、骨代謝および骨吸収への影響を検討した。ASC 欠損又は Caspase-1 欠損マウスへの *P. g.* 菌感染は野生マウスと比較して、歯肉の炎症性サイトカイン (Pro-IL-1 及び Pro-IL-18) や RANKL, OPG 発現を有意に抑制した。更に *P. g.* 菌感染による腹腔マクロファージからの炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  及び IL-18) 産生や Caspase-1 活性を有意に抑制した。以上の結果から、歯周病原性細菌 *P. gingivalis* の経口感染は、種々のインフラマソーム (NLRP3, ASC, Caspase-1) を活性化して

部科校名：松戸歯学部

氏名：大口 純人

研究結果(つづき)炎症性サイトカイン産生を誘導し、その結果 Th17 細胞の誘発、IL-17 の増強により慢性炎症が持続する可能性が示唆された。

#### 5. インフラマソームと Th17 細胞活性化による炎症の持続

インフラマソームの活性化は IL-1b 誘導性炎症に重要であり、自己炎症性疾患の病態において中心的な役割を担っている。近年の研究から、IL-1 や IL-18 が Th17 細胞や  $\gamma\delta T$  細胞からの IL-17 産生を促進していることが示されている。インフラマソームで誘導される IL-1 や IL-18 により活性化された Th17 細胞や  $\gamma\delta T$  細胞は、多くの自己免疫および慢性炎症性疾患に主要な役割を持っている。IL-17 が、人および実験的アテローム性動脈硬化組織や血漿で検出されていることから、IL-17 はアテローム性動脈硬化症の病態形成に重要な役割を果たしている可能性がある。P. g. 感染マウスにおいては、動脈硬化プラークの顕著な蓄積と同時に、脾臓における CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> T 細胞の有意な増加と脾臓及び心臓組織における IL-17 や IL-1 $\beta$  産生、IL-17 関連遺伝子発現の増加が認められた。

P. gingivalis はまた慢性歯周炎における Th17 誘導経路をも促進した。Th17 細胞の持続は慢性炎症を長引かせ、in vitro において線維芽細胞や破骨細胞などの残存のマトリックス細胞の活性化を介して直接組織破壊に働くことが示されている。それゆえに P. gingivalis が慢性炎症性に組織破壊に関与するというメカニズムの解明は歯周病のみならず動脈硬化のような全身の炎症性疾患にも重要である。A. a. 血清型 b 株での感染もまたマウス脾臓の IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞集団や、Th17 関連血清サイトカインレベル、大動脈での Th17 関連遺伝子発現やアテローム性動脈硬化形成を増強した。更に A. a. 感染は大動脈での Th17 関連 microRNA(miR-155 や miR146b)やインフラマソーム関連因子(AIM-2, Mincle, および NLRP3)の発現を増強した。これらの結果は、A. a. 感染マウスでの Th17 細胞の増加が動脈硬化の増悪と関連する可能性を示唆している。更に ApoE 欠損マウスでの miR-155 欠損はマクロファージの浸潤や Th17 細胞数の減少により動脈硬化を軽減した。A. a. 感染が ApoE<sup>shl</sup> マウスの miR-155 や miR146b 発現を有意に増強したことから、A. a. は miR-155 や miR146b の発現増強を介して Th17 細胞分化を制御しているのかもしれない。

#### 6. 酸化 LDL で刺激した未熟樹状細胞による制御性 T 細胞の誘導

制御性 T 細胞は、自己抗原を認識する免疫細胞を免疫寛容状態に維持する重要な役割を果たしている。そこで酸化 LDL 刺激未熟樹状細胞の確立と制御性 T 細胞への誘導を試みるべく、骨髄から単離した未熟樹状細胞を酸化 LDL と共にマウスへ移入した。移入後、2, 4, 6, 8, 10 日目にレシピエントマウス脾臓から CD4<sup>+</sup>T 細胞を単離し、CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>陽性率を検討した結果、8 日目で最大となった為、移入 8 日目の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T 細胞を実験に供した。現在、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の増殖能や抗原特異性を検討中である。

#### 7. プロバイオティクスによる口腔内環境の改善による動脈硬化予防

ApoE<sup>shl</sup> マウスに乳酸菌(Lactobacillus gasseri)を 5 週間に渡り胃内投与し、3 週目から P. g. を 2 週間に渡り、計 15 回経口感染した。感染後 1 日及び 30 日目に歯肉単核球を採取し培養後、炎症性サイトカインの産生性を ELISA 法及び定量 PCR にて確認した。また感染 30 日目における歯肉の炎症状態、歯肉での P. g. 菌の検出、骨吸収状態、及び大動脈起始部の脂質沈着を調べた。小腸、歯肉、舌からの  $\beta$  デフェンシン発現並びに唾液からの  $\beta$  デフェンシン産生は実験期間を通して測定した。乳酸菌の事前の胃内投与により、P. g. 菌経口感染による歯槽骨吸収や歯肉の炎症状態が改善され、歯肉における P. g. 菌の検出が有意に抑制された。更に歯肉単核球からの炎症性サイトカイン(IL-6 及び TNF- $\alpha$ )発現及び産生性が有意に抑制された。小腸、歯肉、舌からの  $\beta$  デフェンシン発現並びに唾液からの  $\beta$  デフェンシン産生性は、乳酸菌投与 1 週目から増加し、3 週目で最大値を計測した。P. g. 菌経口感染による動脈硬化巣における脂質沈着は乳酸菌の事前投与により顕著な減少が認められた。以上の結果から、プロバイオティクスの事前の経口投与は、歯周病や歯周病により増悪する動脈硬化の予防に有用である可能性が示唆された。

課題番号	総 15-017 継続 総 14-020
------	----------------------------

平成 27 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績

報告書

平成 28 年 4 月 15 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 三 枝 禎



所属・資格 松戸歯学部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題		
注意欠如・多動性障害の生物学的特徴の解明とその薬物治療に関する基礎的研究		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名		
三枝 禎	松戸歯学部・教授	統括, 脳内アセチルコリン神経活動の制御機構に関する研究・歯肉の TLR 刺激が血液中の TNF- $\alpha$ に及ぼす影響の研究の立案・実験遂行
○研究分担者		
伊藤 芳久	薬学部・教授	小胞体ストレス関連因子の発現の分子機構に関する研究の立案・助言
石毛 久美子	薬学部・教授	小胞体ストレス関連因子の発現の分子機構に関する研究の立案・助言
清水 邦彦	松戸歯学部・准教授	海馬領域の細胞新生に関する研究の立案
山本 晴子	松戸歯学部・助教	海馬領域の細胞新生に関する実験遂行
小菅 康弘	薬学部・准教授	小胞体ストレス関連因子の発現の分子機構に関する実験遂行
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		
三枝 禎		
1) 科研費 (平成 28 年度) 基盤 B 「リポ多糖に対する歯肉と中枢神経の細胞応答における小胞体ストレスの関与」代表者, 1969 万円, 不採択		
2) 科研費 (平成 28 年度) 挑戦的萌芽 「歯肉と脳が示す内毒素に対する細胞応答における小胞体ストレスの役割」代表者, 500 万円, 不採択		
3) 上原記念生命科学財団 平成 27 年度 研究助成金 「デルタ ( $\delta$ ) 受容体を介した側坐核の神経活動制御機構」代表者, 500 万円, 不採択		
4) 土屋文化振興財団 平成 27 年度助成金 「麻薬性鎮痛薬が示す脳内ドパミン神経亢進機構—デルタ受容体を介した GABA 神経の関与—」代表者, 100 万円, 不採択		
5) JST 平成 27 年度 最先端研究基盤領域 要素技術タイプ 「超小型・軽量液体クロマトグラフの開発」分担開発者, 6500 万円, 不採択		

※ 「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。



部科校名：松戸歯学部

氏名：三枝 禎

## 4 研究目的

注意欠如・多動性障害 (Attention-deficit / hyperactivity disorder : ADHD) は、多動性、衝動性、年齢や発達に見合わない不注意を示す発達障害のひとつである。側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核を有する中脳辺縁系 DA 神経系の主たる投射先で、この領域にはコリン性介在神経が広く分布していることが免疫組織化学的研究から示されている。側坐核の ACh 神経活動の増加は実験動物の移所運動活性を促進させることが行動実験で報告されている。本研究では側坐核の ACh 神経の過活動が ADHD 患者が示す多動性の一因である可能性と、この神経の抑制的制御機構が ADHD 治療薬の新たなターゲットとなる可能性について検討を行なった。すなわち、当該年度は側坐核の ACh 神経の活動制御機構について opioid 受容体サブタイプの役割の面からラットを用いて *in vivo* 微小透析法により検討した。一方、ADHD では年齢や発達に合わない不注意のため口腔衛生の悪化が懸念される。しかしながら疫学調査では、対症療法薬が投与された ADHD 児は歯肉炎の程度が健常児と殆ど差がないことが示されている。このことから申請者らは ADHD 治療薬が患児の行動の改善以外に歯肉を炎症から保護する可能性を考えている。本研究では、歯周疾患に関連する微生物由来の化学物質が、血流を介して脳を含む遠隔臓器へ影響を与える可能性について検討するため、歯周炎の原因菌由来のリポ多糖 (LPS) の実験動物の歯肉への接種が血中の炎症性 cytokine 量に及ぼす効果について解析を行なった。

タンパク質の折りたたみや修飾を行う細胞内小器官である小胞体の機能異常は、小胞体ストレスと呼ばれるシグナル伝達系を介して、細胞の機能障害を誘発することが知られている。近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患では、小胞体ストレスが病態メカニズムの解明や治療薬開発における主要な標的として注目されている。しかし、ADHD においては、一部の培養細胞モデルではその関与が検証されているものの、小胞体ストレスを標的にした治療薬開発には至っていない。そこで、本年度は ADHD 治療薬として使用される薬物が小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響を検証するとともに、新規小胞体ストレス抑制薬開発の可能性について検討を行った。

## 5 研究概要

本研究は、ADHD に見られる症状とその改善に関係する中枢神経機構の解明と、ADHD の対症療法薬の神経細胞への作用機構を手がかりにしてこの病態の発症の基本メカニズムの解明に取り組んでいる。当該年度は2年計画の2年目であったが、新たな薬物治療の提唱につながる可能性を秘めた成果が以下の通り得られた。

1) 側坐核の ACh 神経の過活動は実験動物に活動亢進を誘発する。したがって、この神経の抑制は多動性の改善につながることを期待できる。当該年度の研究から、 $\mu$  受容体サブタイプのうち  $\mu_1$  ではなく  $\mu_2$  受容体刺激は側坐核の ACh 神経活動を低下させ、 $\mu_2$  ではなく  $\mu_1$  受容体刺激は側坐核の DA 神経活動を亢進させることがラットを用いた基礎実験から示された。この成果は 2015 年 9 月に行なわれた日本神経精神薬理学会 (東京)、10 月に行なわれた国際神経科学学会 (米国、シカゴ) で発表した。また、 $\delta$  受容体サブタイプは  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  とも側坐核の ACh 神経活動を低下させることがラットを用いた基礎実験から示された。この成果は、2016 年 3 月に行われた日本薬理学会 (横浜) で発表したほか、2016 年 7 月に日本神経精神薬理学会と国際神経精神薬理学会 (いずれも韓国、ソウル) ほかで発表予定である。

3) 歯肉内で増加した歯周病原菌の *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 由来の LPS (Pg-LPS) は血液中の TNF- $\alpha$  の増大を介して全身状態へ影響を及ぼすことが実験動物を用いた研究から示唆された。このことは 2015 年 9 月に行なわれた日本歯科基礎医学会 (新潟) で発表した。

4) マウス海馬神経細胞由来株化細胞である HT22 を用いて、ADHD 治療薬である methylphenidate および atomoxetine が、小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響を検討したところ、顕著な細胞保護作用が認められた。

5) 昨年度、新規に見出した小胞体ストレス誘発細胞死抑制作用をもつ、フラボノイド誘導体の作用メカニズムを検討したところ、小胞体ストレス関連因子の発現を制御することが明らかとなった。当該化合物については NUBIC を通して特許申請を行った (特願 2015-137590)。

6) ニンニク由来成分成分である S-allyl-l-cysteine (SAC) が示す小胞体ストレス誘発細胞死抑制作用を増強するため 20 個の SAC 誘導体を合成し、その効果を検証した。その結果、S-propyl-l-cysteine が SAC を凌ぐ細胞保護効果を示すことが明らかとなった。これらの研究結果の一部は Journal of Pharmacological Sciences 誌に報告した (Imai T et al., 2016 130 (3): 185-188)。

部科校名：松戸歯学部

氏名：三枝 禎

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

## 1. 側坐核の ACh 神経活動の抑制的制御機構

側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核を有する中脳辺縁系ドパミン (DA) 神経系の投射領域のひとつである。免疫組織化学的研究から、側坐核にはコリン性介在神経が広く分布していることが示されている。側坐核のアセチルコリン (ACh) 神経活動の増加は実験動物の移所運動亢進に関与することが報告されている。したがって側坐核の ACh 神経の抑制的制御機構が ADHD 治療薬の新たなターゲットとなる可能性が考えられる。側坐核のコリン性神経には、神経活動を抑制すると想定される  $\delta$  および  $\mu$  受容体が発現している。 $\delta$  および  $\mu$  受容体はそれぞれ  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  および  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  受容体に分類されている。そこで、*in vivo* 微小透析法を用いて  $\delta$  および  $\mu$  受容体サブタイプの側坐核の ACh 放出制御における役割について解析した。実験には、S-D 系雄性ラットを用いた。側坐核から 15 分毎に得た灌流液中の ACh 量は、HPLC-ECD 法によって定量した。腹腔内に投与した  $\mu_1$  受容体アンタゴニストの naloxonazine を除き、 $\delta$  および  $\mu$  受容体リガンドは透析プローブを介して脳内局所灌流投与した。これらの薬物の用量は 30 分間の灌流時間中の総量 (mol) で示した。基礎的な ACh 量を測定するため、灌流液には低濃度 (50 nM) の physostigmine を添加した。その結果、 $\delta_1$  受容体アゴニストの DPDPE (3, 300 pmol),  $\delta_2$  受容体アゴニストの deltorphin II (3, 30 pmol) はいずれも用量依存的に側坐核の ACh 量を減少させた。DPDPE (300 pmol) および deltorphin II (3 pmol) が誘発した ACh の減少はそれぞれ  $\delta_1$  受容体アンタゴニストの BNTX (0.3 pmol) または  $\delta_2$  受容体アンタゴニストの NTB (15 pmol) 併用投与により抑制された。 $\mu$  受容体アゴニストの endomorphin (EM) -1, EM-2 (6, 30 nmol) はいずれも用量依存的に側坐核の ACh 量を減少させた。EM-1 および EM-2 (30 nmol) が誘発したアセチルコリンの減少はそれぞれ基礎 ACh 量に影響を与えない用量の CTOP (3 nmol) の併用投与により抑制された。EM-1 (15 nmol) が誘発した側坐核の DA 放出を抑制した naloxonazine (15 mg/kg ip) は、EM-1 (30 nmol) または EM-2 (30 nmol) の誘発した ACh の減少には影響を与えなかった。

以上の本研究の結果から、側坐核でコリン性介在神経に発現する  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  受容体のほか、 $\mu_1$  ではなく  $\mu_2$  受容体がこの神経の活動を抑制的に制御することが *in vivo* の条件下で示された。

2. 歯肉の TLR 刺激が血液中の TNF- $\alpha$  に及ぼす影響

歯周疾患に関連する微生物由来の化学物質は血流を介して全身の健康に影響を与える可能性がある。たとえば歯周病による糖尿病悪化の一因として、歯周病関連細菌の内毒素が惹起した血中の TNF- $\alpha$  の増大によるインスリン抵抗性促進が想定されている。

我々は本研究プロジェクトの1年目に *Pg*-LPS のラットの歯肉への局所投与が同部位の IL-6 には影響を与えずに TNF- $\alpha$  を一過性に増大させることを International Journal of Oral Sciences 誌に報告した (Taguchi H et al., 2015 7 (3): 155-160)。しかしこの *Pg*-LPS 処置が血液中の IL-6 と TNF- $\alpha$  に及ぼす効果は明らかでない。そこで本研究では全身麻酔下のラットを用い、歯肉への *Pg*-LPS の投与の血液中の IL-6 と TNF- $\alpha$  に及ぼす影響について解析した。*Pg*-LPS の作用には Toll-like receptor (TLR) 2 の関与が指摘されている (Burns et al., 2010) ので、作用発現に TLR4 が関与する *E coli* (*Ec*) 由来の LPS (*Ec*-LPS) の投与実験も比較のため行った。実験には、urethane (1.5 g/kg i.p.) による全身麻酔を施した S-D 系雄性ラット (体重約 300 g) を用いた。上顎切歯遠心部の歯肉に 0.44 mm, 膜長 2 mm のポリエチレン製透析膜 (cut-off 分子量 1000 kDa) とその表面に薬物注入用ニードルを備えた probe を挿入した。外頸静脈へカテーテルを留置し自動採血装置により 1 時間毎に血液を 500  $\mu$ l 回収した。*Pg*-LPS または *Ec*-LPS を含む溶液 1  $\mu$ l は、血液回収開始 2 時間後にマイクロシリンジにより 30 秒かけて薬物注入用ニードルから歯肉へ局所投与した。血漿中の IL-6 と TNF- $\alpha$  は、ELISA により定量した。その結果、血漿中の IL-6 は約 250 pg/ml であったのに対し TNF- $\alpha$  は検出限界 (5 pg/ml) 以下だった。*Pg*-LPS (1  $\mu$ g) の投与後、IL-6 には殆ど変化はなかったが TNF- $\alpha$  は一過性に増大した。一方、溶媒または *Ec*-LPS (1  $\mu$ g) の投与では IL-6, TNF- $\alpha$  に目立った影響は見られなかった。

本研究では *Pg*-LPS は *Ec*-LPS とは異なり TNF- $\alpha$  を増大させたので、この効果の発現には歯肉の TLR2 刺激が関与した可能性が考えられた。また本研究から、歯肉内で増加した *Pg*-LPS は血液中の TNF- $\alpha$  の

部科校名：松戸歯学部

氏名：三枝 禎

## 研究結果（つづき）

増大を介して全身状態へ影響を及ぼすことが示唆された。

## 3. 小胞体ストレス関連因子発現の分子機構

昨年度の HT22 細胞を用いた検討により、小胞体ストレス誘導薬のひとつである tunicamycin が惹起する細胞死には、小胞体ストレス特異的に変化する転写因子である C/EBP-homologous protein (CHOP) の発現増加と小胞体膜上に存在する小胞体ストレス特異的 caspase である caspase-12 の活性化が関与することが明らかとなった。そこで、ADHD 治療における小胞体ストレス制御の有用性を評価する目的で、現在 ADHD 治療薬として本邦で使用されている atomoxetine および methylphenidate が、tunicamycin 誘発細胞死に及ぼす影響について HT22 細胞を用いて検討した。ノルアドレナリン (NA) 再取り込み阻害作用を示す atomoxetine は、高濃度 (100  $\mu$ M) 処置では細胞生存率の低下が認められたものの、50  $\mu$ M 処置では、tunicamycin が誘発する細胞死を顕著に抑制した。同様に、DA および NA 再取り込み阻害作用を示す methylphenidate の及ぼす影響を検討した。その結果、高濃度 (500  $\mu$ M) methylphenidate 処置では細胞生存率の低下が認められたものの、30~100  $\mu$ M の methylphenidate 処置では細胞死抑制作用が認められた。本研究により、現在 ADHD 治療薬として臨床使用されている atomoxetine および methylphenidate は、いずれも小胞体ストレス抑制作用を有することが明らかとなった。以上の結果は、薬物による小胞体ストレスの制御が ADHD 治療においても有用であることを示唆している。今後、GRP78, GRP94, Pro-caspase-12, Cleaved-caspase-12, CHOP などの小胞体ストレス関連因子の発現に及ぼす影響について検討を加え、その保護メカニズムを明らかにすることで、ADHD の病態メカニズムの解明やより有望な化合物のスクリーニング系の確立につながる知見となると期待している。

また、本研究では、昨年度新規に見出したフラボノイド誘導体の小胞体ストレス誘発細胞死抑制作用のメカニズムを明らかにする目的で、小胞体ストレス関連因子の発現に及ぼす影響について検討を行った。フラボノイド誘導体 (100 $\mu$ M) を tunicamycin (50 ng/ml) と 12 時間 HT22 細胞に共処置したところ、tunicamycin 処置群で認められる CHOP タンパク質の発現増加は顕著に抑制された。最も強い効果を示した化合物 (特許出願中につき化合物名は非公表) では、CHOP の発現がコントロールレベルにまで低下した。一方、これらのフラボノイド誘導体の処置は、小胞体のマーカータンパク質である GRP78 および GRP94 の tunicamycin 処置による発現増加には影響を及ぼさなかった。以上の結果より、我々の研究グループが新規に合成したフラボノイド誘導体は、小胞体ストレス依存的な転写因子である CHOP の発現上昇を制御することで、細胞保護効果を示すことが明らかとなった。これらの結果は、本学 NUBIC を介して「小胞体ストレスによる細胞死抑制剤、小胞体ストレス制御剤、および該制御剤を有効成分とする予防・治療剤」とのタイトルで 2015 年 7 月 9 日に特許出願行った (特願 2015-137590)。なお、現在も NUBIC および JST の協力の下、国際特許出願 (および取得) に向けた準備を進めている。

これまでに、成熟ニンニクエキス中に含まれるチオアリル化合物のひとつである S-allyl-L-cysteine (SAC) は、小胞体ストレスによる caspase-12 活性化を抑制することで細胞保護効果を示すことを報告している (Kosuge Y. et al 2003 Neuroscience)。また、最近、この SAC の caspase-12 活性化抑制作用には、Ca<sup>2+</sup>依存性 protease のひとつである calpain の活性化を抑制することであることを明らかにしている (Imai T. et al 2014 AminoAcid)。本年度は、この SAC をシード化合物として 20 種類の誘導体を合成し、これらの SAC 誘導体が小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響を、ラット初代培養海馬神経細胞を用いて検討した。その結果、S-propyl-L-cysteine (SPC), S-ethyl-L-cysteine (SEC), S-methyl-L-cysteine (SMC) の 3 つの化合物に SAC よりも強力な細胞保護効果が認められた。また、これらの化合物が calpain の活性化に及ぼす影響をリコンビナント human calpain を用いた *in vitro* assay system を用いて評価したが、calpain の活性化に及ぼす影響は認められず、calpain の活性化制御以外の新たな機構を介して細胞保護効果を示すことが示唆された。以上のように、本研究により化学修飾により SAC の小胞体ストレス抑制作用を増強することに成功した。これらの研究成果は、Journal of Pharmacological Sciences 誌に報告した (Imai T et al., 2016 130 (3): 185-188)。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成28年4月25日

日本大学学長 殿

氏 名 塚本 勝巳



所属・資格 生物資源科学部 教授

下記のとおり報告いたします。

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 この地球で人とウナギの共存を目指す総合研究「うなぎプラネット」		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 塚本 勝巳	生物資源科学部/教授	生物学的理解(研究総括)
○研究分担者 朝比奈 潔 竹下 広宣	生物資源科学部/教授 生物資源科学部/准教授 (平成28年3月31日退職)	生物学的理解(仔魚の生理) 食品経済学的理解(食品安全)
佐藤 至子	文理学部/教授	文化的理解(江戸期の文化)
山本 質素	文理学部/教授	文化的理解(動物観・うなぎ観)
松本 恵	文理学部/准教授	食品学的理解(食品化学)
相原 修	商学部/教授	社会経済学的理解(流通・消費)
木村 政司	芸術学部/教授	芸術的理解(うなぎデザイン)
安田 陽一	理工学部/教授	環境工学的理解(河川生態)
蜂巢 浩生	理工学部/教授	環境工学的理解(成育環境調査)
小田 晃	生産工学部/教授	環境工学的理解(河川環境調査)
武村 武	生産工学部/准教授	環境工学的理解(河道内生息域の評価)
陳 文挙	国際関係学部/准教授	社会経済学的理解(国際流通と消費)
福島 康仁	法学部/教授	公共政策学的理解(地方自治・行政管理)
槇島 誠	医学部/教授	生理学的理解(免疫・代謝・ビタミン)
梅田 香織	医学部/助手	生理学的理解(免疫・代謝・ビタミン)
石澤 通康	医学部/助手	生理学的理解(免疫・代謝・ビタミン)
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>本研究プログラムの研究協力者・竹内綾が2015年笹川科学研究助成・生物学部門に応募して70万円獲得した。外部研究資金ではないが、2015年度科学技術振興機構のサイエンスアゴラに企画応募して採用され、日本科学未来館にて出展、うなぎプラネット計画を公開説明する機会を得た。本研究プログラムの研究協力者・渡邊俊が2015年第7回キャンオン財団研究助成プログラムに申請したが不首尾に終わった。2016年度は代表者の塚本勝巳が科研費、キャンオン財団の研究助成等の外部資金に応募する予定になっている。</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。

部科校名：生物資源科学部

氏名：塚本 勝巳

## 4 研究目的

ウナギは日本で年間数万トンも消費される水産重要種である。しかし、1970年以降、ニホンウナギの資源は減少を続け、盛時の5%にまで落ち込んだ。2014年6月、ニホンウナギは国際資源保護連合 IUCN のレッドリストに絶滅危惧種 Ib(EN)として記載された。一方で、人とウナギの関わりは古く、石器時代の貝塚からもウナギの骨が多数出土する。「食べる」という行為が親しみを生み、ウナギの食文化や慣用句、文芸を生んだ。日本人のウナギ消費は世界でも群を抜いている。ニホンウナギ以外の外国産ウナギも輸入して、スーパーやコンビニで大量に販売している。クジラやマグロで国際世論の非難を浴びたように、ウナギについても厳しい環境になりつつある。ウナギ消費について日本人は責任ある態度を世界に示さねばならない時期に来ている。それには、行政の法的な規制や業界の自粛の他に、一般消費者のウナギ消費に対する意識改革が不可欠である。いま我々は何らかの有効なアクションを起こさねば、孫子の代にはウナギのかば焼きもその文化も消失してしまうかもしれない。消費者自らがウナギの危機を正しく認識し、保全のために適切な意識の元に行動することが、ウナギの保全に一番効果がある。そのためには、まず自由な立場にある大学が、ウナギという生き物の研究、その流通、経済、社会に関する研究、さらにはウナギ文化の研究を総合的に行い、ウナギの包括的理解を進めることが必要である。その研究成果をアウトリーチ活動によって積極的に社会に伝え、ウナギの保全意識を高めることが肝要である。そこで、人とウナギの末永い共存をこの地球上に実現するために、本年度は以下の5点について研究を進めた。

1. 調査船を用いてウナギの産卵生態を解明する（生物資源科学部）
2. 河川環境工学を駆使してウナギの棲む河川環境とその生態系を改善する（理工学部・生産工学部）
3. ウナギに関する民俗学的・文化人類学的調査と食品栄養学的調査を行う（文理学部）
4. ウナギの漁業・養殖・加工・販売・消費の実態を調べ、ウナギの社会的理解を図る（商学部）
5. 以上の成果をとりまとめ、芸術的手法を駆使してウナギ保全の社会啓発を行う（芸術学部）

## 5 研究概要

調査船と数値シミュレーションを用いたウナギ産卵生態の研究では、内部潮汐エネルギーの高い地点の上流域に必ずウナギ卵の採集地点のあることが明らかになり、これによって親ウナギが産卵する地点をより狭い範囲に絞り込むことができるようになった。また人工衛星経由でデータ転送するポップアップタグを用いた産卵場における親ウナギの行動追跡の結果、昼間800m層と夜間200m層の間で明瞭な日周鉛直移動を行っていることも明らかになった。さらには産卵親魚の集合地点を探索する新手法として環境DNAを2015年のなつしま航海に導入してみたところ、3x4点の矩形グリッドの一点400m層からニホンウナギの環境DNAが検出された。これらの成果は親ウナギの産卵地点の予測を可能にする。近い将来親ウナギの産卵シーンを実際に観察することも可能になるものと期待された(生物資源科学部)。ウナギの住みやすい河川環境を作るためにウナギの遡上行動と現在の魚道機能について検討したところ、帯工の安定性を保つには礫の上流面を上向きに最大で45度にとどめて石組みを行うことが重要であると示された(理工学部)。河床に蛇かごを設置してウナギの住処とする目的で模型実験を行ったところ、砂の堆積を防ぎ、蛇かご内の空間を維持するために模型上面部にカバーや、模型下流部に複数の突起物を設置することが有効であることが示された(生産工学部)。江戸期の文学(黄表紙「親敵討腹鼓(おやのかたきうてやはらづつみ)」)に現れるウナギを芸術学部学生と共同で現代風アニメにアレンジしてウナギ保全の社会啓発活動に役立てた(文理学部)。デ・マーケティングの観点からウナギの消費量を減らし、保全に役立つ有効な手法を考察した(商学部)。芸術的手法を取り入れて研究成果を分かりやすく社会に伝え、ウナギの保全を訴えるため、約6ヶ月間に亘って日本大学博物館にて企画展「うなぎプラネット」を開催したところ、1万5千人以上の来館者を迎えた(芸術学部、生物資源科学部)。全国の小中高計88校に出向き、ウナギの生物学や海の研究、河川環境の出張授業を行った。

部科校名：生物資源科学部

氏名：塚本 勝巳

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

1. ウナギの産卵生態の解明：数値シミュレーションを用いて内部潮汐エネルギーの高い地点の分布を明らかにし、過去のウナギ卵とプレプトセファルス（Plesiosauroidea）の採集地点との対応関係をみたところ、内部潮汐エネルギーの高い地点の上流域には必ずウナギ卵やプレプトセファルスの採集地点のあることが明らかになった。この「内部潮汐仮説」によって親ウナギが産卵する地点を予測するには、まず西マリアナ海嶺と調査時の塩分フロントの交点の第3象限を決め、その中で最も交点に近い内部潮汐エネルギーの高い地点に調査範囲を絞り込めばよいと考えられた。これによって、ニホンウナギの産卵シーンを直接観察することも夢ではなくなってきた。2015年5月には調査船「なつしま」でマリアナ諸島西方海域のニホンウナギ産卵場へ調査に出かけたが、2つの台風に遭遇し、調査ができたのはその月の産卵がすでに終わった新月後の2日間のみとなった。しかしこの2日間を利用し、産卵親魚の集合地点を探索するために導入した新手法の環境DNAの予備調査を実施した。内部潮汐エネルギーの高い地点に設けた3×4点（計12点）の矩形グリッドにおいて0~1000mの100m間隔計11層で採水・濾過を行い、DNAの抽出とPCR増幅を行ったところ、一点（測点C6）の400m層からニホンウナギの環境DNAが検出された。これは親ウナギの産卵地点の予測に環境DNA法が有効であることを示唆し、今後のウナギ調査で実戦配備できるものと考えられた。また、人工衛星経由でデータ転送するポップアップタグを用いた親ウナギの行動追跡調査では、産卵回遊中の親魚は沿岸域や沖合域のみならず産卵場到着後も、昼間800m層と夜間200m層の間で明瞭な日周鉛直移動を行っていることが明らかになった（生物資源科学部）。

2. ウナギの河川環境の改善：ウナギの住みやすい河川環境を作るために、ウナギの遡上行動と現在の魚道機能について検討したところ、洪水対策と生態保全の調和がとれた河川がほとんどないこと、多様な流れに富んだ河川がなくなりつつあること、魚道構造物の形式に応じた流量変化に伴う魚道内の流れと水生生物の遡上行動との関わりが不明であることなど、種々の問題点が抽出された。また緩傾斜路の実験模型を用いて帯工の流況を調べたところ、安定した流れを保つには礫の上流面を上向きに最大で45度にとどめて石組みを行うことが重要であると示された（理工学部）。一方、河床に蛇かごを設置してウナギの住処とする目的で模型実験を行ったところ、空隙維持を期待する対策を施さない実験では、蛇かご模型内が砂で充填された。砂の堆積を防ぎ、蛇かご内の空間を維持するためには、模型上部部にカバーや、模型下流部に複数の突起物を設置することが有効であることが示された。蛇かご模型上部部を板でカバーした場合は、そのカバーの下は砂が侵入できず、空隙が維持出来たが、開口部には砂が堆積しており、その空隙が有効利用に関しては検討の余地が残る。また、蛇かご模型下流部に複数の突起物を設置した場合は、対策無しの場合と比して約20%堆積率が減少した。その突起物前面部に生じる局所流による局所洗掘が大きく寄与していることが流れの可視化実験より確認された。一連の実験結果より蛇かご模型内の空隙を長期間維持できる可能性を示すことが出来た（生産工学部）。

3. ウナギに関する民俗学的・文化人類学的研究：江戸期の文学に現れるウナギを発掘した。ウナギの蒲焼は、少なくとも18世紀にはすでに江戸の名物になっていた。山東（さんとう）京伝（きょうでん）の小説『荏土（えど）自慢（じまん）名産（めいさん）杖（づえ）』ではウナギの蒲焼が擬人化されて登場する。烏亭焉馬（うてい えんば）によるウナギ店の広告文では、ウナギを「隅田川にいる江戸前の魚」「頭が小さく、浅黄色」「茶漬のおかず、酒の友」と表現し、「江戸前」のウナギと地方産の「旅ウナギ」を区別している。また、町なかでウナギを釣ることは江戸人の娯楽の一つであった。根岸（ねぎし）鎮衛（やすもり）『耳囊（みみぶくろ）』には、ウナギが人間の姿で現れ、ウナギ釣りを趣味とする人間を諷める話がある。他の魚にも言えることだが、ウナギは生きてまま店に運ばれ、調理されることから、命を食べることの罪深さを意識させる魚だったのでないかと推測される。立川（たてかわ）銀馬（ぎんば）『富久喜多留（ふくきたる）』には、放しウナギ（人間が先祖の供養や死後の極楽往生を願って放流するウナギ）を、放すのではなく食べるために買う男が登場する。江戸時代も、ウナギの命を救うことが功德になるという信仰と、ウナギを食べたいという欲望がせめぎあっていた。現代のわれわれも、ウナギの保全と消費の欲望のせめぎあいの中にある。ウナギの保全が長い目でみればウナギの食文化の持続という「功德」につながることを、もっと意識する必要があるだろう（文理学部）。

部科校名：生物資源科学部

氏名：塚本 勝巳

## 研究結果（つづき）

4. ウナギの食品栄養学的・医学的考察：ウナギには、飽和脂肪酸やコレステロールが多く、これらの過剰による動脈硬化症などの疾患が危惧されるが、それらを抑制する n-3 系多価不飽和脂肪酸も多く含まれており、バランスの取れた栄養源であると考えられる。見かけや食感などの類似性から、アナゴ、ドジョウ、ナマズ、ハモをうなぎの代用とすることは、ウナギの数が減っている現状ではやむを得ないことだが、栄養学的には多くの課題が残されている。一方で、ウナギの核内受容体であるビタミンD受容体（VDR）の研究を行い、ニホンウナギの genome データベースの探索からニホンウナギ cDNA 候補配列を決定した。ヨーロッパウナギ cDNA 情報に相当するもの、ゼブラフィッシュとメダカ cDNA 情報に相当するものなど複数の cDNA 配列候補が得られた。ニホンウナギの臓器サンプルから RNA を抽出して、cDNA を合成し、PCR を利用して予測した VDR の cDNA 候補配列からニホンウナギ臓器で発現している VDR の cDNA 配列を決定した。この配列はゼブラフィッシュとメダカの VDR と相同性の高いことが明らかになった。今後、発現ベクターを作成し、リガンド応答性などの機能解析を行う（医学部）。

5. ウナギの漁業・養殖・加工・販売・消費の実態調査と社会学的理解：記念日マーケティングの代表ともいえるウナギについて、デ・マーケティングの考え方を通じて需要抑制を行い保全につなげる方法を考察した。一般の人が見かける多くの場所で、絶滅危惧種であることを PR し、なるべく消費を控え、代替品を利用してもらおうというのが現実的である。消費が多い東海、近畿地域や、消費が多くなる時期（土用の丑の日）の前に絶滅危惧種であることをマスコミに PR して、消費者に認知してもらおうという手法が考えられる。今後、品目は違っていても世界各地で起きているデ・マーケティングの現象を参考とし、ウナギの保全に役立つ有効な手法を提案していく（商学部）。中国最新の統計資料および実態調査の両面から中国のウナギ養殖と消費を調べた。世界のウナギ資源が急速に減少する中、最大のウナギ養殖地としての中国のウナギ養殖および消費は日本のウナギ食文化、ウナギの消費のみならず、世界のウナギ資源の長期かつ持続的な維持に大きく影響する。これまで中国のウナギ養殖は主に日本向けの輸出中心であったが、最近の動向を見てみると、北米やロシア等への輸出も年々増大している。世界各地のウナギ消費の増加が原因の 1 つと思われるが、日本のウナギ輸入のチェック体制が厳しいため、一部のウナギ養殖業者はコストがかかる日本向け輸出を敬遠している可能性がある。中国経済の発展に伴い、人々の所得や生活水準が向上してきたため、中国国内での高級食材や日本名産品に対する関心が高まり、蒲焼をはじめ日本風のウナギ料理に対する需要も拡大した。中国進出した日本スーパーマーケットや料理店、レストランは積極的に日本食の販売を推進しており、ウナギ料理もその中の 1 つになっている。また、中国の高級料理店では「医食同源」という看板の下で、ウナギ料理は豪華料理メニューに入っている。ウナギの資源保護とウナギ養殖、消費拡大とは一見矛盾する存在にみえる。しかし、ウナギに限らず、資源保護と経済発展という 2 つの目標を如何にバランス良く達成するかは世界共通の課題であり、「ウナギプラネット」を通じて 1 つのヒントが得られると期待している（国際関係学部）。2002 年から最近まで、価格高騰を受けて、購入頻度は着実に減少した。近年、家庭内で蒲焼を食べるといった食文化は既に多くの地域で失われているかもしれない。その中で、習慣を比較的強く残しているのは、関西、次いで東海地方である。家庭外で和食を食べる機会が多い消費者ほど、家庭内でうなぎを食べる頻度は小さい。消費者が外でどの程度うなぎを食べているのか、また、うなぎ専門店と比較的低価格で提供する外食店はどのように利用されているのか調べることが、今後の課題である（生物資源科学部）。

6. ウナギ保全の社会啓発を行うための芸術的手法に関する研究：生物資源科学部の博物館でウナギの企画展「うなぎプラネット」を開催した。普段は静かな博物館の展示空間をアートな感覚で演出し、キャンパス内外の空間とつなげて呼吸する展示デザインを目指した。博物館を核として、美しいキャンパスへ拡散させるために新 1 号館、野外うなぎ彫刻、スタンプラリー、小学校のキャラバンやシンポジウムと多様な企画をつなげる事で、うなぎプラネットの活動を広く発信する事を実現した。特に博物館展示室の空間は、透明で繊細なレプトセファルス生態展示を実現し、ウナギ学研究室のこれまでの研究成果の記録映像を今回の展示用に特別編集してマルチ画面によるプロジェクションを演出した。その結果、1 万 5 千人以上の来館者を迎えることができた（芸術学部・生物資源科学部）。

課題番号	総15-019
	継続
	総14-023

## 平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28 年 3 月 31日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 小林 俊亮



所属・資格 薬学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題 YB-1 タンパク質と AhR を分子標的としたインディルビン誘導体によるがんの悪性化阻害		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 小林 俊亮	薬学部・准教授	研究総括、インディルビン誘導体の YB-1 核移行阻害活性評価
○研究分担者 和田 平	薬学部・助教	AhR アンタゴニストのスクリーニングと動物を用いた解析
大橋 祥世	薬学部・助教	インディルビン誘導体の作用機作と YB-1 核移行メカニズムの解析
齋藤 弘明	薬学部・助教	インディルビンの合成と YB-1 との相互作用の解析
青山 忠	理工学部・准教授	インディルビン誘導体の合成と AhR アンタゴニストのスクリーニング
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		
小林俊亮 平成 27 年度 長寿医療研究開発費（国立長寿医療研究センター）獲得 和田 平 平成 27 年度 科学研究費補助金 若手研究（B）獲得		

※「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。



部科校名：薬学部

氏名：小林俊亮

## 4 研究目的

本プロジェクトは、様々ながんの悪性化に関わる YB-1 タンパク質と肝がんの誘発に関わる AhR (aryl hydrocarbon receptor) の活性を阻害し得る化合物としてインディルビン誘導体に注目し、創薬への応用を目指した有効性の評価と阻害機構の検証を行うことを目的としている。

(1) YB-1 タンパク質は、様々な DNA, RNA, タンパク質と相互作用するという特徴を有し、多くの細胞現象に関与する多機能タンパク質である。正常組織では主に細胞質に存在して mRNA の細胞内分布や翻訳調節に関わっている。しかし、がん細胞においては抗がん剤などによる刺激が引き金となって核内への移行が起こり、多剤耐性、増殖促進、がん抑制遺伝子の不活化や転移誘発など、がんの増悪に繋がる様々な現象を引き起こし、治療にとって大きな障害の原因となる。したがって、このタンパク質が核内で発揮する作用を阻害することは大切である。しかし、YB-1 は核内で転写、複製、修復、スプライシングなど多岐にわたって影響を与えるため、それぞれに対処していくことは困難である。ところが、もしも YB-1 の核輸送自体を阻害することができれば、核内で起こるがんの悪性化に繋がる現象の多くを同時に抑制することが可能となる。我々は、インディルビン誘導体が多剤耐性遺伝子発現に抑制的に作用することを見出す過程で、この YB-1 の細胞内局在にも影響することを見出した。そこで、本研究ではその効果について詳しい解析を行う。

(2) 近年、肥満、糖尿病、高血圧などのメタボリックシンドローム患者数の著しい増加に伴い、肝線維化を伴った NASH (非アルコール性脂肪肝炎) を基盤とした肝がん発症への進展が深刻な社会問題となっている。NASH は肝硬変・肝がんへと移行することから、NASH への進展、特に肝線維化を阻止することが望まれているが、肝線維化の抑制を目的とした効果的な治療薬および治療法は未だ確立されていない。この NASH の要因である脂肪肝発症、活性酸素誘導および肝線維化の発症にダイオキシンの受容体として知られている AhR の活性化が関与していることが示唆されている。そのような状況の中、AhR の生体内リガンドとしてインディルビンが同定された。そこで、本研究ではインディルビンの誘導体ライブラリーの中から、実用的な AhR アンタゴニストの同定を行い、AhR 活性阻害を介した肝線維化抑制効果を検討するとともに未だ不明な点が多い NASH を基盤とした肝がん発症メカニズムにおける AhR の役割を明らかにする。

## 5 研究概要

## 1. YB-1 に関する研究

本研究の特徴は、YB-1 の核移行自体を阻害することにより、がんの悪性化に繋がる様々な核内現象の発現を根本から抑えることを目指すことにある。それが可能となれば、がんの増悪を防ぐばかりでなく、細胞障害性を主作用とする抗がん剤の投与量を減らして、副作用の軽減にも寄与できる。もうひとつの特色は、YB-1 核移行のメカニズムの解明に繋がることである。これにより、新たな標的分子の設定も可能となる。YB-1 に関しては、前年度に得られた結果を基に以下のことを行った。

- (1) 腫瘍細胞を抗がん剤で処理することで起こる YB-1 の核移行と、それによって誘発されるがんの増悪に関わる様々な遺伝子の発現増加に対するインディルビン誘導体 (Indirubin II) の抑制効果の検証。
- (2) 抗がん剤と Indirubin II の併用効果を検討するためのアッセイ系の構築の開始。
- (3) 抗がん剤による YB-1 核移行メカニズムの解析。
- (4) 新たなインディルビン誘導体の YB-1 核移行阻害効果の検証。

## 2. AhR に関する研究

薬学部で構築された様々な側鎖を導入したインディルビン誘導体ライブラリーから、AhR 活性阻害作用を有するインディルビン誘導体を同定し、肝線維化の抑制効果および NASH を基盤とした肝がん発症に対する新たな治療薬の開発を目指す。また、肝臓特異的 AhR 欠損マウスを比較対象として用いることで、インディルビン誘導体の肝 AhR 作用の特異性および肝線維化発症メカニズムを明らかにすることが期待できる。AhR に関しては昨年度に得た候補化合物を用いて主に以下の2点について解析した。

- (1) スクリーニングによって得られた候補化合物の AhR 活性化抑制効果の細胞レベルでの検証。
- (2) 肝線維化と NASH 発症への影響を調べるための動物への投与の試み。

## 3. インディルビン誘導体合成に関する研究

上述の生理作用を持つインディルビン誘導体に加え、有用な化合物を得るために側鎖の構造を様々に変換したインディルビンの合成系の確立を目指した。

本研究プロジェクトには研究協力者として博士研究員 (PD) の田中 融が参加した。

部科校名： 薬学部

氏名： 小林俊亮

## 6 研究結果 (4,000 字以上記入してください。)

## 1. YB-1 に関する解析

YB-1 の核移行を示すがん細胞の種類と抗がん剤の組み合わせについて調べるために、Indirubin II が細胞の生存に影響を与えない濃度を検討した上で、神経芽腫、肝がん、肺がん、乳がん由来培養腫瘍細胞を各種抗がん剤で処理して YB-1 の核移行を免疫染色により観察した。その結果、神経系の NG108-15 および肝がん由来 HepG2 細胞をアクチノマイシン D あるいはマイトマイシン C で処理すると効率よく核内へ移行することを見出した。この系を基本としてインディルビン誘導体のライブラリーから得られた核移行抑制活性を持つ Indirubin II の効果の検証を行った。YB-1 の核移行は細胞免疫染色によって観察した。

(1) 抗がん剤処理による YB-1 の核移行に対する Indirubin II の阻害効果とがんの悪性化に関わる遺伝子発現の増加に対する抑制効果の検証

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞では、細胞の生存に影響を与えない濃度 (5  $\mu$ M) の Indirubin II 存在下で、アクチノマイシン D による YB-1 の核移行は阻害される。その条件の細胞から RNA を抽出して、mRNA を精製し、多剤耐性に関わる遺伝子 MDR1 および MVP、細胞増殖因子受容体遺伝子 EGFR さらにケモカイン CXCL12 の受容体でがんの増殖と多臓器転移に関わる遺伝子 CXCR4 の cDNA 断片を特異的プライマーによる RT-PCR で合成した。これらをアクチノマイシン D で YB-1 核移行を誘発した細胞からの同じ mRNA 量当たりの RT-PCR 産物と比較した。アクチノマイシン D で YB-1 が核移行した細胞では、これらのがん悪性化関連遺伝子の発現が活性化されているのに対し、Indirubin II 存在下で核移行が阻害された細胞では、その活性化がよく抑えられていることがわかった。Indirubin II 存在下でのアクチノマイシン D による YB-1 核移行阻害と MDR1 遺伝子発現の活性化の阻害を図 1 と図 2 に示した。

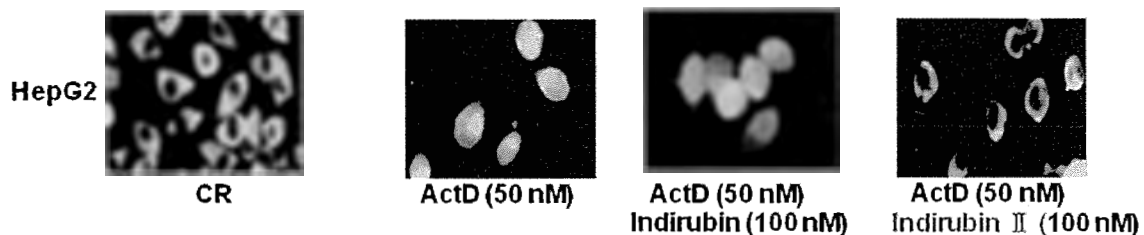


図 1: ActD で誘発される YB-1 の核移行に対する Indirubin II の阻害効果

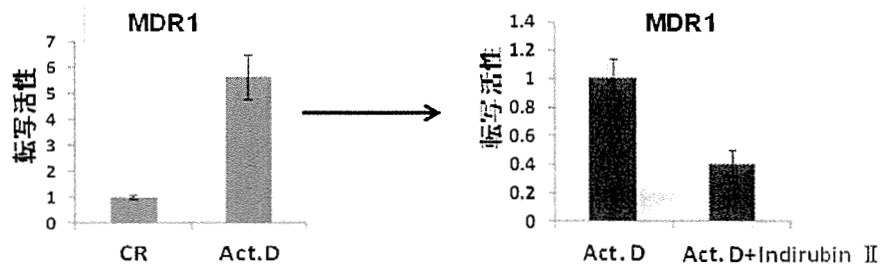


図 2: ActD による YB-1 の核移行で活性化される MDR1 遺伝子発現に対する Indirubin II の抑制効果

神経系腫瘍細胞細胞 NG108-15 を用いた場合でも Indirubin II (2  $\mu$ M) は、アクチノマイシン D 処理による YB-1 の核移行を抑制し、そのような細胞では上述のがんの増悪に関わる因子の発現活性化が阻害された。同様の結果はマイトマイシン C に対しても観察された。

他の多くのがん細胞に対して Indirubin II が同様の効果を示すことを期待して、がん細胞の種類と抗がん剤の組み合わせを様々に変えて調べたところ、乳がん細胞で報告のあるタモキシフェンによる YB-1 の核移行は、MCF7 細胞では十分に観察されなかった。また、肺がん由来 EBC-1 細胞に対するゲフィチニブあるいはシスプラチン投与でも十分な核移行は起こらなかった。処理濃度や時間を検討したが、やはり期待した核移行

部科校名： 薬学部

氏名： 小林俊亮

## 研究結果 (つづき)

が見られなかったため、これらの組み合わせに関しては Indirubin II の検証実験は行うことができなかった。これらの結果から、培養細胞での YB-1 の核移行はがん細胞と抗がん剤の非特異的な組み合わせで起こるわけではなく、例えば神経芽腫や肝がん細胞に対して ActD や MitC のような DNA 合成および転写を阻害する薬剤を使用するときに顕著に観察されることがわかった。また、これまでの解析から、我々は YB-1 の核移行は存在する全細胞に起こるわけではなく、がん幹細胞と呼ばれる休止状態に近い細胞において起こる割合が多く、この細胞が薬剤耐性や再発に寄与するのではないかと考えている。したがって、様々ながんで幹細胞を濃縮し、抗がん剤による YB-1 の核移行と Indirubin II による阻害を調べることが大切であると考え。また、治療に際しては、がんの種類によって異なる作用機序を持つ抗がん剤の併用が行われるため、今後はそのような条件で YB-1 の核移行を調べてみる必要がある。

## (2) 併用効果の検討

抗がん剤と Indirubin II の併用効果を HepG2 に対する ActD との併用で調べた。解析は MTT アッセイで行った。その結果、Indirubin II (1  $\mu$ M) 存在下で、ActD による抗腫瘍活性が優位に増強された。今後、各種のがん細胞について様々な抗がん剤との併用作用を検討していく予定である。

本年度、がん細胞移植マウスを用いた実験を予定していたが、(1)で述べた問題とそれに対する検討などのため、in vivo の系での解析には至らなかった。しかし、本研究を行ったことにより、動物実験では濃縮したがん幹細胞を移植したマウスに対して抗がん剤と Indirubin II の併用効果を検討しておくべきであるという考えに至った。これは、解析を進める上で今後の指針となる結果である。

## (3) YB-1 の核移行メカニズムの解析

YB-1 の核移行阻害の分子標的を明らかにする目的で核移行メカニズムに関する解析を行った。YB-1 の核移行シグナルである 20 アミノ酸からなる領域(YB-NLS)に相互作用するタンパク質を免疫沈殿により調べ、複数のスプライシングに関わるタンパク質が特異的に相互作用していることを見出した。YB-NLS のみの領域を過剰発現させた HepG2 細胞を ActD で処理した場合には、YB-NLS が核内へ蓄積し、このとき内在性の YB-1 タンパク質の核移行が抑制されていた。一方、YB-NLS 領域のみを欠失させた YB-1 を発現させた細胞を ActD 処理した場合には、内在性 YB-1 の核移行が観察された。これらの結果は、抗がん剤処理によって起こる YB-1 の核内蓄積には、YB-NLS 領域を介したスプライシングファクターとの相互作用が重要であることを示唆している。したがって、抗がん剤処理で起こる YB-1 の核移行には YB-NLS が必要であり、Indirubin II はこの相互作用を阻害している可能性が示唆された。

## (4) 新たなインディルビン誘導体の YB-1 核移行阻害効果の検証

本研究で注目している Indirubin II は細胞障害性を示さない低濃度で YB-1 の核移行を阻害するが、腫瘍細胞の種類によって 2  $\mu$ M ~ 5  $\mu$ M 以上ではそれ自体で細胞の生存に影響を与える。合成班は、Indirubin II を基にその側鎖の構造を変えた新たな化合物の合成を行い、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞に対して細胞毒性が低いと言えるもの、あるいは細胞毒性をほとんど示さないものを 8 種得た。そこで、それらを用いて HepG2 細胞における ActD による YB-1 核移行への影響を調べた。現在までに 4 種について検討し、2 種が Indirubin II に匹敵する活性を有することがわかった。これは、Indirubin II と比較して高活性な化合物ではないが、細胞障害性を示さないことから、より多くの量を用いることができることが期待される。これらについて Indirubin II と同様の検証を行っていく予定である。

以上の結果は、特定のインディルビン誘導体が、がんの化学療法において YB-1 の核移行阻害を通じて、その悪性化を抑える薬剤の有望なシードとなることを示している。

部科校名： 薬学部

氏名： 小林俊亮

## 研究結果 (つづき)

## 2. AhR に関する解析

インディルビン誘導体による肝臓 AhR の活性阻害

## (1) スクリーニングによって得られた候補化合物の AhR 活性化抑制効果の細胞レベルでの検証

インディルビンをリガンドとする AhR は肝線維化および NASH 発症を増悪化することが報告されている (He et al., 2013)。一方、肝線維化および NASH の発症メカニズムは未だ未解明な部分が多く、その治療法の確立は社会的急務である。そこで本研究では、AhR を肝線維化および NASH の新たな標的分子として捉え、AhR アンタゴニストの探索および肝線維化および NASH 発症抑制作用を検討した。初年度において AhR 応答配列 XRE (Xenobiotic Response Element) を含むリポーター遺伝子を用いて、インディルビン誘導の AhR 活性に対する抑制効果を指標にしてアンタゴニストの探索を行ったところ、日本大学薬学部が所有する 74 種の化合物ライブラリーの中で、3 種のインディルビン誘導体において AhR 活性阻害が認められた。興味深いことに、これら 3 種の化合物の AhR アンタゴニスト作用は、既存の AhR アンタゴニストである CH223191 に比較して、強い AhR 結合活性を示すのみならず、低濃度で作用する有効な AhR アンタゴニストであることが示唆された。

## (2) 肝線維化と NASH 発症への影響を調べるための動物への投与の試み

これらの誘導体の中で、化合物 12 が他の 2 種よりも強い AhR 抑制作用を示したことから、メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食誘発性の肝線維化および NASH 発症に対する化合物 12 の影響を検討した。方法としては、C57BL/6J マウス (16 週齢、雄) に MCD 食を 5 週間給餌し、肝線維化および NASH 発症を誘発した。なお、化合物 12 (100mg/Kg) および Vehicle (Corn oil) を MCD 食給餌 3 週目から腹腔内に毎日投与を行い、肝臓の病理組織学的解析および遺伝子発現解析を行った。肝線維化に伴うコラーゲンの沈着をマッソントリクローム染色で検討したところ、化合物 12 群および Vehicle 群に違いは認められなかった (図 1)。また、化合物 12 群において肝星細胞のマーカである  $\alpha$ SMA 発現量の減少が認められたものの、I 型コラーゲン *Colla1* および線維化促進因子である *Tgf $\beta$ 1* の発現量に違いは見られなかった。さらに、NASH 発症過程への化合物 12 の影響を H&E 染色および NASH 関連遺伝子 (脂肪酸合成酵素および炎症関連遺伝子) の発現量より検討した (図 2)。その結果、病理組織学的および NASH 関連遺伝子発現量において両群間に違いは認められなかった。また、化合物 12 投与マウスにおいて IL-6 発現量の減少が認められた。この IL-6 発現減少は、AhR が IL-6 遺伝子の発現制御に関与していることを示す報告に一致している (Chen et al., 2012)。

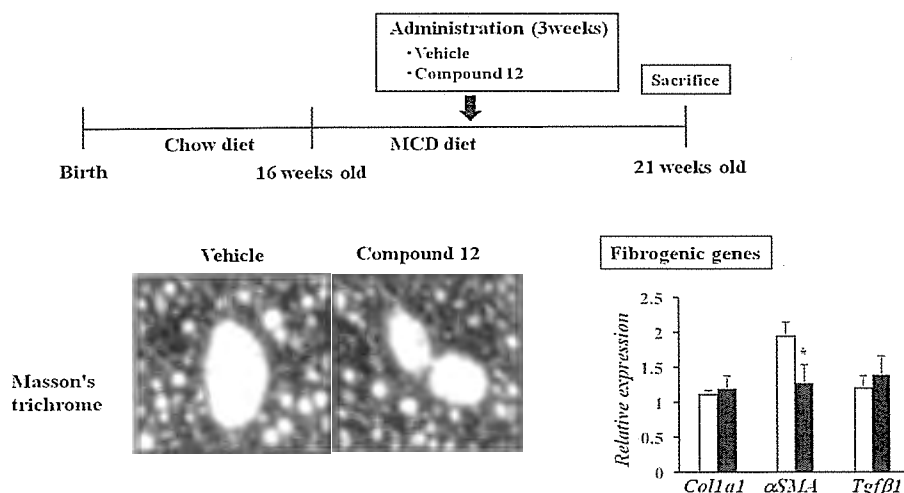


図 1 : 肝線維化への化合物 12 の影響

部科校名： 薬学部

氏名： 小林俊亮

## 研究結果 (つづき)

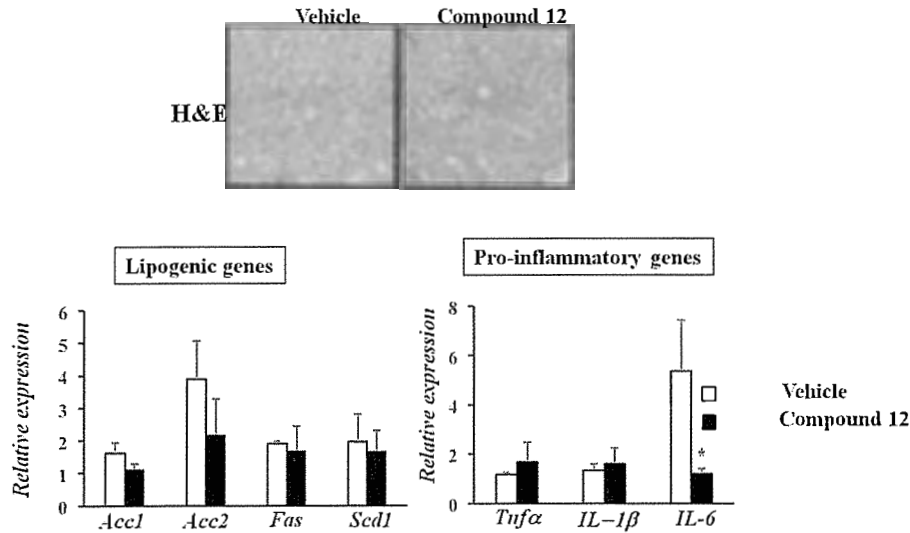


図 2 : NASH 発症過程への化合物 12 の影響

以上の結果より、今回行った実験条件下では、AhR アンタゴニストを示した化合物 12 による肝線維化および NASH 発症抑制はほとんど見られなかった。しかしながら、アルコール摂取などにより活性化される肝星細胞のコラーゲン合成と分泌が、肝線維化に極めて重要であることから、 $\alpha$ SMA 発現減少を示した化合物 12 には線維化抑制作用を示す可能性がある。今後、投与期間および投与濃度などの条件検討を行うとともに、異なる線維化モデルマウスおよび肝臓特異的 AhR ノックアウトマウスを用いた更なる検討を行う予定である。

## 3. 合成班

前年度に報告した Indirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime: Epox/indirubin をシード化合物として、さらに細胞傷害性を向上させるため Epox/indirubin を母核とした誘導体の合成を行った。まず、5, 6, 7, 5', 6' 位に臭素を導入した Epox/indirubin についてヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて細胞傷害性を検討した。その結果、合成した中では、24 時間曝露でも 5-Br 体の細胞傷害性が最も強く ( $IC_{50} = 0.62 \cdot M$ )、さらに indirubin 類への曝露時間を 72 時間延長したところ、5-Br 体のみに曝露時間延長に伴う細胞傷害活性の増強が認められた。この結果から、細胞内における indirubin 誘導体の主代謝経路は 5 位の修飾である可能性が示唆された。本結果を踏まえ、5 位にフッ素原子、塩素原子、ヨウ素原子を導入した Epox/indirubin 誘導体を新たに合成し、HepG2 細胞を用いて細胞傷害性を検討することとした。その結果、ハロゲン原子を導入した Epox/indirubin は、無置換体と比較すると *in vitro* においては一様に細胞傷害活性が向上したが、原子種間での差異は認められなかった。また、indirubin とエポキシド構造間の距離が異なる数種の化合物を合成し、それらを評価することで最適距離に関する知見も得た。その他に、indirubin 化合物ライブラリーの拡充のために合成を行い、現在までに 130 化合物を登録している。

Indirubin は GSK-3 $\beta$ 、CDK のような細胞増殖周期を制御することが知られているキナーゼを分子標的とする阻害剤であり、抗がん剤としても応用が期待されている化合物である。Indirubin が親和性を有する GSK-3 $\beta$  や CDK は細胞周期以外にも様々な生体機能の調節に関与している。我々は、indirubin 誘導体をシード化合物とする抗がん剤は、神経変性疾患や糖尿病を併発している患者の予後を総合的に改善することができると考えており、commentary article として発表した。

部科校名： 薬学部

氏名： 小林俊亮

## 研究結果 (つづき)

本研究に関連した成果発表

## 1. 学術論文

- (1) YB-1 gene expression is kept constant during myocyte differentiation through replacement of different transcription factors and then falls gradually under the control of neural activity.  
Kobayashi S, Tanaka T, Moue M, Ohashi S, Nishikawa T.  
*Int J Biochem Cell Biol.* **2015**, 68:1-8.
- (2) Inhibitory effects of compounds isolated from the dried branches and leaves of murta (*Myrceugenia euosma*) on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.  
 Oikawa, N., Nobushi, Y., Wada, T., Sonoda, K., Okazaki, Y., Tsutsumi, S., Park, Y.K., Kurokawa, M., Shimba, S., Yasukawa, K.  
*J. Nat. Med.* [Epub ahead of print] (**2016**).
- (3) Aryl hydrocarbon receptor plays protective roles against HFD-induced hepatic steatosis and the subsequent lipotoxicity via direct transcriptional regulation of Socs3 expression.  
Wada T, Sunaga H, Miyata K, Shirasaki H, Uchiyama Y, Shimba S.  
*J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print] (**2016**).
- (4) Is an Inhibitor or Blocker of Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) a Reliable Agent for Cancer Chemotherapy? (Commentary article)  
 Ichimaru Y, Saito H and Shinichi Miyairi,  
*Int. J. Clin. Pharmacol. Pharmacother.*, **2016**, 1, IJCPP-102.
- (5) Indirubin 3'-Epoxide Induces Caspase-independent Cell Death in Human Neuroblastoma.  
 Suzuki T, Kurita M, Hanada S, Ichimaru Y, Saito H, Tabata K, Asami S, Miyairi S.  
*Biol. Pharm. Bull.* Accepted.

## 2. 学会発表

1. Stress granule の形成と解除における YB-1 の役割  
 都築竜太、田中融、大橋祥世、小林俊亮  
 第 59 回日本薬学会関東支部大会 (2015 年 9 月 12 日)
2. YB-1 遺伝子発現は骨格筋の分化過程で転写因子の交代によって一定に保たれ、その後神経支配に移行する  
田中融、大橋祥世、小林俊亮  
 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会 (2015 年 12 月 1 日)
3. がん悪性を誘発する YB-1 タンパク質の核内蓄積に関わる因子の解析  
大橋祥世、田中融、齋藤弘明、和田平、青山忠、小林俊亮  
 第 136 回日本薬学会 (2016 年 3 月 29 日)
4. 体内時計の機能低下に伴う代謝性肝疾患の発症とその機構  
和田平  
 第 136 回日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 28 日)
5. 体内時計システムの NASH 発症および進行過程における役割.  
和田平、吉田賢新、山下智鶴、榛葉繁紀  
 第 38 回日本分子生物学会年会 (2015 年 12 月 3 日)
6. 胆汁酸代謝制御における時計遺伝子 BMAL1 の役割  
和田平、吉田賢新、大西悠太、石澤通康、槇島誠、榛葉繁紀  
 第 37 回胆汁酸研究会 (2015 年 11 月 7 日)
7. 肝臓 BMAL1 による臓器連関を介した血糖値制御機構  
和田平  
 第 59 回日本薬学会 関東支部大会 (2015 年 9 月 12 日)

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名： 薬学部

氏名： 小林俊亮

## 研究結果（つづき）

8. アディポネクチンは組織特異的に体内時計システムを制御する  
吉田賢新、和田平、榛葉繁紀  
第 20 回アディポサイエンス研究会シンポジウム（2015 年 8 月 22 日）
9. Epox/Indirubin の細胞傷害性：臭素導入部位の影響と作用持続時間の検討  
市丸 嘉、梅原美乃、藤井 矯、齋藤弘明、内山武人、宮入伸一  
第 59 回日本薬学会関東支部大会（2015 年 9 月 12 日）
10. Epox/Indirubin の細胞傷害性：最適ハロゲン原子種の検討  
市丸 嘉、小藤光章、藤井 矯、木暮隆人、梅原美乃、齋藤弘明、内山武人、宮入伸一  
第 59 回日本薬学会関東支部大会（2015 年 9 月 12 日）
11. Epox/Indirubin の細胞傷害性：Indirubin から epoxide 環までの spacer 長の検討  
市丸 嘉、藤井 矯、金子美奈、齋藤弘明、宮入伸一  
第 59 回日本薬学会関東支部大会（2015 年 9 月 12 日）

課題番号	総 15-020
------	----------

平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

日 本 大 学 学 長 殿

平成28年4月6日

氏 名 榎葉繁紀



所属・資格 薬学部・教授

下記のとおり報告いたします。

退職,転出の場合は, ( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題		
糖尿病治療における新規分子標的としての時計遺伝子の可能性		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 榎葉繁紀	薬学部/教授	総括、マウスの管理
○研究分担者 (学内)		
石毛久美子	薬学部/教授	中枢神経系の解析
榎島 誠	医学部/教授	内分泌系の解析
内山武人	薬学部/准教授	SR9011 の合成
和田 平	薬学部/助教	遺伝子・タンパク質発現解析
合計 5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		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・榎葉繁紀 基盤研究 ( B ) (一般) 結果: 不採択</li> <li>・内山武人 挑戦的萌芽研究 結果: 不採択</li> <li>・榎島 誠 基盤研究( C ) (一般) 結果: 採択「ビタミンD受容体シグナルによる腸管・肝臓免疫調節</li> </ul>		

※「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。



部科校名： 薬学部

氏名： 榛葉繁紀

## 4 研究目的

高齢化社会の進展にともない、“健康に長寿を全うしていく”ことは国民の切なる願いであり、医薬学界にとっても大きな課題となっている。一方で近年におけるわが国のライフスタイルの変化は糖尿病、高血圧および脂質異常症などのいわゆる生活習慣病の患者数増加を招いている。例えば、わが国における糖尿病患者数は現在約950万人と推定されており、またそれにかかる年間の医療費は1.2兆円と過去最高を更新している。そのため糖尿病は五大疾病のひとつに指定され、国策レベルにおいて更なる対策の強化が求められている。世界的に見ても糖尿病人口は爆発的に増え続けており、2013年現在で糖尿病有病者数は3億8,200万人（有病率8.3%）にのぼり、2030年までに5億9,200万人に増加するとの予測が算出されている。特にその増加の程度は発展途上国において拡大しており、したがって糖尿病の制圧は、富裕国のみならず世界的な喫緊の課題であるといえる。

糖尿病の発症要因は多様であるが、多くの疫学研究ならびに実験的検証から体内時計の不調もその一因であることが示されている。体内時計システムは複数の時計遺伝子により調節されているが、中でもBrain Muscle Arnt-like Protein 1 (BMAL1)が中心的な役割を果たす。そこで本研究は、BMAL1の肝臓特異的ノックアウト(KO)マウスを用いて、体内時計による血糖調節メカニズムを明らかにする。

## 5 研究概要

本研究では時計遺伝子BMAL1による血糖値制御のメカニズムの解明ならびに肝臓BMAL1の糖尿病治療における新たな分子標的としての可能性を検討する目的で、肝臓特異的Bmal1欠損マウス(LKOマウス)における血糖制御を以下の観点から解析する。

## (1) 肝臓BMAL1による臓器連関を介した血糖制御機構

LKOマウスにおいてインスリンやアディポネクチンなど肝臓以外の組織において産生・分泌される生理活性物質が増加していること、そして中枢に支配される摂食量に影響が出ていることは、BMAL1による肝臓を中心とした臓器連関の調節機構が存在することを意味している。近年、肝臓を起点とした臓器連関の主要な経路として中枢神経を介した経路が報告されているが(Nature 2006, Nature Commun 2013)、興味深いことにLKOマウスにおいても脳におけるAMPキナーゼ活性の亢進が観察される。したがって肝臓BMAL1による臓器連関を介した血糖値制御においても中枢神経系の関与が考えられる。そこで外科的ならびに薬理的に肝臓-中枢神経系間を遮断し、血糖値ならびにインスリンやアディポネクチンなどの生理活性物質の変化を解析する。

## (2) BMAL1による肝臓におけるインスリン感受性ならびに血糖の制御機構

LKOマウスにおける糖新生能の低下機構を肝臓におけるインスリンシグナル伝達活性の点から明らかにする。

## (3) BMAL1の糖尿病治療における新規分子標的としての可能性

我々は薬学部共同研究助成金の補助により核内受容体REV-ERB $\alpha/\beta$ の合成リガンドがBMAL1の発現ならびに活性を抑制することを*in vivo*レベルで明らかにしている。そこで、本化合物を用いて肝臓BMAL1活性の抑制することで血糖値改善効果を解析し、BMAL1の糖尿病治療における新規分子標的としての可能性を探る。

部科校名： 薬学部

氏名： 榛葉繁紀

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

肝臓 BMAL1 による血糖制御を解析する目的で、*Bmal1<sup>fllox</sup>* マウスと肝臓特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを交配し、肝臓特異的 *Bmal1* 欠損マウス(LKO マウス)を作製した。本マウスの肝臓実質細胞において *Bmal1* mRNA ならびに BMAL1 タンパク質発現が完全に消失していることをリアルタイム qPCR ならびに Western blot 法により確認した。

LKO マウスの表現型を解析した結果、コントロールマウス(*Bmal1<sup>fllox</sup>* マウス)に比較して LKO マウスは低血糖を示した。また LKO マウスはグルコース負荷試験並びにインスリン負荷試験において良好な耐糖能ならびにインスリン感受性を示した。さらに興味深いことに、LKO マウスにおける血中インスリン量ならびにアディポネクチン量は、*Bmal1<sup>fllox</sup>* マウスに比較して高値を示し。このインスリン量の上昇はインスリン抵抗性を示しているとも考えられる結果であるが、後述するように LKO マウスでは糖新生能が低下している。したがってこのインスリン量の増加は、インスリン抵抗性のためではなく、血糖値の低下に積極的に関与していることを示唆している。また LKO マウスは摂食量が低下しており、これもまた血糖値低下の要因であると考えられる。すなわち肝臓の *Bmal1* 欠損に伴う血糖値の低下は、(i)インスリン量・アディポネクチン量の増加による耐糖能ならびにインスリン感受性の増加、(ii)糖新生の抑制さらには(iii)摂食量の減少のいずれか、あるいはこれらの複合的な影響によるものと推測できる。そこで本年度は、LKO マウスにおけるインスリン量ならびにアディポネクチン量の増加と血糖制御との関係を解析した。

LKO マウスにおけるインスリン量ならびにアディポネクチン量の増加は、肝臓と他臓器との間におけるクロストークを意味している。近年、この肝臓を起点とした臓器連関が中枢神経を介して行われていることが報告されている。また、このクロストークには液性因子の関与も考えられるが、LKO マウスにおける RNA-Seq 解析を行った限りでは、そのような因子の存在は期待できず、また LKO マウスより調製した血清を用いて培養脂肪細胞を処理してもアディポネクチン等の量的変化は認められない。そこで LKO マウスにおける肝臓・中枢神経系間クロストークと血糖値制御との関係を検討するために、初年度はマウスの迷走神経肝臓枝を選択的に遮断手術(Hepatic vagotomy ; HVx)を施したマウスならびに求心性神経のみを遮断するカプサイシン処置を施したマウスに関して解析を行った。その際のコントロールとしては、開腹後縫合したシャム手術マウスを用いた。結果の概略は以下の通りである。開腹処理は、コントロールマウスと LKO マウスの間における表現型の違いに影響を与えなかった。一方、HVx 処理あるいはカプサイシン処理によりコントロールマウスと LKO マウス間において見られた血糖値、インスリン量、ならびにアディポネクチン量の違いは消失した。また交感神経遮断薬処理によっても両マウスにおける血糖値の差異は消去した。したがって肝臓における BMAL1 が迷走神経を通じて血糖値、インスリン量ならびにアディポネクチン量の制御を司る事が示された。

上記の結果より肝臓 BMAL1 が神経経路を介して血中アディポネクチン量を増加させることが明らかになった。そこでこのアディポネクチン量増加の意義を明らかにする目的で、LKO マウスとアディポネクチン(Aq) KO マウスとを交配し、アディポネクチン-肝臓 *Bmal1* ダブル KO (Aq LKO)マウスを作製した。*Bmal1<sup>fllox</sup>*、LKO、Aq KO、ならびに Aq LKO マウスの随時血糖値を測定した。その結果、LKO マウスの血糖値は、*Bmal1<sup>fllox</sup>* マウスと比較して有意な低下を示した。それに対して Aq LKO マウスにおける血糖値は1日を通じて常に Aq マウスと同程度の値を示した。また各時間における血清インスリン濃度を測定したところ、LKO マウスでは *Bmal1<sup>fllox</sup>* と比較して有意な高値を示したが、Aq KO マウスおよび Aq LKO マウスの両群間で差異は認められなかった。次いでグルコース負荷試験およびインスリン負荷試験を行った。上述したようにグルコース負荷試験において LKO マウスは、コントロールマウスと比較して良好なスコアを示す。そこで Aq KO マウスおよび Aq LKO マウスに対してグルコース負荷試験を行ったところ、両群間に差は認められなかった。またその際の血中インスリン濃度においても両群間に差は認められなかった。次いでインスリン負荷試験を行ったところ、Aq KO マウスと Aq LKO マウスとの間にスコアの違いは認められなかった。さらに骨格筋におけるインスリン感受性を確認するために *Bmal1<sup>fllox</sup>*、LKO、Aq KO、ならびに Aq LKO マウスより骨格筋を単離し、Western blot 法によりインスリン伝達活性を測定した。その結果、LKO マウスにお

部科校名： 薬学部

氏名： 榛葉繁紀

## 研究結果（つづき）

る AKT 活性は *Bmal1<sup>lox</sup>* マウスと比較して増加する傾向が認められたが、Aq KO マウスと Aq LKO マウスとの間に AKT 活性の差異は認められなかった。すなわち LKO マウスは、アディポネクチンの産生・分泌を促すことによりインスリンの量的増加ならびに感受性を亢進し、その結果、血糖値の低下を示すことが示された。肝臓は、グリコーゲンの貯蔵と分解のバランスを制御することによって血糖を制御する。そこで LKO マウスにおける肝臓グリコーゲン含量を測定したところ、*Bmal1<sup>lox</sup>* マウスと比較して著しい減少を示した。そこで、肝臓-脳-脂肪組織の神経回路遮断した LKO マウスにおける肝臓グリコーゲン量を検討した。その結果、HVx およびカプサイシン処置によっても LKO マウスにおける肝臓グリコーゲン含量の低下は回復されなかった。また、Aq LKO マウスにおいても Aq KO マウスと比較して肝臓グリコーゲン量の減少が示された。肝臓におけるグリコーゲン含量を制御するものとして糖新生能があげられる。そこで次にピルビン酸負荷試験により各マウスの糖新生能力を測定した。LKO マウスの糖新生能は *Bmal1<sup>lox</sup>* マウスに比べて低下していた。そこで Aq KO マウスと Aq LKO マウスに対してピルビン酸負荷試験を行ったところ、*Bmal1<sup>lox</sup>* マウスと LKO マウスとの関係と同様に Aq LKO マウスにおける糖新生能は、Aq KO マウスと比較して低下していた。さらに各マウスにおけるグリコーゲン代謝関連遺伝子の発現量を解析したところ、肝臓 *Bmal1* 遺伝子欠損によりグリコーゲン合成酵素遺伝子の発現低下が認められた。したがって、LKO マウスにおける血糖値の低下には、糖新生能の低下、ならびにグルコースの供給源である肝臓グリコーゲン含量の低下が関与すると思われるが、これらに関しては、アディポネクチンに非依存的事であることが示された。

次に肝臓におけるインスリンシグナル伝達経路関連因子の日内変動を Western blot 法により解析を行った。*Bmal1<sup>lox</sup>* マウスでは、インスリンシグナル経路の中心的なタンパク質である AKT のリン酸化(Ser473 および Th308)は、ZT6 に最大となる日内変動を示した。一方、LKO マウスにおける AKT は明期において恒常的にリン酸化が亢進しており、また暗期においても減弱するもののリン酸化体は検出され、その結果、1日を通じて *Bmal1<sup>lox</sup>* マウスよりも高いリン酸化状態を示した。また、AKT の上流に位置する IRS2 の発現量およびリン酸化 PDK1 量は、リン酸化 AKT と同様なパターンを示した。インスリンシグナル伝達に影響を受ける因子として CREB, AMPK および FOXO1 などがあげられる。そこで、これら因子の日内変動を Western blot 法により検討した。CREB ならびに AMPK のリン酸化は、*Bmal1<sup>lox</sup>* マウスにおいては ZT6 にピークとなる日内変動を示した。一方で LKO マウスでは、CREB に関しては日内変動を示さず1日を通じて *Bmal1<sup>lox</sup>* マウスよりも高いリン酸化レベルが保たれていた。また AMPK に関しては明期において高く暗期にやや減弱する日内変動を示したが、いずれの時点においても *Bmal1<sup>lox</sup>* マウスよりも高いリン酸化レベルを示した。FOXO1 のリン酸化の程度は両群間においてほぼ同程度であった。すなわち肝臓 BMAL1 はインスリン感受性を制御することが示された。

以上の結果より、肝臓 BMAL1 は、神経経路を介して脂肪組織からアディポネクチンの産生・分泌を抑制しインスリン感受性を低下させること、またアディポネクチンに依存しない経路を介して糖新生を亢進することで血糖値の上昇を招く事が明らかになった。

現在、血糖制御に関する基礎研究は、従来の「インスリンの分泌ならびに特定の末梢組織における感受性の制御」から、「臓器連関による統合的な制御」の解明へと展開している。それに伴い糖尿病治療は新しいステージを迎えている。すなわち今日では従来とは明らかにコンセプトの異なる糖尿病治療薬としてインクレチン薬が隆盛期を迎え、昨年度からは新たに SGLT2 阻害薬が登場した。この血糖値制御におけるパラダイムシフトに基づいた治療薬開発は、糖尿病病態のさらなる分子基盤の解明とともに今後も深化すると期待される。体内時計による血糖値制御のメカニズムを臓器連関から明らかにする本研究は、その新しい潮流に乗るとともに従来とは全く異なる糖尿病治療ならびに予防の概念を導入することが期待できる。特に BMAL1 活性を薬理的に調節することで病態の改善を導くことができたならば、その成果は糖尿病に限らず、多くの疾患の治療および予防に新たな道筋をつけるものであると期待できる。

## 平成27年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28 年 5 月 3 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 保 坂 敏 子



所属・資格 大学院総合社会情報研究科・教授

下記のとおり報告いたします。

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 グローバル人材育成のためのオープンエデュケーションに関する総合的研究		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 保坂 敏子	総合社会情報研究科／教授	総括、オープン教材化の計画、メディア・テキスト研究、シンポジウム開催担当
○研究分担者 井上 健 古賀 太 呉 川 椎名 正博 高綱 博文 松岡 直美 合計 7 名	国際関係学部／教授 芸術学部／教授 国際関係学部／教授 文理学部／教授 通信教育部／教授 総合社会情報研究科／教授	翻訳研究担当 映画研究担当 メディア・テキスト研究担当 クロス・メディア研究担当 文化交流史研究担当 日英米文学担当
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>本研究は、平成 27 年度より 2 年間の計画で日本大学学術研究助成金に申請することを当初から予定していた。このため、平成 28 年度に向けて学術助成金以外の外部研究資金に申請を行っていない。</p> <p>平成 28 年度の学術研究助成金への申請結果は不採択であった。不採択となった内容は、調査研究を踏まえた、日本大学の学生ためのオープンエデュケーション教材の制作部分にあたる。本学用の教材の開発が目的となるため、この部分で外部研究資金に申請しても、採択されるのは難しいものと思われる。申請以前の予定では、教材の作成とその検証を踏まえたな内容を検討する予定であった。よって、平成 29 年度に外部資金に申請するためには、本研究を踏まえた研究テーマの大幅な再検討が必要である。</p> <p>一方、研究メンバーの中に平成 28 年度と平成 29 年度に定年退職を迎える者がおり、現在の研究体制での研究継続が難しい状況にある。この点も外部研究資金への申請の隘路となっており、申請のためには、メンバーの再編成を検討する必要がある。</p> <p>尚、本調査研究の成果を活かすことを目的に、日本大学の JMOOC 第 3 講座として、本研究内容を基にした総合社会情報研究科講座「文化翻訳入門―日本と世界の文化コミュニケーション―」(仮)を学務部に提案中である。平成 28 年度は、この JMOOC プロジェクト遂行のための作業を継続する。</p>		

※「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。

部科校名：大学院総合社会情報研究科

氏名： 保坂敏子

## 4 研究目的

本研究は、日本大学で学ぶ大学院や学部の学生が 21 世紀の世界で活躍できるグローバル人材になることを目標に、「言語と文化のトランスレーション」をテーマにした多言語対応のオープンエデュケーション環境の構築を目指すものである。具体的には、下記①②を目的とする。

①総合社会情報研究科、国際関係学部、芸術学部、文理学部、通信教育部の教員が連携して、「言語と文化のトランスレーション」のについて調査研究を行い、テーマにオムニバス講義形式のオープンエデュケーション教材（Open Educational Resources：以下 OER）を開発する。

②その実用性と有効性を、運用・評価することで、総合的に検証する。

教材のテーマとした「言語と文化のトランスレーション」は、グローバル人材に求められる「異文化間理解能力」の涵養に資すると考えられる。「トランスレーション」とは、現在、言語のみならず「文化の翻訳」を包摂するもの、文化の解釈を伴う異文化間コミュニケーション行為、文化伝達・伝播のプロセスとして捉えられている。つまり、「トランスレーション」の概念には、言語テキスト間の「翻訳」だけではなく、言語テキストからメディア・テキストへの翻案、言語テキストおよびメディア・テキストの異なる文化圏での受容、文化の交流、教育活動における文化伝播などが広く含まれる。本研究では、「トランスレーション」のプロセスに参加することにより、文化間の相互作用、文化の混淆、文化の変性が解釈でき、その解釈を他者に開陳して交流させることのできる「文化リテラシー」が涵養され、「異文化間理解能力」が育成できるものと考えている。一方、「オープンエデュケーション」とは、教育の障害を取り払い、教育を「オープン」にし、学習機会を促進しようとする活動のことである。現在、大学の講義や教材などをインターネットで公開し、社会に還元する試みが世界的に広まっている。「オープンエデュケーション」は、未来の学びとも言われており、教材の専門的な内容の習得だけでなく、ICT を使って生涯を通じて主体的かつ自律的に学習していく能力の習得が期待できる。本研究は、「文化翻訳」の考え方を基盤に、「トランスレーション」を複数言語間、複数メディア間、複数文化間における相互往還作用と捉え、学術的に検証して理論化を進める点に学術的特色があり、それをオープンエデュケーションという方法により、グローバル人材の育成と結びつける点に獨創性がある。

## 5 研究概要

本研究は、当初、以下のとおり平成 27～28 年度にわたる 2 年間の研究計画を立てていた。

1 年目：OER の中核をなすオムニバス講義の内容について各メンバーがそれぞれの専門領域の調査や理論的検証を行い講義案を作成してプロトタイプ OER を開発する。

2 年目：プロトタイプの評価・改善を行い、OER 完成版を作成させ、有効性について検証する。

平成 27 年度の交付金額の関係で、OER のプロトタイプ作成まで行くことが出来ない状況となったため、2 年間の研究計画を調整し、1 年目には具体的な教材システムの開発を見送り、OER の中核をなすオムニバス講義の内容について、メンバーが各々の専門領域において事例調査や理論的検証を集中的に行うことにした。また、調査の結果は、国際シンポジウムを開催し報告書としてまとめること、その上で、平成 28 年度の教材開発に向けて講義シラバスを作成するという計画に変更した。

平成 28 年度に向け 2 年目の研究費の申請を行ったが、不採択となった。本研究は OER の開発まで至らず、調査研究とその成果発表としての国際シンポジウムの開催を以て、研究を終了することとなった。

部科枝名：大学院総合社会情報研究科

氏名： 保坂敏子

## 6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

本研究では、オープンエデュケーションのコンテンツとなる講義動開発に向けて、平成27年度に「ことばと文化のトランスレーション」をめぐり、本研究プロジェクトのメンバーがそれぞれの自分の担当領域に関する調査研究を進めた。その調査研究の成果は国際シンポジウムで公表すると共に、報告書にまとめ、内容を広く周知した。具体的な研究の活動の流れは以下のとおりである。

## 1. 「ことばと文化のトランスレーション」に関する調査研究

研究期間中、プロジェクト・メンバーはそれぞれ調査研究を行い、研究の進捗状況を打ち合わせ会議で報告した。海外出張を伴う研究調査活動と打ち合わせの概要は以下のとおりである。

## ①2015年2月28日(土) 14:00~16:00 第1回 打ち合わせ会議 @通信教育部

(井上、呉、椎名、高綱、松岡、保坂、近藤、ドーシィ：全員出席)

・研究計画・進め方に関する協議と分担の確認

⇒新年度に入ってすぐ研究プロジェクトを始められるように、2月末にキックオフミーティングを開催した。

## ②2015年5月14日(木)~19日(火) 上海調査・研究成果発表(呉・保坂)

・研究発表：「中国におけるTVドラマ『半沢直樹』の受容からみる文化的要素」

⇒2015年4月に中国の日本語日文学専攻の学生等を対象にアンケート調査を実施し、その結果を分析して報告した。

於) 2015年日本語教育と日本学国際シンポジウム(中国日本語教学研究会上海分会年会)

上海理工大学(上海・中国)

・復旦大学、上海理工大学、中国電媒大学において、オープンエデュケーションの状況に関する聞き取り調査

## ③2015年7月15日(水) 18:00~20:00 第2回打ち合わせ会議@日本大学第二別館

(呉、椎名、高綱、松岡、保坂)

・研究経過報告、研究の進捗状況・調査計画の確認、今後の進め方について確認

## ④2015年7月21日(火)~8月1日(土) ニューヨーク調査(ドーシィ：研究協力者)

・「グローバル化時代における文化・文学・言語の統合的研究と教育」に関わる研究の一環としてのグローバル・パフォーマンスについての研究・調査のため

於) Lincoln Center Festival in 2015 (ニューヨーク・アメリカ)

## ⑤2015年9月1日(火)~9月13日(日) ベネチア調査(古賀)

・「グローバル化時代における文化・文学・言語の統合的研究と教育」に関わる研究の一環としてのグローバル・パフォーマンスについての研究・調査のため

於) ベネチア映画祭(ベネチア・イタリア)

## ⑥2015年10月29日(木)~11月3日(火) シンガポール調査(松岡)

・グローバル・パフォーマンス(村上春樹の小説『海辺のカフカ』の舞台化)についての研究・調査のため

於) シンガポール エスプラネード・シアター(シンガポール)

部科校名 : 大学院総合社会情報研究科

氏名 : 保坂敏子

## 研究結果 (つづき)

⑦2016年1月27日(水)～2月4日(木) フランス調査(椎名)

- ・アングレーム市の「国際マンガフェスティバル」の取材およびパリでの資料収集のため  
於) 国際マンガフェスティバル(アングレーム・フランス)

## 2. 国際シンポジウムの開催とまとめ(研究成果発表)

研究プロジェクトの各メンバーが、それぞれ実施した調査研究の成果を公開するために2016年2月22日に国際シンポジウムを開催した。国際シンポジウムには海外研究協力者2名(韓国・新羅大学・崔光準教授、中国・大連大学・宋協毅教授)と海外特別コメンテーター(中国・北京日本学研究中心・徐一平教授)を招聘した。シンポジウムの各講演の様子は、撮影してDVDに記録を残した。また、講義映像に字幕がつけられるように、各講演の音声文字化資料も作成した。今後、NU-channelで本研究の成果として公表したり、大学院総合社会情報研究科のHPにアップして、文化情報専攻の反転授業用の教材として利用することを検討する予定である。また、それぞれの講演内容を論文形式にまとめ、シンポジウムの配布資料と合わせて報告書を作成した。映像資料と文字化資料と共に、広く本研究の成果を公開するために使用する予定である。国際シンポジウムから報告書までの流れと、シンポジウムの内容の詳細は、以下のとおりである。

①2015年12月2日(水)～2016年2月21日(日) シンポジウム準備

- ・プログラム作成、ポスター作成、大学等機関へのプログラムの郵送等シンポジウムの広報活動

②2015年2月22日(月) 国際シンポジウム開催

- ・タイトル：文化翻訳が拓く異文化間コミュニケーションの可能性

- ・場所：日本大学通信教育部 1号館7階 71講堂

- ・時間：9:00～16:00

- ・趣旨：グローバル人材・グローバル市民に求められる異文化間コミュニケーション(transcultural communication)能力の養成に向け、「文化翻訳(cultural translation)」の理解と遂行を提唱する。「文化翻訳」は文化人類学、民族誌学、社会学、記号論、コミュニケーション論等々の領域においても様々に定義され、実践されているが、今回の国際シンポジウムでは、翻訳研究、文化研究、ポストコロニアル批評を包摂する比較文学における「文化翻訳」に焦点化する。具体的には、文学、映画、TVドラマ、マンガ、パフォーマンス等の文化的所産が時空を超えて翻訳・翻案され、変容・混濁してグローバル文化を成す、その遂行と過程を取り上げる。アジア圏において古代から連続と続く文化交流、近代西欧との遭遇と文化往来、近年のICT革新によって加速する文化の流通と生産・消費等について再確認し、越境性や関係性、複合性や混濁性こそが文化の本質であることを改めて明らかにする。これによって「異質な文化」や「自文化・他文化」といった差異化・他者化、また分断化の衝動を抑え、文化を超えた(transcultural)相互理解に向けて、個人が自覚的な文化翻訳者となることを促したい。国内外の研究者が集っての本シンポジウムが正に「文化翻訳」であるのだが、オープンエジュケーション、そして異文化間理解教育推進に向けての一助となれば、主催者にとって望外の喜びである。

(出典：シンポジウム・プログラムから)

部科校名 : 大学院総合社会情報研究科

氏名 : 保坂敏子

## 研究結果 (つづき)

・内容 :

**基調講演**

- 1 : 「グローバル人材育成と異文化間コミュニケーション：中国の場合」  
大連大学教授 宋 協教
- 2 : 「グローバル人材育成と異文化間コミュニケーション：韓国の場合」  
新羅大学教授 崔 光準
- 3 : 「文化翻訳と異文化間コミュニケーション」  
日本大学国際関係学部教授 井上 健

**研究成果報告** テーマ： 「文化翻訳と異文化間コミュニケーション」

- 1 : 「日本のイメージと映画 国際映画祭の役割を中心に」  
日本大学芸術学部教授 古賀 太 (映像参加)
- 2 : 「古代から未来へー日中詩歌における文化翻訳」  
日本大学国際関係学部教授 呉 川
- 3 : 「越境する宮沢賢治ー風之又三郎ー」 日本大学通信教育部教授 近藤 健史
- 4 : 「日中文化翻訳装置としての上海内山書店」 日本大学通信教育部教授 高綱 博文
- 5 : 「マンガと BDー文化翻訳のケーススタディとしてー」  
日本大学文理学部教授 椎名 正博
- 6 : 「Global Performance: Translation, Adaptation, Transformation  
(グローバル・パフォーマンス：翻訳、翻案、変容)」  
立教大学教授 Dorsey, John T.
- 7 : 「『海辺のカフカ』ー日本の小説からアメリカの戯曲に、そして日本の舞台から  
世界ツアーへー」  
日本大学総合社会情報研究科教授 松岡 直美
- 8 : 「TV ドラマの文化翻訳 ー『半沢直樹』の中国での受容ー」  
日本大学総合社会情報研究科教授 保坂 敏子

**パネルディスカッション**

特別コメンテーター：北京日本学研究センター教授 徐 一平

・参加者：57名 (申込者 65名)

## ③2016年2月23日(火)～3月31日(木) 国際シンポジウムの報告書作成と送付

- ・シンポジウム映像資料DVD、文字化資料完成(2月29日)
  - ・報告書の完成(3月4日)
  - ・報告書の発送(シンポジウム参加者、シンポジウム広報協力者)
  - ・シンポジウム配布(大学院総合社会情報研究科分科委員会教員、学務部、広報部等)
- ★日大新聞(2016年3月15日付け)にシンポジウム開催記事が掲載された。

以上が本研究活動の流れである。研究費が不採択となったため、この研究成果を踏まえて日本大学の学部生と院生がグローバル人材となるための資質や能力を涵養するためのOER教材を作るまでには至らなかったが、1年の研究期間で、調査研究の成果をシンポジウムと報告書という形で公表することができた。よって、本研究は、1年目の目標と課題を十分に達成することができたと思う。



部科校名 : 大学院総合社会情報研究科

氏名 : 保坂敏子

## 研究結果 (つづき)

惜しむらくは、研究成果を OER という形にして、その有効性を検証できなかったことである。「ことばと文化のトランスレーション」に対する理解と参加が、日本大学の学生の異文化間リテラシーをつけることができるかどうかは、今後の課題となった。

最後に、国際シンポジウムの報告書に総括として掲載された文章を、本研究プロジェクトの研究成果として、転載する。

<総括： シンポジウム報告書 p. 106>

シンポジウムを終えて 一改めでの文化翻訳— 松岡 直美

今回のシンポジウムでは、文化翻訳の諸相に触れ、世界各地の様々な社会が文化レベルでいかに交流し、相互的文化関係にあるかを具体的に理解することができた。政治・経済力や軍事力といったハード・パワーが世界を形成し、個人生活を左右しているのだと喧伝される毎日だが、文学および書籍そのもの、また、映画や TV ドラマ、マンガ、パフォーマンスといった、一般に文芸・芸術と呼び慣らわされているソフト・パワーについて検討し、考察し得たことの意義は大きい。こうした文化活動の所産は、ある特定の国の特定の地方で収穫された葡萄から特産ワインが醸造されるように、ある特定の土地や時代に限定されるものと思いがちである。文化 (culture) と農耕 (agriculture) のラテン語の語義に基づくアナロジーは繰り返し指摘されるところだが、正にその通りである。そして農産物同様、文化的所産も国境や海や山を越えて流通し、障壁を乗り越え、大いに異なる環境に適応していくものなのである。この文化の流通過程には、実に多くの人間が関わっており、その一人一人が文化媒介者 (= 翻訳者) として、その弛まぬ努力と仕事を評価され、認められるべきである。一方で、文化の流通は、普通の世界、普通の人々の暮らしにおいては、ごく自然なことでもある。そのプロセスを学ぶにあたっては、これを忘れてはなるまい。

文化の流通のプロセスを考えると、最も明らかな例はストーリーであろう。技巧を凝らして組み立てられたプロットとテーマや登場人物、状況をも包摂するストーリーが翻訳、翻案、変換、変容によって時空を超えていくのである。だが、実は、時空を超えて移動するものは何もない。紀元前 5 世紀にソフォクレスの『オイディプス王』に登場するオイディプスは決してオリジナルなどではない。それだけでなく、彼は様々なテキストの中に、また、世界中で上演されるソフォクレスの悲劇の舞台において、今もなお存在し続けている。同時に、オイディプスのストーリーは『海辺のカフカ』という日本の小説に、その英語翻訳版の小説に、この翻訳版から翻案された英語劇に、さらには日本語への「再翻訳」劇である蜷川幸雄のパフォーマンス・テキスト『海辺のカフカ』にも存在している。今回のシンポジウムでは、オイディプスよりも新しいストーリーが、文学テキストやパフォーマンス、映画その他のメディアに繰り返し登場することも確認できた。こうしたストーリーの言語的要素は翻訳によって、また、身体的、視聴覚的要素は翻案によってジャンルを超え、政治的・宗教的な制約といった障壁を超えていく。ストーリーが新たな土地で、新たな時代において、新たに具現化されるときには変換や変容という結果になる。

文化の流通プロセスを研究するためには、研究者は本当の、あるいはオリジナルのストーリーを探し求めるだけでなく、また複数の言語を習得するだけでなく、このプロセスに参加することが求められる。その際、プロセスを規制したり、あるいは管理することがあってはならない。はじめに述べたように、文化の流通は自然なプロセスである。文化本質主義によって、この流れを遮ったり、阻んだりしてはなるまい。ある一つの文化がもう一つの別の文化に影響を与えるといった考え方は文化を分裂させ、不和を引き起こすものだ。文化が過去何千年にもわたって流通を続けていることを認め、翻訳、翻案、変換、変容の緻密な分析を通して、文化の流れをさらに推進し、進展させる方策を共に探し求めていきたいものである。

課題番号	総 15-022 継続 総 14-024
------	----------------------------

## 平成 27 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 28 年 4 月 26 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

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題 新規遺伝子制御薬 PI ポリアミドの創薬と iPS 細胞誘導法開発		
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・PI ポリアミドの前臨床試験
○研究分担者		
松本 宜明	薬学部・教授	PI ポリアミドの薬物動態
青山 隆彦	薬学部・助教	PI ポリアミドの薬物動態・毒性・安全性試験
花澤 重正	生物資源科学部・教授	蛋白細胞導入法開発
舩廣 善和	生物資源科学部・准教授	山中因子スタビロン作成
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>1. 平成28年度日本医療研究開発機構 (AMED) 研究費 (医療技術実用化総合研究事業)、研究課題名 (公募番号) : 進行性腎障害に対する新規バイオ医薬ピロール・イミダゾールポリアミドの非臨床試験 (272110101)、研究代表者: 福田 昇、不採択</p> <p>2. 平成28-29年度 科学研究費助成事業 基盤研究 (C) 「ヒト疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝性尿管疾患診断法の確立」代表者: 羽毛田公、分担者: 福田 昇、採択助成金: 490万円/3年間</p> <p>3. 平成28年度 日本学術振興会 平成28年度二国間交流事業 共同研究 (日本・エジプト) 「糖尿病性腎症の進展を抑制する新規遺伝子制御薬PIポリアミドの開発」代表者: 福田 昇、申請中</p> <p>4. 平成28年度 武田科学振興財団「2016年度特定研究助成」申請番号 (2016081179)、「難治疾患に対する次世代バイオ医薬ピロール・イミダゾールポリアミドの創薬開発」代表者: 福田 昇、申請中</p>		

※ 「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。

部科校名：総合科学研究所

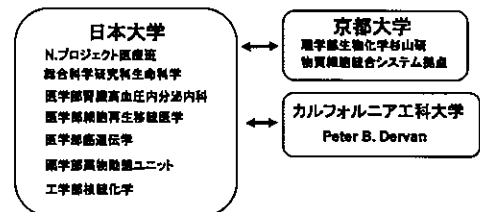
氏名：福田 昇

## 4 研究目的

昨今、ケミカルライブラリーからの実地医薬の開発は困難で、その確立は 32,500 分の 1 である。そこで、新薬としてバイオ医薬が注目されている。ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドは DNA 認識抗生剤から発見されたピロールとイミダゾール基からなる低分子有機化合物であり、2 本鎖 DNA に塩基特異的に結合し、ターゲット遺伝子プロモーターに結合するよう設計すると、転写因子の結合を阻害し遺伝子発現を抑制する。PI ポリアミドは、有機化合物であり核酸医薬と異なり生体内で安定で、DDS を必要とせず全ての細胞の核に取り込まれ、いかなる遺伝子にも自由に分子設計できる全く新しいバイオ医薬であるが、未だ実地医療への臨床応用は成されていない。PI ポリアミドは合成に高度な手法が必要で、大量合成が難しく、世界ではカルフォルニア工科大学、スクリプス研究所、京都大学と日本大学でのみ創薬開発を行っており、カルフォルニア工科大学、京都大学、日本大学は PI ポリアミドについてコンソーシアム（下図）を組んで研究を共有している。日本大学では N.研究プロジェクトにて独自の創薬開発を行い、TGF-β1 に対する PI ポリアミドを知財化し、前臨床試験として実験動物中央研究所との共同研究として、ヒト TGF-β1 に対する PI ポリアミドをマーマセットでの疾患モデルにて前臨床試験を行った。

一方、ヒト iPS 細胞由来網膜細胞の臨床試験が日本で開始されようとしている。しかしウイルスベクターやプラスミドによる安全性、発癌性の問題がある。そこでウイルスベクターやプラスミドを用いない化合物による iPS 誘導法の研究が盛んである。基本的には TGF-β1 の抑制が iPS 誘導に重要であり、そこでヒト TGF-β1 に対する PI ポリアミドを用いて日本大学方式の iPS 誘導法を研究を行った。

核酸認識化合物とその生物学的応用コンソーシアム



## 5 研究概要

## 1. 腎不全モデルに対するヒト TGF-β1 PI ポリアミドの薬物効果の検討

ヒトの TGF-β1 遺伝子プロモーターを認識する PI ポリアミドのリード化合物 (GB1101) を実地医薬として開発する過程において、前臨床試験としてヒトゲノムと高い遺伝子相同性をもつマーマセットに、シクロスポリン腎不全モデルを確立し、ヒト TGF-β1 PI ポリアミドを経静脈的に全身投与し、腎障害への効果を確認その成果を基に日本医療研究開発機構 (AMED) 共同でヒト TGF-β1 の PI ポリアミドの GLP 試験、GMP 大量合成を目指した。

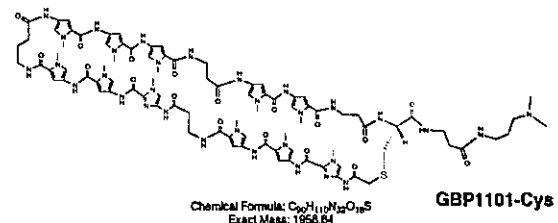
## 2. PI ポリアミドの薬物動態、安全性の検討

薬学部において TGF-β1 の PI ポリアミドをエマルジョン化し、安定性と筋肉内投与、経静脈的投与で体内分布から投与経路の最適化を行った。

## 3. 環状型 PI ポリアミドの薬物効果、創薬開発

新規に環状型 PI ポリアミドの薬効、薬物動態を従来のヘアピン型 PI ポリアミドに比較検討し、その有効性を確認したら、環状 PI ポリアミドの創薬開発を開始した。

\* ヒト TGF-β1 に対する環状 PI ポリアミドの構造 (右図)



## 4. スタビロンと PI ポリアミドによる iPS 細胞誘導法開発

生物資源科学部の花澤・舩廣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 因子する。最近 iPS 誘導に TGF-β1 抑制が必須であることが分かり、さらに TGF-β1 に対する PI ポリアミドを用いて安全な日本大学方式の iPS 細胞誘導法を確立を試みた。

部科校名：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. 腎不全モデルに対するTGF- $\beta$ 1PIポリアミドの薬物効果の検討

実験動物中央研究所と日本大学との共同研究契約を平成27年度も継続し、霊長類マーモセットの実験は当研究費に基づき実験動物中央研究所マーモセット研究部にて以下の実験を行った。

サイクロスポリンA腎症に対するヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドの薬物効果の検証としてヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミド(GB1101)1mg/kgBWを週1回、4週間投与し、蛋白尿、BUN、クレアチニンの増加を認めた。

4週間後に腎臓を摘出し、H&EおよびMasson's Trichrome染色で腎線維化、細胞浸潤、糸球体の効果性変化を認めた。摘出した腎臓ではTGF- $\beta$ 1の免疫染色はヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドの投与で減弱し、ヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドの腎障害への効果を認めた。

## 3. PIポリアミドの薬物動態・安全性の検討

## 1) 薬物動態

PIポリアミドの分子構造とこれらの薬物動態パラメータとの相関関係を調べることにより、設計したPIポリアミドの分子構造より体内動態を予測することが可能となる。これまでに調べたPIポリアミドのクリアランス、分布容積および血漿タンパク結合率と、分子構造を数値的に表す分子記述子との相関関係を調べ、構造-薬物動態相関モデルを構築する。さらにPIポリアミドのエマルジョン化を行い、新規剤形を検討した(薬学部)。エマルジョン化ラットTGF- $\beta$ 1のPIポリアミドをラットに筋肉投与し、マイクロフルイダイザーにより、リン脂質を用いて直径100-300nmのエマルジョンを調製する。エマルジョンの安定性と体内分布で十分に腎臓、血管、肺、肝臓への取り込みを確認した。エマルジョンによる投与経路の最適化を行った。

## 2) 毒性安全性試験(薬学部松本、青山)

- 大量投与安全性試験としてPIポリアミドをマウスの静脈内に大量単回投与し、致死量を決定、組織学的検査を行った。

- PIポリアミドのマウスでのLD50の決定:PIポリアミドをB6マウスの尾静脈からに投与した場合に、半数が試験期間内に死亡する用量のことで、投与した動物の50%が死亡する用量を体重当たりの量(mg/kg)として表す。用量-死亡率のグラフを描き、死亡率50%に相当する用量(LD50)として30mg/Kgであった。

- 反復投与毒性試験では、大量のPIポリアミドをマウスに投与し、体重、摂餌量、飲水量、血液化学的検査、尿検査、組織学的検査を検討し、20mg/kgのPIポリアミドの投与量では全く副作用を認めなかった。

## 4. 環状型PIポリアミドの薬物効果、創薬開発

これまでのPIポリアミドの構造はヘアピン型で、Kd値は $10^{-9}$ Mであったが、2本鎖DNAへの結合が不安定になることが問題であったが、サークルPIポリアミドは安定な結合で、100分の1の濃度で結合する。日本大学では京都大学理学系研究科との共同でサークルPIポリアミドの合成に成功した。そこで今回、サークルPIポリアミドの薬効、薬物動態をヘアピンPIポリアミドに比較検討し、創薬開発を開始する。合成開発は京都大学板東が行い、充分の環状PIポリアミドの合成を行った。

1) 環状PIポリアミドの高効率大量合は反応性の高いPEG系レジン、反応性の高い縮合剤やNMPなどの反応試薬や溶媒の検討などによりPIポリアミド固相自動合成の条件をより最適化し、固相合成機反応カラムで20倍程度の反応スケールで、安価な大量合成を開発し、99%の純度で、100g単位での大量合成を行った。

部科校名：総合科学研究所

氏名：福田 昇

## 研究結果（つづき）

- 2) 薬物動態：環状PIポリアミドにFITCラベルし、ラットに静脈し、UV-HPLC系での薬物動態を判定し、ヘアピンPIポリアミドの薬物動態と比較し、環状PIポリアミドの高効率な臓器への取り込みを認めた（薬学部）。
- 3) 動物での毒性安全性試験：環状PIポリアミドをマウスの静脈内に大量単回投与し、致死量、LD50を決定し、体重、摂餌量、血液化学尿検査、組織学的検査を検討した（薬学部）。
- 4) 腎不全マーモセットモデルでのTGF- $\beta$ 1の環状PIポリアミドの薬物効果：実験動物研究所との共同研究腎不全マーモセットモデルにエマルジョン化ヒトTGF- $\beta$ 1の環状PIポリアミドを週1回筋肉内投与する。尿中クレアチニン、総蛋白質量、アルブミン量を測定し、腎障害への効果を確認した。

## 5. スタピロンとPIポリアミドによるiPS細胞誘導法開発

1) ヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドを用いたEMT誘導型上皮細胞株におけるMET誘導効果の検討

ヒトTGF- $\beta$ 1特異的PIポリアミドはヒトTGF- $\beta$ 1プロモーター領域に設計可能なもので現在3種類設計済みであり、既にヒト血管平滑筋細胞においてTGF- $\beta$ 1の遺伝子、タンパク質発現を抑制することを確認している。まずEMT誘導型上皮細胞に投与し、METへの誘導効果があるか評価する。PMAを100nMの濃度でEMTを誘導したヒト上皮細胞株に、作製したPIポリアミドをそれぞれ単独、もしくは複数組み合わせ、10nM、100nM、1 $\mu$ M等の濃度で投与し、投与後24、48、72時間後のMETの誘導を細胞の形態変化、リアルタイムPCR法によるEMTマーカーの遺伝子発現解析で評価し、EMTの抑制を認めた。

2) ヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドによるヒトiPS細胞誘導効率の検討

ヒトTGF- $\beta$ を標的としたPIポリアミドを用いて、ヒトiPS細胞の誘導を試みる。既存のヒトiPS誘導法は、iPS細胞の発見者である京都大学iPS細胞研究所(CiRA)の山中らが開発した方法で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CytoTune<sup>®</sup>-iPS(DNAVEC, DV-0301)を使用する。PIポリアミドを投与するタイミングを①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、②ヒトiPS誘導培地添加時の2点に分けて、10nMから1 $\mu$ M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、比較検討した。

3) MTM-Stabilon-初期化因子のタンパク質発現系とヒトTGF- $\beta$ 1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

花澤、舩廣との共同で、MTM-Stabilon-初期化因子(Gli3, Sox2, Oct4, Klf4)の融合タンパク質発現系により、精製した融合タンパク質とヒトTGF- $\beta$ 1プロモーター特異的PIポリアミドを直接細胞に投与し、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細胞と比較検討した。誘導法において、投与するヒトTGF- $\beta$ 1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は②で行った検討の結果を考慮し応用する。作成できたヒトiPS細胞を何代か継代しつづき、自己増殖能を確認した。

また他の組織への分化能を評価する。染色体の状態を染色体核型解析、マウスへの移植によるテラトーマ形成観察を行い、作製したiPS細胞の遺伝的な安全性を確認した。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。