


* 課題番号	個08-101
--------	---------

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 3月 31日

日本大学 総長 殿

氏 名 川戸 貴行 
 所属・資格 歯学部・助教
 ()

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人) / <input type="radio"/> 一般研究(共同) / <input type="radio"/> 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	骨芽細胞の石灰化物形成と破骨細胞分化調節因子の発現に及ぼす酪酸の影響の解明	
3 研究の目的	<p>歯周ポケット内の嫌気性歯周病原菌は代謝産物として酢酸, プロピオン酸および酪酸などの短鎖脂肪酸を産生し, 歯周ポケット内におけるこれらの短鎖脂肪酸の濃度は, 歯周病の進行に伴って上昇することが報告されている。酪酸は, その中で最も多く産生され, 上皮細胞の増殖を抑制し, T細胞のアポトーシスを誘導するなど, 歯周組織の免疫応答との関与が示唆されている。本研究は, 歯周病原嫌気性菌由来の酪酸が, 歯肉上皮を浸透し歯槽骨組織にも作用することを想定し, 酪酸が骨代謝に及ぼす影響を調べることを目的として, ヒト骨芽細胞を用いて in vitro での石灰化 nodule 形成と nodule 中のカルシウム量, アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性, および細胞外マトリックスタンパクの発現に及ぼす酪酸の影響について検討した。また, 骨芽細胞によって産生される破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を促進するマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) および分化を抑制する osteoprotegerin (OPG) の発現について調べ, 骨芽細胞による破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化, 誘導調節機能に与える酪酸の影響についても検討した。</p>	
4 研究の概要	<p>本研究では, 骨芽細胞としてヒト正常骨芽細胞 (NH0st, Cambrex) を用いた。NH0st 細胞の培養は 10%ウシ胎児血清と ascorbic acid, 30 mg/ml ゲンタマイシンおよび 15 μg/ml アンホテリシン-B を含む OBM 培地 (Cambrex) を用いて行った。NH0st 細胞を刺激する際の酪酸ナトリウム塩は, 10⁻² M から 10⁻⁸ M までを 10 倍連続希釈した濃度とし, 5% 炭酸ガス雰囲気下で 12 日間培養した。</p> <p>細胞増殖は cell counting kit を用いて細胞数を算定して求めた。ALPase 活性値は, p-ニトロフェニルリン酸を基質とし, 酵素反応の結果生じる p-ニトロフェノール量を測定して調べた。石灰化 nodule の形成は Alizarin red で染色後に観察を行い, nodule 中の Ca 蓄積量はカルシウム E テストワコーを用いて定量した。</p> <p>細胞外基質タンパクである I 型コラーゲン, 骨シアロタンパク (BSP) およびオステオポンチン (OPN), 破骨細胞分化調節因子である M-CSF および OPG の遺伝子発現は real-time PCR 法, タンパク発現は Western blot 法または ELISA 法で分析した。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の (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：川戸 貴行

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

結果

1. 細胞増殖

酪酸ナトリウム塩を 10^{-2} M から 10^{-8} M までの 10 倍連続希釈となるように添加，調整した培地で細胞を 12 日間培養し，NH0st 細胞の細胞増殖量を測定した。その結果， 10^{-4} M から 10^{-8} M の酪酸ナトリウム塩の添加条件では，細胞の増殖に影響は認められなかったが， 10^{-3} M の酪酸ナトリウム塩では細胞の増殖が抑制され， 10^{-2} M では細胞が死滅した。この結果から，NH0st 細胞の骨芽細胞としての機能を分析する際の酪酸ナトリウム塩の培地への添加条件は，0 M (control)， 10^{-4} M， 10^{-6} M， 10^{-8} M とした。

2. ALPase 活性

NH0st 細胞の ALP 活性は 10^{-4} M から 10^{-8} M の酪酸ナトリウム塩の刺激による影響は認められず，control を含むすべての条件で，培養 3 日目から 12 日目にかけて上昇した。

3. 石灰化 nodule 形成と nodule 中の Ca 蓄積量

石灰化 nodule の Alizarin red 染色性は，すべての培養条件において 3 日目から 10 日目にかけて経日的に染色性が増加した。培養 10 日目における Alizarin red 染色性は，control よりも 10^{-4} M 酪酸ナトリウム塩添加条件で高かった。さらに，培養 10 日目における nodule 中の Ca 蓄積量は 10^{-4} M 酪酸ナトリウム塩の添加によって，コントロールよりも有意に増加した。

4. 細胞外基質タンパクの発現

I 型コラーゲン，BSP および OPN の遺伝子発現は，すべての培養条件において 3 日目から 10 日目にかけて経日的に増加し，12 日目でやや減少した。I 型コラーゲンの遺伝子発現には，酪酸ナトリウム塩の添加による影響はほとんど認められなかったが，BSP および OPN の遺伝子発現は 10^{-4} M 酪酸ナトリウム塩の添加によって有意に増加した。培養 10 日目における BSP および OPN のタンパク発現もまた， 10^{-4} M 酪酸ナトリウム塩の添加によって有意に増加した。

5. M-CSF および OPG の発現

M-CSF の遺伝子発現は，すべての培養条件において 3 日目から 10 日目にかけて経日的に増加し，12 日目でやや減少する傾向が認められた。M-CSF の遺伝子発現には酪酸ナトリウム塩の添加による影響はほとんど認められなかった。OPG の遺伝子発現はすべての培養条件において培養 3 日目から 12 日目にかけて経日的に増加した。OPG の遺伝子発現は 10^{-4} M 酪酸ナトリウム塩の添加によって有意に増加した。培養 10 日目および 12 日目における OPG のタンパク発現もまた， 10^{-4} M 酪酸ナトリウム塩の添加によって有意に増加した。

結論

酪酸は，骨芽細胞による BSP および OPN 発現増加を介して石灰化 nodule 形成を促進し，OPG 発現増加によって破骨細胞分化を抑制することが示唆された。

注：課題番号を記入してください。

平成 20 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 3 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 山崎 洋介



所属・資格 歯学部・助教

(助手)

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人) / <input type="radio"/> 一般研究(共同) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	真皮間充織線維系の形成過程における lysyl oxidase 発現パターンの解析	
3 研究の目的	ニワトリ胚の肢芽における lysyl oxidase (LOX) の発現パターンの解析を、発生の時間軸に沿って real-time RT-PCR 法により定量的に検討し、明らかにする。また、免疫組織化学的検索を併せて行い、肢芽間充織における LOX の発現パターンをタンパクレベルでも明らかにする。	
4 研究の概要	LOX は、collagen や elastin の分子内あるいは分子間の架橋形成を触媒し、線維の安定化の上で極めて重要な酵素である。申請者はこれまで、ニワトリ胚を実験モデルとして用い、とくに肢芽におけるマイクロフィブリルの形成について免疫組織化学的な検索を行ってきた (Isokawa ら, Anat Rec, 2004)。肢芽の真皮予定域では、発生 10 日目以降にピクロシリウス染色によって検出される膠原線維の増生に先行して、fibrillin (マイクロフィブリルを構成するタンパクのひとつ) が免疫組織化学的に検出されている。また、そうしたマイクロフィブリルへの elastin の沈着は、発生 13 日目以降に初めて検出される (Yamazaki ら, Anat Rec, 2007)。したがって、線維形成の進行に伴う LOX の発現とその機能的な意義を明らかにすることは意義深いといえる。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の (☑・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：山崎 洋介

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究では、鶏胚後肢芽の真皮形成予定域の間葉組織を検索対象とした。すなわち、免疫組織化学あるいは組織化学的にマイクロフィブリルの存在と elastin 沈着、そして、膠原線維の増生の過程が捉えられる発生 4~20 日目の後肢芽を本研究のサンプルとした。免疫組織化学では、鶏胚後肢芽 足根中足部(tarsometatarsus)を、4% パラホルムアルデヒド-PBS にて固定し、Morse の脱灰溶液 (Morse, 1945) にて脱灰した後、通法に従って凍結切片を作成し、免疫組織化学に供した。用いた 1 次抗体は anti-human LOX 抗体 (IMX-5121, Imgenex) で、HRP 標識 2 次抗体と反応させた後、DAB によって発色を行った。膠原線維の増生を観察するために Picrosirius polarization 法を用いた。LOX mRNA の real-time RT-qPCR では、LOX の PCR プライマーは、Primer3 によって設計し、BLAST 検索によってプライマーの特異性を確認した後、解析に供した。試料は、未固定凍結切片とし、Laser microdissection 法によって真皮予定領域のみを採取し、発現解析に供した。通法に従って抽出した total RNA をランダムプライマーで cDNA とし、PCR テンプレートとした。増幅には Smart Cycler (タカラバイオ)を、また、結果の解析には Smart Cycler software を用いた。内部標準としては glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子を利用した。

免疫組織化学的検索では、真皮予定領域における LOX の発現は間葉組織中で、検索対象としたいずれの日齢においても広範で弱い LOX 反応が認められた。

Picrosirius 染色では、ED10 で膠原線維の存在を示す緑色の偏光が観察され始め、ED13 以降で膠原線維の増生が認められた。

LOX mRNA 発現の real-time RT-qPCR 解析では、真皮予定域において、ED 4 以降発現量を増した LOX は ED17 において発現量のピークになり、ED20 では再び発現量を減じた。一方、表皮においては、経日的に LOX 発現量が増す傾向が認められた。

つまり、膠原線維が増生する時期に、その成熟に関わる LOX mRNA の発現が増加する結果が示された。しかし、LOX の mRNA 発現のパターンと免疫染色で示されたパターンとは一致しなかった。発生の進行にともなって、真皮予定域の単位面積当たりの細胞数が減少することによる影響に加えて、LOX mRNA の翻訳調節が生じている可能性も考えられた。

部科校名：歯学部

氏名：山崎 洋介

研究の結果（つづき）

本研究成果に基づき以下の発表を行った。

鶏胚後肢芽の真皮予定域における lysyl oxidase の発現, 第 114 回日本解剖学会全国学術集会, 2009
年 03 月 28 日, 岡山

Temporospatial expression of lysyl oxidase in the presumptive dermis of chick limb bud., The
48th ASCB annual meeting, 2008 年 12 月 16 日, サンフランシスコ (米国)

成果を纏めた論文は, 英文学術誌に投稿準備中である。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 1月 26日

日本大学 総長 殿

氏 名 津田 啓方



所属・資格 歯学部・助手

()

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人) / <input type="radio"/> 一般研究(共同) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	歯周病細菌由来物質の上皮浸潤に影響を及ぼす因子の探索—新規予防法開発に向けて—	
3 研究の目的	歯周疾患の原因は歯垢中の細菌であり、歯周病原細菌の菌体成分や代謝産物が生体細胞に影響を及ぼすことによって発症すると考えられている。現在まで多くの研究がなされてきたが、菌体由来成分が各組織に浸透していくメカニズムはよく理解されていない。本研究ではこの浸透メカニズムを解明する為の基礎データを収集し、さらに、菌体由来成分の浸透を抑制する物質を食品由来成分等からスクリーニングすることを目的とした。	
4 研究の概要	まず、いくつかの歯周病細菌菌体由来成分がヒト歯肉上皮細胞 Ca9-22 細胞に及ぼす影響を調べた。そのうち、細菌代謝産物である酪酸が Ca9-22 細胞の細胞死を引き起こした。次にこの細胞死がアポトーシスかどうかを調べたところ、アポトーシスのマーカーである蛍光ラベルしたアネキシンVの細胞表面への結合が観察され、カスパーゼ3の活性が誘導された。また、アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 の発現も抑制された。ところが、アポトーシスの実行分子といわれているカスパーゼの阻害剤は酪酸による細胞死を部分的にしか抑制しなかった。そこで、近年細胞死との関連が言われているオートファジーのマーカーを調べたところ、酪酸刺激により LC3 分子発現の増加、LC3 分子のオートファゴソームへの蓄積が認められた。また、酪酸刺激により誘導される細胞死はオートファジー阻害剤でほぼ完全に抑制された。これらのことから、歯周病細菌代謝産物の酪酸が歯肉上皮細胞にオートファジーを介した細胞死を引き起こす事が示唆された。加えて、植物由来成分の一つが酪酸刺激による細胞死を阻害するデータを得ている。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

部科枝名：歯学部

氏名：津田 啓方

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

菌体由来成分の歯肉上皮内浸潤を調査するにあたり、まず、様々な歯周病細菌菌体由来成分の中から最も実験に適した成分を選択する為の実験を行った。現実的にあり得る濃度の細菌由来成分をヒト歯肉上皮細胞 Ca9-22 に作用させたところ、酪酸が 0.5~10 mM の濃度において濃度依存的に細胞死を有意に誘導した。酪酸は歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* や *Fuobacterium nucreatum* などが大量に産生する代謝産物であり、成熟した歯垢中には最大約 14mM 存在すると報告されている。この細胞死は歯周病原細菌由来成分が下部組織に浸達ために役に立っている可能性があるため、本事象を深めて研究することとした。

次に、どのようなメカニズムが働いて酪酸がヒト歯肉上皮細胞 Ca9-22 細胞の細胞死を引き起こすのかを調べるため、まず、アポトーシスのマーカーを調べた。まず、FITC ラベルしたアネキシン V の細胞表面への結合を調べたところ、酪酸刺激 1 2 時間以降で有意に結合の増加が認められた。また、アポトーシスの実行分子と言われているカスパーゼ 3 の活性を調べたところ、1 2 時間以降でコントロールにと比較して約 3 倍増強した。さらに、アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 の発現が抑制された。ところが、広範囲カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK は酪酸による細胞死を部分的にしか抑制しなかった（約 20% 抑制）。

そこで、近年細胞死との関連が多数報告されているオートファジーのマーカーを調べることにした。酪酸刺激により LC3 分子発現の増加と LC3-I 分子の LC3-II 分子への転換がウエスタンブロット法にて確認され、LC3 分子のオートファゴソームへの蓄積の増加が蛍光免疫染色法にて観察された。また、酪酸刺激により誘導される細胞死はオートファジー阻害剤でほぼ完全に抑制された。これらのことから、歯周病細菌代謝産物である酪酸が歯肉上皮細胞にオートファジーを介した細胞死を引き起こす事が示唆された。

これらのデータから、歯周病原細菌の代謝産物である酪酸は歯肉上皮の破壊を起こし、さらに下部の結合組織に浸潤する可能性が示唆された。今まで報告されている様に酪酸が結合組織に存在する細胞へ様々な影響を及ぼす事を合わせて考えると、歯垢中の歯周病細菌が産生する酪酸が歯周病発症の初期において重要な役割担っている可能性がある。

さらに、いくつかの食品由来物質がこの酪酸誘導細胞死に及ぼす影響を調べたところ、植物由来成分が有意に細胞死を抑制することを確認した。

今後は酪酸によるオートファジーを介した細胞死誘導のメカニズムを探ると共に、植物由来成分が酪酸誘導細胞死抑制を引き起こすメカニズムとの関連を調べ、同成分を用いた歯周病予防法の開発を試みる。また、歯周病原細菌の酪酸産生阻害株を作成し、それが歯周病モデル動物実験にて本当に酪酸が歯周疾患を引き起こす原因となっているかどうかを調べる。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成20年3月17日

日本大学 総長 殿

氏 名 高見澤俊樹



所属・資格 歯学部・助教

()

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人) / <input type="radio"/> 一般研究(共同) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	高強度フロアブルレジンの臼歯修復への応用	
3 研究の目的	<p>フロアブルレジンは操作性に優れるところから、その臨床使用頻度が増加している。しかし、ユニバーサルタイプの光重合型レジと比較すると、その物性が劣っていたところから、広範囲の実質欠損あるいは臼歯部での応用に際しては、その長期安定性に疑問が残るところであった。そこで、無機フィラー含有量の増加あるいはモノマー組成の改良を行ない、その機械的性質を向上させた高強度のフロアブルレジが開発、市販された。そこで、これら高強度フロアブルレジンの諸性質を明らかにするとともに口腔内環境を想定した摩耗試験を行うことで、フロアブルレジンの臼歯修復への臨床使用術式を確立することを目的とした。</p>	
4 研究の概要	<p>1) 無機フィラー含有量 示差熱天秤 (TG/DTA 6300, Seiko Instrument) を用いて、フロアブルレジンの無機質フィラー含有量を測定した。</p> <p>2) 熱膨張係数 2×2×13 mm の棒状試片を製作し、これを熱膨張係数測定用試片とした。熱機械分析装置 (TMA/SS 6300, Seiko Instrument) を用いて 25～130℃まで加熱し、30～80℃間の平均熱膨張係数を求めた。</p> <p>3) 吸水試験 レジ硬化物に対して乾燥、吸水飽和、再乾燥をそれぞれ4週間行い、単位面積あたりの吸水量を求めた。</p> <p>4) 歯ブラシ摩耗試験 硬化レジンに対して SiC ペーパーの#600 まで研磨した試片に、歯ブラシ摩耗試験機 (2 連磨耗試験機 K706-02, 東京技研) を用い、磨耗試験を 100,000 回まで行った。磨耗量の測定は磨耗試験前後の重量から吸水量を引いたものを試片に対する磨耗量とし、試片の体積および密度から、磨耗量を体積比率に換算して求めた。</p> <p>5) SEM 観察 歯ブラシ摩耗試験前後の表面性状を FE-SEM(ERA-8800FE, Elionix)を用いて観察した。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ ・ 研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の 是 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：高見澤俊樹

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

フロアブルレジンとして Clearfil Flow FX (Kuraray Medical 以後, FX), Estekite Flow Quick (Tokuyama Dental, 以後 EQ), Beautifil Flow F02 (Shofu, 以後 F02), Supreme Flowable (3M ESPE, 以後 SF) および Clearfil Majesty LV (Kuraray Medical, 以後 CM) の 5 製品を用いた。また, ユニバーサルタイプのコンポジットレジンとして Clearfil AP-X (Kuraray Medical, 以後 AP), Estelite Σ (Tokuyama Dental, 以後 E Σ), Beautifil II (Shofu, 以後 BII), Supreme XT (3M ESPE, 以後 XT) および Majesty Posterior (Kuraray Medical, 以後 MP) の 5 製品, 計 10 製品を用いた。

1) 無機フィラー含有量

フロアブルレジンの無機質フィラー含有量は, 48.7~78.6 wt%の範囲を示し, F02 で最も低い値を CM で最も高い値を示した。一方, ユニバーサルタイプでは, 68.3~88.1 wt%の範囲を示し, E Σ で最も低い値を MP で最も高い値を示した。また, フロアブルレジンとユニバーサルタイプを比較するとその無機質フィラー含有量は, ユニバーサルタイプで高い傾向を示した。

2) 熱膨張係数

得られた熱膨張係数は, フロアブルレジンでは 37.7~66.9 ($\times 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$)の範囲を示し, CM で最も低い値を F02 で最も高い値を示した。一方, ユニバーサルタイプでは 16.7~42.1 ($\times 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$)の範囲を示し, MP で最も低い値を E Σ で最も高い値を示した。いずれのタイプのコンポジットレジンにおいても無機質フィラー含有量の増加に伴って熱膨張係数が低下する傾向を示した。

3) 吸水試験

フロアブルレジンの吸水量は, 8.4~18.6 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ の範囲を示し, CM で最も低い値を F02 で最も高い値を示した。一方, ユニバーサルタイプでは 3.7~12.8 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ の範囲を示し, MP で最も低い値を示し, E Σ で最も高い値を示した。いずれのタイプのコンポジットレジンにおいても無機質フィラー含有量の増加に伴って吸水量が低下する傾向を示した。

4) 歯ブラシ摩耗試験

摩耗試験前後の重量から吸水量を引いたものを試片に対する摩耗量とし, 試片の体積および密度から, 摩耗量を体積比率に換算して求めた。フロアブルレジンの摩耗率は, 0.18~0.87 (vol %) の範囲を示し, EQ で最も小さく, F02 で最も大きな値を示した。ユニバーサルタイプの摩耗率は, 0.05~0.66 (vol %) の範囲を示し, P1 で最も小さく, E Σ で最も大きな値を示した。

5) SEM 観察

歯ブラシ摩耗試験前後の表面性状の SEM 観察から, いずれのレジンにおいても摩耗試験前では研磨の際の削条痕が認められた。一方, 試験後の SEM 観察では, いずれのレジンにおいても選択的にマトリックスレジンが摩耗し, フィラーが突出した像が観察されたものの, 用いた製品によって異なる傾向を示した。すなわち, 不定形フィラーを有するレジンにおいてはフィラーの突出した像のみならずフィラーが脱落した像が観察されたに対して, 球状フィラーを有するレジンにおいては, フィラーの脱落像は少なかったものの, 広範囲に渡る表面のうねりが観察された。

以上の結果から, 供試したレジンの機械的性質あるいは歯ブラシ摩耗量は, 製品によって異なる傾向を示すことが判明した。また, いずれのレジンにおいても無機フィラー含有量の増加に伴って, 機械的性質が向上する傾向を示した。機械的強度が懸念されているフロアブルレジンにおいても製品によっては, 十分な機械的性質あるいは耐摩耗性を有するところから臼歯部への応用が可能であることが示唆された。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 4月 3日

日本大学 総長 殿

氏 名 林 誠



所属・資格 歯学部・准教授

(助教)

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人) / <input type="radio"/> 一般研究(共同) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	硬組織形成に関与する材料がヒト歯髄細胞に与える影響について	
3 研究の目的	<p>歯髄の保存はその後の歯の寿命を大きく左右する重要な要素と考えられている。そのため露髄を適切な材料で保護し、歯髄を保存する直接覆髄法は重要な歯髄保存療法のひとつである。</p> <p>直接覆髄材には、従来から水酸化カルシウム製剤が第一選択として臨床応用されてきた。しかしながら、その有用性に対してはいくつかの問題点が報告されており、理想的な直接覆髄剤の開発が望まれている。本研究の目的は間葉系細胞の硬組織形成に関与するとされている材料を使用し、ヒト歯髄細胞の分化に与える影響を解析し、直接覆髄材としての有用性を検討することである。</p>	
4 研究の概要	<p>供試材料は試験材料として Mineral Trioxide Aggregate (MTA)、5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR)、ポリリン酸を使用し、対照試料としては従来から広く用いられている代表的な直接覆髄剤である水酸化カルシウム製剤の Dycal (Dentsply 社製)を使用した。</p> <p>硬組織形成能に関しましては以下の3項目について行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・位相差顕微鏡を利用して細胞形態の観察 ・歯髄細胞の増殖に与える影響について経時的に Cell Counting Kit を使用して解析 ・歯髄細胞のアルカリフォスファターゼ活性に与える影響について経時的に解析 ・歯髄細胞のタイプIコラーゲンの遺伝子発現に与える影響について解析 	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の (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：林 誠

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

歯髄細胞は治療を目的として抜去された歯より歯髄組織を採取し、10%FBS添加の α -MEM培地にて継代培養したものを使用した。供試材料は cell culture insert に静置させ、cell culture plate に歯髄細胞を播種した。



【歯髄細胞の形態学的観察】

供試材料と歯髄細胞の共培養における細胞形態の観察では MTA、AICAR ならびにポリリン酸ともに細胞形態に大きな違いは認められなかった。すなわち、位相差顕微鏡による観察では供試材料下に多数の生細胞を確認し、材料を静置しなかったコントロールと同様な細胞形態であった。これらのことからすべての供試材料が高い生体親和性を有しているものと推察された。

【歯髄細胞の増殖に与える影響】

供試材料が細胞増殖に与える影響について Cell Counting kit を使用して7日間まで測定した結果、すべての供試材料とも経日的に増加した。統計学的解析から材料を静置しなかったコントロールより MTA、AICAR、ポリリン酸で有意に高かった。しかしながら、Dycal はコントロールと統計学的な有意差は認めなかった。

【歯髄細胞のアルカリフォスファターゼ活性に与える影響】

供試材料がアルカリフォスファターゼ活性に与える影響について Paranitrophenol-phosphate を利用した比色法にて7日間まで計測を行った結果、経日的な増加を示し、AICAR とポリリン酸では材料を静置しなかったコントロールと比較して有意に高かったが、MTA と Dycal では統計学的な有意差を認めなかった。

【骨芽細胞の石灰化に与える遺伝子発現】

歯髄細胞を前述した条件下で培養して通法にしたがい RNA を分離し、歯髄細胞の石灰化に関与している代表的な細胞外マトリックスであるタイプ I コラーゲンの遺伝子発現を経時的に PCR 法にて、現在解析している。PCR プライマーのデザインと DNA ポリメラーゼによる DNA の増幅条件は、本解析において重要な事項であると思われるため、決定され次第タイプ I コラーゲンの遺伝子発現を検索する予定である。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 24 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 田 中 陽 子



所属・資格 松戸歯学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	Down 症における歯周疾患の発症と進行の抑制についての検討	
3 研究の目的	Down 症における染色体異常は、知的障害を始め様々な全身症状を引き起こしている。その一つである免疫応答不全は Down 症においてウィルスや細菌に対する易感染性を引き起こしている。そのため、嫌気性グラム陰性桿菌の感染による歯周病の罹患率が高く、早期に発症し進行が早く重篤であるとされている。しかしながら Down 症における歯周病の発症と進行のメカニズムについては依然不明な点が多い。そのため、臨床応用できるような手掛かりすらないままである。従って、本研究では歯周病を誘発する Lipopolysaccharide (LPS) に感染した後、著しい炎症症状を引き起こすのは何かに注目し、健常者と Down 症における LPS に対する応答性の違いを検討し、さらに次の段階として LPS が細胞表層の receptor で受容されたのち、細胞が炎症関連物質を産生するまでの過程での応答性の違いが何かを知るために、細胞内のシグナル伝達系についても検討を加え、炎症症状を抑える手段への手がかりを見つけることを目的とした。	
4 研究の概要	健常者および Down 症から歯の交換期、矯正による便宜抜歯もしくは齶蝕による抜歯の際に、同意を得たのち歯周組織を採取し上皮細胞および歯肉線維芽細胞の樹立を行った。樹立した上皮細胞および歯肉線維芽細胞を LPS で刺激した後、培養上清中のサイトカイン産生量を測定するとともに、各種の細胞から RNA を採取し Gene chip 解析を行うことで遺伝子発現レベルでの LPS に対する応答性の違いについて検討をした。さらに、IPA 解析にてシグナル伝達系の応答性の違いを確認するとともに、炎症関連物質を産生する細胞内シグナル伝達系で非常に重要な役割を果たしている NF-Kappa B の活性量の違いについても検討を加えた。その結果サイトカインの産生量および Gene chip 解析において上皮細胞ならびに歯肉線維芽細胞の両方において Down 症由来のものの方が有意に高く、さらにも NF-Kappa B の活性量についても同様の結果が得られた。IPA 解析については Down 症由来のものとは異なる遺伝子の動きが認められた。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

部科校名：松戸歯学部

氏名：田 中 陽 子

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究では十分な説明をし、同意を得た Down 症および健常者から、歯の交換期、矯正による便宜抜歯もしくは齶蝕により保存不可能な歯の抜歯時に周辺の歯周組織を採取し、通法に従い歯肉線維芽細胞および上皮細胞を樹立した。樹立した Down 症上皮細胞 (EDGF)、Down 症歯肉線維芽細胞 (DGF)、健常者上皮細胞 (EGF) ならびに健常者歯肉線維芽細胞 (GF) を培養した後、歯周病誘発物質である *Porphyromonas gingivalis* (P.g.)由来 LPS で刺激を加えた。LPS 刺激濃度は 10^6 細胞あたり $0.1\mu\text{g/ml}$ とし、刺激時間は 3, 6, 12, 24 時間とした。それぞれの刺激時間における培養上清から ELISA 法によって Interleukin-8 (IL-8) の産生量を測定した。その結果、いずれの刺激時間においても、IL-8 の産生量は EDGF, DGF の方が NGF, GF に比べて有意に高かった。さらに、LPS 刺激時間を 3, 6, 12, 24 時間としたが、LPS で刺激した後のシグナル伝達系に注目したため、Gene chip 解析に関しては短い刺激時間に対して行うことが重要であると考え、3 時間および 6 時間のみの解析とした。DGF および GF に関してはすべての刺激時間において採取した RNA を用いて LPS のレセプターであると考えられている CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), Toll-like receptor 4 (TLR4) および IL-8 の遺伝子発現レベルの違いを RT-PCR を利用して検出した。RNA の採取は、RNeasy Mini RNA 抽出キット (QIAGEN) を用いて行った。cDNA 合成は RT Omniscript RT Kit (Qiagen) を用いて行い、PCR は Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen) を用いて行った。産生物は 2% アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色を行った。プライマーに関しては以下に示したものをを用いた。

CD14 : CCAGTAGCTGAGCAGGAACC, CTGCAACTTCTCCGAACCTC

TLR2 : AAAATGATGTGGGCCTGGCT, GGTGTTGCACATTCCATTTCG

TLR4 : CACTCTCCAGTCTTCAAGTA, TACCCAAAATCCTTCCCCTG

IL-8 : ATTGCATCTGGCAACCCTAC, CTGCGCCAAACAAGAAATTA

RT-PCR の結果では、炎症関連物質である IL-8 は GF に比べて DGF の遺伝子発現の方が高く認められ、LPS レセプター関連では CD14 および TLR2 の遺伝子発現レベルは DGF の方が高く発現したものの、TLR4 に関しては発現に差が明確には認められなかった。過去の論文では通常 LPS 刺激に対して TLR2 は Constitutive に発現し、TLR4 が高く発現すると考えられている。従って本研究では TLR4 の遺伝子発現レベルが DGF の方が GF に比べて高くなると予測していた。しかしながら本研究の結果では TLR4 よりも TLR2 の動きが著しかった。つまり、LPS に対する応答性に DGF と GF の間には違いが生じていることが認められた。さらに高くなることが予測された CD14 に関しては予測通り DGF の方が GF に比較して高い遺伝子発現が認められたことから、何らかの異常なレスポンスが Down 症において働いていることが示唆された。

このように LPS receptor の応答性の違いが DGF と NGF において認められたため、前述のように次の段階として炎症関連物質を産生する細胞内シグナル伝達系で非常に重要な役割を果たしている NF-Kappa B の活性量の違いについて LPS を 2×10^4 細胞あたり $0.1\mu\text{g/ml}$ の濃度で刺激した後、CASE™ Cellular Activation of Signaling ELISA (Super Array) を用いて測定したところ、やはり DGF における NF-Kappa B の活性量が NGF よりも高いという結果が得られた。

Gene chip 解析においては、3 時間の LPS 刺激に対して 130 遺伝子が DGF の方が GF 比べて高い遺伝子を認め、180 遺伝子が DGF の方が GF に比べて低かった。遺伝子発現の内容は、DGF の方が高く発現した遺伝子の方に炎症関連物質が多く検出された。DGF の方が低く発現した 180 の遺伝子に関しては、さらなる検討が必要である。そして、6 時間の LPS 刺激に対しては 253 遺伝子が DGF の方が高い発現をし、277 遺伝子が低い発現を認めた。3 時間同様に 253 遺伝子には炎症関連物質が多く含まれていた。低い発現のなかにはサイトインシグナルを抑制するとされる遺伝子も含まれていた。IPA 解析に関しては、炎症時に中心的役割をする CCL-20 や NF-Kappa B について検討したが DGF と GF ではこれらを中心とした伝達系は様々な点で異なっていた。

また EDGF および EGF に関する実験であるが、LPS に最初に感染する個所であり歯周病の発症のメカニズムを知る上で非常に重要な役割を示している。しかし、上皮細胞は歯肉線維芽細胞に比べ細胞増殖能力が低く、すべての実験を網羅するのは困難であった。そこで、今回は LPS の刺激を 3 時間、6 時間加えた EDGF および EGF から RNA を採取し Gene chip 解析のみを行った。その結果、やはりレセプターに関与する遺伝子において EDGF の方が高い反応を示すことが示唆された。以上の結果から、Down 症において、最初の LPS 感染の時点で健常者よりも反応性が高いこと、また応答性も健常者と歯異なっており、異常なレスポンスが認められることが示唆された。さらに感染後の細胞シグナル伝達系

部科校名：松戸歯学部

氏名：田 中 陽 子

研究の結果（つづき）

においても、炎症関連物質の産生を促すように働いており、炎症の進行をより一層重篤にしていることが示唆された。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 19 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 太 田 (横田) ル ミ



所属・資格 松戸歯学部・助手

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	象牙質組織形成と象牙芽細胞の集合と動きについての免疫組織化学的研究	
3 研究の目的	<p>これまでの研究で、エナメル質の構造はエナメル芽細胞の集団形成とその集団および個々のエナメル芽細胞の動きに寄って形成されることを免疫組織化学的に明らかにし、これを Amemoblast grouping and dancing と名づけた。この研究からエナメル芽細胞の grouping and dancing は、エナメル器に制御され、エナメル器自体も自律的に動いていることが予測された。</p> <p>この仮説に基づけば、象牙質構造の形成に於いても予想される象牙芽細胞の grouping and dancing の存在を、本研究によって立証を試みた。</p>	
4 研究の概要	<p>この研究には歯の組織構造が特徴的な、細胞分化組織の観察に適した歯胚が必要であり、またエナメル質形成との関連も重要な焦点であるため、エナメル芽細胞の grouping and dancing 研究時にも用いたイヌ歯胚を対象として研究を行った。</p> <p>出生後 50 日齢のビーグルの幼犬を免疫組織学用に未固定または固定し、取り出した歯胚から凍結切片およびパラフィン切片を作成し、keratin, cadherin, connexin 等の細胞接着因子、actin 等の細胞運動因子などの組織発生過程における発現を試みた。</p> <p>エナメル芽細胞の grouping and dancing の結果とあわせて象牙芽細胞を検討し、エナメル器全体における相互の動きをより明確にすることにより、エナメル器全体の動きを解明する。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

部科校名：松戸歯学部

氏名：太田（横田） ルミ

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

これまでの研究で、エナメル質の構造はエナメル芽細胞の“Ameloblast grouping and dancing”によって形成され、これはエナメル器に制御され、エナメル器自体も自律的に動いていることが予測された。象牙質にはエナメル質に観察されるエナメル小柱やハンター・シュレーゲルの条紋のような細胞の動きと関連して捉えやすい構造が少ないため、これまでの研究では見過ごされてきたと考えられる。しかし、エナメル質構造の形成と同様に、象牙質構造の形成に於いても象牙芽細胞の grouping and dancing の存在が予測されるため、この立証を試みた。

【方法・結果】歯の組織構造が特徴的で細胞分化組織の観察に適しており、またエナメル質形成との関連も重要な焦点であるため、エナメル芽細胞の研究時にも用いたイヌ歯胚を対象として研究を行った。出生後 50 日齢のビーグルの幼犬を未固定または固定し、取り出した歯胚から凍結切片およびパラフィン切片を作成し、H・E 染色、接着や運動、分泌に関わる因子である keratin, connexin, cadherin, actin, tubulin の免疫染色を施し、組織発生過程における発現を HS オールインワン蛍光顕微鏡（(株) キーエンス・BZ-9000）にて観察した。

象牙質形成期の H・E 染色像を観察してみると、十数個程度の象牙芽細胞の集合が認められた。

外エナメル上皮の接線断面で観察されるような帯状に交叉する細胞の集団が、象牙芽細胞でも観察された。この様子は歯髄に向かうにつれて不明瞭になる。

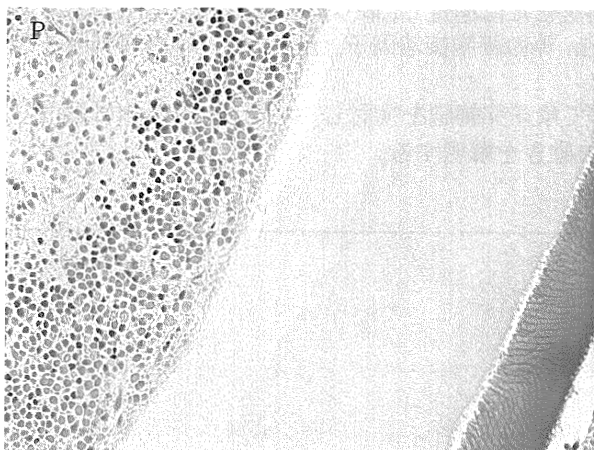
免疫染色の結果、cadherin の反応は、エナメル芽細胞から外エナメル上皮では認められたが、歯髄から象牙芽細胞層には発現が認められなかった。

connexin の反応は、歯髄ではほとんど認められないが、象牙芽細胞層付近になると反応が認められた。しかし、その反応にははっきりとした周期性は確認できなかった。

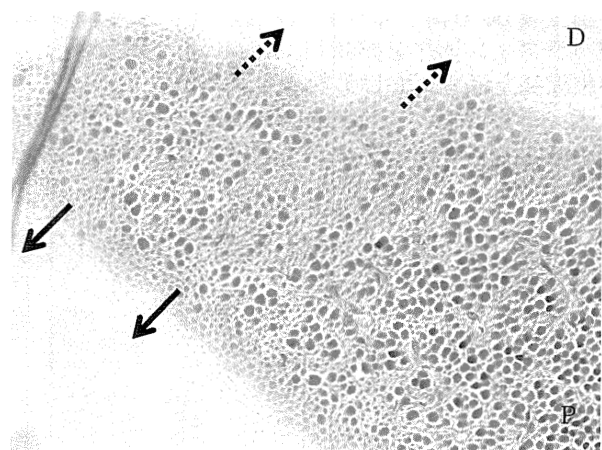
tubulin の反応は、象牙芽細胞の細胞体と象牙細管内の突起に発現が認められた。

actin と keratin の蛍光二重染色では、エナメル芽細胞層のような発現の変化は actin, keratin 共に認められず、actin では象牙芽細胞層付近では反応を示さなかったが、象牙芽細胞体の基底側の発現が細胞によって異なり、一定の象牙芽細胞の集合の存在を示していた。

E: enamel, D: dentine, PD: pre dentine, P: pulp, O: odontoblast



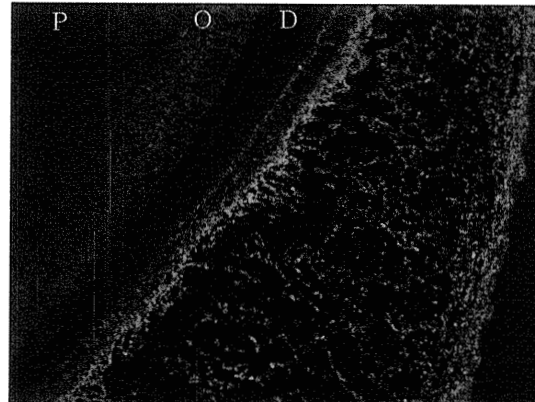
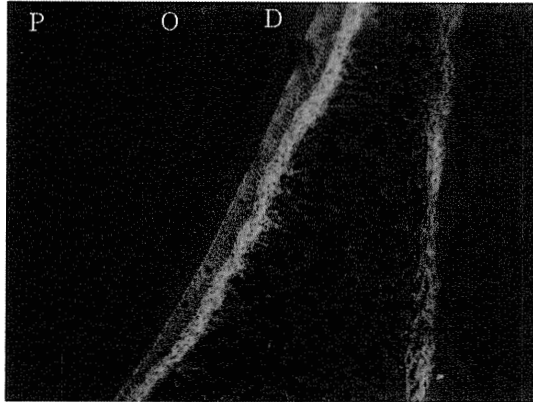
H・E 染色



部科校名：松戸歯学部

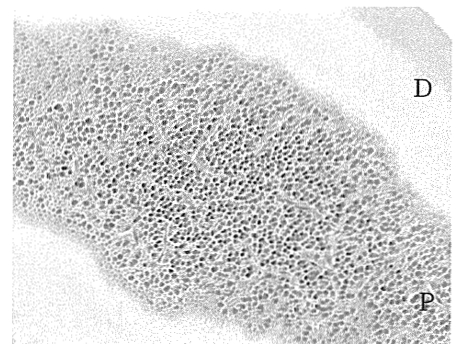
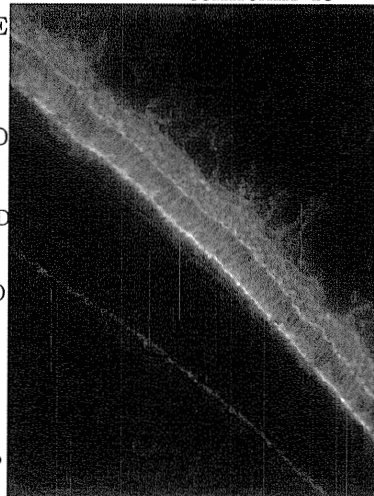
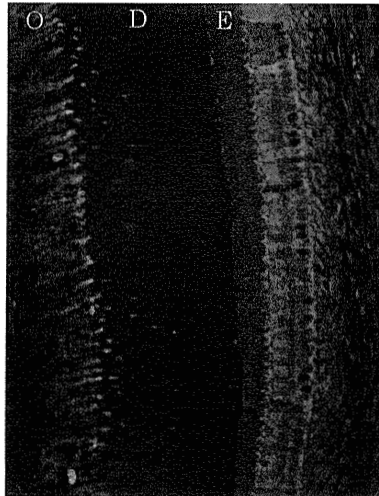
氏名：太田（横田） ルミ

研究の結果（つづき）



e-cadherin

connexin 43



tubulin

actin・keratin 二重染色

H・E

歯髓の構造を観察すると、血管が象牙芽細胞をグループ化している様子が観察された。これは、ラット切歯の中間層細胞層に観察される乳頭層の構造に血管が侵入する様子を連想させるものである。

免疫染色では、接着や運動、分泌に関わる因子の周期性を示す発現は、エナメル芽細胞より不明瞭ではあるが明らかとなった。今後は、象牙芽細胞の集合が確認されたことから、エナメル質形成となんらかの連動があることが示唆されるため、内エナメル上皮やエナメル芽細胞の細胞集団との相関などをより詳細に観察し、象牙質形成に出現する特異的なタンパク質（BMP, DSP, HSP など）の局在についての検索を試み、対応させて検討する予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 19 日

日本大学 総長 殿

氏 名 成 田 貴 則



所属・資格 松戸歯学部・助教

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	マウスおよびラット唾液腺に発現する遺伝子の時間および空間的な発現マッピング	
3 研究の目的	<p>唾液腺は口腔環境の維持に重要な体液である唾液を分泌する器官である。ヒトにおける唾液分泌障害は口腔環境の悪化のみならず全身疾患発症にも関与し、QOLの著しい低下をもたらす。そのため、唾液腺における分泌メカニズムの解明は極めて重要である。</p> <p>当研究では組織中のタンパク質局在を知る免疫組織化学染色と mRNA を直接可視化することのできる <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法を用いて、唾液腺における遺伝子発現の時期および組織中の空間的分布を詳細に解析する。</p>	
4 研究の概要	<p>他の生物種または組織においてこれらの系と関連が示唆される遺伝子を用いて免疫組織化学染色と <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションを行う。具体的にはタイトジャンクション関連タンパクなどを解析する。</p> <p>当研究では、まずマウスおよびラットの組織固定条件やハイブリダイゼーション条件等の至適化を行う。マウスまたはラット唾液腺組織に対して染色を行った後、顕微鏡下で観察を行う。</p> <p>さらに、免疫染色と <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションの二重染色を試みる。これにより、遺伝子産物の転写および翻訳の両方のレベルで組織内だけでなく細胞内の空間的な局在を明らかにすることができるようになることが期待される。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

部科校名：松戸歯学部

氏名：成田貴則

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

二重染色条件設定のため、まず免疫組織染色法の確立を試みた。唾液腺は組織切片の自己分解を引き起こすタンパク質分解酵素を多量に含むなど、免疫組織化学染色および *in situ* ハイブリダイゼーションが難しい組織の一つである。

一般的に免疫組織化学および *in situ* ハイブリダイゼーションでは、ホルマリンなどのアルデヒド系固定剤で固定後、組織をパラフィン包埋した後に免疫染色を行う。しかし、この方法では多くのタンパク質の抗原能が失われ検出が困難になることが知られている。

この研究ではまず抗原能をできるだけ失わずに免疫染色を行うことのできる条件の確立を目指すこととした。特に薄切法と固定法についてより穏やかな方法を採用することにした。切片作製については急速凍結切片法、固定はアルコール系固定剤であるメタノールを検討した。

使用した抗体はこれまで固定サンプルで安定したシグナルを得ることが難しかったアクアポリン5に対するものを用いた。対照として固定サンプルで安定してシグナルを検出できるタイトジャンクションタンパク質である抗ZO-1抗体を用いた。

アクアポリンは水を通すチャネルタンパク質の一群である。唾液腺腺房細胞においては数種のアクアポリンが発現され水分泌に非常に大きな役割を果たしていることが知られている。深刻な唾液分泌減少症状を示すシェーグレン症候群の患者ではアクアポリン5の発現量が有意に低下していることが知られている。アクアポリン5は水よりも陰イオンの透過性が高いという非常に変わった性質をもっており、唾液分泌に重要である腺腔への塩素イオンの放出に関与しているのではないかと考えられている。

本研究によりマウスにおいて安定的にアクアポリン5とZO-1の発現を観察できるようになった。耳下腺においては腺房細胞の腺腔膜上および分泌顆粒表面に強いシグナルを確認した。また顎下腺においても腺房細胞の腺腔膜上にシグナルを確認した。既存の方法に比べてシグナル強度が強く、図1に示すように良好な画像を得ることができた。

現在、免疫染色と *in situ* ハイブリダイゼーションの共染色が可能かどうか検討を行っている。

以下に本研究で確立した唾液腺における免疫組織化学染色法の手順を示す。

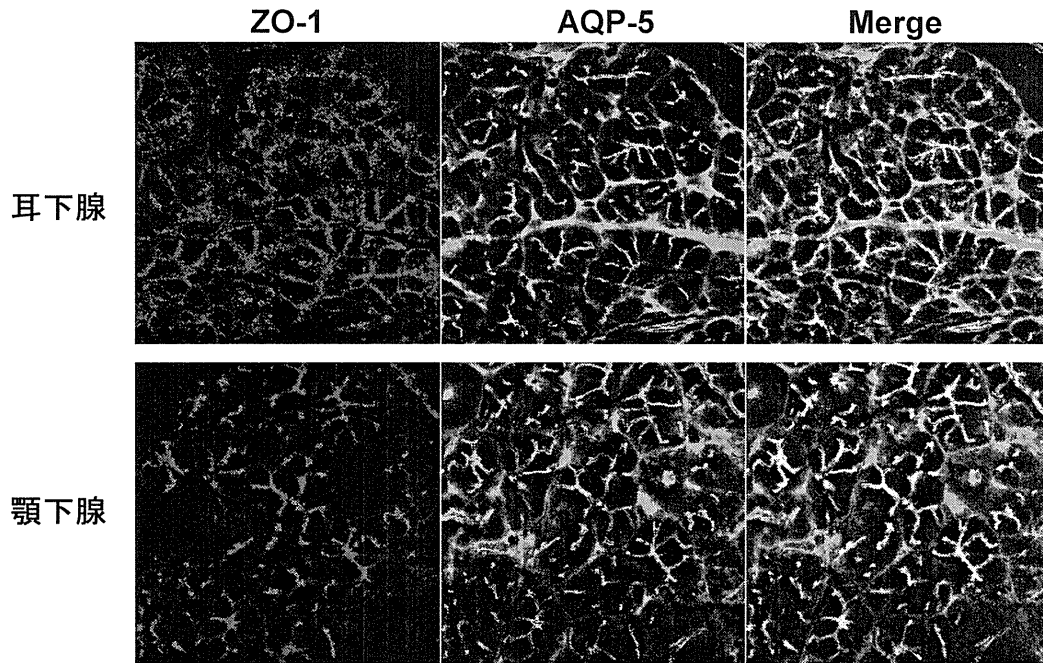
深麻酔した動物から摘出した新鮮組織をO.C.T.コンパウンド（サクラファインテックジャパン）を適量分注したクライオモールドNo.1（サクラファインテックジャパン）中に封入し、液体窒素で急速凍結を行った。凍結ブロックは凍結切片作製装置（MICROM HM505）を用いて5ミクロン厚で薄切し、MASコートスライドグラス（マツナミ）に貼り付けた。次に-20℃に冷却したメタノール中で固定した。切片を貼り付けたスライドグラスは使用時まで-80℃で保存した。

PBS(-)で洗浄後、抗アクアポリン5ウサギ抗体（ミリポア）および抗ZO-1マウス抗体（ミリポア）を組織切片に添加し、4℃で一晩インキュベートした。PBS(-)で十分に洗浄を行い、抗マウスIgG-Alexa Fluor 488抗体、抗ウサギIgG-Alexa Fluor 568抗体（インビトロジェン）および核染色剤（TOPRO3、インビトロジェン）を組織切片に添加し、室温で1時間インキュベートした。PBS(-)で洗浄後、No.1カバーグラス（マツナミ）で封入した。

観察は共焦点レーザー顕微鏡でアルゴンレーザー（488nm）、ヘリウムネオンレーザー（543nm および 633nm）で励起してシグナルを検出し記録を行った。

研究の結果（つづき）

図1. マウス耳下腺および顎下腺におけるアクアポリン5およびZO-1の染色像



注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 17 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 谷 本 安 浩



所属・資格 松戸歯学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	医学・工学技術の融合による HAp/collagen 複合体シートの創製	
3 研究の目的	再生医療の分野において生体材料、再生医療材料に対するニーズが高まり、より生体適合性の高い材料を開発するためには、さらなる医学・工学技術の融合が必要不可欠である。現在、欠損補填や骨形成を促進するためのスキャフォールド材料として用いられているハイドロキシアパタイト（以下、HAp）などのリン酸カルシウム系材料は脆性材料のために体内で早期に破壊してしまう恐れがある。そのため生体適合性および機械的性質に優れたスキャフォールドの開発が望まれる。そこで本研究では、主に工業分野において用いられているポリ-L-乳酸（以下、PLLA）繊維シートを HAp/collagen 複合体に導入することで、生体適合性と機械的性質に優れた PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートを開発し、スキャフォールドとしての有用性を評価することが目的であった。	
4 研究の概要	本研究では、生体活性の高い HAp と生体由来高分子である collagen の混合スラリーを調製後、強度のある生体吸収性の PLLA 繊維シートを導入することで PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートを作製した。また作製に際しては凍結乾燥法を応用した。さらに作製した PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートの生体適合性を検討するため、電子顕微鏡による構造観察、X 線回折による分析、擬似体液浸漬試験による体内でのアパタイト生成能の評価を行なった。その結果、本研究で作製した PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートは PLLA 繊維と HAp が結合していることが確認でき、また擬似体液中における挙動も良好であったため、スキャフォールド材料として有用であることが示唆された。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 研究分担者（役割分担） 	

部科校名：松戸歯学部

氏名：谷本 安浩

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究では新規スキャフォールド体を開発することを目的として、以下に示す方法・手順により PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートを作製し、作製した複合体シートのキャラクタリゼーションについて検討した。

1. PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体の作製

HAp 粉末と豚皮膚由来 I 型コラーゲンをメノウボールと一緒に遊星型ボールミルで混合することで、HAp 粉末の二次凝集粒子を解粒するとともに、HAp と collagen を複合化して、HAp/collagen 複合スラリーを調製した。また collagen のゲル化を促進するために pH 緩衝液を HAp/collagen 複合スラリーに適量添加した後、速やかに PLLA 繊維シートを HAp/collagen 複合スラリーに含浸した。その後、37°C で 24 時間放置することで完全にゲル化させ、-80°C で 48 時間予備凍結した。最終的に凍結乾燥法により真空中において -52°C で 48 時間凍結乾燥を行なうことで、PLLA 繊維と HAp/collagen とを複合化した、PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートを作製することができた（図 1）。

2. PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートのキャラクタリゼーション

1) 電界放射走査電子顕微鏡（FE-SEM）による構造観察

作製した PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートについて FE-SEM により観察した結果、collagen がバイндаの役割を担うことで、PLLA 繊維と HAp 粒子が結合している様子が確認できた。

2) 薄膜 X 線回折による構造分析

PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シート表面の薄膜 X 線回折の結果、アパタイトのピーク（図 2）が見られたことから、PLLA 繊維と HAp が均一に複合化していることが確認できた。

3) 擬似体液浸漬試験によるアパタイト生成量の評価

生体内でのアパタイト生成能を明らかにするために PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートをハンクス溶液（37°C、pH=7.4）に 7 日間浸漬した後、複合体シート表面を FE-SEM により観察した。その結果、PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートの表面には PLLA 繊維単体（コントロール）に比べて、より多くのアパタイト結晶が生成しており、高いアパタイト生成能を示した。

以上、本研究では PLLA 繊維シートによって HAp/collagen 複合体を強化した PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートを作製することができた。さらに PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シートのキャラクタリゼーションを行なった結果、スキャフォールド体として有用であることが示唆された。

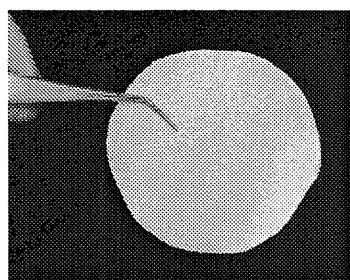


図 1 作製した PLLA 繊維強化 HAp/collagen 複合体シート

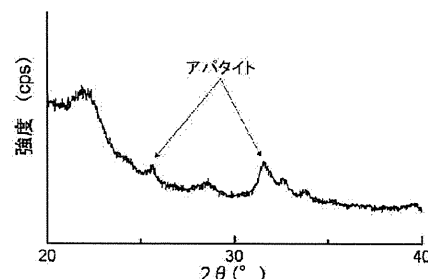


図 2 X 線回折パターン

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 3 日

日本大学 総長 殿

氏 名 中田 浩史



所属・資格 松戸歯学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	Micro FT-Raman および微小部 X 線回折による生体アパタイト結晶性の分析	
3 研究の目的	<p>高齢化社会および医療技術の進歩に伴い、医科・歯科ともにインプラント希望の患者は毎年増加しており、インプラントは患者にとって魅力的な治療法である。インプラント周囲における生体硬組織は、上下の顎が噛み合うことで過大な咬合力を負担しても吸収や破壊なく維持を継続させるために、大変重要な責務を負っている。また、インプラント周囲における新生骨の存在は顕微鏡観察等では明らかであっても、形成された骨質の生体アパタイト結晶性は既存骨程度に成熟しているのか、海綿骨程度、または類骨程度で未熟なのか、結晶性の程度については確認されていないのが現状である。</p> <p>そこで本研究は、新たな擬似体液の浸漬を行ったインプラント表面処理法による新生骨形成観察および Micro FT-Raman および微小部 X 線回折を用いてインプラント周囲における新生骨の生体アパタイト結晶性の経時的変化について明らかにする。</p>	
4 研究の概要	<p>まず先に本研究課題には、Micro FT-Raman を用いた手法であった。しかし共同研究機関である日本大学理工学部に管理する Micro FT-Raman の波長(532nm)では、生体の骨を試料とした際に蛋白質の存在から良い結果がうまく出ないことが明らかとなった。他研究機関で同機の異なる波長(782nm)を試みたところ良い結果がでた。他研究機関での同機の利用が困難であったことから、残念ながら本研究には Micro FT-Raman での分析から Micro FT-IR および偏光顕微鏡を利用した生体アパタイト結晶性の分析を行うこととした。</p> <p>インプラントは今もっとも注目を浴びている研究分野であり盛んに研究が行われている。しかし、インプラントを支える新生骨そのものの分析報告は少なく、その性状や代謝、咬合力に対する反応などいまだ完全な回答が得られていない。そこで本研究は、未だ解明されていないインプラント周囲に形成される新生骨の骨質および成熟のプロセスを観察することを目的とし、Microcomputed tomography (以下、Micro-CT) にて骨とインプラントとの三次元的な関係の観察、偏光顕微鏡にて骨構造の成熟度、Micro-FTIR イメージング装置にて骨に含まれる分子 (PO_4^{3-}, CO_3^{2-}, Amide I) と、骨の形成、アパタイト結晶の成長との関連を経時的に観察した。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 研究分担者 (役割分担) 	

部科校名：松戸歯学部

氏名：中 田 浩 史

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

1. Micro-CT による新生骨の観察

Micro-CT を用い、薄切切片では把握できないインプラントと新生骨との三次元的構造を確認した。Fig. 1 に CT 撮影画像を、Fig. 2 に観察像を、Fig. 3 に新生骨体積の経時的变化を示す。

・ 表面処理群

本実験にてウサギ脛骨に埋入したインプラントは、いずれもその上端と下端が既存骨と接している。表面処理群では、4 週、8 週ともに新生骨はインプラントの上端、下端両方の既存骨からインプラント表面に沿って中心へと伸長しており、インプラントと新生骨との広範囲での接触を認めた。また 4 週から 8 週にかけて新生骨の不透過度の増加が顕著であった。また表面処理群では 4 週、8 週ともにコントロール群よりも新生骨の体積は有意に多く、観察を裏付ける結果であった。しかし、Type A と B 二種類の表面処理間における新生骨量に有意差は認められなかった。

・ コントロール群

コントロールとした鏡面研磨のインプラントでは 4 週、8 週ともに埋入口周辺つまりインプラント上端の周囲のみ既存骨から連続してわずかに新生骨の形成がみられ、インプラント下端では既存骨と接してはいるが、インプラントを支持するような新生骨の形成はみられなかった。しかし新生骨量としては 4 週から 8 週にかけて増加が認められた。

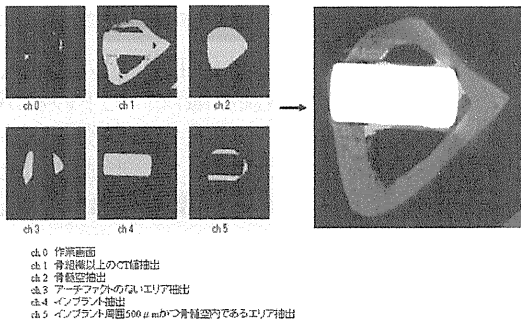


Fig. 1 Extraction of the new bone by logical operation
 Total Volume (TV) = circumference 500 μm of the implant \wedge marrow space = ch 5
 New Bone Volume (BV) = ch 1 \wedge ch 3 \wedge ch 5

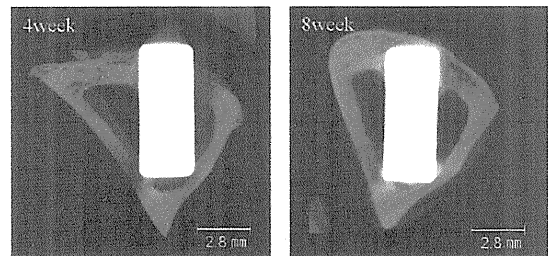
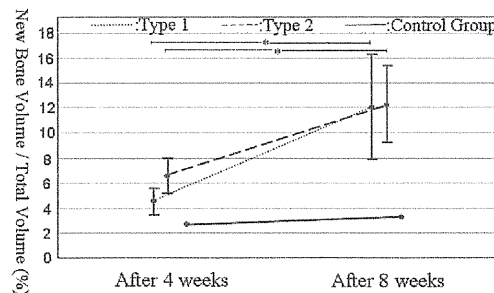


Fig. 2 Micro-CTによる観察像
 (試料は、4w、8wともにより結果のわかりやすいインプラント表面処理Type 2)

Fig. 3 新生骨体積の経時的变化



2. 偏光顕微鏡による薄切切片の観察

・ Fig. 4 に、コラーゲン線維の配向性が最も特徴的に表れるクロスニコル法および検板法の観察結果を示す。表面処理群ならびにコントロール群の 4 週、8 週ともに共通して既存骨では幾層にも重なる層板構造が観察された。偏光顕微鏡において骨の層板構造は図の既存骨部分に見られるように、消光位と対角位が交互に連続する像として観察される。消光位はコラーゲン線維が観察方向に平行に並び暗黒となり、対角位は同じくコラーゲン線維が観察方向に垂直に並び、最も明るく観察される位置を指す。したがって、いずれの試料も既存骨は成熟したハバース層板骨であることを確認した。

コントロール群では 4 週、8 週ともに表面処理群よりも新生骨の形成量が少なくコラーゲンの配向性を観察するのが困難な状態であったが、新生骨の成熟速度は表面処理群とほぼ同様の結果であった。

・ 表面処理群

表面処理群 4 週の試料において既存骨からインプラントへと伸びる骨は、クロスニコル法の観察像で消光位と対角位が索状で不規則な配列を示し、層板構造を形成していないために既存骨との境界が明瞭であった。すなわちその索状の部分がインプラント埋入後に形成された新生骨であり、4 週の新骨はまだ未成熟な線維性骨であることを確認した。また、表面処理群 8 週の新骨は皮質骨と平行して数層の縦走層板つまり第一次ハバース層板の形成および管状構造の形成が見られ、既存骨との境界が不明瞭であった。しかし層板数はまだ少なく、各層板内におけるコラーゲン線維の走行の規則性も不十分であったことから、表面処理群 8 週の新骨はまだフェルト状層板および最小層板系の段階であることを確認した。

部科校名：松戸歯学部

氏名：中 田 浩 史

検板法では、4週ならびに8週の新骨においてコラーゲン線維はまだ様々な方向に向き、規則的に配向していないことがより明確に観察された。

コントロール群

コントロール群では4週、8週ともに表面処理群よりも新骨の形成量が少なくコラーゲンの配向性を観察するのが困難な状態であったが、新骨の成熟速度は表面処理群とほぼ同様の結果であった。

3. FTIR イメージング装置による分析

本実験では Type 1 と 2 の 2 種類の表面処理を行ったインプラントを埋入した骨について測定を行ったが、表面処理法に違いによる際立った差異は認められなかった。

Fig. 5 には表面処理 Type 2, 埋入後 4 週の試料について行った FTIR イメージング測定の結果を示した。図 5C ならびに E のスペクトルは、骨の主要成分である PO_4^{3-} (ハイドロキシアパタイト由来)、 CO_3^{2-} (ハイドロキシアパタイト中の PO_4^{3-} , OH⁻に置換した CO_3^{2-})、Amide I~III (骨を構成するたんぱく質, おもに Type I コラーゲン) の存在を示している。本実験で得られた各赤外吸収スペクトルはいずれも骨組織に特徴的なものであり、過去の報告と良く一致している。

・ 表面処理群

インプラント埋入後 4 週の新骨は、既存骨に比べ PO_4^{3-} , CO_3^{2-} とともに明らかに吸収が弱いことが認められた。 PO_4^{3-} , CO_3^{2-} に共通して、既存骨から新骨にかけて分子の量が徐々に移行されるのではなく、比較的明瞭な境界線が認められた。また、 CO_3^{2-}/PO_4^{3-} 比の分布は、既存骨と新骨とのあいだで差異は認められなかった。Fig. 6 には表面処理 Type 2 の 4 週、8 週における $PO_4^{3-}/Amide I$ 比の分布を示した。4 週において新骨の $PO_4^{3-}/Amide I$ 比は、既存骨と比べて明らかに低い値を示した。新骨の中でもインプラントと接する部分の新骨は、既存骨近傍よりも低い値であった。また 4 週において既存骨と新骨との境界は比較的明瞭であった。8 週も同様に、新骨の $PO_4^{3-}/Amide I$ 比は、既存骨と比べ低い値を示し、インプラントと接する部分の新骨は特に低い値であった。しかし全体として 4 週よりも 8 週の新骨で $PO_4^{3-}/Amide I$ 比は高い傾向にあり、既存骨と新骨との境界は 8 週において不明瞭となったことを確認した。

・ コントロール群

コントロールにおいては、イメージングを行うだけの新骨骨量が形成されなかったため、測定の対象外とした。

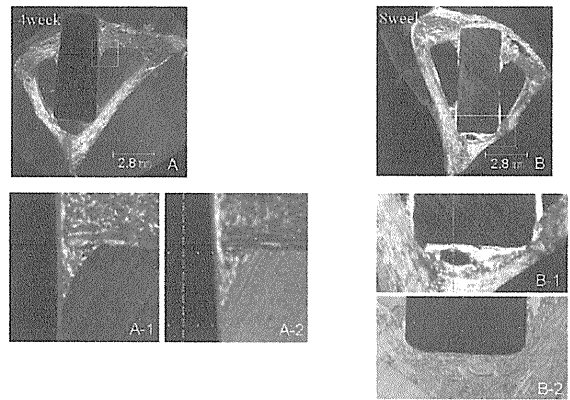


Fig. 4 偏光顕微鏡による観察像 (表面処理Type 2)
A: 4week クロスニコル法 (A-1クロスニコル法, A-2検板法)
B: 8week クロスニコル法 (B-1クロスニコル法, B-2検板法)

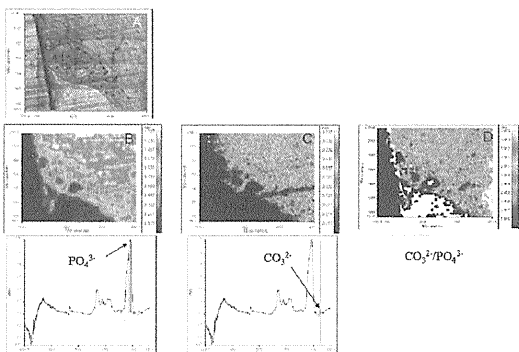


Fig. 5. FT-IR image of treated group-type 2 after 4 of implantation. A: Measurement range, B: PO_4^{3-} distribution, C: PO_4^{3-} absorption band, D: CO_3^{2-} absorption band, E: CO_3^{2-} absorption band, F: CO_3^{2-}/PO_4^{3-} ratio of distribution

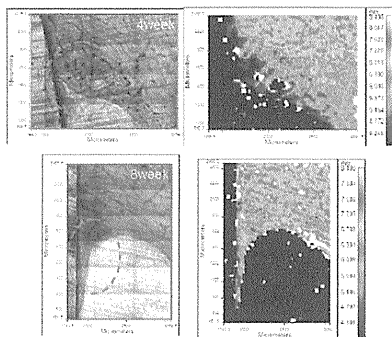


Fig. 6. $PO_4^{3-}/Amide I$ ratio distribution in treated group-type 2 observed by FT-IR analysis

結論：インプラント周囲に形成される新骨のアパタイト結晶性の評価を行い、以下の結論を得た。

- 1 インプラント埋入 4 週後、8 週後では 3 つのいずれの分析手法でも、新骨と既存骨の間にはアパタイト結晶の質的な差異が認められた。
- 2 埋入 4 週後の新骨と 8 週後の新骨の間でもアパタイト結晶の質的な差異が認められた。
- 3 新骨は、既存骨のそばから成熟していく傾向が認められた。
- 4 今回用いた分析手法はいずれも試料が破壊されず、再現性のある結果を得ることが可能であった。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 19 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 鈴木 浩 司



所属・資格 松戸歯学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	いびきや睡眠時無呼吸症候群に対する歯科的対応、特に予防について	
3 研究の目的	いびきや睡眠時無呼吸症候群は病的認知が無く、肥満者特有のものとしてされて来たが、社会的弊害を考慮し欧米では早くから睡眠医療が盛んに行われるようになった。一方、日本人は肥満人口が欧米程多くないにもかかわらず、いびきをかく人種として知られている。近年、新幹線の居眠り運転を契機に我が国でもいびきや睡眠時無呼吸症候群に対する認知が高まり、これらが生活習慣病と深い関係を持っていることから、国の医療制度も歯科的治療を保険制度に導入したという経緯もある。では日本人になぜ多いかということ、第一は長顔と小さい顎を持つヒトは痩せていたとしても先天的に咽頭部が狭くなり、気流の流れを遮ってしまう傾向にある。第二に口呼吸を習慣としているヒトはいびきをかく傾向にあるため、睡眠障害を起こしやすいと考えられているからである。そこで、大学生を中心に顔面形態や睡眠状態を把握し、すでに睡眠障害がある群、あるいは予備軍を抽出し、口唇閉鎖力と口唇引っ張り強さを調査、その後口呼吸を改善するトレーニングの実施等、歯科的な対応を施す。この成果が得られれば、若年者のうちから睡眠障害に対するケアができるばかりでなく、睡眠障害の治療法としても十分活用でき、睡眠障害改善の一助になればと考えている。	
4 研究の概要	被験者は、顎口腔系に異常を認めない学部4年生(21~26歳、平均年齢21.5歳)92名の中から睡眠状態に関するアンケート調査を行い、結果を点数化して、その成績をもとに睡眠状態に改善が必要と判断された6名(男子3名、女子3名)とした。口唇閉鎖力はLIP-DE-CUM(コスモ計器社製)を用い、トレーニング開始前から2ヶ月間にわたり毎週測定した。一回の測定では疲労を考慮しながら3回計測を行い、その平均を求め測定値とした。一方口腔周囲筋のトレーニングはパタカラ(デンタルユーミー社製)を用い毎日朝夕2回5分間程度使用説明書に従ってトレーニングを行った。このトレーニングについては著者らが常に状況を把握するように努めた。2ヶ月に渡るトレーニング終了後、再度睡眠に関する調査を実施し、継続的な口腔周囲筋のトレーニングによる口唇閉鎖力の変化が睡眠状態にどのような影響を及ぼしているか評価した。さらに、一度行ったトレーニング効果の持続を調べる目的でトレーニングを終了してから約2ヶ月後に再度口唇閉鎖力の測定および睡眠に関するアンケートを実施した。	
5 研究組織(共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者(役割分担) 	

※ホームページ等での公開の(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：鈴木浩司

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

これまで、いびきや睡眠時無呼吸症候群は病気としての認知が低く、肥満者の代名詞として捉えられることが多かった。しかし、睡眠障害が起こす社会的弊害を考慮し欧米では数年前から睡眠障害に対する医療が盛んに行われるようになった。一方、日本人は肥満人口が欧米程多くないにもかかわらず、いびきをかくことで知られているが、病的な認識より、むしろ豪快なイメージすら持たれている。近年、新幹線の居眠り運転事故やトラック運転手の居眠り運転、会議中の居眠り等を契機に社会問題化し、我が国でもいびきや睡眠時無呼吸症候群に対する病的認知が高まってきた。

いびきは睡眠時無呼吸症候群の入り口であり、これらが生活習慣病と深い関係を持っていることから、国の医療制度もスプリントによる歯科治療を保険制度に導入したという経緯がある。しかしながら、スプリント療法により治療効果は得ているが、スプリント治療は対症療法であるため、予防面を含めた総合的な対策が必要とされる。そこで、いびきと関係の深い口唇閉鎖力に着目し、口唇閉鎖力向上のための継続的口腔周囲筋筋力トレーニングが睡眠状態に及ぼす影響について調査した。

スクリーニングを目的として最初に実施した睡眠状態に関するアンケートの結果、睡眠状態に大きな問題を認めない者が86人、改善の必要性があるとされた者が6人であった。従って、この6人に対し本実験の目的や内容、方法等を十分に説明した後、同意を得て、被験者とした。この被験者6人のトレーニング前の口唇閉鎖力は平均8.8 Nであったが、トレーニング後の結果は平均11.9 Nまで増加し、被験者全員が上昇傾向を示した。また、2ヶ月のトレーニング後に行った調査の結果6人の睡眠状態には改善が見られ、特にいびきの消失、熟睡感の獲得、起床時の口臭の消失等が見られるようになった。一方、トレーニング終了後2ヶ月後に行った再調査では、口唇閉鎖力は平均10.9 Nに低下し、アンケート調査でも目覚めの悪さや日中傾眠、口渇感を覚える等の回答が得られた。

現在、睡眠歯科診療に関わる研究や文献を検索してみると、多くの研究者や臨床家達はいびきや睡眠時無呼吸症候群で悩んでいる患者に対するより効果的な治療法の検討¹⁾や、スプリント療法を用いた症例を通じた診療成果の報告²⁾している。しかしながら、予防について報告されたものは少なく、いびきや睡眠時無呼吸症候群が生活習慣病の病態に深く関係していることを考えると、予防に関する検討は急務であると考えられる。また、日本人のいびきや睡眠時無呼吸症候群の患者は肥満を伴っている者も多いが、顎顔面の骨格形態が大きく影響していると考えられている³⁾。特に長顔と小さい顎を持つヒトはダイエットをして、たとえ痩せたとしても先天的に咽頭部が狭いため、気流の流れは遮られてしまいいびきや無呼吸を発症してしまう。このため、下顎前方位タイプの床副子が効果的である所以である。さらに日本大学松戸歯学部附属病院スポーツ・睡眠健康歯科を訪れる患者様の殆どが口呼吸を伴っており、いびきや無呼吸の発生と密接な関係がうかがえる。従って日本人に対する予防法を考えた場合、肥満に気をつけることはもちろんのことであるが、歯科の見地から顎骨や歯列の矯正、あるいは口呼吸の改善がいびきや睡眠時無呼吸症候群の防止に役立つのではないかと考えた。しかし顎骨や歯列矯正は治療そのものが大変であり、予防効果は高いかもしれないが、誰しもができるものではない。そこで安全で、簡便で、誰にでもできる予防法を確立するために、口呼吸と関係の深い口唇閉鎖力に着目し、口唇閉鎖力向上のための継続的口腔周囲筋の筋力トレーニングが睡眠状態に及ぼす影響について調査した。

今回スクリーニングとして行った睡眠に関するアンケートの結果、睡眠状態に大きな問題を認めない者が86人(93.4%)改善の必要性がある者が6人(6.5%)であった。この被験者6人のトレーニング前の口唇閉鎖力は平均8.8 Nであり、過去に日本人の平均と報告されている平均13 Nを大きく下回っていた⁴⁾。今回口唇閉鎖力の計測に用いたLIP-DE-CUMは被験者の口唇閉鎖力をデジタル表示することができ、客観的に評価することが可能である。従ってこの結果を見ると本被験者達は非常に口唇閉鎖力が弱いということが言える。一方、口腔周囲筋のトレーニングは、口輪筋を始めとする周囲筋を鍛える方法としては糸のついたボタン口に含み引っ張る方法や、ストローを用いてコップ内の水をぶくぶく吹くという方法など様々あるが、簡便で、全員が一様に行えるということでパタカラを用いることにした。そして、1日2回、1回約5分のトレーニングを1セットとし、週4回、2ヶ月間実施した。口唇閉鎖力の測定は毎週末に行い、その都度記録した。2ヶ月にわたる継続的なトレーニングの結果、平均11.9 Nまで増加し、被験者全員が上昇傾向を示していた。これはパタカラによるトレーニングの効果と考えられる。そして、2ヶ月におよぶトレーニング後に行った睡眠状態に関するアンケートの結果6人の睡眠状態には著しい改善が見られ、いびきの消失、熟睡感の獲得、起床時の口臭が無くなった等の状況が見られるようになった。一方、トレーニング終了後に約2ヶ月が経過した時点で再度調査を行った。これはいわゆる戻りを調べる目的であるが、口唇閉鎖力は平均 N に低下し、アンケート調査でも目覚めの悪さや日中傾眠、口渇感を覚える等の回答が少し見られた。このことから、トレーニングの継続は重要であり、口腔周囲筋を鍛えることは睡眠状態改善の一因として深く関与しているものと考えられる。

部科校名：松戸歯学部

氏名：鈴木浩司

研究の結果（つづき）

本研究のように口輪筋を鍛え口唇閉鎖力の向上が睡眠状態の改善に役立つ可能性が考えられることから、予防の一環として、若年者のうちからトレーニングをすることにより睡眠障害に対するケアができるばかりでなく、現在睡眠障害で悩んでいる患者様に対する治療法としても十分活用できるものと考えられる。最後に、軽度から中等度の睡眠時無呼吸症候群の患者に対し、スリープスプリントは大変効果的であるが、無歯顎や残存歯少数症例ではスプリント治療に苦勞する。このような場合、口腔周囲筋のトレーニングは効果的かもしれない。さらに検討を継続し、歯科から発信する予防法の確立に努めていきたい。

一方、今回の研究は筋電計測までは行かなかった。この理由として、被験者の協力や被験者の人数が多かったため実験のコントロールに手間取ったということがある。また睡眠時のデータを採るにあたり、被験者の負担を考えると、必要経費も含めて研究計画の再検討も視野に入れていきたい。しかしながら、良いデータが得られたことから、学会発表、論文投稿に結びつけていきたいと考えている。

本研究の結果以下のような結論を得た。

1. パタカラを用いた口腔周囲筋のトレーニングにより、口唇閉鎖力は上昇傾向を示した。
2. 口唇閉鎖力の増加に伴い、睡眠状態の向上が見られた。
3. 口腔周囲筋のトレーニングを中止すると、口唇閉鎖力と睡眠状態は低下した。

参考文献

- 1) 成井浩司：睡眠時無呼吸症候群の全て。三省堂、東京、2003
- 2) 加藤隆史：歯科疾患と睡眠障害。現代医療 35(10)：133-137, 2003
- 3) 塩見利明, 菊池哲：睡眠に歯学の臨床。日本歯科評論別冊, 東京, 2004
- 4) 秋広良秋：宇宙飛行士はイビキをかかない。三和書籍、東京、2003

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 16 日

日本大学 総長 殿

氏 名 飯 田 崇



所属・資格 松戸歯学部・助教

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	fMRI を用いたクレンチングに関わる脳活動様相	
3 研究の目的	<p>ヒトの行動は9割以上の割合で無意識下に行われている。日常生活で目にする Tooth contacting habit と呼ばれる噛みしめも、大抵は無意識下で行われている。しかしながら、ヒトが何を目的として歯を噛みしめる行為を行っているか、そのメカニズムは未だに解明されていない。現在までに、機能的磁気共鳴装置 (fMRI) を用いてクレンチング時と静止時と比較した時の脳活動賦活部位に関する報告がされている。また、顎口腔領域の運動と脳機能活動の連関についてはさまざまな機器を使用した報告がなされている。しかしながら、これらの報告は口腔領域の静止時と運動時における脳活動を比較したものであり、身体運動と顎口腔領域の運動における脳活動を比較した報告は認めない。そこで今回は fMRI (functional magnetic resonance imaging) を用いて測定し、手指の握りしめと歯の噛みしめを行わせた時の脳活動賦活部位の相違について比較検討を行った。</p>	
4 研究の概要	<p>今期間における本研究の目的は fMRI を用いて意識下でのクレンチングに関わる脳活動の変化を検討することである。実験は日本大学松戸歯学部附属病院が所有する 1.5 テスラの fMRI を使用した。被験者はインフォームド・コンセントを得た、脳障害の既往がなく、顎口腔領域に異常を認めない 23~30 歳の右利きの 15 名(男性 13 名, 女性 2 名)とした。被験者へは顎運動に関する課題を指示し、fMRI にて顎運動に関係する脳内血流動態反応を測定した。なお、本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認を得ている。(07-009)</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の 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：飯田 崇

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

fMRI を用いた実験は初期段階として実験デザインおよび測定機器のパラメーター確立のため、被験者数名によって pilot study を行った。これらのデータを脳機能画像解析ソフトである Statistical Parametric Mapping 5 (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, University College London, UK) を用いて解析を行った。数回の pilot study を行った後に実験デザインおよび測定機器のパラメーターを以下に記述する内容によって行った。

1) 実験方法

被験者はインフォームド・コンセントを得た、脳障害の既往がなく、顎口腔領域に異常を認めない 23～30 歳の右利きの 15 名(男性 13 名, 女性 2 名)とした。fMRI による測定前に MRI にて脳内に異常を認めないことを確認後、fMRI を用いて測定を行った。

被験者のタスクは両側手指の握りしめ(fists clenching)と歯の噛みしめ(teeth clenching)の 2 課題で、実験デザインは 2 課題によるブロックデザインとした。30 秒毎の ON/OFF 期間を 8 回繰り返し、それぞれの動作を 4 回ずつ行った。2 つの課題は連続して 4 回行うこととし、前後半の課題の振り分けは各被験者においてランダムとした。

撮影には Philips 社製 Achieva 1.5T を用いて Echo planner imaging (EPI 法) により機能画像を得た。Gradient echo-echo planner sequence のパラメーターは TR : 3000ms, TE : 50ms, FA : 90° , FOV : 230mm, matrix size : 128×128, スライス厚 : 4mm と設定した。

測定データの解析には脳機能画像解析ソフトである Statistical Parametric Mapping 5 (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, University College London, UK) を用いた。fists clenching と teeth clenching における BOLD 信号に対して、ボクセル毎に 2 課題を対象とした t 検定を行い、BOLD 信号の増加するボクセルを抽出した。この活動を認めた領域を MNI 標準脳に変換し、賦活部位に関する解剖学的検討を行った。

2) 実験結果

fists clenching と teeth clenching を比較すると teeth clenching において前頭前皮質において有意に賦活していることが示された。この前頭前皮質における活動は両側において認められた。

以上の結果より、teeth clenching が手指運動と比較して高次脳機能を担う前頭前野の活性に関与している可能性が高いことが示唆された。

なお、本研究結果は 2009 年 6 月に開催される(社)日本補綴歯科学会第 118 回学術大会において発表を予定している。

* 課題番号	個 08-113
--------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 19 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 布 施(長井) 恵  印

所属・資格 松戸歯学部・講師（専任扱）

下記のとおり報告いたします。

1 種 目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	細胞接着タンパク質を固定化した生分解性材料の開発	
3 研究の目的	<p>今回、細胞接着タンパク質やBMP, TGF-βなどのサイトカインの固定化に必要な足場の試作を行った。足場材料として応用する場合、組織の侵入が期待できる大きさのポアを有する3次元多孔体の足場が有用とされ、ポリ乳酸と塩化ナトリウムを混合して固化した後に塩化ナトリウムを溶出するポロジェン法と凍結乾燥法を組み合わせることで3次元多孔体を作製した。すなわち、PLAのジオキサン溶液に塩化ナトリウムを混合し、凍結乾燥により多孔体を作製した時の、塩化ナトリウムの混合率が多孔体の作製状態、特にポアの形成に与える影響について検討したので報告する。</p>	
4 研究の概要	<p>各種生分解性高分子プレートを試作した。</p> <p>1) 材料はPLAとして、Resomer R202S (固有粘度：0.22dl/g, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. Ingelheim, Germany), PLGAとしてはGCメンブレン (ジーシー社製, 東京), ポロジェンとして、塩化ナトリウム (粒径180~300 μm, 和光純薬工業社製, 大阪) を使用し、有機溶媒として、1,4-ジオキサンを用いた。</p> <p>2) ジオキサン溶液単独：PLA またはGCメンブレンを10wt%の割合でジオキサンに溶解した。PLA ジオキサン溶液またはGCメンブレンジオキサン溶液20ml溶液をそれぞれ直径6cmのステンレスシャーレに流し込み、液体窒素を用いて凍結後、凍結乾燥機を用いて、24時間凍結乾燥を行った。</p> <p>3) 塩化ナトリウム混合の効果：10wt%PLA ジオキサン溶液に、30wt%, 40wt%, 50wt%, 70wt%の割合で粒径180~300 μmの塩化ナトリウムを混合した後、上記と同様に、凍結後24時間凍結乾燥を行った。</p> <p>SEM観察：3D多孔体試料の表面観察および切断して断面の内部構造のSEM観察を行った。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<p>・研究代表者</p> <p>・研究分担者 (役割分担)</p>	

※ホームページ等での公開の 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。

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

PLA 単独の場合

SEM 像は、試料表面は滑沢で、ポアの生成は見られなかった。試料断面では、不規則性なしわが多数見られたが、表面同様にポアの生成は見られなかった (Fig. 1)。作製した試料は形態を維持していた (Fig. 3a)。

GC メンブレンの場合

SEM 像は、試料表面に直径 10~20 μm のポアの形成が不規則性に認められた。ポアは表面全体に均一には出来ていなかった。試料断面では、比較的規則的に、多数のポアが生成しているのが確認された (Fig. 2)。試料の表面側と裏面側ではポアの形成状態が異なっていることも確認された。試料は厚みが薄く、弾性で、形態を維持し、表面は滑沢であった (Fig. 3b)。

塩化ナトリウム混合量が 30 wt% の場合

SEM 像は、試料表面および内部にポアの形成が確認されたが、ポアの直径は約 30 μm 程度と小さく、また、ポアの数も少なく、形は不定形で連続性がみられなかった (Fig. 4)。試料は撤去時にもろく、形態をとどめていなかった (Fig. 3c)。

塩化ナトリウム添加量が 40% の場合

SEM 像は、試料の表面はポアの大きさが約 180~200 μm と大きくなり、30wt% に比べてポアの形成は明瞭になってきた。しかしながら、ポアの形成は試料表面に均一には見られず、局在化していた。また、内部では 30~40 μm 、または 180~200 μm と様々な大きさのポアが、かなりの連続性を有して形成されていた (Fig. 5)。試料は撤去時に試料はくずれることはなかったが、辺縁はかけてしまった (Fig. 3d)。

塩化ナトリウム添加量が 50wt% の場合

SEM 像では、試料表面に大きさ約 300 μm 程度の大きなポアが、多数認められた。断面では、約 60 μm 程度のポアが規則的に連なって形成されていた。塩化ナトリウム 30wt%、40wt% の時に比べて、試料全体に平均的に大きさのそろったポアが形成されることが分かった (Fig. 6)。試料は撤去時、辺縁はかけることはなく、形態を維持していた (Fig. 3e)。PLA 単独の場合と比較して厚みは均一で増加した。

塩化ナトリウム添加量が 70wt% の場合

SEM 像ではポアの形成は明瞭ではなく、繊維が束ねられた様な状態であり、約 2~3 μm とかなり小さなポアがわずかに見られた。また、断面でも、約 2~3 μm 程度の小さなポアが多数確認された (Fig. 6)。試料はステンレスシャーレから簡単に撤去できたが、辺縁はもろく試料の裏面側に微細な粒子の散在がみられた。ディスクの厚みは均一であった (Fig. 3f)。

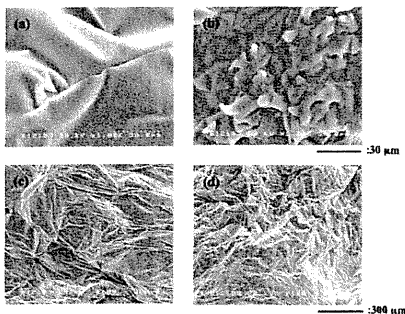


Fig.1 SEM pictures of freeze-dried PLA without NaCl (a),(c) :surface view, (b),(d) :cross-sectional view

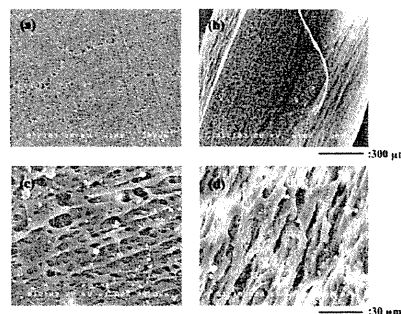


Fig.2 SEM pictures of freeze-dried GC-membrane without NaCl (a),(c) :surface view, (b),(d) :cross-sectional view

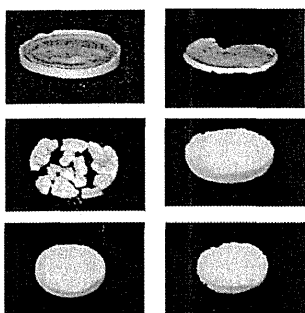


Fig.3 Gross View of freeze-dried PLA (a), GC-membrane (b), freeze-dried PLA with 30 wt% NaCl (c), 40 wt% (d), 50 wt% (e), 70 wt% (f).

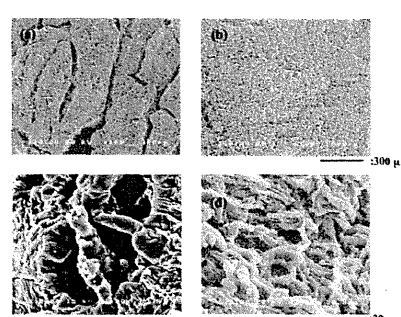


Fig.4 SEM pictures of freeze-dried PLA with 30 wt% NaCl (a),(c) :surface view, (b),(d) :cross-sectional view

部科校名：松戸歯学部

氏名：布施(長井) 恵

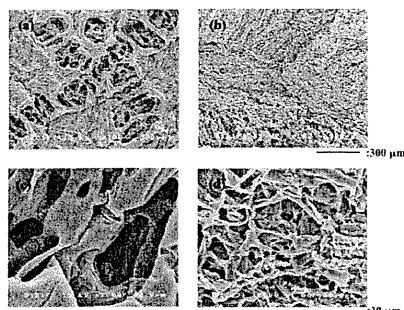


Fig.5 SEM pictures of freeze-dried PLA with 40 wt% NaCl
(a),(c) :surface view, (b),(d) :cross-sectional view

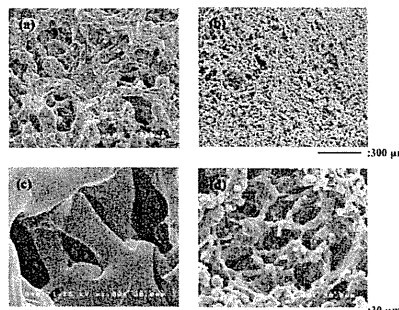


Fig.6 SEM pictures of freeze-dried PLA with 50 wt% NaCl
(a),(c) :surface view, (b),(d) :cross-sectional view

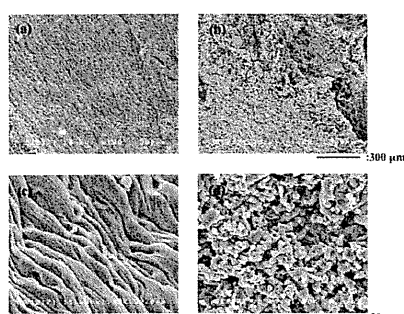


Fig.7 SEM pictures of freeze-dried PLA with 70 wt% NaCl
(a),(c) :surface view, (b),(d) :cross-sectional view

考察

本研究では、生分解性高分子材料である PLA 多孔体を作製するための基礎的な検討を行った。主に、ポロジェンの混合率を変化させた場合の多孔体の形成状態について検討を行った。長井¹⁾は、PLA とセバシン酸誘導体の共重合体をジオキサンに溶解し、凍結乾燥を行っている。そこで、有機溶媒としてジオキサンを、ポロジェンとして塩化ナトリウムを用い、凍結乾燥法によって多孔体の作製を試みた。まず、塩化ナトリウムを混合せずに、PLA 単独、PLGA 単独で凍結乾燥を行った。その結果、PLA 単独では、ポアは形成されなかったが、PLGA の場合にはポロジェンなしでもポアが形成されていた。この様に、同じ溶媒に溶解しても、生分解性高分子の構造が違えば凍結乾燥の効果が異なることが分かった。PLGA はポロジェンなしでもポアを形成できるが、GC メンブレンを使って多孔体を作製することは経済的ではないので、PLA/ジオキサン溶液にポロジェンとして塩化ナトリウムを混合して多孔体の作製を試みた。塩化ナトリウム 30~70 wt%の混合でいずれも多孔体を作製できるものの、ポアの生成状態は塩化ナトリウムの混合率により大きく影響を受けることが判明した。混合率 30wt%、40wt%では、ポアは形成できるが、試料全体に均一には形成されず、局在化していた。これは、塩化ナトリウムの混合率が低く、かつ、結乾燥前のシャーレ中での分布が均一ではなかったためと思われる。シャーレ中で塩化ナトリウムを均一に分散させることは困難であり、この濃度は実用的でないことが推察される。塩化ナトリウムの混合率 50wt%の時が、強度も安定で、比較的均一に連続性を有するポアが形成された。塩化ナトリウムの分散状態は溶液の粘性に受けることが予想され、本実験での 10wt%PLA のジオキサン溶液の粘性が、50wt%の塩化ナトリウムの分散には適当であったためと思われる。また、塩化ナトリウムが比較的均一に混ざっていたため、試料の表面性状は粒がそろい、変形も少なかったと思われる。PLA の濃度が異なれば溶液の粘性が異なってくるので、塩化ナトリウムの分散状態も当然影響を受け、多孔体の形成状態にも影響してくる。塩化ナトリウム混合率を 70wt%と増加させると、ポアの形成が明瞭に確認できなかった。これは、塩化ナトリウムの混合率が多過ぎて、凍結乾燥作業に影響を与えたためと思われる。混合するポロジェンの濃度には最適な値が存在することが判明した。以上の結果から、ポロジェンである塩化ナトリウムの混合率によって PLA 多孔体の形成状態が大きく影響を受けることが分かった。今後、引き続き、塩化ナトリウム 50wt%混合した時の多孔体について、アルカリ加水分解処理によるカルボキシル基の導入やコラーゲン、フィブロンectinなどの細胞接着タンパク質の固定化を行い、その生体適合性の評価を行い、生理活性機能を有する新たな足場材料や骨補填材の作製を試みる予定である。

1)長井 恵：生体内分解性材料の研究：ポリ乳酸/コポリセバシン酸エステルブロックポリマーおよびそのリン酸カルシウムとの複合材の分解性，歯材器，19:56-64, 2000.

* 課題番号	個 08-114
--------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 19 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 青 木 伸 一 郎



所属・資格 松戸歯学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1	種 目 <input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2	研究課題 歯科治療が QOL に及ぼす影響についての基礎的研究	
3	研究の目的 十分に咀嚼をすると脳の活性化がおこることや発育に影響を与える可能性が示唆されており、咬むことと脳機能との関連について研究が進められている。咀嚼がどのような機能に影響を与えるかについて現在多くの研究が行われている。歯科治療行為における目的の一つは、咀嚼機能の改善である。近年では歯科治療行為と全身への影響も示唆されているが、歯科治療を行い咀嚼機能が改善された患者の QOL の変化については統一された見解はなされていない。本研究では歯科治療前後の QOL について脳波測定やアンケート調査等を行うことにより、歯科治療が患者の QOL にどのように影響を与えているかを検討し、いままであまり行われていない歯科治療前後の客観的な変化について検討することを目的としている。 これらのデータを蓄積することにより、歯科治療の重要性が確立できると考えている。	
4	研究の概要 咀嚼機能低下を主訴に病院に訪れる患者を対象とし、患者に実験主旨を十分に説明し、治療後にも測定を行う事を含めて説明し承諾を得る。承諾を得た患者を被験者とし、咬合状態の確認及び購入済みの咬合力測定システムを用いて、咬合力を測定する。次に心理テスト及び口腔内状態についての満足度を中心としたアンケート調査を行う。最後に脳波計を用いて脳波測定を行う。 歯科治療終了後に改善前との比較のため、1回目を行った被験者において、咬合状態の確認及び咬合力測定システムを用いて、咀嚼機能改善後の咬合力を測定する。次に再び心理テスト(YG 性格検査)及び口腔内状態についての満足度を中心としたアンケートを行う。最後に改善前と同様に改善後についての脳波測定を行う。得られたデータについてコンピュータソフトを用いて改善前後について検討を行う。	
5	研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) ・ 研究代表者 ・ 研究分担者 (役割分担)	

※ホームページ等での公開の 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：青木 伸一郎

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

<対象および方法>

1. 対象

被験者は、日本大学松戸歯学部付属病院に来院している51～82歳の患者である。医療面接により現在医科病院に通院が必要な疾患は有していないこと、実験に支障がない程度の視力を有していることを確認した。

現在の口腔状態は、残存歯に疼痛を有する歯や進行した歯周疾患がないが、咬合支持がほとんどない多数歯欠損を有する咀嚼機能の改善を主訴とした患者を選び、患者には実験の趣旨について説明し、研究について理解し、承諾を得られた患者を対象とした。

2. 脳波測定課題

課題は円、三角、四角の試料を用いた視覚による図形の鑑別である。本実験ではoddball課題に準じ、標的刺激(Rare刺激)を円、非標的刺激(Frequent刺激)を三角、四角とし呈示頻度を20%、80%とした。呈示前にRare刺激とFrequent刺激および呈示回数について口答で説明し、Rare刺激を認めた時にボタン押しを行うよう指示し、呈示時間を1000msec、呈示間隔を3000±500msecとしてランダムに連続して100回呈示した。

3. 脳波測定方法

シールドルーム内において椅子に安静な状態で座位をとらせ1m前方にあるディスプレイの中央を見るよう説明し、呈示された試料を見せ、Rare刺激が呈示されたときのみボタンを押すよう指示した。情報収集から判断にかけての一連の認知過程をデジタル多用途脳波計(日本GE マルケット社製SYNAFIT5500)、開始からボタンを押すまでの反応時間を多目的刺激コントローラ(メディカルトライシステム社製MultiTriggerSystem2001)にて測定した。

事象関連電位(ERP)は、国際10/20法に基づき、正中前頭部(Fz)、正中中心部(Cz)、および正中頭頂部(Pz)の3箇所より両側耳朶連結を基準として導出し、振幅が±100μV以上を越える時にはアーチファクトの混入と考え除去した。ERPの測定はRare刺激、Frequent刺激の画像を多目的刺激コントローラを用いてディスプレイ上に呈示した。

4. 心理検査

患者の心理的な傾向および現在のQOLについて測定するために、心理検査及びQOL検査の測定を行った。心理検査はCDによる強制読み上げ方式で行い、記入時間は1問につき数秒程度で行い、深く考え込まず、直感で応えるように指示をした。QOL検査は、各自で任意記入方式とし、時間の制限は行わなかった。

5. 解析方法

標的刺激が提示されたときに測定した電位を20回加算平均し、被験者ごとに加算平均波形を求めた。刺激開始をトリガーとして、トリガーポイントからの経過時間を潜時とし、波形の高さを振幅とした。潜時を基準としてそれぞれの成分を行った。その後、義歯製作を行い、義歯がおおむね安定した約2ヶ月後に再びERPの測定、心理検査、QOLの測定を行った。義歯装着前後の事象関連電位の成分について比較を行い、義歯装着前後における脳科学的な違いについて検討を行った。

<結果>

義歯装着前後の事象関連電位の成分について検討を行った結果、事象関連電位の面積による比較では、義歯装着後は義歯装着前に比べ大きくなる傾向を認めた。

<考察>

近年、「食育」などの言葉に代表されるように食べることの重要性について、一般に認知されるようになってきたが、咀嚼のために行う歯科治療行為の全身的な影響については、不明な点が多い。以前からの治療に関する研究では、治療後の咀嚼能率の変化や天然歯と補綴物との咬合力の違いなど物理的な変化についての検討は多く行われてきた。その結果、天然歯と比べ補綴治療後は、咬合力や咀嚼能率は半分もしくはそれ以上に低下するといわれており、咀嚼の重要性、特に脳機能との関連性については注目され、医療測定機器の進歩により、徐々にではあるが、脳機能との関連について報告がされてきている。しかし、歯科治療と脳機能との関連について検討したものはまだ少ない。

部科校名：松戸歯学部

氏名：青木 伸一郎

研究の結果（つづき）

医療分野においては、Evidenceに基づいた医療行為の施行、そして患者満足度においても質の向上が求められている。歯科治療における質の向上が求められ、患者満足度などを用いた歯科治療効果に対するEvidenceが求められている。歯科の医療行為も形態回復から、さらに機能回復のEvidenceが求められるようになったが、歯科分野においては、報告は少なく、特に歯科治療を行った後の咀嚼機能が改善された患者のQOLの変化については、統一された見解はなされていない。また検討方法としてはアンケート調査が主流であり、それ以外の方法についてはほとんど行われていない。

本研究では歯科治療前後のQOLについて脳波測定やアンケート調査等を行うことにより、歯科治療がどのようにQOLに影響を与えているかを検討し、いままであまり行われていない歯科治療前後の全身の客観的な変化について検討することを目的とし、歯科治療行為の中でも患者にとって影響が大きいと考えられる義歯による補綴治療において、脳波および心理検査を測定し、義歯装着が脳機能とくに心理的影響について認知的科学的検討を行った。

事象関連電位は、誘発電位の一種類であり、 α 波、 β 波などのような定常脳波とは違い、一過性の刺激によって誘発する電位といわれている。この誘発電位は、刺激や方法により種類があり、末梢神経の刺激伝達障害の診断や、脳死の判定基準など臨床的にも応用されている。歯科分野では体性誘発電位（SEP）が三叉神経痛や抜歯後の麻痺の治療などについて用いられている。

事象関連電位は、聴覚や視覚などの刺激により誘発される電位であり、刺激開始後100ミリ秒程度までに誘発されるものと、100ミリ秒程度から数百ミリ秒の間に誘発されるものとに区別される。前者を外因性の要因からのものと考えられ主に刺激による生体の反射に近いとされる。それに比べ後者は、内因性の要因からのものと考えられ主に刺激を情報処理した結果などの認知機能的なものを反映すると考えられている。今までアンケート調査などで心理的な状態の検討を行う研究は、多数認められてきたが、このような事象関連電位を用いて、QOLなどの患者の内因性の測定についての検討はほとんど見られない。

治療前後の脳活動を客観的に観察することは、歯科治療が心身両面の健康に及ぼす効果のEvidence確立に貢献できると考えられ、今回、義歯の装着前後において事象関連電位を指標とした結果、装着前後に差を認めたことより、歯科治療で義歯を製作し、義歯を使用することは、脳のパターン認知や記憶の照合に関連した認知機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 19 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 岡 本 康 裕



所属・資格 松戸歯学部・助教

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	顎関節症に対する理学療法効果の顎運動測定を用いた検討	
3 研究の目的	<p>顎関節症に対する治療は、これまで咬合治療が優先された時期が長く存在してきた。しかし近年、顎関節症に対する治療のアプローチは大きく変わってきており、理学療法が多用されるようになってきている。これまで顎関節症に対する理学療法効果の評価法は上下切歯間の距離の計測による開口量の増大が主なものである。</p> <p>そこで、開口量の増大に対しこれまでの検討とは異なった評価が行なえる、顎運動測定を用いて理学療法効果の評価を行う。顎運動を用いることにより、開口量の増大が開口量構成要素の何が変化したことにより確保できるようになったのかを確認できる。開口量構成要素の何が変化し開口量が確保されているのかを知ることは、顎関節症に対する理学療法効果の評価として重要であると考え。</p>	
4 研究の概要	<p>1. 開口障害を認め来院した顎関節症患者さんの中で治療が理学療法での対応となったもので、その後理学療法のみで開口量が回復した患者さんに対しチェアサイドでの顎運動測定を簡便に行える CMS-JAW を用いて顎運動測定を行う。</p> <p>2. 測定した顎運動を解析し、理学療法によって回復した開口量は開口量構成要素の何が変化し開口量の回復が得られているのかを検討する。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

部科校名：松戸歯学部

氏名：岡本康裕

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

【対象および計測】

日本大学松戸歯科病院に来院した患者より開口障害を主訴とし、MRI 検査において片側性の非復位性関節円板前方転移と診断された患者で理学療法（開口訓練）により同等に開口量の回復を認めた者 2 例に対し、最大開閉口運動の測定を WinJaw システム（超音波動作解析器 CMS-20S, デブリス社製）を用いて連続 15 回の顎運動計測を行った。

また、被験者に対しては実験の内容の説明を十分に行いインフォームド・コンセントの得られた被験者に対して行った。また、実験の結果は採取の場合において PC 画面上にて学院どうデータの開示ならびに説明を被験者に対し行った。（日本大学松戸歯学部倫理委員会承認番号 EC06-012 号）

なお、理学療法（開口訓練）は自己開口訓練とし、方法は親指と人差し指を交差させ上下の前歯を押し広げ、開口した状態で 10 秒間保持し、これを 10 回繰り返すこととした。

【結果および考察】

今回検討を行う 2 例の初診時の開口量は症例 1. は 27mm, 症例 2. は 22mm であった。

顎運動測定の解析結果は、症例 1. では回復後開口量は 36.22mm, 患側滑走量は 3.84mm, 健側滑走量は 8.05mm, 下顎回転量は 21.59° であった。症例 2. では回復後開口量は 37.00mm, 患側滑走量は 10.75mm, 健側滑走量は 12.57mm, 下顎回転量は 23.45° であった。

回復後の開口量において症例 1. 症例 2. ともに開口量は 36.22mm および 37.00mm であり一般回復目標の 35mm を超える近い値を認めた。滑走量において患側滑走量では症例 1. は滑走量 3.84mm, 症例 2. は滑走量 10.75mm であり、健側滑走量では症例 1. は滑走量 8.05mm, 症例 2. は滑走量 12.57mm であり、患側、健側ともに症例 2. において大きい値を認めた。回転量においては症例 1. で 21.59° 症例 2. で 23.45° であり症例 2. が若干大きな値を認めた。また、初診時開口量と回復後開口量の差においては症例 1. で 9.22mm, 症例 2. で 15.00mm であり症例 2. において大きい値を認めた。

近年、顎関節症分類における非復位性顎関節円板転移症例に対して理学療法（開口訓練）が用いられるようになり、自然治癒群と開口訓練群との開口量の回復状況の比較や顎関節腔洗浄、消炎鎮痛剤療法における開口訓練の有無による開口量の回復状況の比較など、理学療法（開口訓練）に対する治療効果の評価が多数行われている。しかし、これまでに行われている理学療法効果の評価は上下切歯点間の計測による検討であり開口量を構成する下顎の回転と左右下顎頭の滑走についての検討は行われていない。

今回の結果では、顎運動を用い開口量を下顎の回転と下顎頭の滑走量に分離し検討を行うことによりこれまでの理学療法効果の評価では回復後の開口量から同等の評価となるものであっても下顎頭の滑走量に大きな差を認めた。これは回復後の開口量は同等であるが初診時開口量と回復後開口量の差が症例 2. の方が大きいことを反映したものとも考えられるが、従来の評価では下顎頭の滑走量の回復により得られた開口量の回復であるとは判断できない。

このことから開口量が同等であっても顎機能の回復状況は同等であったとは判断できないと考えられ、理学療法効果の評価を開口量のみでなく顎運動を用いて開口量を下顎の回転と下顎頭の滑走量に分離し検討を行うことにより詳細に理学療法の顎機能回復の効果について評価を行うことができると考える。

また、今回の検討では病態、理学療法ともに限定し検討を行ったが、顎関節症はさまざまな病態を認めることから今後その他の病態に対する検討が必要であると考えられ、顎関節症に用いられる理学療法においても患部のマッサージ、温熱療法（ホットパック）、超音波、低周波マッサージ等さまざまなものがあることから、それぞれに検討が必要であると考えられる。さらに理学療法においては治療効果についての検討は行われているものの、その種類、回数、強度、期間においてのエビデンスは未だ十分でない環境である。そこで、今後さまざまな病態、理学療法の種類、回数、強度、期間において顎運動を用いて理学療法効果の評価効果の評価のデータを蓄積することにより病態に即した理学療法の種類、回数、強度、期間に関するエビデンスの確立が可能となっていくと考える。

部科校名：松戸歯学部

氏名：岡 本 康 裕

研究の結果（つづき）

【結 論】

顎関節症患者に対する理学療法効果の評価に顎運動を用いて検討を行ったところ、開口障害を主訴とする非復位性の片側性顎関節前方転移患者における理学療法による同等な開口量の回復であっても異なる顎運動様相を認めた。

そこで、理学療法効果の評価に顎運動を用いることにより、従来の理学療法効果の評価では検討できない詳細な評価ができる可能性が考えられた。

【今後の展望】

今後さまざまな病態，理学療法の種類，回数，強度，期間において顎運動を用いて理学療法効果の評価効果の評価のデータを蓄積することにより病態に即した理学療法の種類，回数，強度，期間に関するエビデンスの確立を目指す。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月20日

日本大学 総長 殿

氏 名 窪田 聡



所属・資格 生物資源科学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	植物生産における多孔質鉢による超節水・省力型給水システムの開発	
3 研究の目的	<p>花き生産過程における環境負荷項目を低減する認証プログラム (MPS-ABC) では、農薬・肥料・水・エネルギー等の使用削減が評価基準となっている。農薬と肥料については国内法等の整備により適正使用が義務付けられたこともあり、それらに関する研究の蓄積も十分にある。一方、灌水方法については、灌水労力の低減という観点からの研究は多いが、わが国は降水量が多く、水が花き生産上の制限要因になることが少ないことから、水利用効率の向上という観点からの試験研究はほとんどない。今後、MPS の利用拡大に伴って、花き生産の水使用状況がクローズアップされることは必至であり、節水型灌水技術の確立は急務である。そこで、本研究では鉢物生産における超節水・省力型給水システムの開発を行った。</p>	
4 研究の概要	<p>微細な孔隙を持つ多孔質素材を用いて鉢を製作する。鉢内部に土壌を充填し、この鉢を常時水槽内に置き、鉢壁を通して鉢内部の土壌に給水する。給水は鉢壁の孔隙と土壌孔隙の毛管力の差によるものであり、土壌の当該孔隙が水分で飽和されるとほぼ停止する。一方、植物の吸水によって土壌水分量が減少した場合は再び鉢壁から給水が開始される。従来法は灌水直後に土壌孔隙が一時的に水分で満たされるため、一時的な根の呼吸障害が発生するが、本法では毛管孔隙にのみ給水されるため、給水が飽和量に達しても根の呼吸障害を起こす恐れはほとんどない。しかし、本法では従来法に比べると給水速度は遅いので、季節によっては植物の生育が抑制される懸念がある。そこで本研究では、異なる土壌における給水速度を検討するとともに、数種の植物を従来の頭上灌水法、底面給水法および本システムにおいて、植物の生育、水消費量等を比較検討し、基礎的なデータを収集するとともに、適用可能作目を明らかにした。なお、本研究成果をもとに、「容器に植えた植物の地下部環境制御装置及び地下部環境制御方法」として特許出願（特願 2008-245231）した。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 研究分担者（役割分担） 	

※ホームページ等での公開の 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：窪田 聡

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

実験1 多孔質鉢の給水速度に及ぼす土壌の種類の影響

花卉栽培によく利用されている赤玉土、黒土、砂、市販の培養土であるサカタスーパーミックス、赤玉土：黒土：サカタスーパーミックス=1:1:1（用土1）、黒土：サカタスーパーミックス=1:1（用土2）の6種類を供試した。また、比較として鉢のみで給水させた区も設けた。鉢は3.5号の無穴素焼鉢（多孔質鉢）を用いた。これらの土壌を3.5号多孔質鉢に入れ、鉢を水槽内に静置し12時間ごとに重量を測定し、給水速度を求めた。また、これらの給水速度と10分間ごとの蒸発散量のモデルを用いて多孔質鉢に入れたこれらの土壌に植物を植えた場合の鉢内土壌水分率を計算し、本システムにおける水供給能力についてシミュレーションした。

多孔質鉢単体の透水性は4mL/日であったが、各土壌の吸水速度はこれよりも著しく速く、赤玉土の場合最も速い時89.3mL/日であった。したがって、多孔質鉢内土壌への水分供給は鉢壁からの透水性に加えて、土壌の毛管力による吸水性が大きく影響を与えていると考えられる。土壌の毛管水はpF1.8~4.2までの土壌水分張力で保持された水分であるが、この内植物が有効に利用できる水分の範囲は、pF1.8~2.7の範囲である。したがって、毛管水を利用する本給水システムの場合、このpFの範囲の水分を多く保持できる土壌が本システムに適しているといえる。本実験では各土壌のpF-水分曲線を測定していないため、供試した土壌の水分特性は不明であるが、池田（2000）のデータによると、赤玉土とピートモスのpF1.8~2.7の範囲の土壌水分率の差はそれぞれ9%と5%であった。したがって、赤玉土はピートモスよりも、1.8倍給水速度が速いと考えられる。サカタスーパーミックスはピートモスを主体とした培養土であるため、サカタスーパーミックスはピートモスに近い特性を示すと考えられる。本実験の赤玉土とサカタスーパーミックスの給水速度は、サカタスーパーミックスよりも赤玉土が著しく速かったこととおおむね一致する。

1日当たり10%の土壌水分が連続して失われると、供試したほとんどの土壌では土壌水分率が回復することなく低下したが、1日当たり8%の土壌水分が失われた場合には、赤玉土と用土1では土壌水分率はほぼ一定に維持された。したがって、これらの土壌の場合、植物に対する有効水分の供給能力の限界は、1日あたり8%の水分に相当すると考えられる。本実験で利用した3.5号鉢の有効土壌容積は400mLであることから、32mLの蒸散量まで対応できる。4号鉢の場合には容積が650mL、5号鉢の場合には1000mLであるから、植物に供給できる水の量は1日あたり52mLと80mLと概算できる。実際に5号鉢でシクラメンを育成した場合の一日の蒸散量は培養土からの蒸散量も含め約80mLとされている（三浦,1993）。これらのことから、5号の多孔質鉢を用いれば、水の供給能力から見てシクラメンの栽培も十分可能であると判断できる。また、赤玉土を主体とした土壌の場合、水分率が45%の時の気相率は約30%確保されていることから、これらの土壌を利用することにより、土壌水分と空気がバランスよく植物根に供給できるものと考えられる。

実験2 多孔質鉢栽培における花卉作物の生育・開花

植物材料はパンジー（*Viola × wittrockiana* Gams）‘デルタプレミアム ディープブルーウィズブロッチ’、デージー（*Bellis perennis* L.）‘タッソー ストロベリー&クリーム’およびガーデンシクラメン（*Cyclamen persicum* Mill.）‘リブレット F1’を供試した。実験区は3号の無穴素焼鉢を用いた多孔質鉢区、3号の黒ビニールポットを用いたマット給水区、同じく3号の黒ビニールポットを用いた手灌水区とした。多孔質鉢区は3号無穴素焼鉢を直径9cmの穴を5箇所あけた発泡スチロールの板にはめこみ、パンジーの場合は水面に浮かべ、デージーの場合は8分目まで水を入れた白色プランター（菜園プランター650, アイリスオーヤマ）（縦22.5cm×横64.5cm、深さ18cm）の上に乗せた。給水量がわかるよう、各プランターに22cmの透明なビニールチューブをとりつけた。マット給水区はサカタのタネから購入したジフィーキャピラリーシートをベンチ上（117cm×89cm）に7cm垂れ下がるように敷き、そこに3号黒ビニールポットを置いた。水は多孔質鉢区では水深15cmを維持するよう、毎週1回プランター内へ給水した。マット給水区は土壌水分率が39%になった時、マットに1分間ポンプで給水した。ポンプの吐出量は13.5L/分であった。手灌水区はマット給水区と同様の土壌水分率になったときに、130mL/鉢灌水した。根域温度と気温は温度ロガーを用い、10分間ごとに自動計測した。なお、根域温度は地表面から3cmの深さにセンサーを差した。土壌水分率はセンサーを用い、データロガーにより10分間隔で自動計測した。

部科校名：生物資源科学部

氏名：窪田 聡

研究の結果 (つづき)

パンジーの乾物生産と生育は多孔質鉢区が最も優れた。栽培期間中の灌水量は多孔質鉢区では 1.8L/鉢、マット給水区では 3.0L/鉢、頭上灌水区では 0.9L/鉢となり、多孔質鉢区の灌水量は従来法のほぼ中間的な値を示したが、これを乾物生産量の水の利用効率として捉えたと、多孔質鉢区では 0.96g/L、マット給水区では 0.3g/L、頭上灌水区では 1.13g/L となった。したがって、多孔質鉢では灌水中に利用された水が有効に利用され乾物生産が促進されたものと考えられる。

デージーの乾物生産と生育はパンジーと同様に多孔質鉢が最も優れた。栽培期間中の灌水量は多孔質鉢区では 1.7L/鉢、マット給水区では 7.8L/鉢、頭上灌水区では 3.1L/鉢となり、多孔質鉢区で最も少なくなった。デージーの栽培では多孔質鉢区の水面からの水分蒸発を抑えるように装置を改良したため、パンジーと比較して著しく灌水量が少なくなったものである。また水利用効率は多孔質鉢区、マット給水区、頭上灌水区でそれぞれ 3.9g/L、0.6g/L、1.4g/L となり、多孔質鉢区では灌水中に利用された水が極めて効率的に乾物生産に利用されていた。

ガーデンシクラメンの生育は頭上灌水に比べて多孔質鉢区で優れた。マット給水区では植物が途中で枯死した。

パンジー、デージー及びガーデンシクラメンの栽培において、マット給水区および頭上灌水区の鉢内の温度(根域温度)は特に夏季において根の生育が阻害される 30℃以上になる日が多いが、多孔質鉢区の根域温度は気温とほぼ同じかそれよりもやや低く推移するため 30℃を越える日は少なく、また最低温度は気温よりも約 2℃高く推移した。すなわち、多孔質鉢区の根域温度は従来法の栽培方法に比べて、マイルドに推移し、根の生育に好適な環境が長く維持されていることが判明した。その結果、パンジー、デージー、ガーデンシクラメンの根の生育は、従来法に比べて著しく促進された。

3種類の植物を栽培した結果、乾物重は多孔質鉢で増加したことから、他の2区に比べて光合成活性が高かったものと推察される。光合成は葉から CO₂ を吸収し、光エネルギーを利用して炭水化物を生産する一連の過程であるが、CO₂ の葉内への取り込みは気孔を介して行われる。気孔は水ストレスに敏感に反応し、水分が減少すると葉の水分の損失を防ぐために速やかに閉鎖する。したがって、水ストレスを受けた植物は大気中から CO₂ を吸収することが困難となり、その期間中には光合成はほとんど行われなくなる。今回の実験では、多孔質鉢では土壌水分率が約 45% で実験期間中きわめて安定的に推移したのに対し、頭上灌水区とマット給水区では 36% まで低下することがあった。土壌水分に対する気孔の閉鎖の程度は植物の種類によって異なると考えられるが、少なくとも頭上灌水やマット給水のように一時的に土壌水分率が低下する場合には、気孔が閉塞し、光合成が抑制されていたものと考えられる。さらに、根の生育は多孔質鉢で著しく促進されていた。このことも、養水分を土壌から効率よく吸収するように働き、一層 CO₂ 吸収が促進されたと推測される。また、吸収された養分、特に窒素は CO₂ の暗固定に関与する Rubisco やクロロフィルの生合成に不可欠であることから、根の発達は窒素の吸収量の増加をもたらす、間接的に光合成活性の促進に寄与したものと考えられた。

以上のことから、従来法では土壌水分率は灌水時に著しく高く、灌水直前に低下する変化を示し、土壌水分率と気相率の変動は激しいが、多孔質鉢を利用した給水方法では、赤玉土を主体とした土壌を利用すると、昼に土壌水分率は一時的に数%低下するが、夜間に回復するため、鉢内土壌水分率が約 45%、気相率は約 30% の環境がほぼ安定的に維持できることがわかった。鉢内の温度環境も従来法に比べると極めてマイルドに維持され、根の生育を阻害する温度環境に遭遇する時間が従来法に比べて大幅に低減できた。このような環境でパンジー、デージー、ガーデンシクラメンを栽培すると、いずれの植物も従来法に比べて著しく生育が促進され、水面からの蒸発量を改善すると従来法に比べて著しく灌水量を低減できた。

本研究では灌水量の低減を主目的として実験を行ったが、多孔質鉢栽培では根の生育促進が著しく、それには根域温度が強く影響していると考えられたことから、今後は根域温度を積極的に制御することにより植物成長を調節する技術に結びつけることが可能で、地下部の水分環境と温度環境を複合的に制御する装置が開発できる。このため、これらの研究成果を基にして特許出願した(特願 2008-245231)。また地下部の温度環境がどのようなメカニズムで地上部の生育を調節するのかという学術的な研究にも役立つと思われるため、今後これらについてさらに検討を進めるつもりである。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年3月21日

日本大学 総長 殿

氏 名 村田 浩一



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。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	琉球列島を水際とした保全医学のための外来病原微生物侵入モニタリング	
3 研究の目的	<p>本研究は、琉球列島における外来病原微生物 (Alien Micro-Organisms) 侵入のモニタリングシステム構築を試みると伴にリスク評価を行い、希少鳥類保全およびヒトの健康維持に役立てることを目的とした。</p> <p>琉球列島は国内における「南限の水際」として外来病原微生物侵入を監視する上で極めて重要な検疫地域である。渡り鳥や漂鳥が飛来する琉球列島の湿地および森林地帯には、ヤンバルクイナ、ノグチゲラ、カンムリワシなど希少な固有鳥類が生息している。このような土地に国外の熱帯もしくは亜熱帯地域から飛来した鳥類によって節足動物媒介性病原微生物がもたらされ、それらが在来の蚊によって媒介された場合、国内に固有鳥類に与える影響は大きい。また、その病原微生物がヒトと動物に共通のものであれば、公衆衛生上の問題ともなる。そのようなことから、琉球列島をモニタリング地域に選定し住血原虫を節足動物媒介病原体の指標微生物として外来病原微生物侵入のモニタリング手法の構築を試みた。</p>	
4 研究の概要	<p>沖縄本島のラムサール条約指定湿地である漫湖およびその周辺地域ならびにヤンバルクイナの生息地である国頭村安田区周辺において蚊を採取し、蚊種を同定すると共に分子生物学的手法を用いて蚊体内から鳥マラリア原虫遺伝子断片の検出を試みた。</p> <p>漫湖に飛来する渡り鳥と住血原虫媒介蚊との関係について調査し、シギ・チドリ類を中心とした渡り鳥の飛来時期や媒介蚊の発生時期さらに其々の種の違いによる原虫感染の可能性を分析した。さらに漫湖周辺の湿地で捕獲された渡り鳥と留鳥から血液採取して住血原虫感染の有無を調べた。</p> <p>沖縄本島北部に限局的に生息する希少鳥類であるヤンバルクイナ (<i>Gallirallus okinawae</i>) と寄生体 (住血原虫) との関係、原虫媒介蚊や生息環境も含めて野外調査し、人間の生活環境が野生生物間の相互関係に与える影響を評価した。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

部科校名：生物資源科学部

氏名：村田 浩一

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究目的を達成するため、沖縄県の漫湖およびその周辺地域ならびに国頭村で行った調査研究の結果を以下のとおり分けて記す。

【沖縄県漫湖およびその周辺地域での研究結果】

約1年間にわたり、沖縄県那覇市漫湖周辺において捕虫網およびドライアイス誘引剤としたCDC型トラップを用いて蚊を採集し遺伝子解析をおこなった。採集された蚊は、実体顕微鏡下で形態学的に種同定した。最大5匹を1プールとしてDNA抽出した後、鳥マラリア原虫のmtDNA *cyt b* 部分領域を標的としたnested-PCRを行った。蚊とシギ・チドリ類との関係を漫湖水鳥・湿地センターから提供を受けた同年度の飛来情報を用いて検定した。同県沖縄市比屋根湿地において環境省の許可を得て捕獲されたシギ・チドリ類等の渡り鳥ならびに留鳥から得られた血液試料を用い、同様の方法で鳥マラリア原虫遺伝子の検出を試みた。標的遺伝子の増幅が認められた場合は、増幅産物の塩基配列をダイレクト・シーケンス法で決定し、DNAデータベースに登録された配列と比較検討した。

漫湖周辺の周年調査で、7種758頭の蚊 {フタクロホシチビカ (*Uranotaenia novobscura*)、シロハシイエカ (*Culex pseudovishnui*)、ネッタイエカ (*Cx. quinquefasciatus*)、コガタアカイエカ (*Cx. tritaeniorhynchus*)、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*)、キンイロヤブカ (*Ae. vexans nipponii*)、オオクロヤブカ (*Armigeres subalbatus*)} が採集された。そのうちヒトスジシマカが88%、ネッタイエカが11%と大半を占めていた。最も多くの蚊が採集されたのは7月から9月の3ヶ月間で、その期間はキアシシギ (*Tringa brevipes*) 飛来数のピークと重なっていた。12月と1月の飛来時期における蚊採集数は少なかった。全体的に蚊採集数とシギ・チドリ類飛来数のピークは重なっていたが、鳥種および蚊種毎の関係性を解析すると接触時期がそれぞれの間で異なることが推察された。今回、吸血蚊は採集されなかったため、吸血源となる鳥種は特定できなかった。また、蚊体内から鳥マラリア原虫遺伝子は検出されなかった。

比屋根湿地で捕獲された8種39個体の鳥類のうちリュウキュウメジロ (*Zosterops japonicus lochooensis*) やアオアシシギ (*T. nebularia*) など4種4個体 (10.3%) から鳥マラリア原虫遺伝子が検出された。沖縄島の留鳥からのみ検出される遺伝子配列が認められた一方で、本州の野鳥から一般的に検出される配列も認められた。

渡り鳥によって伝播される鳥マラリアやウエストナイル熱等の節足動物媒介感染症 (VBDs) の国内産鳥類への影響を評価するには、鳥の飛来時期と媒介昆虫の発生時期との関係を理解することが重要である。渡り鳥の中でもシギ・チドリ類は南北半球間を長距離移動し、その中継地として国内の湿地や干潟を春と夏に利用している。かれらの夏の渡りは蚊の発生時期と重なっており、越冬地としても利用される沖縄島内の湿地では蚊が周年発生している。そのような時期と場所へ国内に存在しないVBDsが渡り鳥によって運搬され侵入した場合、当地に生息する蚊の媒介によって感染拡大する可能性がある。希少固有鳥類が生息する琉球列島の湿地においては、種保全の観点から蚊媒介感染症に対する継続監視調査が求められる。

【沖縄県国頭村での研究結果】

沖縄県国頭郡国頭村安田区および同村伊部において捕虫網およびドライアイス誘引剤としたCDC型トラップを用いて蚊を採集し種同定した。最大5匹を1プールとしてDNA抽出した後、鳥マラリア原虫のmtDNA *cyt b* 遺伝子部分領域を標的としたnested-PCRをおこなった。陽性サンプルについてはダイレクトシーケンス法で塩基配列決定後、分子系統解析をおこなった。

10属25種4,272個体の蚊 {オオハマハマダラカ (*Anopheles (Anopheles) saperoi*)、オオクロヤブカ (*Armigeres (Armigeres) subalbatus*)、ムラサキヌマカ (*Coquillettidia (Coquillettidia) crassipes*)、カラツイエカ (*Culex (Culex) bitaeniorhynchus*)、ネッタイエカ (*Cx. (Cux.) pipines quinquefasciatus*)、ヨツホシイエカ (*Cx. (Cux.) sitiens*)、コガタアカイエカ (*Cx. (Cux.) tritaeniorhynchus*)、アカクシヒゲカ (*Cx. (Culiciomyia) pallidothorax*)、リュウキュウクシヒゲカ (*Cx. (Cul.) ryukyensis*)、カギハシクロウスカ (*Cx. (Eumelanomyia) brevipalpis*)、コガタクロウスカ (*Cx. (Eum.) hayashii*)、フトシマツノフスカ (*Cx. (Lophoceraomyia) infantulus*)、アカツノフスカ (*Cx. (Lop.) rubithoracis*)、トラフカクイカ (*Cx. (Lutzia) halifaxii*)、オキナワヤブカ (*Ochlerotatus (Bruceharrisonius) okinawanus*)、ハマダラナガスネカ (*Orthopodomyia anopheloides*)、ヒトスジシマカ (*Stegomyia albopictus*)、リバースシマカ (*St. riversi*)、トウゴウヤブカ (*Tanakaius togoi*)、フタクロホシチビカ (*Uranotaenia (Pseudoficalbia) bimaculata*)、ムネシロチビカ (*Ur. (Pse.) nivipleura*)、ストウンチビカ (*Ur. (Pse.) jacksoni*)、オキナワチビカ (*Ur. (Uranotaenia) annandalei*)、マクファレンチビカ (*Ur. (Ura.) macfarlanei*)、コガタフトオヤブカ (*Verrallina (Harbachius) nobukonis*)} が採集された。

部科校名：生物資源科学部

氏名：村田 浩一

研究の結果（つづき）

なおコガタフトオヤブカは長崎県大村で発見され（Yamada, 1932）、同地において再発見されたが（Ohmori, 1952）、1954年以來基産地での採集報告はない。西表島、石垣島での採集報告はあるものの、これらの地域でも非常に稀な種で、九州と八重山諸島の間地域にあたる沖縄本島、奄美大島での採集報告はこれまでなかった。本報は、沖縄本島におけるコガタフトオヤブカの分布初記録となった。

採集された蚊のうち、液浸標本、乾燥標本、損傷が激しいサンプルを除く6属18種3,253個体の雌蚊（オオハマハマダラカ、オオクロヤブカ、ムラサキヌマカ、カラツイエカ、ネッタイエカ、コガタアカイエカ、アカクシヒゲカ、リュウキュウクシヒゲカ、カギハシクロウスカ、コガタクロウスカ、フトシマツノフスカ、オキナワヤブカ、ヒトスジシマカ、リバーシマカ、トウゴウヤブカ、フタクロホシチビカ、ムネシロチビカ、オキナワチビカ）から抽出されたDNAサンプル0.86%（28/1263）に鳥マラリア原虫遺伝子の増幅が認められた。増幅が確認された種はオオハマハマダラカ、オオクロヤブカ、ヒトスジシマカ、リバーシマカの4種で、それぞれの感染率（MIR）は、0.20%、1.27%、0.58%、1.19%であった。また、オオクロヤブカからは*Haemoproteus* sp.の遺伝子が検出され、過去にヤンバルクイナから検出され*Haemoproteus* sp.の塩基配列と比較した結果、241塩基中240塩基が一致した。分子系統解析の結果、ヤンバルクイナとオオクロヤブカから検出された*Haemoproteus* sp.の隣接するクラスターには主に南方の鳥種から分離された鳥マラリア原虫遺伝子が存在していたが、これらの*Haemoproteus* sp.との相同性は88%と高かった。

我々は、これまでに本地域の野鳥から鳥マラリア原虫（*Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp.）を検出しているが、そのベクターとなる蚊種に関しては不明であった。今回、オオクロヤブカから検出された鳥マラリア原虫遺伝子配列は過去にヤンバルクイナから検出されたものと高い相同性を示し、オオクロヤブカが本原虫を媒介している可能性が示唆された。オオクロヤブカは東南アジア起源の蚊であるが、人間の生活環境に適応して分布拡大してきた。ヤンバルクイナが本来の生息地である森から出て人家近くで生息し始めたことで本蚊種と出会い、新たな原虫感染環が形成されたとも考えられる。

以上の研究結果から、琉球列島において渡り鳥が関与する節足動物媒介病原微生物の侵入をモニタリングする上で、住血原虫が適切な指標微生物となる可能性が示された。とくに鳥類が感染源となり蚊の媒介によってヒトに感染するウエストナイル熱のような人獣共通感染症のモニタリングにおいては、蚊の吸血嗜好性すなわち蚊と鳥との関係を知る上で、住血原虫を対象とした本研究手法はきわめて有用であると考えられる。近年、「やんばる」では鳥マラリア原虫保有率が高くウエストナイルウイルスに対する感受性も高いハシブトガラス（*Corvus macrorhynchos*）が増加していることから、当地に生息する希少な固有種の保全を図るためにも、鳥類と媒介蚊に関する継続的なモニタリング調査必要であると考えられる。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 28 日

日本大学 総長 殿

氏 名 梶川 博



所属・資格 生物資源科学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	バイオエタノール生産に伴う副産物の反芻家畜飼料としての利用に関する研究	
3 研究の目的	<p>地球温暖化ガスである二酸化炭素の削減を目的とした燃料用バイオエタノールの生産・利用の増加に伴い、その原料となる穀類の需給が逼迫して価格が高騰している。そこで穀類の代替としてバイオエタノール産生に伴う副産物であるDDGS (dried distiller's grains with solubles : アルコール蒸留粕) の飼料としての利用が期待されている。本研究ではDDGSの反芻家畜飼料としての特性を明らかにしてその適正な利用の可能性を検討する。</p> <p>具体的には、DDGSは粗脂肪および粗蛋白質含量が高いことからエネルギーおよび蛋白質飼料としての両面の可能性が考えられる。しかし反芻胃内微生物の活性を阻害する多価不飽和脂肪酸含量が高いこと、および製造工程における熱処理に伴って反芻胃内での蛋白質分解性が低下していることにより、微生物の発酵・増殖が制限される可能性も想定される。本研究では、成分的には栄養価が高いと考えられるDDGSの負の側面に焦点を当てることにより、DDGSの給与に伴う問題点を明らかにする。</p>	
4 研究の概要	<p>国内の飼料会社で入手可能なDDGSを用いて反芻胃内における蛋白質の分解率とその変動範囲を測定する。併せて、反芻胃内微生物の発酵・増殖に及ぼすDDGS添加の影響を調べる。最初、バッチ式の培養により、添加量や併給飼料の組合せ等をスクリーニングした後、人工ルーメンを用いてより実際に近い条件下でのDDGSの添加効果を検討する。前任地（畜産草地研究所）では英国で開発された人工ルーメン（ルシテック）を用いた研究実績があり（下記業績参照）、日本大学でもこの装置が利用可能となれば、今回の研究を含め、研究の幅が多岐にわたって広がる。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

※ホームページ等での公開の (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：梶川 博

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1) バイオエタノール製造粕（DDGS）の反芻家畜用飼料としての利用が注目を集めているが、現在国内で流通しているDDGSは、飼料成分、特に繊維において大きな変動が認められている。そこでロットの異なるDDGSにおける飼料成分間の関連を解析することでその原因を検討した。

供試試料として国内に流通しているDDGS 27点を使用し、それぞれのCP、NDF、ADF、ADFリグニン（ADL）、および繊維結合性の蛋白質である中性洗剤不溶性CP（NDICP）と酸性洗剤不溶性CP（ADICP）等を測定した。

NDFは、31～41%、ADFは9～19%、ADLは1.1～4.2%、NDF-ADF（ヘミセルロース）は20～26%の間で変動し、ADLはNDFおよびADFと有意な正の相関が見られた（5%水準）。いっぽうCPの変動範囲は28～33%と比較的小さかったものの、NDICPは1.5～6.8%、ADICPは0.7～5.2%の間で変動し、それぞれNDFおよびADFと有意な正の相関が見られた（1%水準）。NDFの変動に対する影響要因としては、NDICP>ヘミセルロース>ADLの順であった。このことから原料トウモロコシの成熟に伴うリグニン化よりも製造過程での熱処理による蛋白質熱変性（あみのカルボニル反応）の差がより大きな変動の要因になるものと考えられる。

いっぽうNDF含量の差はTDN推定値に有意に影響を及ぼす程ではなく、粗脂肪の変動（11～17%）がより大きなエネルギー価の変動要因となった。

2) 上記で報告されたDDGSに見られる繊維成分の変動は、蛋白質の利用性に影響を及ぼす可能性が高い。そこで繊維成分値が異なるDDGSを用いて、そのルーメン内消化性に及ぼす繊維含量の影響を検討した。

NDF含量の異なるDDGSを6点選択して、第一胃フィステル装着牛を用いたインシチュ試験を行った。すなわち試料をポリエステルバックに5g秤量し、72時間までの経時的な消化率を求めた。水のみで洗浄したものを0時間の試料とした。消化残渣は60℃で乾燥後、NDF、ADF、CP、NDICP、ADICP等を測定した。

NDF含量の低い2試料（平均NDF34%）と高い4試料（平均NDF39%）の間では乾物の消化速度に違いは見られなかったものの、0時間の消失率は前者が高く、可溶性画分において差が見られた。CP消失率も同様に低NDF試料で高い可溶性画分を示したが、消化速度は高NDP試料で高い値を示した。消化残渣CP中のNDICPおよびADICPの割合はどの試料も基本的には増えてこないことから、熱変性した蛋白質（繊維結合性蛋白質）の消化性は決して低くないことが示唆された。

3) DDGSは、新しい飼料資源として注目されているが、脂肪含量が高いことから反芻胃内微生物の代謝に対する影響が懸念される。本試験では、バッチ培養によるインビトロ試験を用い、DDGSの消化および発酵性に及ぼす効果を特に脂肪の側面から検討した。また、同時に脂肪添加によるメタン産生抑制効果についても検討した。当研究室飼養の牛から採取したルーメン内容液を希釈した培地に試験試料を添加してバッチ培養を行い、消化および発酵性（ガスおよび揮発性脂肪酸（VFA）産生量）を測定した。試験区は①脱脂DDGS+GL（脱脂された脂肪に含まれるものと同量のグリセロールを添加）、②DDGS、③脱脂DDGS+コーン油（脱脂された脂肪に相当する量）の3区とした。その結果、消化率およびガス圧において試験区間で差が見られなかった。一方、脂肪酸の存在による有意なメタン産生量の低下が見られた。このことから、DDGSは発酵を阻害することなくメタン抑制効果を持つ有用な飼料であると考えられる。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月22日

日本大学 総長 殿

氏 名 松宮 政弘



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。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	海洋生物キチナーゼの構造と基質分解特性に関する研究	
3 研究の目的	<p>キチン質は地球上ではセルロースに次いで2番目に多いバイオマスであり、キチンのキチナーゼによる分解生成物であるキチンオリゴ糖は哺乳類において免疫賦活作用を、単糖（N-アセチルグルコサミン）は変形性関節炎の治癒効果や甘味（砂糖の60%）などを示し、機能性食品素材として有用である。化学合成されたN-アセチルグルコサミンの食品への利用は認可されないため、酵素法による調製が最も主要な調製方法である。しかしながら天然に存在するキチン質は強固な結晶構造を有して不溶性であり、これまでに報告されている微生物由来の酵素では分解しにくい。申請者はこれまでに、海洋生物の魚類胃、イカ肝臓および海藻に特異なキチン分解特性を示すキチナーゼが存在し、特に魚類胃のそれは強固な結晶性キチンに対する分解能が高いことを明らかにしてきた。本研究は海洋生物キチナーゼを用いた効率の良いキチンオリゴ糖、単糖製造のための基礎研究を目的とする。</p>	
4 研究の概要	<p>海洋生物より粗酵素液を調製し、硫酸分画および各種クロマトグラフィーによりキチナーゼを精製し、その酵素学的性状を明らかにする。新たに、およびこれまでに精製したキチナーゼの結晶性キチン分解能およびキチンオリゴ糖分解様式を測定する。精製キチナーゼのN-末端アミノ酸配列あるいはペプチドのアミノ酸配列を分析する。特異な基質分解能を示すキチナーゼを複数選び、Total RNAを抽出し、逆転写酵素を用いてmRNAよりcDNAのテンプレートを合成する。N-末端アミノ酸配列より縮重プライマーを設計し、PCRにてDNAフラグメントを増幅する。得られたPCR生成物をテンプレートとし、さらにNested PCRを実施する。増幅断片をベクターに結合させ、大腸菌に形質転換させ、プラスミドを得る。DNAシーケンスにより内部配列を明らかにする。得られた部分配列のデータよりPrimerを合成し、5'および3' RACE法により上流域および下流域の塩基配列を分析する。全長のクローンを得、その構造を明らかにし、キチナーゼの構造と基質分解特性との関連を比較検討する。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

※ホームページ等での公開の（）・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：松宮 政弘

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1. シログチ胃キチナーゼの精製：シログチ胃より粗酵素液を調製し、硫酸分画後、キチンアフィニティーカラムに添加し、吸着タンパク質を 0.1 M 酢酸にて溶出した。次に、得られたキチナーゼ活性画分を陽イオン交換の CM トヨパール 650S カラムに添加し、0-0.7 M NaCl のグラジェントにより吸着タンパク質を溶出させた。キチナーゼ活性は 0.55M 付近で溶出したため、SDS-PAGE により、純度を検討したところ、2種のタンパク質（分子量 50 kDa と 42 kDa）が含まれていることが判明した。そこで、この活性画分をさらに疎水性クロマトグラフィーのブチルトヨパール 650S カラムに添加し、吸着タンパク質を 0.8-0 M 硫酸アンモニウムのグラジェントにより溶出させた。その結果、硫酸アンモニウム濃度 0.1 M 付近にキチナーゼ活性とタンパク質の溶出が一致したピークを得た。精製されたキチナーゼは SDS-PAGE において単一バンドを示し、分子量は 42 kDa、等電点は 6.7 と推定された。

2. シログチ胃キチナーゼの諸性質：シログチ胃キチナーゼの N-末端アミノ酸配列を 25 残基まで分析したところ、ヒラメ胃キチナーゼ chi-1 のそれと一致し、他の family 18 キチナーゼのそれらとも高い相同性が認められた。シログチ胃キチナーゼの pNp-(GlcNAc)₂ と pNp-(GlcNAc)₃ に対する最適 pH はそれぞれ pH 2.5 と pH 4.5 に、またコロイダルキチンに対する最適 pH は 4.0 に認められた。一方、グリコールキチンに対する最適 pH は 8.0 で、pH 4.0 の酸性においても最大活性の 70%以上の活性が観察された。さらに本酵素は pH 3.0-5.0 の酸性域で安定な性質を示した。また、pNp-(GlcNAc)₂ に対する最適温度は 60℃に認められ、本酵素は 10 分間の熱処理では 40℃まで安定であった。シログチ胃キチナーゼの低分子および高分子基質分解能はいずれも NaCl (0.1-0.8 M) 添加により賦活した (110-298%)。一方、比較のために同一条件で測定した *Streptomyces griseus* キチナーゼは NaCl 存在下では賦活せず、 α -および β -結晶性キチン分解能は阻害された。

3. シログチ胃キチナーゼの基質特異性：pNp-(GlcNAc)_n (n = 1-4) を基質とした場合、シログチ胃キチナーゼは pNp-(GlcNAc)_n (n = 2-4) より pNp を遊離したが、pNp-(GlcNAc) 分解能は示さなかった。また、本酵素は pNp-(GlcNAc)₂ に対して著しく高い活性を示した。N-アセチルキトオリゴ糖 ((GlcNAc)_n, n = 2-6) 分解生成物とそのアノマー比を TSK-GEL Amide-80 カラムを用いた HPLC により分析した。シログチ胃キチナーゼは (GlcNAc)_{2,3} に対する分解能は示さず、(GlcNAc)_{4,6} を分解し、family 18 キチナーゼと同様に β アノマーの増加した (GlcNAc)_{2,4} を生成した。また、分解生成物中に単糖である GlcNAc は検出されなかった。本酵素はいずれの基質に対しても (GlcNAc)₂ を良く生成した。シログチ胃キチナーゼの不溶性基質に対する基質分解能を結晶性 α -キチンのカニ殻キチン、エビ殻キチン、カイコ幼虫表皮キチン、結晶性 β -キチンのイカ甲キチン、微細藻キチン、非晶性のコロイダルキチンを基質として測定した。本酵素の不溶性基質に対する分解能は非晶性キチン > β -キチン > α -キチンの順であることが明らかとなった。本酵素はエビ殻、カニ殻の α -キチンおよびイカ甲の β -キチンを分解する広い基質特異性を示し、それらを主たる餌料とするシログチの食性と良く符合した。

4. 魚類、昆虫および海藻キチナーゼの基質特異性比較：マサバ胃 (SjChi, 38kDa)、アイナメ胃 (HoChiB, 51kDa; HoChiC, 47kDa)、シーラカンス胃 (LcChi, 46kDa)、タバコスズメガ幼虫 (full length enzyme MsChi535, 81kDa; and C-terminally truncated enzyme MsChi386, 48kDa) および紅藻イボソノマタ (CvChi, 24.5kDa) よりそれぞれ精製したキチナーゼを用い、pNp-GlcNAc_n、GlcNAc_n、グリコールキチン、コロイダルキチンおよび結晶性キチンを基質とし、基質特異性を比較検討した。

5. シログチ胃キチナーゼの cDNA クローニング：シログチ胃の mRNA より合成した cDNA を鋳型とし、family 18 キチナーゼの保存配列より設計したプライマーを用いてネステッド PCR を行ったところ、約 350bp の増幅物が確認できた。この塩基配列を解析したところ、ヒラメ胃キチナーゼの chi-1, 2 と高い相同性が認められた。そこでこの配列を基に新たにプライマーを設計し、5' RACE および 3' RACE 法により、上流域と下流域の増幅を試みた。5' RACE 法では約 700bp、3' RACE 法では約 1kbp の DNA 増幅物が確認できた。現在はこれら塩基配列を解析中である。

6. マサバ胃キチナーゼの cDNA クローニング：マサバ胃の mRNA より合成した cDNA を鋳型とし、family 18 キチナーゼの保存配列より設計したプライマーを用いてネステッド PCR を行ったところ、約 350bp の増幅物が確認できた。この塩基配列を解析し、5' RACE および 3' RACE 法により、上流域と下流域の増幅を試みた。5' RACE 法では約 700bp、3' RACE 法では約 1kbp の DNA 増幅物が確認できた。現在はこれら塩基配列を解析中である。

* 課題番号	個 08-120
--------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年4月30日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 小 島 隆 人 

所属・資格 生物資源科学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="checkbox"/> 一般研究(個人研究) / <input type="checkbox"/> 一般研究(共同研究) / <input type="checkbox"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	定置網漁業支援のための沿岸回遊魚の動向予測システム開発	
3 研究の目的	<p>わが国沿岸漁業の中で中核的な地位を占める定置網漁業は、受動的な漁法であるために、漁獲の多寡の予想が難しいばかりでなく、そのことが市場価格の暴落を招く遠因ともなっている。市場における魚価の乱高下は、近年問題となっている投棄にもつながっていることが指摘されており、資源の有効活用と沿岸漁業者の安定的な経営のためにも、直近の漁獲を推測するための定量的な情報提供が必要である。そこで、一定地域内に隣接して設置されている定置網漁場における毎日の魚種別漁獲量を用いて、沿岸を来遊する魚群の動向を予測する手法の開発を行い、何時どの魚種がどの網に入網するのか、に関する漁業者が身近に利用可能な情報を提供することが可能かを検証することを目的とした。</p>	
4 研究の概要	<p>静岡県水産技術研究所、静岡県定置漁業協会および静岡県伊東市赤沢定置漁業の協力を得て、伊豆半島東岸に敷設されている大型定置網漁場10カ統における、毎日の漁獲量に関する資料を2002年度まで過去8カ年にわたって入手し、解析に供した。各漁場における漁獲されたすべての魚種についての記録が得られたが、定着観察を行った、伊豆半島東岸中部の赤沢漁場の南北に隣接する川奈、富戸、北川、谷津と赤沢の計5漁場に着目し、これらの漁場における主要な水揚魚種に関して自己相関関数、相互相関関数および高速フーリエ変換(FFT)などの時系列解析的手法による魚群来遊の時間的差異の検出を試みた。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の 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：小島隆人

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

左図(Fig. 1)は調査を行った赤沢漁場を初めとする計 5 カ統の漁場位置を示す。図からも明らかなように、伊豆半島は南北に長く延びる地形であるため、そこに敷設される漁場も当然南北に一定間隔で隣接している。したがってこれらの漁場間における特定魚種の漁獲時期に一定のずれ(差異)が認められるということは、沿岸部を回遊もしくは沿岸に沖合から来遊する魚群の動態を反映しているものと考えられる。ここでは Fig. 1 に示す赤沢漁場において顕著な投棄が見られるゴマサバの回遊状況を、毎日の漁獲記録の時系列解析によって推測した。

計 5 カ統の各漁場で漁獲される魚種の時系列より、漁獲は概ね季節的な変動を示し、特定の時期に顕著な漁獲が見られることが明らかとなった。そこで赤沢 (Fig. 1:3) および富戸 (Fig. 1:2) 漁場におけるゴマサバ漁獲記録の周期特性を FFT (高速フーリエ変換) を用いて計算した結果が Fig. 3 である。結果はいずれも横軸が周期(この場合は時系列が 1 日間各であるため、何日に一度現象が生じるかを (1/日) の単位で示している)、縦軸はパワースペクトル密度を表している。その結果、富戸および赤沢漁場ともゴマサバ漁獲には 0.01~0.1 (1/日) といったかなり長い周期 (10~100 日間隔に相当) の成分が顕著であった。さらに長周期成分ばかりでなく、0.2~0.3 (1/日) (3.3~5 日間隔に相当) の短い周期も存在していることが明らかとなった。これは前述した季節性のみならず、漁獲が佳境に入った時期には、数日単位の断続的な魚群来遊傾向があることを示しており、しかもその周期には一定の法則性が見られることを示している。このことから、各漁場において特定魚種の漁獲には一定のリズムがあることが予想されるばかりでなく、当然隣接漁場間においても相互に何らかの関係が存在するものと予想される。

そこで 1 例として、各漁場間におけるゴマサバ漁獲に見られる日数差を相互相関関数により明らかにしたのが Fig. 4 (A: 富戸-川奈間, B: 赤沢-富戸間, C: 赤沢-北川間, D: 北川-谷津間) である。A の富戸-川奈間は -13 日および 0 日にピークが認められたため、当該漁場間では同日に漁獲もしくは川奈より南方に位置する富戸の方が 13 日遅れて漁獲される傾向にあることを示している。同様に、各漁場間の計算結果より、最も漁場間隔の短い赤沢-北川間(C)を除いて、各漁場間には概ね同日漁獲、もしくは南方に位置する漁場の漁獲が北方漁場よりやや遅れる傾向にあることが明らかとなった。このことは、伊豆半島東岸中部において、北から南に向かって沿岸部を南下回遊しながら定置網に入網するゴマサバ魚群が存在することを示している。この計算結果はほぼ 365 日間にわたる漁獲記録を用いたものであるため、より顕著にその回遊傾向が現れる季節とそうでない期間とを併せた解析である。漁獲がピークを迎えた時期に特定期間のみのデータを用いた同様の解析を行うことで、魚群の来遊時期をある程度推測可能であることが、本研究の結果示された。

(本研究の成果の一部は、第 5 回世界水産学会議において発表した他、静岡県水産技術研究所伊豆分場での研究発表も併せて行った。)

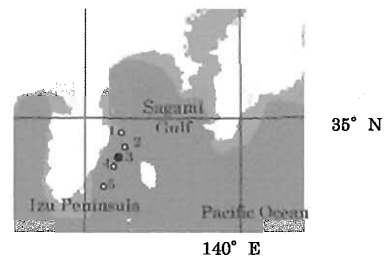


Fig. 1 The area for survey showing locations

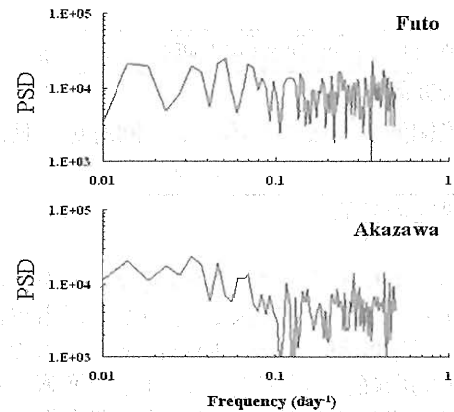


Fig. 3 Periodicity in the landing of spotted chub mackerel in Futo (upper) and Akazawa (lower) set-nets calculated by the fast Fourier Transform using the records of the second half year in 2006.

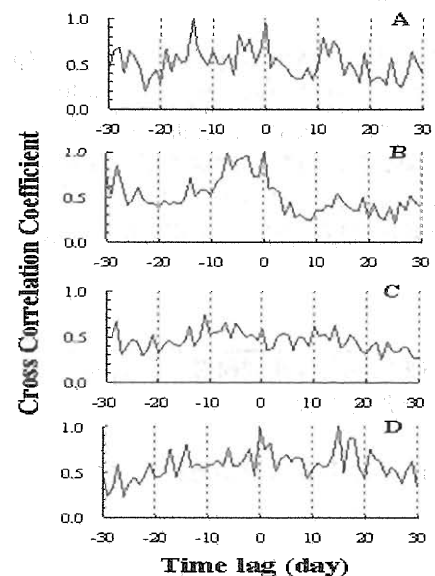


Fig. 4 Differences in appearance day of spotted chub mackerel in the adjacent set-nets (A: Futo to Kawana, B: Akazawa to Futo, C: Akazawa to Eokkawa, and D: Hokkawa to Yatsu). Positive time lag in day express the preceding of fish appearance in the latter nets.

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月 9日

日本大学 総長 殿

氏 名 佐藤 喜和



所属・資格 生物資源科学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	ヒグマの生息地適性からみた手入れの異なる人工林の比較	
3 研究の目的	<p>1950-1960年代に進められた拡大造林政策により、日本国内の森林における人工林面積は大きく拡大し、現在面積比にして約40%を占めている。これら人工林は、近年の林業不振により手入れ不足となることが多く、森林に生息する野生動物にとっては生息地の質の低下として負の影響をもつと予想される。一方、適切に手入れされた人工林では、林床の光環境も好適であり、樹種多様性こそ低いものの林床植生や無脊椎動物群集などは天然林と同様に現存量・多様性が高く、生息地適性も高いと予想される。しかし手入れの異なる人工林間での野生動物の生息地適性に関する比較研究はほとんど行われていない。</p> <p>そこで本研究では、森林性野生動物の指標としてヒグマを対象とし、手入れの異なる人工林の林分間、および隣接する天然林において、ヒグマの夏期主要採食資源である草本・キイチゴ類、アリ類の現存量を比較し、適切に手入れされた人工林では採食資源の現存量・種多様性が高く、生息地としての適性が高いことを示す。</p>	
4 研究の概要	<p>本研究は、過去に申請者が継続的にヒグマの生態調査を実施しており基礎情報が蓄積されている、北海道十勝郡浦幌町に位置する道有林、および周囲の町有林・民有林を調査地として行う。</p> <p>調査地域の人工林の大半を占めるカラマツ人工林を対象に、植採年度、除伐、間伐などの保育作業の履歴を調べ、調査区を設定する。</p> <p>各調査林分内にコドラートを設定し、採食資源量を調べる。草本類については現存量を、アリ類についてはコロニー数を明らかにする。また、採食資源量に影響する立木密度、胸高断面積、林床の光量についても測定する。光量は、天候や測定時間の影響を受けにくい全天空写真の解析により行う。</p> <p>野外調査により得られたデータの解析を行い、手入れの異なる林分間の採食資源量の違いについて明らかにする。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 研究分担者（役割分担） 	

部科校名：生物資源科学部

氏名：佐藤 喜和

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

現在、日本国内の森林における人工林面積は、面積比にして40%を占めている。人工林は、木材生産の目的で作られるため、植栽後の保育作業と適期の収穫が必要となるが、近年の林業不振により手入れが不足した人工林が増加している。このことは、森林に生息する野生動物にとっては生息地の質の低下として負の影響をもつと予想される。特に近年国内で問題とされている手入れが不足した人工林は、間伐が行われず本数が過密になり、林床へ光が届かないため灌木や草本類の成長が悪く、野生動物にとっては採食資源量が少ない生息不適地となっていることが予想される。一方、適切に手入れされた人工林では、林床の光環境も好適であり、樹種多様性こそ低いものの林床植生や無脊椎動物群集などは天然林と同様に現存量・多様性が高く、生息地適性も高いと予想される。しかし、手入れの異なる人工林間での野生動物の生息地適性に関する比較研究はほとんど行われていない。適切に手入れされた人工林が野生動物にとって高い生息地適性を示すことは、適切な手入れの促進が、生産される木材の質を高め、同時に野生動物個体群の保全にも貢献することを意味し、さらに、近年増加している野生動物の農業被害に関しても、本来の生息地である森林の中で、人工林の生息地適性を上昇させ、野生動物による農作物利用を根本的に減少させることに結びつく可能性がある。

そこで本研究では、森林性野生動物の指標として夏期の農業被害が急増しているヒグマを対象とし、手入れの異なる人工林の林分間、および隣接する天然林において、ヒグマの夏期主要採食資源である、草本類、キイチゴ類、アリ類の現存量を比較した。

北海道十勝郡浦幌町の道有林および民有林内のカラマツ人工林を対象に、半径12.5mの円形プロットを2年生から48年生までの13箇所設定し、胸高断面積、開空度(全天写真に基づく葉面積指数で評価)、下層植生現存量、アリ類営巣数を調査した。

その結果、林齢が増加するに伴い、胸高断面積が増加する傾向が見られたが、除伐や間伐経歴の違いにより、林齢が高いほど(30-50年生)林分間の差が大きくなった。林齢と葉面積指数の関係を見ると、10年生前後の林分がもっとも高い値を示しその後減少するというパターンが見られ、また30-50年生の林分では、林分間の差が大きくなった。これらの結果から、胸高断面積と葉面積指数の間には正の相関が期待され、実際に有意な相関関係は認められたが、ばらつきもまた見られた。これらの差は、最後の間伐からの経過年数に起因すると考えられた。

ヒグマの夏期採食資源として重要な、草本類の現存量(1m²あたりの乾燥重量)を林分間で比較すると、林齢が低く、胸高断面積が小さく、葉面積指数の小さな林分で現存量が多いことが明らかとなった。ただし、当初の予測と異なり、林床がササ類・外来性の双子葉草本・シダなどで覆われている場合には、明るい林分でも現存量が小さくなった。また光条件だけでなく、1990年代以降増加したエゾシカの採食圧も草本類の現存量に影響していた。キイチゴ類については、2年生の林分から確認されるようになり、7年生の林分でピークを迎え、その後まったく確認されなくなった。これは一般的なキイチゴ類の成長特性、すなわち攪乱後の光環境が良い場所で繁栄するという性質を裏付けるものとなった。アリ類のうち、ヒグマが好むトビイロケアリの巣数を林分間で比較すると、10年生前後までの若い林分で多い傾向にあり、また林齢が高くても、葉面積指数が小さく明るい林分では多く巣が確認された。トビイロケアリは地中または朽ちた切り株の根元などに営巣する様子が観察されたことから、伐採後植林された若い林分や、除間伐を経た林分に多く見られることが示唆された。ただし、林床がササで覆われた林分では確認される巣が少なかった。

これらの結果から、ヒグマの夏期主要採食資源である草本類、キイチゴ類、アリ類ともに若齢の林分および除間伐により林床が明るくなった壮齢の林分で豊富に見られる傾向が示唆された。このことは、今後ヒグマの生息地として人工林を評価する場合に重要な知見となるであろう。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月 30日

日本大学 総長 殿

氏 名 糸 長 浩 司

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。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	ストローベイル住宅における室内壁内環境、断熱性能評価に関する研究	
3 研究の目的	<p>日大キャンパス内での小規模なストローベイル小屋の実験的建設、アトムハウスでの断熱性能及び、断熱性能、腐食状況を評価すると同時に、国内で建設されたストローベイル建築、住宅、事務所、カフェ等の実際の建物を対象として、そこでの住生活、活動によるストローベイル壁内及び室内の環境状況及び断熱性能に関して、年間を通しての温湿度状況を策定し、その解析を通して、日本での適用に関しての条件を明らかにする。地球環境問題の中で、有機素材としての農業副産物を活用したストローベイル建築は今後とも注目される建築であり、その環境性能を実際の住宅において明らかにする。海外での建設事例も多く、米国等では州単位での建築法規の基準が策定されている状況に対して、日本ではまだ認知状況も低く、建築法規の対象建築ともなっていない状況である。本研究での実際の住宅での性能評価は、日本での建築基準法等での一定のルール化に寄与し、また、DIYで建設する環境市民にとっても有益で実用性のある資料を提供する意義があり、年間を通して気候変化、温湿度変化の激しい日本での研究は国際的にも意義が高い。</p>	
4 研究の概要	<p>① 申請者が実験的に建設し観測している日大キャンパス内のストローベイル小屋での継続的研究を進める。と同時に、山梨県小淵沢及び京都市美山町に建設した実際の住宅、また、京丹後市における里山での山地酪農のミルク製造工場と事務所、千葉県の子供の建設したストローベイルカフェ等の実際の建物の施工に関与し、壁内に温湿度センサーを設置し観測をすると同時に、含水率計により、壁内の湿度、水分、カビ等の生息状況を観察した。</p> <p>② 年間における気温差があり、特に冬期間は寒い地域では、ストローベイル住宅の室内及び壁内での断熱性能、湿度変化を、年間を通して観測機器で測定し、その動態について明らかにした。また、室内の人間活動に伴う室内空気環境が、ストローベイル壁内の温湿度環境に及ぼす影響、壁内の上部、下部における温湿度変化、内部結露問題の有無等、ストローベイル壁の耐久性に関する実証的なデータを集積し、その性能評価及び内部結露対策に関する基礎的知見を得た。</p> <p>③ 研究対象の建物は、2008年度途中の建設もあり、2009年度での夏期期間での観測を継続して、2009年度中に、より詳細な解析をする。これらにより、年間を通してこれらの調査により明らかになった知見を活かして、今後の日本におけるストローベイル住宅、建築の建設に関する留意点及び建設後のメンテナンス、補修・改善に関する留意点を明確にしていく、一部、留意点を指摘した。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

部科校名：生物資源科学部

氏名： 糸長浩司

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

(1) CNES でのアトムハウスの性能評価

CENS のストローベイル建築アトムハウスの壁面の性能評価をした。方法は、①温湿度データロガー(以下おんどり)を用い継続的に測定しているアトムハウス温湿度データより 2004 年から 2008 年までの南北面の壁内相対湿度を比較し分析した。北面の高さ 1500mm のベイルの中心設置されているセンサー 8 の内装側と外装側にセンサーを増設し、壁面内の温熱環境を詳細に分析した。2007 年 11 月～2008 年 10 月までの外気温とアトム室内の月平均温度から断熱性能を分析した。②アトムハウスの北側と南側にベイルの含水率を測定するための穴を常設し、測定を行なった(2008/10/29～11/20 以降は温湿度データ回収時に測定)。米製ベイルマスター含水率計(ストローベイルの含水率測定器)で、北面の床面から 320mm を L, 1500mm を M, 2120mm を H とし室内壁側から 200mm と 350mm の深さでベイルマスター含水率計を刺し測定をした。③アトムハウスの北・南壁面から藁を取り出し、目視と顕微鏡による状態の観察・分析、さらに炭素・窒素同時定量装置 CN コーダーで炭素分析を行い、微生物が藁を分解する過程で消費される炭素の減少量から、藁の分解の度合いを調べ腐敗の状況を評価した。

2008 年も 2004 年～2007 年の傾向と同じく南北面とも、冬から春にかけて下降・乾燥化傾向にあり、その後夏にかけて上昇・湿潤化傾向にあり、秋から冬にかけて下降・乾燥化傾向を示す。これは外気の相対湿度に対応した状況であり、ストローベイル壁が外気の相対湿度に影響されていることを示す。2008 年度のデータを加えても、同様に北面はこの傾向が安定化しているように見えるが、南面に関してはバラツキが大きい。南面では 1 月の平均相対湿度は 2004 年の 67.6%から 2005 年の 72.9%まで上がったが、2006 年の 71.5%、2007 年で 66.6%と年々下降していた。しかし 2008 年は 76.9%再び上昇した。3 月以降の相対湿度は毎年上昇しており 2007 年の 8 月で 82.0%、10 月には 86.3%、12 月でも 81.8%と 8 月から 12 月にかけて壁内相対湿度が年々上昇し冬季でも 85%前後である事からこれが長期化するとベイルの腐敗の恐れが心配されたが、2008 年は、8 月で 76.5%、10 月では 72.4%、12 月 71.4%で下降化傾向がみられる。北面詳細温湿度より、湿度は内装側(8I)・中心(8N)・外装(8E)で外装が一番高い傾向にある。外装側は、雨などの水分や外の湿気を土壁が吸収した湿気がストローベイルに影響していることが考えられる。

アトムの断熱性は、2007 年 11 月～2008 年 2 月までの冬季期間は、外気温よりアトム室温が高くなっていてアトムハウスに断熱性がある。夏季期間では、アトムハウス室内と外気温に差は見られず、十分な断熱性能が示されないが、9 月から室内の方が暖かくなる。アトムハウス内のラムドアース壁の蓄熱効果による影響が出ているためと考えられる。

アトムハウス内壁の北面と南面に穴を縦に 3 か所ずつあける。床面から 320mm を L, 1500mm を M, 2120mm を H とする。3 か所の穴は、蓋により開け閉めのできる状態にして、2008 年 10 月 29 日～11 月 20 日の期間で含水率は、ストローベイル用の水分計の米製ベイルマスターを使用して測定する。ベイルマスターを内装から 200mm と 350mm の深さに刺して測定する。本来センサーが設置されていた箇所が M であり、M の箇所のセンサーを内壁表面から 0mm・150mm・300mm の三箇所にセンサーを設置する。北壁と南壁のベイルを取り出し、ベイルの状態を目視・顕微鏡にて観察し、腐食状況を明らかにする。さらに炭素・窒素同時定量装置 CN コーダーで炭素分析を行い、微生物が藁を分解する過程で消費される炭素の減少量から、藁の分解の度合いを調べ腐敗の状況を調べた。含水率の測定は、北面で行いセンサーの増設と藁の取りだしを行った 10 月 20 日に一度行い、2008 年 10 月 29 日～11 月 20 日の期間で含水率を一日ごとに記録し、それ以降はおんどり回収時に測定を行った。初回測定日で、最高値の 23%の数値が測定された箇所があった。10 月 29 日の測定からは、10%～18%の間の数値で、平均では L 16.4%、M 14.6%、H 12.6%と床面に近い位置ほど、数値が高くなった。これは、床面に近い方がベイルの密度が高いこと、結露水分が下降してくることが原因と考えられる。北面センサー 8(高さ 1500mm)から取り出した藁は、手で触った状態と肉眼で確認した状態では、濡れているものや目立った痛みは見られず状態は良好であった。しかし、顕微鏡で観察すると、小さなカビがいくつか発見された。センサー 3(高さ 1500mm)・4(高さ 300mm)の藁は、A とは違いははっきりとカビが確認できる藁がある。炭素分析では、A・B・C から取り出した藁と 2008 年収穫の新しい藁を使用して比較分析を行った。炭素分析結果は、新しい藁で 36.36%、センサー 8 で 36.26%、センサー 3 で 33.49%、センサー 4 で 35.80%である。新しい藁と比較し、分解が一番進んでいるものは、南面 B である。

部科校名：生物資源科学部

氏名：糸長浩司

研究の結果（つづき）

ドイツの既往研究では、稲藁に生息するカビがどのような温度と湿度と期間で胞子を放出し成長することを示すグラフが提示されている。グラフは、3日間・14日間・28日間・56日間の線であらわされている。28日間の線の範囲に入ると、28日間この状態が続くことで、カビが成長することになる。4年間の月平均より、ペイルの腐食に影響の大きい高温高湿度の夏季を評価した。その中から、センサー3の2005年10月20.3°C85%と2007年10月20.3°C86%に着目した。この数値は、月平均なので稲藁に生息するカビが胞子を放出する条件の28日間の範囲に当てはまる。センサー3は、28日間でカビが胞子を放出する条件に月平均で2回当てはまることになる。炭素分析の結果と温湿度環境からみても、南壁面の腐食が北面に比べ進んでいることが明らかになった。

アトムハウスでの2008年からの5年間の温湿度データを見ると、北壁面の温湿度は安定してきている。しかし南面は、バラつきがあり不安定である。この南面はセンサー3のデータである。センサー3は、高温多湿でペイルの腐食に影響の大きい夏季期間の温湿度平均をみても、2005年10月20.3°C85%と2007年10月20.3°C86%で藁に生息するカビの成長条件に当てはまる。そして、炭素分析でも表1にあるように、新しい藁で36.36%、センサー8で36.26%、センサー3で33.49%、センサー4で35.80%である。新しい藁と比較し、分解が一番進んでいるものは、南面センサー3である。南面と北面を比較しても南面の腐食が進んでいるといえる。以上のことから、南面は腐食が一番進んでいるといえる。本年度のみでは、判断できないが冬季期間の湿度の下降傾向が続けば、腐敗の恐れは低下すると考えられる。

現在アトムハウスのストローペイル壁で腐食し始めている部分があり、壁面の損傷(特に屋根付近)も見られる。アトムハウスの断熱性などを生かすためには、壁の腐食が進まないための改善・補修が必要である。改善補修を行うことで、南壁面の温湿度環境の改善にもつながる。土壁が吸収する水分を減らすことが必要である。アトムハウスの改善点1：屋根、庇の改善。アトムハウスの庇は浅く、壁面に雨が多く当たるため、庇が深く土壁でない防水能力が高い屋根に変更する。改善点2：アトムハウスの壁面は、土壁が地面に接しているため地表面から水分を吸い上げる恐れがある。壁面と地面を離すことが必要である。加えてドアや窓の機密性も高めることで、アトムハウスの性能や耐久性を上げていけると考えられる。

(2) 建設されたストローペイル住宅の性能評価

京都府の甚弥という個人家屋、山梨県の藁舎という別荘での継続研究である。甚弥は3個のセンサーが北側の壁内、室内、外部に設置した。藁舎は4個のセンサーが西側の壁内、北側の壁内、室内、外部に設置したものを継続調査した。

甚弥での北側の壁内温湿度を観察結果は、壁内湿度は80%に達したが、80%を超えることはない状況である。藁舎の北側と西側の壁内温湿度を観察した結果は、2007年において西側壁内湿度は9月に2週間程度約80%の湿度が続き、3日間81%に達した。北側壁内湿度は9月にほぼ三週間、約80%の湿度が続き、83%に達したこともあったが、2008年も同様の傾向である。甚弥と藁舎の壁内センサーが設置された壁の内装は板である。板は塗り材より壁内を密閉しにくく、室内の高い湿度の空気が壁内に簡単に入る可能性がある。もし板の代わりに土壁を使ったなら、壁内の湿度はもっと低くなると思われる。その上、土壁は板より湿気を吸収したり、調節したりすることができる。この結果から建物の構造、例えばひさしや防湿シートはペイル壁内の相対湿度に大きな影響を与えることが推察された。大きな庇による壁面への雨水対策、地面との完全分離による地面からの湿気対策の重要性が推察できる。

本研究では、世界におけるペイル壁内の相対湿度と藁の含水率との関係の研究成果を整理し、藁の腐食に対する危険値を推定した。それを参考として、日本で近年建設され、現在使用されているストローペイル住宅でのペイル壁内の相対湿度を測定し、藁の腐食に対する心配の状況にはないと推察できた。ただ、壁及び基礎での防水対策の必要性も推察できた。今後は、継続的な観察調査及び藁の腐食の過程のメカニズムを解明し、的確な腐食対策を明らかにする必要がある。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月 20日

日本大学 総長 殿

氏 名 新井直人



所属・資格 生物資源科学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	出芽酵母の遺伝子相同組換えに関する蛋白複合体の解析	
3 研究の目的	<p>遺伝子相同組換えは、DNA 修復や真核生物の配偶子形成時に必要な機能である。相同組換えは二本鎖 DNA の切断より開始される。そしてその切断末端に生じた一本鎖 DNA と相同な部位を二本鎖 DNA から探し出し対合体 (D-loop) を形成する。これを「相同対合」といい必要な過程である。出芽酵母では、相同対合に Rad51, Rad52, Rad55, Rad57 等の蛋白が関与している。Rad51 蛋白は相同対合の中心的な役割を果たし、Rad52 蛋白と複合体を形成して D-loop 形成を触媒する。この相同対合では、両蛋白が一本鎖 DNA に結合した後、二本鎖 DNA を反応系に加える必要があり、両蛋白が二本鎖 DNA に先に結合することにより阻害される。一方、Rad51 蛋白は Rad55 蛋白とも複合体を形成し、Rad55 蛋白は Rad57 蛋白と複合体を形成する。そこで本研究では Rad51 の一本鎖 DNA への優先的結合に対する Rad55 と Rad57 の関与に注目し、Rad55, Rad57 と Rad51-Rad52 複合体の相同対合への影響について解析する。</p>	
4 研究の概要	<p>Rad55 蛋白の発現精製のために、<i>trxB/gor</i> 変異大腸菌でチオレドキシンを共発現し低温で培養することにより可溶化し、各種カラムクロマトにより SDS-PAGE でほぼ単一のバンドにまで精製した。精製した Rad55 蛋白は一本鎖 DNA へ結合したが、二本鎖 DNA への結合は見られなかった。Rad55 蛋白による Rad51 蛋白の一本鎖 DNA への優先的結合は見られなかった。D-loop 形成では Rad51 蛋白単独では D-loop 形成は検出されないのに対し、Rad55 蛋白を加えると D-loop 形成が見られた。しかし Rad51-Rad52 蛋白複合体による D-loop 形成の 1/10 程度であった。一方、Rad51-Rad52 蛋白複合体による D-loop 形成において、二本鎖 DNA 結合欠損変異 Rad52 蛋白の解析から Rad52 蛋白は二本鎖 DNA への結合に関与していることが示された。Rad55 蛋白による D-loop 形成促進は Rad55 蛋白が二本鎖 DNA 結合しないことから Rad52 蛋白の促進効果とは異なる機構であると推測される。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

部科校名：生物資源科学部

氏名：新井直人

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

遺伝子の相同組換えは、電離放射線や化学物質等による DNA への傷害によって、または減数分裂の過程で生物自らの制御によって生じた二本鎖 DNA の切断により開始される。そしてその DNA の切断末端に生じた一本鎖 DNA と塩基配列の相同な部位が、切断されていない二本鎖 DNA から探し出され、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の間で対合体を形成する。この過程を相同対合といい、形成された対合体では一本鎖 DNA と相補的な二本鎖 DNA の片方の鎖が水素結合し“D-loop”と呼ばれる構造を形成する。出芽酵母ではこの相同対合過程に複数の蛋白質 (Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Dmc1, RPA 等) が関与している。Rad51 蛋白質は DNA の相同性検索に関与し、相同対合の中心的な役割を果たしている。Rad52 蛋白質は、遺伝学的解析から最も重要であるとされ、Rad51 蛋白質と複合体を形成して D-loop の形成を促進する。また Rad55 蛋白質は Rad57 と Rad51 の両蛋白質と複合体を形成することができる。本研究ではこれら Rad51 蛋白質, Rad52 蛋白質, Rad55 蛋白質, Rad57 蛋白質の相同対合への影響について生化学的解析を目指した。Rad51 蛋白質と Rad52 蛋白質はすでに精製が完了しているため (Arai, *et al.*, J. Biol. Chem. **280**, 32218-32229, 2005), Rad55 蛋白質と Rad57 蛋白質を大腸菌内で発現、精製することに着手した。両蛋白質は通常の発現条件下では不溶化するが、*trxB/gor* 変異をもつ大腸菌株でチオレドキシンを多量に共発現し低温で培養することにより可溶化が可能となった。しかし、Rad55 と Rad57 の両蛋白質を同じ菌体内で同時に発現すると発現量が共に減少し、実験に必要な量の複合体の精製は極めて困難であった。そこで Rad55 蛋白質と Rad57 蛋白質を別々の菌体内で発現・精製した後、両蛋白質を混合し複合体を形成させる計画に切り替えた。(His)₆-tag を付加した Rad55 蛋白質を発現誘導した菌体から、硫酸分画、各種カラムクロマトにより SDS-PAGE (CBB 染色) でほぼ単一のバンドにまで精製した。精製した Rad55 蛋白質についてゲルシフト法により DNA 結合性を調べた。Rad55 蛋白質は一本鎖 DNA へ結合したが、二本鎖 DNA への結合は見られなかった。Rad55 蛋白質と Rad51 蛋白質の両方の存在下では、Rad51 蛋白質単独と同様に一本鎖と二本鎖 DNA の両方に結合し、Rad55 蛋白質の添加による結合促進や、Rad51 蛋白質の一本鎖 DNA への優先的な結合は見られなかった。続いて試験管内での相同対合を解析するために、超らせん構造をもつ二本鎖 DNA (6,457 bp) と塩基配列の同じ一本鎖 DNA 断片 (259 bp) を基質 DNA とした D-loop アッセイ系を用いた。Rad51 蛋白質単独では D-loop 形成は検出できなかったのに対し、Rad55 蛋白質を加えると D-loop 形成が見られた。しかし Rad51-Rad52 蛋白質複合体による D-loop 形成の 1/10 程度の効率であった。

一方、Rad51-Rad52 蛋白質複合体による D-loop 形成における Rad52 蛋白質の役割についての解析を行った。これまでの研究から Rad52 蛋白質は一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の両方に結合し、D-loop 形成には二本鎖 DNA への結合が関連していることが推測されていた。さらに詳細な解析をするために Rad52 蛋白質の二本鎖 DNA 結合に関与するアミノ酸リジン-117 とアルギニン-148 (Kagawa *et al.* J. Biol. Chem. **283**, 24264-24273, 2008) の両方をアラニン (K117A/R148A) またはアスパラギン酸 (K117D/R148D) に置換した Rad52 変異蛋白質を作成し精製した。加えて、Rad51 蛋白質の DNA 結合欠損を示す Rad51 変異蛋白質 (Rad51K191A) も作成し精製した。Rad52 蛋白質は K117A/Rad148A 変異と K117D/Rad148D 変異の両方で同様に二本鎖 DNA への結合が弱くなっていたが、一本鎖 DNA への結合には影響なかった。Rad51K191A 蛋白質は、一本鎖と二本鎖のどちらの DNA にも結合しなかった。Rad51-Rad52 蛋白質複合体による D-loop 形成は Rad52 蛋白質の K117A/Rad148A 変異または K117D/Rad148D 変異により 1/6 以下に低下し、Rad51 蛋白質の K191A 変異では D-loop は全く形成されなかった。Rad51-Rad52 蛋白質複合体による D-loop 形成反応には、Rad51 蛋白質と Rad52 蛋白質が 1:2 の濃度比で複合体を形成し、一本鎖 DNA に結合した後、二本鎖 DNA に結合することが必須である。変異蛋白質を用いてこれらの各過程について解析を行った。その結果、Rad52 蛋白質の K117A/Rad148A 変異または K117D/Rad148D 変異は、Rad51 蛋白質と Rad52 蛋白質の複合体形成と一本鎖 DNA に結合には影響しなかったが、その後の二本鎖 DNA への結合が低下していた。一方、Rad51 蛋白質の K191A 変異では Rad51-Rad52 蛋白質複合体の形成、一本鎖 DNA に結合、二本鎖 DNA への結合には影響がなかったが、Rad51-Rad52 蛋白質-一本鎖 DNA-二本鎖 DNA からなる複合体内で相同性検索のために生じる二本鎖 DNA の巻き戻し (untwisting) が見られなかった。このように Rad52 蛋白質は一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の蛋白質を介した結合に関与し、Rad51 蛋白質は一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の間の相同性検索に関与していた。

以上のことから相同対合において Rad51 蛋白質が相同性認識という中心的な役割をし、Rad52 蛋白質は二本鎖 DNA への結合に働きかけて Rad51 蛋白質による D-loop 形成を促進している。その一方で Rad55 による Rad51 蛋白質による D-loop 形成の促進効果は Rad55 が二本鎖 DNA に結合しないことから Rad52 の促進効果とは異なる機構であると推測される。今後 Rad57 の添加により新たな効果が期待される。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年4月15日

日本大学 総長 殿

氏 名 宮 部 和 幸



所属・資格 生物資源科学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	日中の食文化の生成と融合化に関する研究	
3 研究の目的	<p>本研究では、中国の食文化との相互関係のもとで生成されてきたわが国の食文化に着目し、つぎの諸点を中心に取り組んだ。一つは、日中の食文化の生成・発展とその相互関係の解明であり、わが国の食文化形成のうえで重要な役割を果たした醤油、味噌、豆腐の製造技術が、わが国に伝来した背景とその歴史的経緯を明らかにすることである。二つは、中国から日本への食文化の伝来の歴史的背景と食文化融合の要因解析である。わが国に伝来したこれら3つの食品が、その後どのような経緯と過程を経て日本の食文化と融合(fusion)して定着し、わが国固有、あるいは地域固有の食品として発展していったのかを解明する。三つは、わが国の食文化研究への新たな試論的フレームワークの提示である。</p>	
4 研究の概要	<p>本研究では、食文化論、食調理技術論、食生活論、食材流通論、豆腐・味噌・醤油の文化論、経営技術論など、多面的に文献・資料を収集し、分析を試みた。また、収集文献・資料の分析から得られた基礎的情報をもとに、食文化の専門家等の関係者および関係機関に対するヒアリング調査と情報収集活動を実施した。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の(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：宮部 和幸

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1. 中国から日本への伝来の歴史的背景と経緯

(1) 醤油

醤油は中国の「醬」を母体としている。醬については、紀元前11世紀の中国の文献『周礼』や、孔子の『論語』にも記されるなど、極めて歴史を有したものである。醬は魚肉等を叩き潰し、雑穀の麴と塩と酒をまぜて漬け込み、熟成させた動物性のものと、大豆や雑穀等を発酵させた植物性のものの2つがあった。醤油は後者の植物性の醬にその原型があるといわれている。その後の、中国の農業書『齊民要術』（530～550年）によれば、醬は米や麦、雑穀を麴として、それを大豆に加えて発酵させたものとの記録が残されている。

醬が日本に伝来した時期は明確ではないが、『正倉院文書』（686～780年）では、醬が大豆、塩、米、酒等の植物性の素材を発酵させてから、搾り取る液状のものとして記されており、また『万葉集』では、醬が調味料として使われていたことも歌われている。さらに大宝律令では、宮内庁の大膳職に属する「醬院」で、大豆を原料とした醬が製造されていた。8世紀初期には、原料となる大豆、米は日本に伝来しており、麴の発酵や製塩技術も確立していたことから、醬を製造する条件は既に整っていたといえよう。

醬から醤油への移行は、鎌倉時代までの時を経ることになる。信州の禅僧の覚心が、中国から持ち帰った径山寺味噌の製法を、紀州湯浅の人々に教えているなかで、醬からしみ出た液体が、調味料に向くことに気付いたという。この醤油の製法は、その後も改良が施され、1580年頃には、わが国での最初の醤油屋といわれる「玉井醬」が醤油業を開始し、1588年には紀州から湯浅醤油100石が大阪に送られた記録が残っている。また同時期には、播州龍野でも醤油の製造が始まり、いわゆる「薄口醤油」が製造された。

大阪、京都などの上方では、醤油は既に普及していたが、関東では製造がされておらず、上方からの輸送された醤油に依存していた。都から醤油が運ばれることから、これを「下り醤油」と呼び、高価であったこともあり、庶民にはあまり普及しなかった。しかし、江戸の人口が増加し、人々の好みにあった濃い味の醤油が製造される。下り醤油に対して、「地回り醤油」と呼ばれ、今日の「濃口醤油」である。醤油造りが盛んになったのが、原料となる大豆や小麦の産地を抱え、利根川、江戸川などの水路にも恵まれていた野田や銚子の地域であった。このように醤油は地域的な相違を有しながら、多様な醤油の種類に繋がっていったのである。また、今日の大豆と小麦を組み合わせた醤油の製法は、江戸時代後期に定着したといわれている。それまでは原料が小麦ではなく大麦を用いて、圧搾して絞った汁に火入れが行われてはならず、この火入れの工程はなかった。

(2) 味噌

味噌も醤油と同様であり、その根源は中国の「醬」であるといわれている。日本に醬が伝来し、融合していくなかで独自の製法によって味噌が製造されるようになった。味噌の中国から日本への伝来ルートには、大きく次の3つが考えられている。その1つは、中国大陸から伝来したルートであり、中国の径山寺の禅僧によって伝えられたとする。これは径山寺味噌のように撒麴を使用するものに通じていくことになる。2つは、中国から朝鮮半島を経由したルートである。これは味噌玉と呼ばれる餅麴を使用するものに通じるものである。さらに3つは、これら2つのルートによるものであるとする。

わが国において、現在の「味噌」の文字が最初に使われたのは、平安時代後期の『扶桑略記』であるとされる。奈良時代には、すでに文献にも味噌の原型と思われる「未醬」が確認でき、平安京の西市には未醬屋の存在が記録されている。

味噌はいわゆる「精進料理」とともに展開していった特徴をもつ。鎌倉時代初期に、中国から禅宗とともに精進料理が伝来し、寺院を中心とした味噌造りやその食文化が展開していった。後期には、庶民仏教によって全国に広がり、寺院の味噌やすり鉢が庶民生活にも浸透し、味噌の主原料である大豆が生産されると、農民も味噌を造る自家用味噌が普及した。さらに室町時代になると、各地で味噌づくりが展開し、調味料というよりは保存食としても用いられるようになる。そして江戸時代の『本朝食鑑』（1697年）では味噌が滋養となり、内臓を整え、病後の回復や老人、子どもにもよく、酒や食品の毒を消すものとして、その効用が広く紹介され、『黒白精味集』（1746年）では、七日味噌、上白味噌、白味噌などの多様な種類の味噌の製造方法が記載された。現在のように調味料として認識されるようになったのは、江戸時代になってからであり、味噌は各地の風土・気候を反映し、熟成方法などの異なる多様な味噌の製造方法が展開した。

部科校名：生物資源科学部

氏名：宮部 和幸

研究の結果（つづき）

(3) 豆腐

豆腐の起源は、紀元前2世紀の前漢の淮南王劉安によって発案されたといわれている。しかし、劉安の漢の時代には、豆腐の原料となる大豆が存在しておらず、また豆腐に関して記された文献は、唐以降にならないとみられない。その起源は、劉安の時代ではなく、唐代中期という説も存在するが、いずれにしても唐代の中期頃には、既に豆腐が作られていた。豆腐の製造方法は、滋養に富む大豆を、どのようにして食べるかということから、まず豆乳という形態に、これに塩味を加えて調味した豆腐が原形と推測されている。最初から製法があったのではなく、試行錯誤のなかで今日の豆腐が製造されたと考えられるのである。

わが国への豆腐の伝来時期は明らかになっていないが、奈良から平安時代にかけて、中国に渡った遣唐使の僧侶等によって、豆腐の製造技術が伝えられたとされる。ただ、奈良や平安時代の文献には豆腐を記した文献は存在せず、豆腐が記録として登場したのは、平安後期、奈良春日大社の神主の日記のなかの「唐符」（豆腐）である。

中国から伝来した豆腐は、精進料理のなかで多様な工夫がなされていったといえる。鎌倉時代、修行の一環とした精進料理において、不足しがちなたんぱく質を補うために、豆腐が重宝された。次いで精進料理の普及等に伴って貴族や武家社会にも伝わり、室町時代になると豆腐の製造方法は広く普及した。

豆腐の製法は、浸漬、磨砕した「呉」を加熱し、こした豆乳を、にがりの凝固剤で固める、その製造方法自体はシンプルなものである。『和漢三才図絵』（1713年）では、原料の豆を黒豆、黄豆、豌豆、緑豆として、凝固剤を塩のにがり、山麓の葉、石膏の粉などが記載されており、その製造方法は、現在と基本的に変わらない。室町時代の「七十一番職人歌合」には、食関係の職種に「豆腐うり」があり、また『人倫訓蒙図彙』（1690年）には、豆腐の二次製品の焼豆腐や揚げ豆腐も記載されていた。『本朝食鑑』（1697年）では、豆腐の種類として、汲豆腐、錦豆腐、油揚げ、凍豆腐、六条豆腐などが記され、バリエーションが豊富になってきたことが確認できる。

江戸時代になると、主に僧侶や武士の食べ物であった豆腐が、一般にも普及し始め、1782年には100種類の豆腐料理を紹介した『豆腐百珍』が出版され、その翌年には続編が、その後付録までが出版される。江戸時代には、豆腐が幅広く使われる食品となっていることがわかる。冷蔵技術等は確立しておらず、製品の流通も限られた地域に限定されていたことから、地域の風土や気候などに根ざした豆腐造りが行われていった。

2. 融合・普及論による一般的考察

醤油、味噌、豆腐の製法の技術的特質に着目した場合、醤油、味噌、豆腐は、大豆の発酵工程、製麹工程を有するなど、いずれも人間が大きく関わる技術を不可欠としている。すなわち、ヒューマン・ウェアとしての技術的特質を強く有するのである。したがって、醤油、味噌、豆腐の製法そのものは、人に体化されており、製法の伝来や普及の圧倒的な部分は、人によって担われることになる。

「融合」（fusion）とは、単に入り混じったり、溶け合ったり、あるいは連携するということを含意しているものではない。それは新しい技術、新しい製法を受け入れるための「入れ子状態」を形成し、その状態に種々の「小さな改善」が施される一連の過程、すなわち、動的な過程であると捉えることができる。そして、この「入れ子状態」に「小さな改善」を施すことは、新技術、新製法の普及の速度を早めるものとして、理論的に位置づけることができるのである。

醤油や味噌は、ともに麴を作る工程を有している。麴は発酵食品を製造する上で重要であるが、醤油や味噌が伝来する以前に、既に日本には麴技術が確立していた。また、豆腐についても、その原料である大豆は伝来しており、製塩技術も確立していた。つまり、醤油、味噌、豆腐がわが国に伝来するまでに、それらを受け入れる「入れ子状態」がある程度形成されていたのである。とりわけ食文化との関連からいえば、醤油、味噌、豆腐のいずれもが、精進料理への適合に向けて、種々の「小さな改善」が施されたといえる。入れ子状態に小さな改善が施され、動的に変化するなかで、醤油、味噌、豆腐の製法は普及していったと考えられるのである。

* 課題番号	個08-127
--------	---------

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月30日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 山 谷 吉 樹



所属・資格 生物資源科学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1	種 目 <input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注: 該当する種目を○で囲んでください。
2	研究課題 犬の気管支肺胞洗浄液中における気道炎症バイオマーカーに関する研究	
3	研究の目的 犬や猫の呼吸器疾患は特異的な臨床症状もなく、しかしながら分類すると鼻腔内の疾患、咽頭の疾患、喉頭の疾患、気道の疾患、気管支の疾患、間質の疾患、肺実質の疾患と多彩でありこれらを鑑別することは難しい。これらの呼吸器疾患の中で慢性気管支炎や気管支喘息などアレルギーを起因とする呼吸器疾患の発症が多いが、その発症機序が明確にされていないため、これまでの治療は気管支拡張薬とステロイドなどを中心とした対症療法となっていた。ステロイドが治療に用いられる理由は漠然と気道炎症を抑制するためで、これらには免疫学的思考による根拠はなく炎症という病態のどこを抑制するかといった目標がない。そこで、この研究では犬の呼吸器疾患について気管支肺胞洗浄液中に含まれるさまざまな気道炎症バイオマーカーのプロファイルを取得することにより、その動態を観察することから発症機序、病態生理ならびに病気との関連性について検討する。	
4	研究の概要 ①実験試料の収集：実験試料は健常犬ならびに日本大学動物病院に呼吸器疾患の鑑別診断のために来院した犬を用いて、気管支鏡検査下で回収した気管支肺胞洗浄液とする。気管支鏡検査は全身麻酔下にて実施し、肺へ生理食塩水を注入後、内視鏡の吸引チャンネルから気管支肺胞洗浄液を回収する。回収された気管支肺胞洗浄液は直ちに冷蔵とし、その後、細胞成分と液性成分へ遠心器にて分離、細胞成分は細胞の種類解析、液性成分は-20度で凍結保存する。②気管支肺胞洗浄液中の気道炎症バイオマーカーの測定：凍結保存された気管支肺胞洗浄液を室温、流水中で融解し測定用チューブに小分けした後、気道炎症バイオマーカーを測定する。③気道炎症バイオマーカープロファイルの解析：呼吸器疾患犬は慢性気管支炎群と特発性間質性肺炎群、その他に分類し健常犬と気道炎症バイオマーカーのプロファイルについて比較を行い、それぞれの疾患に炎症タイプについて免疫学的に検討し発症機序や治療法について考察する。	
5	研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します） ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担）	

※ホームページ等での公開の 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：山 谷 吉 樹

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

この研究で使用した気道炎症バイオマーカーは肺サーファクタントと呼ばれる界面活性物質で、これは肺胞Ⅱ型細胞ならびに気道のクララ細胞で合成されるといわれている。肺サーファクタントは呼吸器という器官において主に2つの重要な役目を担っている。1つは肺胞における気相と液相の干渉として肺胞表面張力を調節し、もう1つは肺の宿主防御機構として働いている。肺サーファクタントはSP-A、SP-B、SP-CおよびSP-Dの4つに形態学的ならびに機能的に分類され、この研究で注目したSP-Aは免疫調節能を有するのではないかと考えられている。例えばSP-Aは病原体を凝集させ、マクロファージやリンパ球などの特定の細胞へ食作用、殺菌作用を促すことで抗細菌・ウイルス・真菌性に作用し、またこれらの細胞からのサイトカイン、ケモカインなどの分泌調整をすることがわかってきている。そこで犬の呼吸器疾患の病態を把握するためにこのSP-Aを気道炎症バイオマーカーとして採用し、気管支や肺胞内におけるSP-Aの動態を日本大学動物病院に来院した症例より観察した。

①呼吸器疾患犬の分布

気管支肺疾患犬38頭が検査され、その内7頭が感染性肺炎、8頭が間質性肺炎、19頭が慢性気管支疾患、3頭が結節性肺疾患、1頭が肺高血圧症であった。

②気管支肺胞洗浄液の回収

気管支肺疾患38頭より、1肺葉もしくは2肺葉で気管支肺胞洗浄液を回収する検査が行われ、総計55標本を得ることができた。また健康犬14頭より気管支洗浄液26標本を回収しこれが正常値の指標となった。

③血液標本の回収

気管支肺胞洗浄液中の気道炎症マーカーが全身循環へ波及するかを検討するため、同時に血液標本を回収し、呼吸器疾患犬38頭より血清34標本、健康犬14頭より血清14標本を回収することができた。

④気道炎症バイオマーカー（SP-A）の測定と再現性

サンドウィッチELISA法による気管支肺胞洗浄液中のSP-Aを測定・定量化するために、2種類のモノクローナル抗体(MAB3274 and MAB3272, CHEMICON International, Inc.)を用いて検量線を作成した。検量線は直線性であり、測定時期ならびに標本の保存期間を変えた数度の測定で誤差は生じず再現性が得られた。

⑤健康犬のSP-A

健康犬における気管支肺胞洗浄液中のSP-A濃度は $1,897 \pm 241$ [mean \pm SE] ng/ml、健康犬を若犬（1歳未満）群と成犬（1歳以上）群で区分すると $1,739 \pm 369$ ng/ml、 $2,033 \pm 324$ ng/mlで統計上の差を示さなかった。血液中のSP-A濃度は 32 ± 4 ng/mlで、若犬群 42 ± 4 ng/mlの方が成犬群 23 ± 5 ng/mlより高値となった。

⑥呼吸器疾患犬のSP-A

健康犬と比較して、呼吸器疾患犬の気管支肺胞洗浄液中のSP-A濃度は $3,214 \pm 290$ ng/mlと高値を示し、特に間質性肺疾患および慢性気管支疾患では $4,003 \pm 1075$ ng/ml、 $3,522 \pm 271$ ng/mlと高値となり、結節性病変では $1,311 \pm 550$ ng/mlと低値となった。血液中のSP-A濃度もまた 61 ± 12 ng/mlと高値を示し、特に間質性肺疾患および結節性肺疾患で 138 ± 68 ng/ml、 75 ± 5 ng/mlと高値となった。

⑦総括

今回用いた気道炎症バイオマーカー（SP-A）は気管支肺胞洗浄液中では安定しており、年齢などの影響を受けないことが示された。またこの研究で開発されたSP-Aの測定系が再現性に優れ、これからの診断メソッドとして有望であることが示された。さらにこの気道炎症バイオマーカーは血液中にも流出することが示され、若犬ではその値が高い傾向にあることがわかった。胎児期における羊水中にはサーファクタントが豊富に含まれていることが知られていることから、血液中のSP-Aは出生時期の予測や胎児の疾患判定にも使用できるかもしれない。この研究では犬の呼吸器疾患において気道炎症バイオマーカーが気管支・肺胞内で変動することを予測し、呼吸器疾患では気管支肺胞洗浄液中ならびに血液中において健康犬に比べて有意に高値となることを考えていた。このような結果が得られたのは間質性肺疾患ならびに慢性気管支疾患であった。一方、結節性肺疾患のように一部の呼吸器疾患においては気管支肺胞洗浄液中のSP-A濃度が逆に低値となることが判明し、これは血液中では高値となることから、腫瘍による肺障害により産生されたSP-Aが気管支・肺胞内へ向かわず全身循環へ流出することを意味している。よって血液中のSP-Aは肺腫瘍マーカーとしても利用できる可能性が示唆された。また予測と反して感染性肺疾患ではあまり変動が認められないことから、呼吸器感染症の成立にSP-Aの機能低下もしくは異常が関与していることが示唆された。

以上のように、気道炎症バイオマーカー（SP-A）は犬の肺障害の診断に有効であり、気管支肺胞洗浄液中と血液中の濃度を比較することにより鑑別診断を進めることができ、治療方針の決定につながる重要なファクターであることが示された。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月 30日

日本大学 総長 殿

氏 名 小堂 俊孝



所属・資格 生物資源科学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	名詞句の解釈位置と数量詞繰り下げに関する考察	
3 研究の目的	<p>従来の研究では、項の移動(A 移動)によるコピーは論理形式(LF)では計算されないと主張され、(1)の読みが適切に説明できた。</p> <p>(1) a. John is likely to be intelligent. (John>likely; *likely>John) b. John is likely <John> to be <John> intelligent</p> <p>ところがこの説明では、A 移動によって生じる構造上低い位置のコピーが解釈されるという、繰り下げ現象を示す(2)の読みを説明することはできない。</p> <p>(2) a. Nobody is believed to be in the reactor room. (believed>nobody) b. Nobody is believed to be <nobody> in the reactor room.</p> <p>本研究では、繰り下げ現象が生じるメカニズムを生成文法の素性認可理論の枠組みでの説明を試みる。</p>	
4 研究の概要	<p>上記の繰り下げ現象について、いくつかの提案がなされてきた。Boeckx (2000)は繰り下げ現象がみられる名詞句が不定名詞句に限定されることに着目し、定性効果を示す there 構文と並行的に捉える提案をした。ところが、there 構文と並行的に捉えられない場合にも虚辞 there に相当する要素が関与しなければならないなど、その提案にはいくつかの不備が存在する。また佐藤(2007)は素性認可の観点から繰り下げ現象の説明を試みているが、なぜ解釈不可能な素性が存在すれば移動コピーが残されるのかなどの疑問が残る。</p> <p>本研究ではこれらの先行研究を検討した上で、項の持つすべての素性が認可される位置が論理部門で解釈される位置であるという新たな提案をする。この提案には新たな素性を仮定する必要があるが、繰り下げ操作を用いずに繰り下げ現象を説明できるなどの利点が考えられる。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

部科校名：生物資源科学部

氏名： 小堂 俊孝

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

1. はじめに

(1)が示すように、項の移動(A-movement)には、論理部門での再構築(reconstruction)が生じないと主張されてきた。

(1) a. John is likely to be intelligent. (John>likely; *likely>John)

b. John is likely <John> to be <John> intelligent

ところがこの主張では、主語が構造上低い位置で解釈を受ける読みを持つ(2)の説明が不可能となる。

(2) a. Nobody is believed to be in the reactor room. (believed>nobody)

b. Nobody is believed to be <nobody> in the reactor room.

本研究では、(2)のような主語が構造上低い位置で解釈される読みの説明を試みる。2節では(2)を there 構文と並行的にとらえるとした Boeckx (2000)を、3節では論理部門での移動操作に依存せず、素性認可の観点から繰り下げ効果の説明を試みた佐藤(2007)を概観し、その問題点を指摘する。4節では本研究の提案を行い、5節でその検証を行う。6節はまとめである。(なお6節と参考文献は紙面の関係で割愛する。)

2. Boeckx (2000)

Boeckx (2000)は繰り下げ現象を示す名詞句と示さない名詞句の違いに着目した。

(3) a. John is likely to be intelligent. (*likely>John)

b. Everyone seems not to be there yet. (*not>everyone)

(4) a. Nobody is believed to be in the reactor room. (believed>nobody)

b. Someone from NY is likely to be here. (likely>nobody)

(3)の主語は繰り下げ現象を示さないが、一方(4)の主語は繰り下げ現象を示す。これらの名詞句を比較すると後者の名詞句は there 構文の主語名詞句として生起可能であることから、(2)には隠在的な there(thereLF とする)が関与していると仮定した。

(5) ThereLF is believed to be nobody in the reactor room.

ところがこの分析ではいくつかの問題点が浮上する。例えばそのひとつとして、(6a)のように対応する there 構文が存在しない場合にもかかわらず、thereLF の関与を仮定しなければならない。

(6) a. Someone from NY is likely to win the lottery.

b. ThereLF is likely to <someone from NY> win the lottery.

c. *There is likely to someone from NY win the lottery.

3. 佐藤(2007)

佐藤(2007)は素性認可理論の枠組みで、LF での移動操作に依存しない提案をしている。

(7) An item whose unvalued features are all valued does not leave its copy behind.

(7)は、素性がすべて認可された名詞句は、移動の際にコピーを残さないという主張である。この提案に付随して、名詞句には解釈不可能素性 F が付与され、その素性は補文標識 C に付与される QU 素性によって認可されるとする。

この提案では、繰り下げ現象を示す(4)の名詞句は、素性 F が基底生成された位置で認可されないため、移動の際にコピーを残すことになる。コピーが残るために、論理部門においてその位置での名詞句の解釈が行われ、繰り下げ現象の説明が可能となる。

ところが定義上、繰り下げ現象を示さない名詞句、つまり定名詞句にも素性 F が付与される。この場合、素性 F は基底生成位置で認可されなければ理論上大きな問題になる。その問題を回避するために定名詞句に付与された素性 F はコンテキストによって認可されるという提案をしている。この提案は、素性認可は一致(Agree)によって行われるという理論から逸脱していると考えられる。

4. 提案

本研究では(8)の提案をする。

(8) 名詞句に付与された解釈不可能素性の認可がすべて完了する位置が、その名詞句の解釈位置である。

この提案に付随して、定名詞句には解釈不可能素性 F が義務的に、不定名詞句には選択的に付与されるとする。また、この F は補文標識主要部 C に付与される素性 F によって認可されると仮定する。

以上の提案を(9)と(10)で具体的に見ていく。まず、(9)では定名詞句の場合を見ていく。

部科校名：生物資源科学部

氏名： 小堂 俊孝

研究の結果 (つづき)

(9) a. Agree between T and *John*

T John <Case, F>

b. Movement of *John*

John <Case, F> T John <Case, F>

c. Agree between C and *John*

C <F> John <Case, F> T John <Case, F>

John は定名詞句であるため格素性(Case)とともに素性 F が義務的に付与される。John の基底生成位置では素性 F が認可されない(9a)。よって論理部門において、この位置では John の解釈がなされない。John は時制句指定部(TP Spec)へ移動し、さらに補文標識 C の併合により John と C の素性 F がそれぞれ認可される。John の持つ解釈不可能素性の認可は TP Spec においてすべて完了するため、John の解釈位置は TP Spec となる。

次に不定名詞句に素性 F が付与されない場合を考えてみよう。

(10) a. Agree between T and *some politician*

T some politician <Case>

b. Movement of *some politician*

some politician <Case> T some politician <Case>

素性 F が不定名詞句 *some politician* に付与されていないので、T との一致(Agree)によって、その名詞句が持つ唯一の解釈不可能素性(格素性)が基底生成位置で認可される。よって、仮定によりその位置が論理形式での解釈位置となる。

5. 検証

(1)と(2)の解釈が、4での提案によって説明可能となるかを検証する。まず(1)の読みを(11)で検証する。

(11) a. John(Case, F) intelligent

b. T to be John(Case, F) intelligent

c. John(Case, F) to be <John(Case, F)> intelligent

d. T is likely John(Case, F) to be <John(Case, F)> intelligent

e. John(Case, F) T is likely <John(Case, F)> to be <John(Case, F)> intelligent

f. C(F) John(Case, F) T is likely <John(Case, F)> to be <John(Case, F)> intelligent

John には格素性と解釈不可能素性 F が付与される。intelligent との併合から派生が開始される(11a)。T が併合されると T の ϕ 素性と John の ϕ 素性が一致(Agree)する(11b)。ところが T の ϕ 素性は不完全であるため、John の格素性を認可するに至らない。T の EPP 素性を満たすために、John が TP Spec に移動する(11c)。主節の T の併合により、T の ϕ 素性と John の ϕ 素性に一致が成立する(11d)。この T の ϕ 素性は完全なものであるため John の Case 素性が認可される。さらに T の EPP 素性を認可するために John が TP Spec へ移動する(11e)。C が併合され、C の F 素性と John の F 素性が一致し、それぞれが認可される(11f)。John の持つ解釈不可能素性がすべて認可されるのは主節 TP Spec であり、論理部門ではこの位置が John の解釈位置となる。よって John >likely の読みが期待され、また likely >John の読みが期待されない。これは(1)の事実と合致する。

次に(2)の解釈を(12)で検証する。ただし紙面の関係上、nobody には素性 F が付与されていない場合のみを検証する。

(12) a. nobody(Case) in the reactor room

b. T to be nobody(Case) in the reactor room

c. nobody(Case) to be <nobody(Case)> in the reactor room

d. T is believed nobody(Case) to be <nobody(Case)> in the reactor room

e. Nobody(Case) T is believed <nobody(Case)> to be <nobody(Case)> in the reactor room

nobody の解釈不可能素性は格素性のみである。nobody が併合され(12a)、派生が TP の投射まで進む(12b)。この時点で T の ϕ 素性と nobody の ϕ 素性に一致がかかるが、T の ϕ 素性が不完全であるため、nobody の Case 素性が認可されることはない。T の EPP 素性のために nobody は TP Spec へ移動する(12c)。さらに主節 T が併合されると、T の ϕ 素性と nobody の ϕ 素性が一致する(12d)。この T の ϕ 素性は完全なものであるため、nobody の格素性を認可する。この時点で nobody の解釈不可能素性がすべて認可されることになり、論理部門で nobody の解釈される位置は埋め込み節の TP Spec 位置となる。派生は T の EPP 素性を満たすために nobody が TP Spec へ移動する(12e)。この結果、believed >nobody という読みが期待され、この期待は(2)の読みと矛盾しない。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年5月8日

日本大学 総長 殿

氏 名 光澤 浩



所属・資格 短期大学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	酵母の窒素源シグナル伝達系におけるアンモニウムトランスポーターの役割	
3 研究の目的	<p>アンモニウムは、微生物にとって重要な窒素源であるだけでなく、窒素代謝系や生活環に大きな影響を及ぼすシグナルとしての機能を有している。酵母においては、環境中のアンモニウムの存在量に応じて、窒素源の輸送および代謝が制御され、また、形態分化や休止期・有性生殖過程への移行が調節されている。アンモニウムの膜透過を仲介するアンモニウムトランスポーターは、進化上高度に保存された11回膜貫通型タンパク質である。最近、分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> の3つのアンモニウムトランスポーターが初めて機能的に同定され、興味深いことに、そのうちのひとつが低アンモニウム条件下で誘導される形態分化（寒天培地内部での繊維状の成長）に必要であることが見出された（Mitsuzawa 2006; 光澤 2006）。この形態分化をもたらすシグナル伝達系におけるアンモニウムトランスポーターの役割を明らかにすることが本研究の目的である。</p>	
4 研究の概要	<p>形態分化を誘導するシグナル伝達系におけるアンモニウムトランスポーターの役割を明らかにするために、Amt1 の遺伝子破壊株を用いて、様々なアンモニウム濃度における形態分化能について調べ、形態分化誘導シグナルの実体の解明に迫る。</p> <p>接合・胞子形成およびオートファジー（自食作用）も、形態分化と同様に低アンモニウム条件下で誘導されることが知られているので、これらの過程にもアンモニウムトランスポーターが関与している可能性について検討する。また、アンモニウムトランスポーターの生理機能として、窒素代謝により生じたアンモニウムの細胞内保持における役割についての解析を行う。</p> <p>アンモニウムトランスポーターが、形態分化や接合・胞子形成を仲介する cAMP シグナル伝達系の上流で機能している可能性を検証するため、培地に添加した cAMP の効果を観察する。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

部科校名：短期大学部

氏名：光澤 浩

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

これまでに、分裂酵母の3つのアンモニウムトランスポーター Amt1, Amt2, Amt3 を機能的に同定し、高親和性と推定される Amt1 が、低アンモニウム条件で誘導される分裂酵母の形態分化（寒天培地内部で繊維状に成長し、特異な形態を示すコロニーを形成するもので、以下、繊維状侵入成長と呼ぶ）に必要であることを明らかにしてきた (Mitsuzawa 2006; 光澤 2006)。本研究では、繊維状侵入成長をもたらすシグナル伝達系におけるアンモニウムトランスポーターの役割を解明することを目指して解析を行った。

繊維状侵入成長におけるアンモニウムトランスポーターの役割に関しては2つのモデルが考えられる。細胞内に取り込まれたアンモニウムあるいはその代謝産物がシグナル分子である可能性と、アンモニウムトランスポーターがアンモニウム濃度センサーとして機能しシグナルを生成するという可能性である。今回、アンモニウム濃度を上げると、Amt1 欠損株が繊維状侵入成長を示すようになることを見出した。この結果は前者のモデルを支持している。次に、出芽酵母について同様の実験を行った。出芽酵母の偽菌糸成長（二倍体株が低アンモニウム条件で示す形態分化）に必要であり、センサーとしての機能が提唱されているアンモニウムトランスポーター Mep2 について、遺伝子破壊株を作製しアンモニウム濃度の効果について検討した。分裂酵母の場合とは異なり、Mep2 欠損株はアンモニウム濃度を上げて偽菌糸成長を示さなかった。これらの結果は、分裂酵母と出芽酵母とでは形態分化誘導におけるアンモニウムトランスポーターの役割が異なるという興味深い可能性を示唆している。

分裂酵母の形態分化誘導において、アンモニウムトランスポーターの下流で働いているシグナル伝達系についての手がかりを得るため、培地に添加した cAMP の効果について検討した。cAMP を添加することによって Amt1 欠損株が繊維状侵入成長を示すようになったことから、窒素源シグナル伝達に cAMP 経路が関与していることが示唆された。

以上の Amt1 欠損株の繊維状侵入成長不能表現型に対するアンモニウム濃度および cAMP の効果に関する結果より、分裂酵母においては、アンモニウムトランスポーターによって取り込まれたアンモニウムあるいはその代謝産物が形態分化誘導のシグナルであり、それが cAMP 経路を活性化しているという可能性が明らかになった。このことは、シグナル分子の実体および cAMP 経路の活性化機構の解明という今後の研究の方向性を明確にしたという点でも意義深い。

本研究はまた、分裂酵母のアンモニウムトランスポーターの新しい生理機能を明らかにした。分裂酵母のアンモニウムトランスポーター三重破壊株 (*amt1Δ amt2Δ amt3Δ* 株) は低アンモニウム培地における生育が野生型株に比べて非常に遅い (Mitsuzawa 2006; 光澤 2006)。これは、アンモニウムを窒素源として外界から取り込むためにはアンモニウムトランスポーターが必要であることを示している。今回、意外なことに、三重破壊株がアンモニウム以外の窒素源での生育においても欠損を示すことを見出した。例えば、アンモニウムの代わりにセリン、フェニルアラニン、トレオニン、またはトリプトファンを窒素源として含む培地において、三重破壊株は野生型株と比較して明らかに生育が遅かった。さらに、窒素源を含まない (EMM-N) 培地においても、三重破壊株は野生型株より生育が悪かつ

(つづく)

部科校名：短期大学部

氏名：光澤 浩

研究の結果（つづき）

た。これらの結果は、アミノ酸の代謝によって細胞内で生じたアンモニウムが細胞外へ漏れ出すかあるいは排出され、それがアンモニウムトランスポーターによってふたたび細胞内に取り込まれると考えることにより説明できる。三重破壊株の EMM-N 培地におけるオートファジー（自食作用）の有無について胞子形成能を指標にして検討したところ、オートファジーは起きていることが示唆された。このことは、三重破壊株が EMM-N 培地において生育欠損を示すのは、オートファジーが起こらないためではなく、オートファジーの結果生じたアンモニウムを細胞内に保持できないためであることを示している。以上は、分裂酵母のアンモニウムトランスポーターがアンモニウムの細胞内保持という生理機能を持つことを示す結果である。

本研究により、分裂酵母の窒素源シグナル伝達系におけるアンモニウムトランスポーターの役割が明らかになり、また、分裂酵母アンモニウムトランスポーターの生理機能としてアンモニウムの細胞内保持を見出した。これらは今後の解析の基礎となる重要な知見である。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 5 月 8 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 飯島 洋



所属・資格 薬学部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="checkbox"/> 一般研究(個人研究) / <input type="checkbox"/> 一般研究(共同研究) / <input type="checkbox"/> 総合研究	注: 該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	カテコール O-メチル転移酵素活性化物質の探索と活性化機構の研究	
3 研究の目的	カテコール-O-メチル転位酵素(COMT)は肝臓、腎臓などに存在し、血中カテコールの除去を行っている酵素である。近年の疫学的な研究によって、慢性腎機能障害患者の心血管系障害による致死と血中のノルアドレナリン濃度の上昇には正の相関がある事が示されている。この相関は生活習慣病由来の腎機能障害患者の場合には特に著しい。血中ノルアドレナリン濃度の亢進が心血管系疾患死の原因であるかを直接的に検証した報告は無いが、ノルアドレナリンの亢進が心筋肥大、血圧上昇などにつながっていることは証明されている。我々は二つの腎機能障害モデルラット(糸球体基底膜に対する抗体による腎機能障害ラット、5/6腎機能障害ラット)におけるCOMTの代謝物を定量し、血中NEと腎機能低下が相関することを検証した。COMTの酵素活性を強化できれば、血中ノルアドレナリン濃度を低下させることが期待できる。本研究はCOMTの活性化物質を探索するものである。	
4 研究の概要	ヒト COMT 遺伝子を組換えタンパクとして調製し、スクリーニング用の酵素とする。COMT の比活性は低いので、酵素活性評価はノルアドレナリンの生成量を正確に定量する必要がある。エチレンジアミンとカップリングすることによりカテコール骨格特異的な蛍光物質を導いて検出する HPLC 法を導入し、アッセイ方法を確立する。 この評価系を利用して主として天然化合物ライブラリをスクリーニングする。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の (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：飯島 洋

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

H20年度目標の目標は下記のとおりであった。

(1) ヒト組換え COMT 生産大腸菌を利用した酵素の生産と精製方法の構築。

COMT 生産大腸菌については、ヘルシンキ大学、キッセイ薬品工業などから発表されている。この情報に従い、発現、生産、精製の方法を確立する。：遺伝子組み換え生物の培養。タンパク質の精製。

(2) HPLC による COMT 活性測定方法の確立

活性化剤の探索なので生成物の量を正確に定量することが大事である。HPLC を利用した評価系を立ち上げる。

(3) 既に発見済み化合物 (本化合物の知財権についてはキリンファーマ社から許諾見込み) を用いた COMT 活性化メカニズムの解析の実施ウサギ酵素に体して発見された化合物であるので、まずは再現性などを確認する。確認されれば、COMT の活性化機構を探る。化合物の結合部位の確認などを行う。

(4) COMT 活性化物質のスクリーニングの着手 (当初は腎治療関連に用いられている天然物 (単離化合物) を、生薬学ユニット北中教授から提供を受け、スクリーニングソースとする)

本助成申請時の計画書では、ラット COMT を購入して入手し、(4)も含め、各目標を並行させて実施する予定であった。ところが、ラット酵素は実質市販が中断されており、計画項目(3)ならび(4)を並行することは不可能であった。

平成20年度末日においては(1)を完了、(2)をほぼ達成できた。(3)と(4)については残念ながら実験的には未着手となったが、(4)については天然物化合物ライブラリに関する調査/一部化合物の購入し、(3)については協和発酵キリン社(合併が行われた)と既存化合物の使用のための知財に関する許諾を再度取得しなおしている。

(1) COMT 組換え酵素の取得

COMT c-DNA を含む市販のプラスミド(pOTB7)を購入し、COMT c-DNA 遺伝子を増幅後、制限酵素で切り出し、発現カセットを含む市販の発現ベクター (pGEX-2T) に挿入し、可溶性 COMT(s-COMT) を Glutathione-S-transferase C 末端側への融合タンパク質として生産できる発現ベクターを構築した。このベクターで形質転換した大腸菌を培養し、対数増殖期に培地に IPTG を加え、GST-COMT タンパク質の発現を行った。大腸菌菌体を破碎し、可溶性タンパク質を抽出し、抽出液からグルタチオンセファロースによる GST に対する親和性を利用して、GST-COMT 融合タンパク質を吸着させた。グルタチオンセファロース担体を洗浄後、トロンピンで GST-COMT 間の選択的な切断を行うことにより、COMT タンパク質を取得した。

SDS 電気泳動により組換え COMT は計算分子量に相当する移動度をもつバンドとして検出できた。またタンパク質の発現量としては 1L 培養あたり約 6mg のアフィニティ精製 COMT が得られた。今後、培養条件の検討などを行い、収率の向上を図る余地があると思われる。

酵素の活性測定を実施した。

文献を参考にし、50mM Sodium Phosphate (pH7.5)中、4mM DTT、2mM MgCl₂ 共存下に、NE 2mM、SAmE 0.2mM を反応させた。(NE:ノルアドレナリン、SAmE: S-アデノシルメチオニン) HPLC 分析により、反応生成物であるノルメタネフィリンの生成を検出できたものの、その生成量は、酵素量、反応時間と直線相関していなかった。そもそも、本研究の着眼は COMT という酵素のもつ酵素としては低い触媒回転数 (数回/秒) と低い基質親和性 (Km として数百 μM) という特性に基づくものではあるが、活性化物質の探索という観点からは、活性評価方法には更なる改良が必要であると考えられる。

部科校名：薬学部

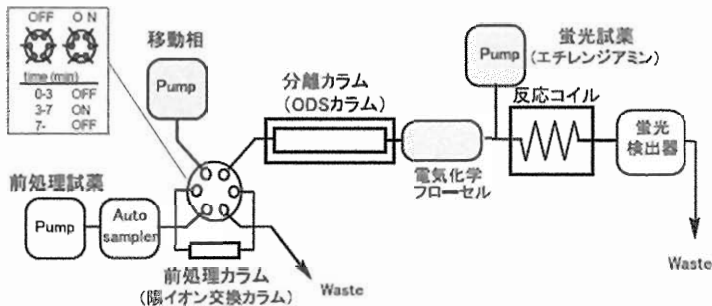
氏名：飯島 洋

研究の結果 (つづき)

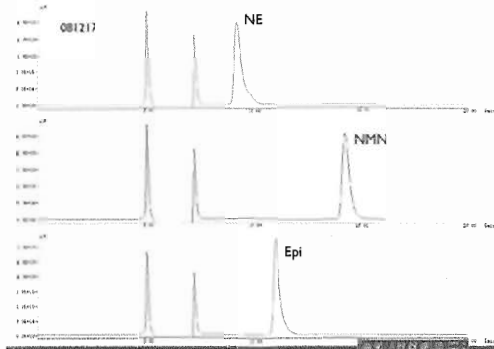
(2) HPLC による活性測定

HPLC システムの整備

角田・今井らにより報告されている高感度高選択的なカテコールアミン分析法を導入した。主要な機器本体については武蔵野大学薬学部今井先生から貸与をいただき、蛍光ディテクターについては生薬学ユニットの機器を借用した。さらに、電気化学反応セルは新規に導入し、分析システムハードウェアを完成させた。



当初は定量性の欠如、不明なピークの出現などにより難航したが、流路の洗浄、老朽化したパーツの交換、試薬の見直しなどを経て、酵素レベルのスクリーニングには十分と期待できる 20pmole の感度で、ノルメタネフリン (ノルアドレナリンのメチル化体) を検出できるようになった。蛍光では pmole レベルが限界であり、今後はさらに化学発光検出を組み合わせる事により、fmole レベルでの検出を目指す。将来、化合物が発見できれば、fmole 感度の分析により、動物の血中のノルメタネフリンの定量が可能になる。



今後の計画

今回、助成いただいた期間・範囲内では、出版発表などには至れなかったが、新規プロジェクトの立ち上げを行うことが出来た。今後、下記の方針で研究を継続する予定である。

- (1) 活性評価系の確立
- (2) 酵素タンパク質の大量取得
- (3) 当初目標(3)と(4)の実施。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 5 月 15 日

日本大学 総長 殿

氏 名 草間 國子

所属・資格 薬学部・准教授



下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	神経障害の発現に及ぼすストレスの影響に関する基礎的解析	
3 研究の目的	H. Selye 以来ストレスは多くの疾患の背景あるいは原因となることが知られている。器質的変化を伴う神経疾患においても例えば Alzheimer 病の発現において、ストレス反応系である視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸との関連について報告がある。(O' Brien et al. 1996. Psychol Med 26:7-14 など)。申請者は上位および下位運動神経に選択的な変性・脱落を引き起こす運動疾患 neurolathyrism について、ゲッ歯類モデルの作製に成功し報告したが、研究過程でその出現頻度に影響する因子としてストレスがあることが予想された。本疾患の発生状況をかながみても、ストレスが運動神経の変性に影響を及ぼすと推論される。ところがこのテーマに関連した研究は少ない。そこで、再現性の良いこの実験系を利用すれば比較的容易にストレスと運動神経脱落との関連を調べうると考え、本研究においては準備段階としてストレス下での運動不全の発現と症状について基礎的データを収集することをめざした。	
4 研究の概要	<p>対麻痺出現に及ぼすストレス負荷の影響：neurolathyrism 原因化合物 β-N-oxalyl-L-α,β-diaminopropionic acid (以下 ODAP) を Wistar 系ラット新生仔に連続末梢投与し、後肢のみに対麻痺を起こした動物を作製する際に、母親から引き離し、隔離ストレスを与える。その条件と対麻痺発症頻度との関係を調べた。</p> <p>ストレス応答系 (HPA 軸) における変化①ODAP 投与条件下、ストレスの主な反応系である HPA 軸の反応性について corticosterone の血中濃度を指標として検討した。ホルモン測定には EIA 法を用いた。②ODAP 投与の際、直前に腹腔内投与したグルココルチコイド(dexamethasone)によって対麻痺の発症がどのように影響を受けるかについて検討した。③脳内 HPA 軸関連領域における変化を組織化学的に検討した。以上から運動神経の特異的障害とストレスの関連について知見を整理検討し、考察した。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の (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：草間 國子

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

(1) 対麻痺出現に及ぼすストレス負荷の影響：

誕生後 8 時間以内のラット新生仔に neurolethyrism 原因化合物 β -N-oxalyl-L- α,β -diaminopropionic acid (以下 ODAP) を連続で末梢投与した。投与条件は化合物の性状と up and down 法に近似した手法にもとづき投与量として 100 mg/kg を 1 日 1 回皮下投与、毎日 5% ずつ増量とした。2 日目から一日 6 時間 (午前 10 時～午後 4 時) 母ラットから引き離し、隔離・飢餓ストレスを与えた(ストレス群)。ストレス非負荷条件(非ストレス)と負荷条件(ストレス)における麻痺ラットの出現について表 1 に示した。

表 1 ストレス負荷条件が対麻痺ラット出現に与える影響¹⁾

合成 ODAP を生後 8 時間以内のラット新生仔に一日一回皮下投与し、2 日目よりストレス群は投与前から投与まで親から 6 時間引き離した。非ストレスでは投与時のみ引き離し、痙攣回復後(約 30 分)すぐ親に戻した。

	対 照		L- β -ODAP	
	ストレス	非ストレス	ストレス	非ストレス
全個体数 (%)	117 (100)	45 (100)	157 (100)	92 (100)
対麻痺*	0 (0.0)	0 (0.0)	24 (15.3)	3 (3.3)
症状なし/可逆性症状	107 (91.5)	42 (93.3)	32 (20.4)	57 (62.0)
死亡	10 (8.55)	3 (6.7)	101 (64.3)	32 (34.8)

表の数値はラットの匹数を、カッコ内は出現頻度(%)をそれぞれ示す。

* 後肢が両側性完全に痙攣性麻痺を起こしたものを「対麻痺」とした。一側性の麻痺も便宜上ここに入れた。

この実験結果から Wistar 系ラット新生仔(オス)に対する ODAP の連続投与はストレス非負荷の場合は後肢対麻痺個体の出現率が 3.3%であったのに対し、6 時間隔離では 15.3%と約 4.6 倍に上昇した。他方、投与による死亡も 1.8 倍に増加した。以上のことからストレス負荷は ODAP 投与による対麻痺ラットの発生を大幅に高める事が判明した。

(2) ストレス応答系 (HPA 軸) における変化

① ストレスに対する体内の応答系として視床下部-下垂体-副腎系 (HPA) がある。ラットのグルココルチコイドであるコルチコステロンについて、まず数値が大きく現れると予想されたストレス負荷ラットについて、対照群 (生食群) と ODAP 群のコルチコステロン濃度を測定し、結果を図 1 に示した。生後 10 日まではコルチコステロン濃度が非常に低かったためキットの定量下限付近であった。その後、3 週、23 週とそれぞれ 6 倍、16 倍まで血中濃度が増加し、HPA 系の反応性が増大することが確認された。現在までの結果では、ストレス負荷下では対照と ODAP 群 (麻痺を起こさなかった個体) でコルチコステロンの濃度において大きな差は認められなかった。麻痺が生じる時期である投与中の生後 1 週間以内についての測定値を得る必要があり、今後より感度の高いキットを用いることにより、特に生後初期の HPA 軸が不完全な時期の HPA 軸の反応性について更なる検討が必要と考えられた。

図 1 ストレス負荷ラット各時期における血清コルチコステロン濃度
表 1 に示した条件でラット雄に ODAP または生理食塩水を皮下投与し、5 日、3 週間、23 週間目に採血し、血清のコルチコステロンを EIA 法で測定した。ODAP と表記されているものは対麻痺を示さなかった個体 (n=2) である。

部科校名：薬学部

氏名：草間 國子

研究の結果 (つづき)

②HPA 軸と同等の働きをする可能性がある時期 50 µg/kg dexamethasone (以下 dex) を ODAP の直前 (30 分前に腹腔内) に投与した。この群について、前実験にもとづき、安定した数値として捉えうる 3 週間目のラットについて、コルチコステロンの血中濃度を前述の方法で測定した結果を図 2 に示した。雄 (n=4) と雌 (n=2) の間でコルチコステロンの血中濃度に大きな差は認められなかった。また、雌についても ODAP 投与群と対照との間の差が認められず、図 1 と同様の結果となった。一方、雄に関して dex 単独投与でやや減少傾向がみられるものの、dex と ODAP 連続投与は 3 週間で見る限り corticosterone レベルの大きな変動は認められなかった。

また、データには示していないが、dex の同時投与によって対麻痺の出現は全く認められなかった。のみならず、ストレス負荷下で ODAP 投与によって生じていた 60 もの死亡率は 21% まで低下した (dex 単独による死亡率は 23% であった)。

ただし、被験個体数がまだ少数 (n=18-24/群) であるため、この知見は予備的なものである。

③視床下部の組織化学については現在検討中である。

以上の検討により、神経毒 ODAP による下行性 motor conduction system における障害に関して、隔離・飢餓ストレスの負荷はその特異的毒性を高めることが判明したが、内分泌学的にストレス応答系 (HPA 軸) の明瞭な応答は現在までのところ認めえなかった。ただし、麻痺発生期の HPA 軸の変動、対麻痺個体についてのデータは不十分であり、今後あきらかにしたい。

1. Kusama-Eguchi K, et al. 2009. J.Comp.Neurol. submitted.

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年5月8日

日本大学 総長 殿

氏 名 小林 秀昭



所属・資格 薬学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	チャバネアオカメムシ共生菌と腸内細菌 <i>S. typhimurium</i> のゲノム比較	
3 研究の目的	<p>昆虫にはその6割の種にそれぞれの共生菌（昆虫共生菌）が存在するといわれている。昆虫共生菌は、宿主との数億年にわたる共生関係から特徴的な遺伝子が濃縮されていると考えられる興味深い微生物である。そのため、自立型の細菌ゲノムと比較することによりゲノムレベルでの特徴を明らかに出来る可能性がある。昆虫共生菌のモデルとしてチャバネアオカメムシ共生菌に注目し、そのゲノムの特徴を自立型の腸内細菌である <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 (<i>S. typhimurium</i>) のゲノム塩基配列と比較することによりゲノムの特徴を明らかにすることを目的とした。</p>	
4 研究の概要	<p>チャバネアオカメムシ共生菌は中腸盲のう部の菌細胞塊内にできていることから、細胞表面分子の変化が期待される。そこで、細胞表面を構成している分子の中で、lipopolysaccharide(LPS)に注目し、その合成関連遺伝子を中心に比較解析を行った。比較の対象として <i>S. typhimurium</i> の他に <i>Escherichia coli</i> K12 (<i>E. coli</i>) も用い自立型の細菌内の比較対照とした。LPSは大きく3つの部分（リピドA、コアオリゴ糖、O多糖）に分けることができ、さらにコアオリゴ糖は内部コアと外部コアに分けることができる。内部コアまでの生合成遺伝子は <i>S. typhimurium</i> と <i>E. coli</i> に共通であることから、これら遺伝子を中心に解析した。その結果、リピドAや内部コアを構成する合成遺伝子については相同性検索の結果、その存在が示唆された。しかしその相同性は <i>S. typhimurium</i> と <i>E. coli</i> との相同性に比べて低かった。以上の結果から、少なくともlipidAの合成および内部コアの合成酵素を有することが強く示唆された。LPSは細胞壁構成成分であり宿主の異物認識の観点からは遺伝子が失われていてもおかしくないと思われたが、自立型の微生物と同様に存在していることが示唆された。宿主との相互作用の観点から興味深い知見が得られたと考えられる。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

※ホームページ等での公開の 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：小林 秀昭

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

多くの昆虫は菌細胞塊といわれる特殊な器官に微生物を共生させている（共生菌）。共生菌は昆虫に対して栄養などを供給していると考えられている。これまで研究されてきた多くの共生菌は菌細胞塊の細胞内に共生しているタイプのものであった。これら共生菌は細胞内に存在していることから宿主の免疫システムから逃れていると考えられる。しかし、共生菌の中には菌細胞塊の中に存在するものの細胞内ではなく細胞外に共生しているものが知られている。細胞外に存在する共生菌は宿主からの免疫システムに常にさらされているはずである。

今回解析の対象とした宿主のチャバネアオカメムシは、日本の果樹害虫として最もよく知られているものの一つである。チャバネアオカメムシの共生菌は中腸盲のう部の中に存在し、盲のう部の内腔は小さな穴を通じて中腸とつながっているため、共生菌は宿主との接触に常にさらされている。この共生菌は盲のう部から中腸に放出された後、卵の表面に塗布され、それを孵化した幼虫がなめて体内に取り込むというプロセスを経て次世代のカメムシに受け継がれていると考えられている。この共生菌は宿主に対するビタミンの供給を担っていると考えられている。

一般に、宿主にとって好ましいとは言えない微生物の感染は、宿主の免疫システムにより排除される。チャバネアオカメムシ共生菌は腸内細菌科に属し、中腸とつながっている盲のう部の内腔に存在していることから何らかの宿主-共生菌間相互作用を行っているはずである。チャバネアオカメムシ共生菌が宿主の免疫システムからいかにして逃れているかについてはこれまで研究はされていない。宿主との相互作用でまず注目するのは共生菌の細胞表層の構成成分である。

リポ多糖（Lipopolysaccharide、LPS）はグラム陰性細菌の重要な細胞壁構成成分である。脊椎動物では、LPSは自然免疫を強く活性化することから、宿主による微生物の認識の対象物質であるといえる。LPSは、リピドA（エンドトキシン）といわれる疎水領域、コアオリゴ糖、O多糖に大きく3つの部分に分けることができる。さらにコアオリゴ糖はKDO（3-deoxy-D-manno-octulosonic acid）やHep（L-glycero-D-manno-heptose）で構成される内部コアおよび外部コアに分けることができる。LPSについては、自立型の微生物について詳しく調べられているが、共生菌についての研究はほとんどない。グラム陰性菌では、LPSは増殖や生存に関わっていると考えられている。*Escherichia coli* (*E. coli*)では、リピドAの合成に関わる遺伝子を欠損させるとある条件化で生存できなくなる。*E. coli*と*Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*)について、最小のLPS構造が調べられており、リピドA-KDOであることが明らかになっている。これらのことは、グラム陰性菌ではLPSが生存に必須であることを示唆している。しかし、例外も知られており、*Neisseria meningitidis*は、KDOがなくても生存でき、リピドA合成酵素の一部であるlpxA遺伝子を欠損させても生存できることが明らかとなった。ペスト菌である*Yersinia pestis*ではyrbHやwaaA遺伝子がなくてもKDOのないLPSを合成でき生存可能であることも報告されている。これらのことから、細胞外に存在する共生菌では、宿主との共生にむしろ不必要と考えられるLPSの合成について何らかの変化があることが期待された。そこで、共生菌のLPSについて、ドラフト塩基配列を得ていたことから、相同性により探索することにした。当初の計画では全ゲノム塩基配列を利用することを予定していたが、ドラフト塩基配列の未決定部分の配列の決定が難航し、全ゲノム塩基配列を決定することができなかった。これは、類似の塩基配列が何カ所もあることが分かり、contig間の対応付けが想定以上に難しかったことによる。このことは逆に、未結合部分は類似の配列であり、ユニークな配列はドラフト塩基配列中に存在すると考えられることから、ドラフト塩基配列を利用して以下解析を行うことにした。

解析には、我々の決定した共生菌のドラフト塩基配列情報ならびに*E. coli*と*S. typhimurium*のLPS合成酵素の塩基配列情報を利用した。*S. typhimurium*は共生菌のCOG解析から最も相同性の高い微生物として選択した。自立型の微生物の比較の対照として*E. coli*を選択した。それぞれのLPS合成酵素の塩基配列についてはKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)より入手した。これらをもとに、共生菌のLPS合成酵素遺伝子をまず、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のBLAST searchにより探した。そして、その領域を含むORFをLasergene software (DNASTAR, WI)により同定した。その後、それぞれの合成遺伝子ごとに翻訳したアミノ酸配列を元に、三者をclustal W法により比較した。

内部コアまでの生合成遺伝子は*S. typhimurium*と*E. coli*に共通であることから、これら遺伝子を中心に解析した。

部科校名：薬学部

氏名：小林 秀昭

研究の結果 (つづき)

(1) LipidA の合成では、その関与する遺伝子群として lpxA, lpxC, lpxD, lpxH, lpxB, lpxK, lpxL, lpxM, の8個について解析した。これらの遺伝子群について、*E. coli* と *S. typhimurium* の DNA 塩基配列情報を KEGG より入手した。これらの塩基配列をもとに、共生菌のドラフト塩基配列に対して BLAST 検索を行い、相同性の高い領域を抽出した。次に Lasergene software を用いて、抽出した領域について、ORF 領域を推定した。末端の相同性が高い場合には 5' 末端, 3' 末端をその部位とし、相同性が低い場合には ORF を用いた。このようにして遺伝子領域を推定した後、アミノ酸レベルで相同性を clustalW により比較した。その結果、*E. coli* と *S. typhimurium* では5個の遺伝子は、93%以上の相同性を示したが、一部、lpxH 84%、lpxK 82%、lpxL 84% と相対的に低いものがあった。これに対し、本共生菌との比較では、lpxH では、*E. coli* とは 71%、*S. typhimurium* とは 67%であった。lpxK では、*E. coli* とは 64%、*S. typhimurium* とは 65%であった。lpxL については、*E. coli* とは 68%、*S. typhimurium* とは 67%であった。その他5個の遺伝子については、*E. coli* とは 74~86%、*S. typhimurium* についても 74~86%であった。以上のように共生菌との比較では全般に 10~20%程度低かった。しかし BLAST 検索で相同性の高い領域として抽出され、かつ、アミノ酸レベルで 60%以上と相同性が高いことからこれらリピド A 合成遺伝子については共生菌でも保持されていると考えられる。

(2) コアオリゴ糖の合成経路のうち、KDO 合成経路では、waaA, kdsA, kdsC, kdsB の4個の遺伝子について解析した。これら遺伝子についても同様に検索したところ、*E. coli* と *S. typhimurium* との比較では 93%以上の相同性をいずれの遺伝子も示した。これに対し、本共生菌については、*E. coli* との比較では 76~90%であり、*S. typhimurium* との比較では 73~88%であった。共生菌との比較では全般に 20%程度低かったが、いずれの遺伝子も存在していると考えられた。

(3) コアオリゴ糖の合成経路のうち、Hep 合成経路では、gmhA, yraO, rfaE, yaeD, rfaD の5個の遺伝子について解析した。これら遺伝子についても同様に検索したところ、*E. coli* と *S. typhimurium* との比較では 93%以上の相同性をいずれの遺伝子も示した。これに対し、本共生菌については、*E. coli* との比較では 75~92%であり、*S. typhimurium* との比較では 75~91%であった。共生菌との比較では全般に 10%程度低かったが、いずれの遺伝子も存在していると考えられた。

(4) コアオリゴ糖の合成経路のうち、KDO 合成や Hep 合成以外の *E. coli* と *S. typhimurium* で共通の遺伝子である、rfaY, rfaB, rfaG, rfaQ, rfaF, rfaP, rfaC の7個について同様に検索した。その結果、*E. coli* と *S. typhimurium* との比較では 64~92%と遺伝子ごとにばらつきが見られた。BLAST で本共生菌のドラフト塩基配列に対し相同領域を検索したところ、rfaF と rfaC の2個のみ見出すことができた。rfaF と rfaC は Hep の KDO への連結に関わる酵素である。rfaF については、*E. coli* とは 77%、*S. typhimurium* とは 76%の相同性を示した。rfaC については、*E. coli* とは 67%、*S. typhimurium* とは 68%の相同性を示した。相同性検索で見つからなかった遺伝子は、*E. coli* や *S. typhimurium* とは大きく異なった構造を有している可能性も否定できず、種の違いを反映している部分もあると思われる。

以上の遺伝子検索の結果から言えることは、少なくともコアオリゴ糖のうち内部コアの合成までは行われていると考えられ、少なくとも最低限の LPS については合成していることが強く示唆された。外部コアについては本共生菌特有の遺伝子の存在の可能性もあり、相同性の解析によるのではなく、糖鎖構造の解析が必要である。

宿主との相互作用を考えると共生菌は LPS を欠落していてもおかしくないと考えたが、そうではなかった。LPS は宿主との相互作用部位である一方、LPS 自体の機能として重要なものがあり、そのため欠損させることができなかつたと考えるのが妥当である。LPS のコアオリゴ糖はマイナスに荷電しており、2価陽イオンと結合し細胞壁における物質の通過を強く妨げている。そして、細胞壁には OMP といわれる外膜タンパクを配し、そこから栄養などを取り込んでいる。この OMP の会合に LPS は必要であると考えられている。共生菌は宿主との物質のやり取りが盛んであることが考えられるため、このような物質交換に必要な OMP を正常に働かせるため LPS は必要であると推察される。

以上をまとめると、共生菌のゲノムの特徴を明らかにするため LPS 合成遺伝子について自立型のグラム陰性菌のゲノムと比較し、共生菌についてもリピド A や内部コアの合成酵素を有することが強く示唆され、自立型の微生物と同様 LPS を持っていることが考えられた。LPS の存在が示唆されたことから、宿主-共生菌間相互作用を考えるうえで興味深い知見が得られたと考えられる。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 5 月 8 日

日本大学 総長 殿

氏 名 泉澤 恵



所属・資格 日本大学薬学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目 <input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題 OTC 医薬品の labelling に関する調査研究	
3 研究の目的 OTC 医薬品は、2006 年の薬事法改正によってリスクに応じて3分類され、情報提供と相談応需の整備が今後の課題とされ、新ラベル表示方法、情報提供のあり方をはじめ、より具体的な情報提供システムの整備が必要とされている。現状の外箱表示は、商品名などマーケティング情報が大きな割合を占めており、リスクに応じた製品選択や使用前に注意を促す情報は十分に記載されていない。また、重要な情報はマーケティング情報に比べて目立たないため、情報を正確に把握しづらい。そこで、本研究では、どのような外箱情報であれば必要な情報が購入前に消費者に認識され、OTC 医薬品の適正使用がもたらされるかを明らかにすることを目的とした。OTC 医薬品の情報項目に関して消費者ニーズをもとに階層化し、新しいリスク分類表示を加えた外箱表示のデザインを試作後、印象評価実験や意識調査によってリスク情報への意識の変化を確認する。また、眼球運動による情報内容の注目度とその背景を調査し、リスク情報をはじめとする適正使用情報に係る内容を精査し、デザイン心理学的側面と認知プロセスの考察を試みた。	
4 研究の概要 OTC 医薬品の labelling、すなわち、OTC 医薬品の外箱情報と添付文書情報の適正使用を考慮された外箱を作成し、薬剤師などの専門家とのコミュニケーションを介して、その情報源が、適正使用へと繋がる新しい labelling 情報源となる可能性に着目し、心理的手法及び人間工学の双方の視点から検討した。まず、薬事法改正に伴ってOTC 医薬品の変更点の一つであるリスク分類表示の添付によるデザイン変更が、心理学的にどのように影響するかに着目した。そこで、新しい分類表示のデザインを試作し、印象評価実験と意識調査によってデザイン心理学的な影響を調査し、コミュニケーションツールとしての可能性を模索した。その結果、新しいリスク分類表示が印字されることで注目度が高まる一方で、リスクが高いほど購買意欲は低下した。さらに、眼球運動の停留時間の実験から、購入者の情報項目への注目度はOTC 医薬品メーカーの重視する項目と符号したものの、適正使用情報を重視する結果ではないことが明らかとなった。したがって、今後、OTC 医薬品のセルフメディケーションを支援する Labelling 情報とは、必要かつ重要な情報を消費者が瞬時に注目し、見極め理解しやすい情報となるよう構成されることが望ましい。その為には、人間工学の視点を考慮し効果的な認知プロセスを実現する labelling 情報への新たな視点が必要となることが示唆された。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します） ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担）	

※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：泉澤 恵

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

本研究は、階層化された情報項目と新しいリスク分類表示を付けた新しい外箱を作成したサンプルと既存の製品を対象に、印象評価実験、注目度実験、質問紙調査等を実施し、新しい labelling 情報の構成に係る調査研究を行い、考察した。

【結果】

I. 情報項目に関する注目度実験

(1) 注目度実験 (眼球運動実験)

20～30代の大学生・主婦 (医薬品平均購入回数：0.3回/月) を対象に医薬品4種類をサンプルとし眼球運動実験を行った。各医薬品表示の項目は、12項目に分類し、被験者による各医薬品表示の外箱項目の停留時間を眼球運動計測装置を用いて測定し、各項目ごとに注目度を比較した。

薬品名、キャッチコピー、効果・効能、用法・用量の項目は、どの医薬品であっても注目度が比較的高く、一方、リスク分類表示、問い合わせ先、内容量、使用期限などの注目度は低かった。リスク分類表示の停留時間は、いずれの製品においても、薬品名に比較し有意に短かった ($p < 0.05$)。使用上の注意項への着目度は、かぜ薬ではキャッチコピーと同程度の時間であったのに対し、ビタミン剤では約18分の1と短い時間を示した。

かぜ薬およびビタミン剤の全12項目に対する合計停留時間 (かぜ薬：平均14.50秒、ビタミン剤：平均15.61秒) に統計的有意差は認められなかったが ($p > 0.05$)、かぜ薬の用法・用量、使用上の注意、製薬会社名、問い合わせ先に対する停留時間はビタミン剤よりも有意に長かった ($p < 0.05$)。また、かぜ薬では色がついているキャッチコピーの停留時間は、色がついていないキャッチコピーより有意に長く、図がついている用法・用法に対する停留時間がついていない場合より有意に長かった ($p < 0.05$)。

(2) 質問紙調査

眼球運動実験終了後、質問紙によるアンケート調査を実施した。被験者は選択した薬品の各項目をどの程度よく見たか、および各項目にどの程度目を引かれたかについて4段階で評価した。また、注目度の背後に潜む理由も調査した。さらに、薬局に来店した20代～70代の客140名 (医薬品平均購入回数：0.7回/月) も同様の調査を行った。

調査の視点は、①選択した薬品の各項目をどの程度見たか？②選択した薬品の各項目にどの程度目を引かれたか？③選択の決め手になった部分の3項目とした。

被験者の87.3%が「キャッチコピーをととても・少しよく見た」と回答し、その理由においては38.4%の被験者が「必要な情報だから」、37%の被験者が「文字が大きかったから」と回答した。また、75%の被験者が「キャッチコピーにはとても・少し目を引かれた」と回答し、その理由には36.1%の被験者が「文字が大きかったから」、14.9%の被験者が「色が目立ったから」と回答した。

また、被験者の88.7%が「薬品名にはとても・少し目を引かれた」と回答し、その理由には49.6%の被験者が「文字が大きかったから」、17.7%の被験者が「色が目立ったから」と回答した。

そして、選択の決め手は、被験者18.6%は「選択した薬品のキャッチコピーによって決めた」、18.2%が「選択した薬品の効果・効果によって決めた」と回答した。次いで、被験者12.81%は「選択した薬品の外箱のデザインによって決めた」、被験者の12.6%「選択した薬品の文字によるインパクトによって決めた」と回答した (複数回答)。

(上記の内容は、学会発表を予定)

部科校名：薬学部

氏名：泉澤 恵

研究の結果（つづき）

II. リスク表示への注目度実験

(1) リスク表示への注目度実験

今まで OTC 医薬品に馴染みがあり、今後も使用する可能性のある被検者を対象に、リスク分類表示を印字した外箱表示を試作後、Change Blindness 法によって注目度を調査し、印象評価実験によって識別性と嗜好性を調査した。その結果、新しい情報構成とリスク表示が良好な結果を得た。

(2) 質問紙調査

試作したリスク表示の印象評価実験では、リスク表示対して「わかりやすさ」78.6%と高いが、「手の取りやすさ」58.8%、「購買欲」21.3%と徐々に低下し、リスク表示を取り入れた結果、購入意欲の低下傾向を示した。また、「わかりやすさ」と「購買欲」(χ^2 検定、 $p < 0.05$)、及び「手にとりやすさ」と「購買欲」の間に関連性(χ^2 検定、 $p < 0.01$)を認め、購買欲により密接に影響するのは、「手にとりやすさ」であった($r=0.410$, $p < 0.01$)。「表示の購読度」と「薬剤師等の医療の専門家への相談度」の関係はリスク分類ごとに異なっていた(Kruskal Wallis $p < 0.01$)。

即ち、リスク分類が高いほど「表示全体の購読度」や「薬剤師への相談」の割合は高く、2 因子間にはやや強い相関を認めた(第一(第一類: $r=0.521$ 、第二類 $r=0.443$ 、第三類 $r=0.414$ 、各 $p < 0.01$)。また、コレスポンデンス分析によって「リスク表示がわかりやすい」と思う人ほど箱全体の表示内容を読む頻度も高く、この2 因子間で弱い正の相関が認められた(第一類: $r=0.26$ 、第二類: $r=0.33$ 、 $p < 0.01$)。そして外箱情報を購読する意欲が高い人ほど、薬剤師への相談希望の割合も高かった($r=0.405$, $p < 0.01$)。

【考察】

情報項目に関する注目度実験から消費者は OTC 医薬品購入の際に「薬品名」「キャッチコピー」「効果・効能」をよく見、「リスク分類表示」に対する着目度が、他の項目と比較してやや低いことが示された。さらに、色彩や図等の視覚的効果が消費者の目を重要な情報に引き付ける効果を持つことが確認された。これらの項目は我々の先行研究の調査した製薬会社の重視項目と符号する結果となった。外箱記載情報において消費者が重視している項目と選択時に実際に注目している項目の間にギャップが生じた原因については、外箱のデザイン等いくつかの要因が考えられるが、今後さらに検討する必要があるものと思われる。外箱全体に対する停留時間に約 15 秒を要したことは、必要な情報を入手するのに十分であるかどうかについても今後の検討が必要である。

また、リスク表示への注目度実験から、わかりやすいリスク分類表示であることと、リスクが高い医薬品ほど、表示の購読度や薬剤師等の専門家への相談欲を高めるため、医薬品の安全性を担保する重要なツールであることが示唆された。一方、「表示のわかりやすさ」よりも「医薬品の手のしやすさ」のほうが「購買欲」へ結びつくことも示されたため、効率的なデザインのみでなく、購入者の心理学的側面を考慮した OTC 医薬品の陳列とその際の薬剤師の介入などを考慮するしくみこそが、よりよい販売制度に繋がることも推察された。したがって、labelling 情報に基づいた医薬品購入の適正使用には、“使える情報づくりのしくみ”に裏づけられたデザイン心理特性を考慮する重要性が示唆された。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 15 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 濃 沼 政 美



所属・資格 薬学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	統計的品質管理(Statistical Quality Control)の活用による薬物療法の質向上を目的とした研究	
3 研究の目的	工業製品の品質管理において汎用される SQC(Statistical Quality Control)手法を医療分野の品質管理に対し活用するための方法論について検討する。SQC 手法には、パレート図、チェックシート、ヒストグラム、管理図、層別、特性要因図、散布図からなる QC7つ道具が存在し、これら複数のツールを活用し種々の問題解決を行うものであるが、本研究では、主に管理図の活用法について活用法の検討を行う。検討事項としては活用可能な管理図の種類や管理限界値の設定、また、工程能力指数等の活用法についてとする。特に本研究では、臨床検査値やバイタルサインなどの生体機能の管理に着目し、複数のパネルから得られた血圧値をデータサンプルの採取を行う。ここで得られたサンプルデータに対し SQC 手法を用いた解析を行うことで、医療現場で利用可能な SQC 手法の提案を行いたい。	
4 研究の概要 方法(手順)	<ol style="list-style-type: none"> 1. チェックシート(日常生活調査票)の作成 2. 血圧測定・・・健常男性5名(被験者A~E)、1日2回、朝・就寝前、5ヶ月間 3 データ集計・・・各サンプルの記述統計量の算出 4. データの管理図への当てはめ・・・X管理図、Xbar管理図、R管理図、CUSUM管理図 5. CUSUM管理図の活用・・・管理図上での異常値とチェックシートの関係を検証 CUSUM管理図においてVマスクの外に出た点の前・後の期間で2群に分けWilcoxon順位和検定を実施 6. 工程能力指数(Cpk)の活用法・・・1サンプルのC_{p0}の低い期間の標準偏差を用い、C_{p0}算出式を変換することで血圧目標値の算出を行った。 	
5 研究組織(共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者(役割分担) 	

※ホームページ等での公開の 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

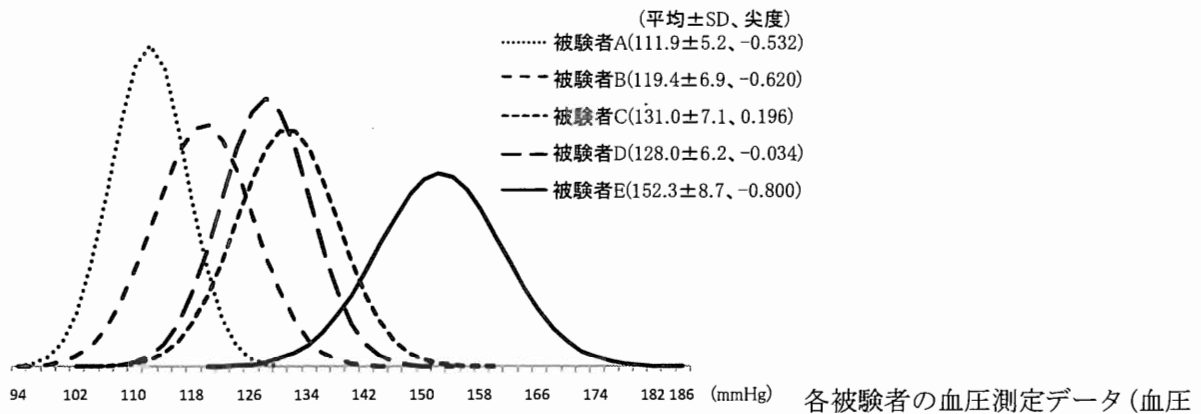
氏名：濃沼 政美

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

1. 日常生活調査票

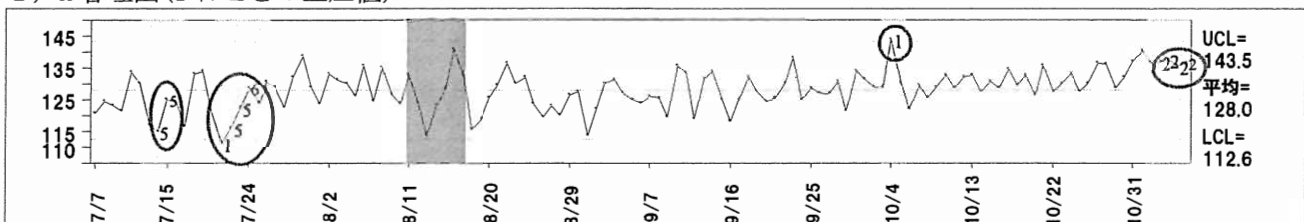
調査票は (1)精神的項目、(2)運動項目、(3)食事項目に分類し、朝夕2回調査した。

2. 各被験者の血圧データ (朝収縮期血圧)



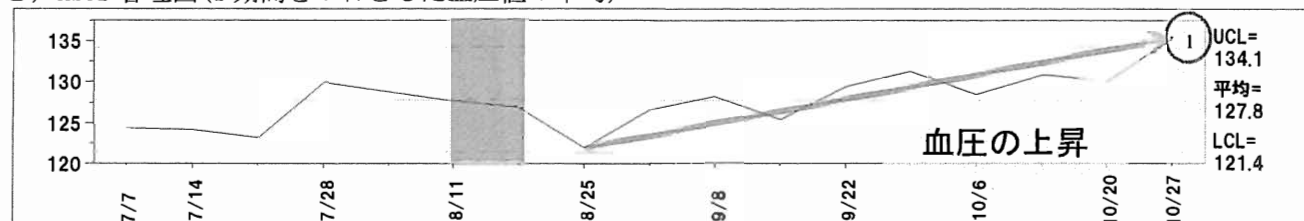
3. 管理図への当てはめ (被験者Dの例)

1) X管理図(1日ごとの血圧値)



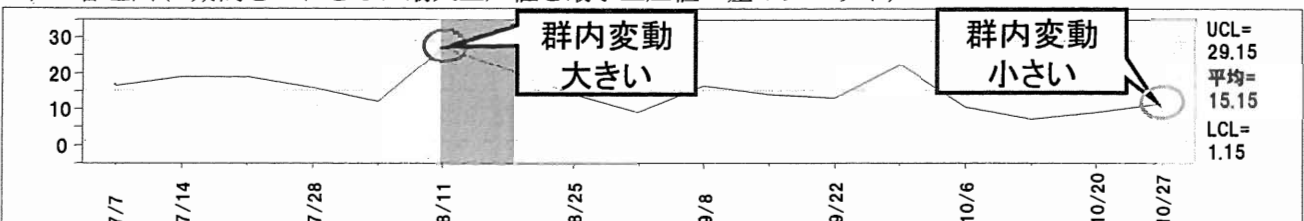
被験者Dの朝の収縮期血圧値は、UCLおよびLCLを超えたルール1に該当する異常が2点、その他ルール2、ルール5、ルール6に該当する異常が認められた(図3)。しかし、日常生活と異常値の照合を行ったところ、異常は発見できなかった。

2) Xbar管理図(1期間を7日とした血圧値の平均)



朝の収縮期血圧値を用いて7日間を1期間(Lot)とし、各群の平均値を1つのプロットとして、Xbar管理図を作成した。その際、UCLを超えたルール1の異常が1点確認できた。

3) R管理図(1期間を7日とした最大血圧値と最小血圧値の差のプロット)



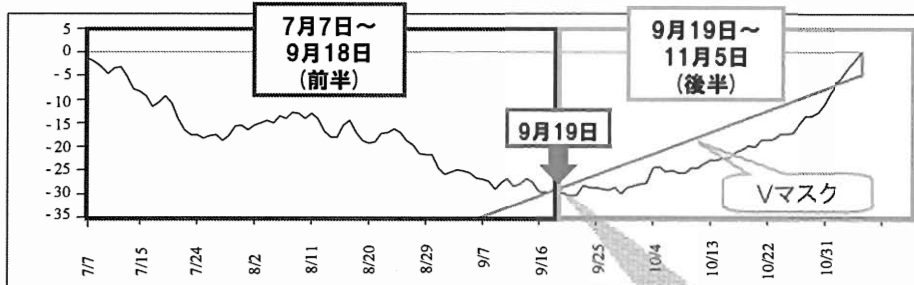
8月11日からの7日間においてUCLに最も近づいた点が認められた。チェックシートからこの期間には旅行に行った事が原因と推定された。

部科校名：薬学部

氏名：濃沼 政美

研究の結果 (つづき)

4. CUSUM 管理図の活用 (被験者 D の例)



Vマスクとは：工程平均の変化点を推定することができる
Vマスクの下側から点がでてくる場合には平均の上昇を、
Vマスクの上側から点がでてくる場合には平均の下降を示す。

平均の
上昇ポイント

朝の収縮期血圧値から作成した CUSUM 管理図では、V マスクの下側に外れるプロットが存在した。V マスク外に出た 9 月 19 日の時点から血圧の上昇傾向が認められた。朝の収縮期血圧の平均値において、V マスクの下側に出た 9 月 19 日で前・後で 2 群(前半 7 月 7 日～9 月 18 日、後半 9 月 19 日～11 月 5 日)に分け、日常生活調査票を比較した。

朝の収縮期血圧の平均値は前半が 126.1mmHg、後半が 131.0mmHg であり、前・後で有意差が認められた($p<0.0001$)。1 日の平均睡眠時間は前半が 7.1 時間、後半が 6.7 時間であり、前・後で有意差が認められた($p=0.0149$)。1 日の平均歩数においては、前半が 5,185 歩、後半が 7,802 歩であり、前・後で有意差が認められた($p<0.0001$)。飲酒量においてアルコール重量に換算した結果、前半が平均 6.5g、後半が 17.6g であり、9 月 19 日前・後で有意差が認められた($p=0.0003$)。

平均変化点前後の日常生活の比較結果

因子	(単位)	前半	後半
血圧	mmHg	126.1±0.7	131.0±0.8*
睡眠時間	時間	7.1±0.1	6.7±0.1*
歩数	歩	5,185±401.9	7,802±434.1*
飲酒量	g	6.5±1.9	17.6±2.3*

* $p<0.05$

5. 工程能力指数の活用 (被験者 E の例)

1 期間 (Lot) を 14 日間として工程能力指数 C_{pu} (C_p の上限規格値)の算出を行った。その結果、最大 C_{pu} は 1.69 であり、最小は 0.90 であった。最小値を認めた期間の出来事を日常生活票から抽出した結果、実父の葬儀などがあったため、通常通りの生活ができなかったためと推察された。

次に被験者 E の目標とすべき血圧値をシミュレーションにより算出した。

最も管理状態の悪い期間の標準偏差を用い、目標とする C_p を 1.0 に設定したところ、上側規格値を 180 で算出した被験者 E の目標血圧値は 149.4 であった。また、上側規格値を 160 で算出した場合の目標血圧値は、129.4 であった。ここで算出した目標値を被験者の平均値に設定出来れば、それぞれの上側規格値以上の血圧値が測定される頻度を 0.15%以下に抑えることが可能となる。

結語

本研究から、検査値に基づき X 管理図、 \bar{X} 管理図、R 管理図、CUSUM 管理図を作成することで、管理状態の推移や異常の発見、平均の変化点などを発見することができ、問題点の発見や解決に対し有用であるものと考えられた。また、問題解決を行うものであるが、それぞれの管理図を別々に評価するよりも、総合的に評価することで、より明確に異常の発見が可能になると考えられた。

本研究により SQC 手法、主として管理図を医療の現場で利用することは、客観的にデータを評価でき、医療の質の向上につながるができることと考えられた。更に、本手法を発展させることで、薬剤師の業務評価や薬物治療の新たな評価などにも結びつけることが可能であると考えられた。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 31 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 鈴木 豊 史



所属・資格 薬学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	一過性脳虚血障害による血液脳関門破綻の蛍光イメージング	
3 研究の目的	<p>血液脳関門 (BBB) は、物質輸送機能を有する脳毛細血管内皮細胞同士の密着結合 (TJ) により形成され、循環血液と中枢神経系間の物質移行を厳密に制御している。脳虚血/再開通 (I/R) は、活性酸素・フリーラジカルなどの産生により内皮細胞の損傷が引き起こされ、BBB における物質透過性を亢進させる。I/R 後に生じる BBB 透過性の変化は、虚血時間によって規定される TJ の開口だけでなく、エンドサイトーシスやトランスポーター介在輸送などの諸変動に起因するものと考えられる。特に、グルコースやアミノ酸のような栄養物質のトランスポーター介在輸送が、I/R 障害後にどのような影響を受けるかについて把握することは、超急性期脳梗塞治療に大きな進展をもたらすことが期待される。そこで本研究では、マウス中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いて、虚血時間によって規定される BBB 破綻の進行とその程度を明らかにすることを目的とした。</p>	
4 研究の概要	<p>中大脳動脈閉塞モデルマウスは、外科縫合用ナイロン栓糸を外頸動脈から内頸動脈を通して中大脳動脈まで挿入することにより作製し、一定時間 (0.5-1 h) の虚血を行った。虚血後の BBB における TJ の開口の程度を評価するため、蛍光トレーサー分子の BBB 透過性を <i>in situ</i> マウス脳灌流法により測定した。細胞間隙経路の指標として低分子量の蛍光物質フルオレセインナトリウム (SF)、エンドサイトーシス経路の指標として高分子量の蛍光物質エバンスブルー (EB) にアルブミン (A) を結合させた EBA を含有する灌流液を用いて、それぞれの脳内移行量を蛍光光度法により定量した。TJ の開口に及ぼす再開通時間の影響は、血管内容積の指標である^[14C]スクロース (Suc) を用いて検討した。BBB 破綻の蛍光イメージングは FITC-ゼラチン溶液を用いた共焦点レーザー顕微鏡 (CLMS) を用いて行った。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の (◎・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： 鈴木豊史

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

SF と EBA の BBB 透過性は、虚血 0.75 時間後まで偽手術 (Sham) 群と比較して変化が認められなかった。一方、虚血 1 時間後における SF 及び EBA の脳内移行量は、それぞれ約 4 倍および 2 倍に増大した (Fig. 1)。

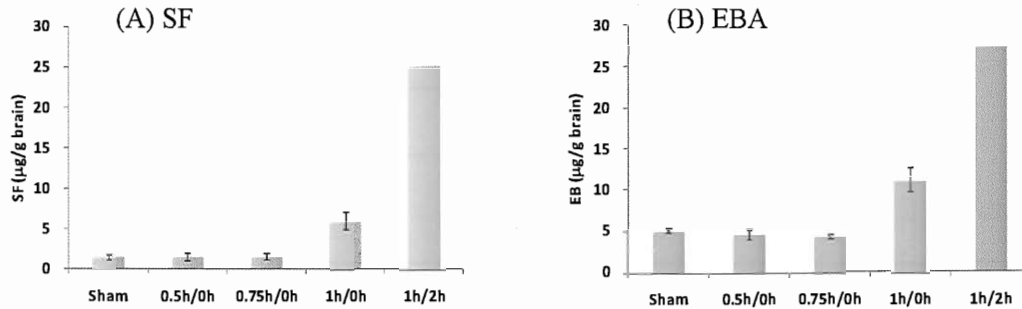


Fig. 1 SF and EB concentration in the left brain following MCAO

また、各虚血時間 (0.5, 0.75, 1 時間) における脳微小血管像を共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、Fig. 1 の結果に一致して、虚血 1 時間後においては、FITC-ゼラチンの血管外漏出が認められた (Fig. 2)。このことから、虚血 0.75 時間までは TJ が保持されており、TJ の開口に起因する BBB 破綻は 0.75 時間の虚血時間以降に進行していることが示唆された。

次に、虚血後の再灌流は、BBB 破綻に影響を及ぼすことが知られているため、虚血時間を TJ の開口が認められなかった 0.75 時間に固定し、再灌流時間を変化させたときの TJ 開口の程度について検討した。虚血後の再灌流障害による TJ 開口の程度の評価には、血管内容積の指標である¹⁴C]スクロース (Suc) を用いた。

¹⁴C]Suc の透過性から見積もられた脳血管内容積は、虚血 0.75 時間後、再灌流を 2 時間まで延長させた場合においても Control 群と比較して変化が認められなかった (Fig. 3)。一方、再灌流 4 時間後においては、¹⁴C]Suc の脳血管内容積は約 6 倍に増大した。

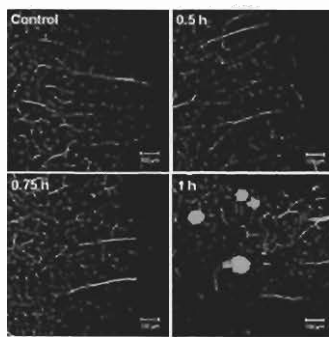


Fig. 2 CLMS images of on brain microvascular following ischemia

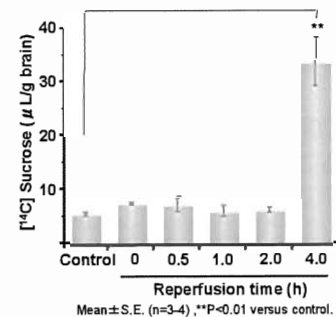


Fig. 3 Brain vascular volume of [¹⁴C]sucrose following ischemia/reperfusion

また、各再灌流時間 (0.5, 2, 4 時間) における脳微小血管像を共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、Fig. 3 の結果に一致して、虚血 2 時間までは FITC-ゼラチンの血管外漏出が認められなかった (Fig. 4)。

以上のことから、TJ の開口は虚血 0.75 時間後、再開通 2 時間までの間に生じないことが示唆された。

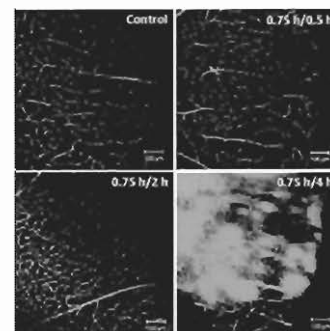


Fig. 4 CLMS images of on brain microvascular following ischemia/reperfusion

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 5月 8日

日本大学 総長 殿

氏 名 青山 隆彦



所属・資格 薬学部助手

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	母集団薬物動態解析による集中治療領域における抗真菌薬投与計画の個別化基盤研究	
3 研究の目的	救急・集中治療室では、深在性真菌症の発症により入院期間の延長、死亡率の増悪が認められる。救急・集中治療患者は多臓器不全、熱傷などの患者背景を持つことから、薬物体内動態の個人差が大きく、薬物投与計画の個別化が必要である。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症治療薬バンコマイシン、テイコプラニン、母集団薬物動態パラメータおよびベイズ推定法が臨床応用され、Therapeutic Drug Monitoring (TDM)による患者個別の投与計画が行われている。抗真菌薬においても同様に TDM による投与計画の個別化を行うことにより、治療効果が向上することが考えられる。抗真菌薬フルコナゾールは、深在性真菌症の第一選択薬であり、プロドラッグであるホスフルコナゾールとともに汎用されている。そこで、救急・集中治療患者における深在性真菌症治療の個別化を目的として、抗真菌薬フルコナゾールの母集団薬物動態解析を行い、母集団薬物動態パラメータを算出した。	
4 研究の概要	収集した患者情報、薬物血中濃度データをもとに非線形混合効果プログラム NONMEM ver. VI を用いて母集団薬物動態解析を行い、救急・集中治療患者における抗真菌薬フルコナゾールの母集団薬物動態パラメータを算出した。母集団薬物動態解析の結果、フルコナゾールまたはホスフルコナゾール投与後のフルコナゾール体内動態は、クレアチニンクリアランスおよび血中尿素窒素によって影響を受けることが示唆された。算出したフルコナゾール母集団薬物動態パラメータにより、救急・集中治療患者における血中フルコナゾール濃度の予測が可能であった。算出した母集団薬物動態パラメータを用いてモンテカルロ・シミュレーションによりコンピュータ上で集中治療患者 59000 症例におけるホスフルコナゾール 200 mg 投与後の血中フルコナゾール濃度・時間曲線化面積を予測した結果、その中央値 (95 パーセント点, 5 パーセント点) は 300 (119, 913) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ であり、大きな個人差が認められた。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

※ホームページ等での公開の 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：青山隆彦

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

日本医科大学付属病院高度救命救急センターにてフルコナゾールまたはホスフルコナゾールを投与された患者 57 症例に、集中治療患者を対象に頻回採血しフルコナゾール体内動態を検討した文献 (Nicolau et al., *J Antimicrob Chemother.* 1995 ;36(2):395-401.、Buijk et al., *Intensive Care Med.* 2001;27(1):115-21.) 2 報より血中フルコナゾール濃度データを抽出し、それぞれを 1 症例としたデータを加え、59 症例を対象に母集団薬物動態解析を行った。

ホスフルコナゾールは投与後すべてフルコナゾールへ変換され、その速度は一次速度過程に従うと仮定し、フルコナゾールの薬物動態モデルは、1-コンパートメントモデルとした。薬物動態モデルを Fig. 1 に示す。薬物動態パラメータであるクリアランスおよび分布容積の変動要因として、年齢、体重、クレアチニンクリアランス、血清クレアチニン、血中尿素窒素、アラニンアミノトランスフェラーゼ、乳酸脱水素酵素、血清アルブミンを検討した。算出したフルコナゾールの母集団薬物動態パラメータを用いて血中フルコナゾール濃度推移のモンテカルロ・シミュレーションを行った。母集団薬物動態解析およびモンテカルロ・シミュレーションは非線形混合効果モデルプログラム NONMEM ver. VI (ICON development solutions, MD, USA) を用いた。

フルコナゾールのクリアランスの変動要因として、クレアチニンクリアランスおよび血中尿素窒素が示唆された。算出した母集団薬物動態パラメータ平均値より推定した血中フルコナゾール濃度と実測値の相関係数は 0.74、ベイズ推定した患者個別の薬物動態パラメータを用いて算出した推定血中フルコナゾール濃度と実測値の相関係数は 0.96 であった。推定血中濃度と実測値の関係を Fig. 2 に示す。モンテカルロ・シミュレーションにより算出した 1 日 1 回 200 mg 投与における血中フルコナゾール濃度-時間曲線下面積の中央値 (95 パーセント点, 5 パーセント点) は、300 (119, 913) $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$ であった。本研究により得られた情報は集中治療患者における深在性真菌症治療の個別化に有用と考えられる。

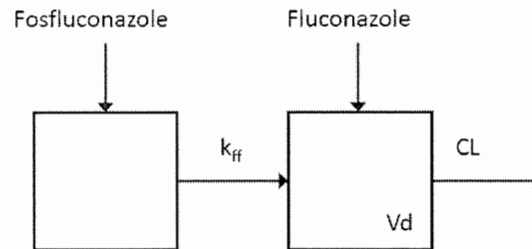


Fig. 1. Pharmacokinetic model after administration of fosfluconazole or fluconazole. k_{ff} , CL and Vd represent first-order rate constant of the biotransformation of fosfluconazole into fluconazole, total clearance and volume of distribution, respectively.

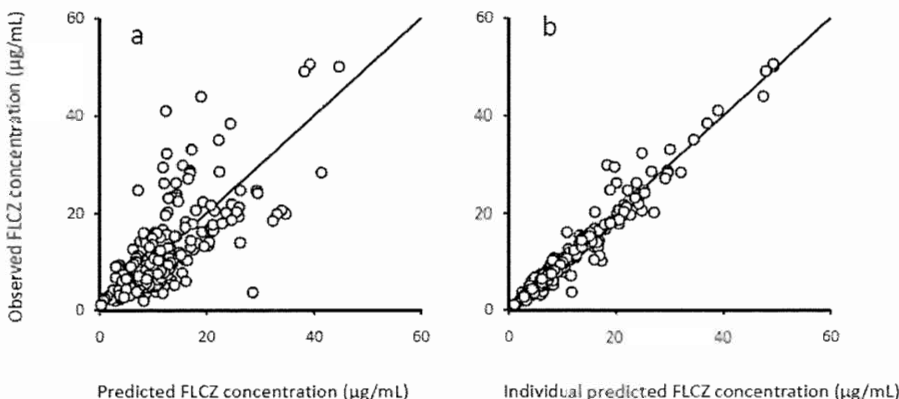


Fig. 2 Observed vs. (a) population predicted and (b) individual predicted FLCZ concentration.

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 1 日

日本大学 総長 殿

氏 名 根本晋一



所属・資格 通信教育部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	契約法と損害賠償法の現状と課題に関する研究	
3 研究の目的	<p>債権法の一領域である契約法を支配する基本原理の一つに、“契約自由の原則”がある。契約自由の原則とは、契約締結の自由・当事者選択の自由・内容方式の自由を意味し、物権法における物権法定主義と対比して説明される法原則である。この原則が承認されている故に、契約当事者は、民法典所定の典型以外の無名契約を、自由に締結できるのである。申請者は、最近における法学界や実務界において注目されており、理論的な深化を遂げつつある、医療契約・企業統合契約・流動資産担保権設定契約などをはじめとする、新しい契約類型を素材として考察を加える。</p> <p>また、契約内容の実現に際し、契約当事者が円満に協力をなし、債務の本旨に従う内容の履行がなされた場合には（本旨弁済）、当事者間における債権債務は消滅し、契約は目的を達成して消滅する。しかし、契約当事者間において円満な協力が得られず、本旨弁済がなされない場合には、契約不履行、つまり債務不履行になるので（民法第415条）、当事者間における債権債務は消滅することなく、本来履行すべき内容が損害賠償債務に転化する形で存続することになる。また、債務不履行の効果としては、既往のような損害賠償債務への転化のみならず、契約解除権の発生などの（民法第541条、543条）、付随的な効果をも発生する。そして、契約類型が多様化していることも相俟って、契約類型ごとに、損害賠償債務の内容・解除権の発生要件などの効果も多様化する様相をみせている。申請者は、かような多様化の様相について考察を加える。また、多く事例において、債務不履行に基づく損害賠償請求権を行使する場合には、同時に不法行為に基づく損害賠償請求権の行使要件をも充足するので、こちらについても考察を加える。</p> <p>さらに、既往の研究の背景に位置する法学全体、および、わが国の最高法規である憲法についても、民法の研究に必要な限度において考察を加える。</p> <p>※ 医療については医療過誤訴訟全体、即ち民事事件のみならず刑事事件をも含む趣旨である。 ※ 不法行為に基づく損害賠償請求については、国家賠償請求をも含む趣旨である。</p>	
4 研究の概要	申請者は、新たな契約類型をめぐる裁判例の分析を中心として、それより抽出される判例理論や学説を渉猟・整理・検討する。そのための手法として、先行業績に関する、国内外の文献の購入や、文献の渉猟・整理を、容易化・能率化するための備品の購入などを考えている。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

※ホームページ等での公開の（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：通信教育部

氏名：根本 晋 一

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

【学術論文】

- 1 患者が転倒による割箸刺入に起因する頭蓋内損傷により死亡した症例につき、医師が患者の頭蓋内に遺残していた割箸片を看過した過失を否定した事例（前編）
 一杏林大学病院頭蓋内割箸片看過男児死亡事件（綿飴割箸事件）に関する請求棄却判決の評価—
 （東地民28判平成20年2月12日・控訴・判例集未掲載）
 横浜国際経済法学（横浜国立大学法科大学院紀要）第17巻第2号（2009年1月）
 所収論文・既刊
- 2 国の行為に起因する国民の健康被害救済制度の研究
 一予防接種禍事故をめぐる損害賠償と損失補償の間隙に関する諸問題—
 日本大学歯学部紀要第36号所収論文・既刊
- 3 患者が転倒による割箸刺入に起因する頭蓋内損傷により死亡した症例につき、医師が患者の頭蓋内に遺残していた割箸片を看過した過失を否定した事例（後編）
 一杏林大学病院頭蓋内割箸片看過男児死亡事件（綿飴割箸事件）に関する請求棄却判決の評価—
 （東地民28判平成20年2月12日・控訴・判例集未掲載）
 横浜国際経済法学（横浜国立大学法科大学院紀要）第17巻第3号
 久留島隆先生・三邊夏雄先生・森川俊孝先生退官記念号（2009年3月）所収論文・既刊
- 4 医事紛争解決手段の研究
 一医療事故における事案の解明と補償・賠償のスキームに関する一考察—
 企業法学（企業法学会 学会誌）第11巻（商事法務研究会） 所収論文（2009年3月）・既刊

【著書】

- 1 後藤光男（早大教授）編著・根本晋一共著「人権保障と行政救済法」所収論文
 「損害賠償制度と損失補償制度の間隙と国の責任 一予防接種禍の救済方法に関する法律構成の検討—」成文堂・2009年9月刊行予定
- 2 山川一陽（日本大学法学部教授・弁護士）編著・根本晋一共著「財産法概説」所収
 「第14章 損害賠償制度」学陽書房・2010年3月刊行予定

【学会報告等】

- 1 医師が患者の頭蓋内に遺残していた割箸片を看過した過失を否定した事例
 一杏林大学病院頭蓋内割箸片看過男児死亡事件（綿飴割箸事件）に関する請求棄却判決の評価—
 企業法学会第32回定時総会・研究報告会個別報告
 於 キャンパスイノベーションセンター山形大学東京サテライト・2008年7月

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 20 日

日本大学 総長 殿

氏 名 古賀 徹



所属・資格 通信教育部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	戦後教育改革（刷新）構想に関する審議会議事録の分析	
3 研究の目的	<p>1980年代後半以降に“戦後教育の見直し”という方向で進められてきた現在の教育改革は「第3の教育改革」と称されることもある。本研究では、この“教育改革”における議論・審議過程に注目し、改革・改正あるいは新たなシステムが施行されるまでに通過する手続きを明らかにしようとするものである。そのため、「第3の教育改革」において改正される対象となる「第2の教育改革」（＝「戦後教育刷新」）を比較の対象として設定し考察を行う。もちろん「改革」された後の施行されていく中で周囲の条件の変化もあり、制度に改正が求められていくのであるが、「改革過程」そのものを比較の対象とすることで、はじめて現在の改革の進む方向性や課題もみえてくる。戦後教育刷新委員会および戦後教育刷新審議会の議事録・関係資料の分析・整理を行い、同時に収集資料の目録化も行うことで、学界における後の研究進展に貢献できるように考えている。</p>	
4 研究の概要	<p>戦後の教育刷新期（新教育のスタート期）における改革の議論・審議過程を明らかにすることにより、現在推進される教育改革の手順（手続き過程）と比較しうる指標を得ることができる。当時（戦後刷新期）は被占領下ではあったものの、その独自性と建言を認められた日本側の委員会（教育刷新委員会）による初めての（自前の）大改革であったという一面をもっている。皮肉にも1980年代以降、「戦後は終わった」等のキャッチフレーズにみられる保守化傾向が強まり、その立場から「戦後の改革は占領側（米国）に押し付けられたもの」であったとみなされ、「私たち日本人自らが自国にあった教育をつくりあげるべき」と語られ、その流れにおいて改革が進められつつある。そういった事実面を実際の（当時の）議論から明らかにすることと、そういった「改革のために“語られること”」自体の意味を明らかにすることが（本研究により）可能となる。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

※ホームページ等での公開の 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： 通信教育部

氏名： 古賀 徹

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究では、現在の「教育改革」をより多角的視点から考察するために、戦後の「教育改革」の過程、および議論を分析・整理するという作業を行った。

教育（教育制度）はこれまでも常に小さい修正を経て発展し、保持されてきた。それは国家レベルのみではない。例えば、自治体レベルでも、特色ある教育内容の設定や人材の採用・加配、教員の研修、地域教育事業の実践等が行われてきている。また各学校現場レベルでも、教員集団による教育（授業）に関する修正、改善の試みが積み重ねられてきている。

そもそも学校教育の現場は「変化」の連続である。個人の発達のためや文化・技術伝承の営みであり、また社会形成者を育成するという目的を「教育」はもっているが、「個人」の差異や、「発達」等の違い、地域性、文化・伝統・慣習の違い等、「様々な違い」が前提としてある以上、学校という教育が行われる場（社会）もつねに「変化」し続ける空間であるといえる。その本質性としてもつ「変化」に対応するという意味において、直接に対応する教師たちはつねに「小さな修正を積み重ねている」ということもできよう。そういった「教育実践」の献身によって、日本の（世界の）教育は支えられ、発展し、保持されてきたのである。この個人の実践、教授法や教育に関する考え方等についても、「個人」の活動を対象に追跡取材された研究の成果が公表されつつある（例えば、大村はまの教育論等）。

しかし、この「小さな修正の積み重ね」と、国家レベルでの「教育改革」とでは、意味が大きく異なる。現場での実践からでてきた問題点や意見に対応して、国家レベルでの教育制度の改正につながっていくことももちろんあり、「新しい時代に必要な改革」として実施・実現され、実際に教育現場に（時間がかかっても）貢献できることももちろんあり得る。しかし、「小さな修正の積み重ね」が実際の問題への対応、つまり個別のケースへ対応（個人への対応）という「柔軟性」をもつものとするなら、国家レベルで施行される「教育改革」は「新しい制度」「新しい規制」でもあり、これは「個人への対応」というよりは「全体性」の維持（全体の方向性を指示）を示すという点で大きく異なる。学校での活動に「教育内容」「学校での指導」「学校運営（事務的作業を含む）」「諸活動」と「時間」という“限定”があるところへ、大きな改革（改正）という「新たな規制」が（全体性の意図をもって）加えられるとき、それにより「個別の生徒への対応」という「小さな修正の積み重ね」が制限されることのないよう注意をするべきと考えている。

国家レベルでの「教育改革」とはそれだけ大きな意味をもつ。現在進められている教育改革が「第3の教育改革」と表現され、まだ“3回目でしかない”ということも、その重要性や慎重を期すべきものであることをあらわしている。「第1の教育改革」とされるのは明治維新期の「近代学校教育制度の創設」期のことである。「第2の教育改革」とは戦後の教育刷新期のことである。第3期が1980年代後半以降から現在までを含んでいる。たしかに明治初期（1970年代後半）から戦後（1940年代）までで60年間、戦後の再スタート期から現在でも「60年以上」が経過しており、80年代から「もはや戦後ではない」等のスローガンのもと「制度の変化」を求める声が出てきたことも（時間的な流れとして）理解することはできる。また、80年代においては、米国（レーガン政権）、英国（サッチャー政権）等が中心となり、世界中で行政改革や教育改革が進められた時期でもある（他にもフランス、ドイツ、ソ連等）。グローバル化や高度情報化が急速に進展するなかで新たな市場経済主義（の導入）による規制緩和やグローバル基準への対応が求められるということもあった。それらを背景にして、日本でも「新しい時代にそくして教育を改正・改革するべきだ」という意見が高まり、それが教育改革の原動力になったのである。

問題は、この教育改革の原動力となる意見が、「小さな修正の積み重ね」を行う教師や学校現場たちを含む、国民的コンセンサスと共通するものであるかという点である。また、その改革が実施された際に問題が発生すると予測される点について、より客観的に考察していく必要がある。そのために「第2の教育改革」期の議論と展開を比較の対象として設定した（第1の時期は新制度を諸外国から移入する形態であったため、「批判」と「乗り越え」を含む議論が行われた戦後改革期を選択した）。

戦後の教育刷新期（新教育のスタート期）における改革の議論・審議過程の特色は、被占領下ではあったものの、その独自性と建言を認められていたという点にある。教育刷新委員会の設置目的（法規）には同委員会が“諮問への答申”と“独自の調査・検討”を行えることが明記されており、また当時なんらかの諮問を受けた記録はない。もちろん占領統治され、占領側との連携のもと推進されたという「状況」による影響は否めないが、基本的には初めての（自前の）大改革であったという一面をもっている。皮肉にも1980年代以降、「戦後は終わった」等のキャッチフレーズにみられる保守化傾向が強まり、その立場から「戦後の改革は占領側（米国）に押し付けられたもの」であったとみなされ、「私たち日本人自らが自国にあった教育をつくりあげるべき」と語られ、その流れにおいて改革が進められつつある。そういった事実面を実際の（当時の）議論から明らかにすることと、そういった「改革のために“語られること”」自体の意味を明らかにすることも本研究を進めることで可能となってくる。

部科校名： 通信教育部

氏名： 古賀 徹

研究の結果（つづき）

本研究では、この戦後教育改革期の議論をリードする場となった教育刷新委員会・教育刷新審議会（1946～1952年）の議事録を基礎資料として用いて、その議事録・資料の分析・整理作業を行った。この審議内容全般を扱った唯一の先行研究（参考文献）が『教育刷新委員会／教育刷新審議会会議録』（全13巻）である。ただし同著は資料集として編纂されたものであり、解題以外には独自の論考・指摘はなく、また「資料」も議事録稿本にあたって活字化しているという点が特色であるが、対応する法案整備関係（国会や他の審議会）については収録されていない。また、総会議事録の一部やステアリング・コミッティの資料でまだ未掲載のものもあるという限界がある。筆者は、同資料集編纂にも関わっていたが、同資料集以上に当時の資料を網羅し、まとめられたものはないと実感しているし、それでも未だ未整備の部分があるのを痛感している。その未整備部分を埋め、未収集資料の収集と整理を進め、それらの分析を進めることで、“戦後教育そのものの理解”をも深めていけるという点で学界に寄与できるのではないかと考え、本研究を進めてきた。

教育刷新委員会（審議会）の議事録の多くについて原文（資料）と対校させ、その内容を確認し、目録状に入力し整理を進めることができた。また、とくに議論をリードした人物として南原繁等の数人をピックアップし、その人物の立場や思想等を整理し、実際の「教育改革」として実現されたものへの影響について考察をすすめてきた。

また、各種審議会（総会、特別委員会、連絡委員会ら）の期日、開催場所、時間、出席委員等のデータベース化を行ってきた。各委員の当時の職掌や背景についてもほぼ把握し整理している。今後は議論をリードした人物の会議内における発言と、各審議会間での役割に注目して分析を進めていきたい。

目録化した資料は膨大な量となり、今後キーワードや入力項目を整理することにより様々な考察が可能になると考えている。なお、データを整理したのちに（平成21年度内に）、論文としてまとめ、これまでの考察の成果を公表していくつもりである。

ただし、在米資料については、時間的限界もあり、その収集についてはまだ不十分な点が残されている。当時の「改革」の背景を理解するためにも、また批判論的に語られる「占領の影響」について明らかにするためにも、この在米資料（英文資料）に基づく考察を欠くことはできない。この点については継続的研究テーマとしてとりこんでいきたい。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 3月 10日

日本大学 総長 殿

氏 名 菅澤 喜男



所属・資格 グローバル・ビジネス研究科 教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input type="radio"/> 一般研究(個人研究)	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	米国 NPO 法人 SCIP 組織と研究成果普及活動に関する調査研究	
3 研究の目的	<p>日本では未だ不毛の専門領域と言われているインテリジェンス関連領域に関して、特に米国におけるコンペティティブ・インテリジェンス（以降CIと記す）は、その研究動向およびビジネスマンに対する実践的な教育につき歴史と実績を有している。本研究では、米国の NPO 法人である SCIP (Society of Competitive Intelligence Professionals) 組織および研究普及のための年次大会、そしてビジネスマンのインテリジェンス教育について行うものである。</p> <p>平成20年4月に米国・サンディエゴ市において開催された SCIP 年次大会に出席し、同大会における講演発表の様子そして企業のインテリジェンス研究成果発表につき調査研究を実施した。</p>	
4 研究の概要	<p>平成20年4月13日より17日まで米国・サンディエゴ市において開催された SCIP の年次大会に参加し、講演発表および企業で実践された研究成果発表会に参加をした。発表の内容は、具体的かつ実践的なものであり、大会を通じて約600名の会員が登録参加をした。SCIPの大会運営方法は、基本的には企業のインテリジェンス部門が必要なセッションを設け自由に聴講者を集める方法である。また、有料のセミナーは、コンサルタント系企業あるいは独立したコンサルタントが独自の集客方法で集めているようである。ここにも、インテリジェンスはビジネス活動の基本であることが生かされていることは、日本の学会運営では見られない方法である。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

※ホームページ等での公開の 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:グローバル・ビジネス研究科

氏名:菅澤 喜男

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

平成20年4月13日より17日まで米国・サンディエゴ市において開催されたNPO法人としての法人格を有するSCIPの年次大会に参加した。学会運営の基本は、具体的かつ実践的な内容をビジネスマンに教授する狙いがある。

参加人数は、SCIPの会長によれば約600名であり、他にExhibitionとしてインテリジェンス調査企業およびインテリジェンス・ソフトウェアを中心とした23社の参加があった。

特別講演者は、急遽、入れ替わりMicrotrendの共著者であるE.Kinney Zalense女史が勤め、会場には300名近くの聴衆が集まっていたようである。

年次大会開催のプログラム:

4月13日

4:00 PM-6:00PM Registration

4月14日

7:00AM-5:00PM Registration

7:00AM-8:00AM Continental Breakfast for Workshop Participants

8:00AM-5:00PM Full day Conference Workshops

8:00AM-12:00PM Morning Half-day Pre-Conference Workshops

12:00PM-1:00PM Lunch for Workshop Participants

1:00PM-5:00PM Afternoon Hal-day Pre-Conference Workshops

4月15日

7:00AM-5:00PM Registration

7:00AM-8:00AM Continental Breakfast for Workshop Participants

8:00Am-12:00PM Full-Day Conference Workshop

8:00Am-12:00PM Morning Hal-Day Pre-Conference Workshop

12:00PM-1:00PM Lunch for Workshop Participants

1:00PM-5:00PM Afternoon Hal-Day Pre Conference Workshops

5:00PM-5:30PM Welcome to CI Community

5:30PM-6:30PM Opening Reception in the Exhibit Hall

6:30PM-8:30PM Exhibit Hall Remains Open

6:30PM-7:30PM Networking Sessions in Exhibit Hall

4月16日

7:00AM-5:00PM Registration

7:00AM-8:00Am Continental Breakfast for Attendees

9:30AM-5:00PM Exhibit Hall Open

8:00AM-9:30AM General Session

9:30AM-10:30AM Refreshment Break in Exhibit Hall & Book Signing

10:30AM-11:30AM Session

11:30AM-1:00PM Lunch in Exhibit Hall, Women's Leadership Council Luncheon

1:00PM-2:00PM Sessions

2:00PM-2:30PM Exhibit Hall-Break

3:30PM-4:00PM Sessions

3:30PM-4:00PM Exhibit Hall-Refreshment Break

4:00PM-5:00PM Sessions

5:30PM-7:00PM Evening Networking Reception

部科校名：グローバル・ビジネス研究科

氏名：菅澤 喜男

研究の結果（つづき）

4月17日

7:00AM-4:00PM Registration
8:00AM-9:30AM Award Breakfast
9:30AM-4:00PM Exhibit Hall Open
9:30AM-9:45AM Exhibit Hall Break
9:45AM-10:45AM Sessions
10:45AM-11:00AM Refreshment Break
11:00AM-12:00PM Sessions
12:00PM-1:30PM Lunch in Exhibit Hall
1:30PM-2:30PM Sessions
2:30PM-2:45PM Refreshment Break
2:45PM-3:45PM Sessions
3:45PM-4:00PM Refreshment Break
4:00PM-5:00PM Sessions

かなり綿密に組まれたプログラムであり、特別講演はその年で話題となった書籍あるいはニュース提供者を中心に選出しているとのことであった。

本調査研究の結果としては、大学などがリードする学会では無く、基本的な運営主体は企業主体であったことが最も優れた点であったと考える。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 5 月 21 日

日本大学 総長 殿

氏 名 竹 野 一 雄



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。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <input type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	C. S. ルイス研究の動向調査及びルイスの書簡の予備的研究	
3 研究の目的	<p>①C. S. ルイスは20世紀の秀逸なファンタジー作家であると同時に偉大なキリスト教弁証家であり、その甚大な影響はルイスの活躍した1930年代から1960年代初期はもとより、逝去して久しい今日においても世界各地に及んでいる。ルイスは多彩であり、その才能は多分野で開花したがゆえに、ルイスの著作は数多く出版されて版を重ねており、ルイス関連研究書の出版もとぎれることがない。</p> <p>本研究の目的は、ルイスの著作のキャノンが確定されていない状況下、C. S. ルイスの著作の再確認とルイス関連の研究文献を調査し、研究の現況を掌握し、併せて、作家としてのルイスと弁証家としてのルイスを形成した要因をルイスの膨大な書簡を通して検証する本格的研究に向けての準備を整えることにある。この二重の目的を達成するため、ルイス研究の世界的中心地であるイリノイ州ウィートン・カレッジ内にあるマリオン・E・ウェイド・センター所蔵の豊富な資料を活用したい。</p> <p>②我が国におけるルイス研究は1950年代半頃から始まり、それに伴うかのように1950年代後半から邦訳も現れるようになった。欧米におけるルイス関連文献と日本におけるルイス関連文献については『C. S. ルイス文学案内事典』（彩流社、1998）巻末において1998年までの資料を共同で踏査し掲載した。</p> <p>本研究の意義は、『ナルニア国物語』の映画化によってルイスに関心をよせる研究者も増えつつある今日、ルイス研究のこの10年の有り様を検証し、併せてルイスの書簡の予備的研究を行うことによって、我が国のルイス研究者に対し多様な研究の方向性を提供し、現在の、そして未来の我が国のルイス研究の深化進展に多少なりとも寄与することにある。</p>	
4 研究の概要	イリノイ州ウィートン・カレッジ内にあるマリオン・E・ウェイド・センターを訪れ、センター所蔵の豊富な資料を閲覧し、ルイスの著作の確認、ルイス関連研究書ならびに博士論文のリスト作成を行う。時間的ならびに経済的制約があるが、最新のルイス関連研究書については可能な限り現地で購入し、ルイス関連の博士論文については少なくともアブストラクトに目を通し、その他、多種多様な資料収集を図る	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

部科校名：大学院総合社会情報研究科

氏名： 竹野一雄

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

C. S. ルイス研究の動向については、ルイス研究の世界的中心地であるシカゴ郊外のウィートン・カレッジ校内にあるマリオン・E・ウィエド・センター所蔵の豊富な資料を閲覧することができた。その結果、ルイス研究の動向としては、ルイスのキリスト教信仰と想像力の織りなす芸術的達成の成果の検証とキリスト教弁証家としてのルイスに関する研究が持続的になされていることが確認できた。

ルイスの書簡についても短期間ではあったが、いくつか気になっていたオリジナルの書簡を閲覧できた。それとともに大部の三巻本のルイスの書簡集の現物を帰国後に入手したが、これらの書簡集が出版される前に出た数冊の書簡集（*They Stand Together*, *Letters to an American Lady*, *Letters to Children*, *Letters: C. S. Lewis, LETTERS C>S> LEWIS DON GIOVANNI CALABRIA*）などの価値がかえって高まったとの判断に至った。なぜなら、三巻本以前に編まれたこれらの書簡集は、ある特定の友人、知人、子どもたちへの手紙であったルイスの生涯において重要な出来事を収録したもので、ルイスの思想遍歴や人となりを知るのに最適であると考えられるからである。

なお、今年度中に、聖学院大学大学院総合研究所の紀要に研究成果の一端として論文が掲載される予定。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 3月 31日

日本大学 総長 殿

氏 名 茂呂 周



所属・資格 総合科学研究科・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	Double strand RNA 刺激による innate immunity の誘導	
3 研究の目的	本研究は RNA ウイルスの増殖の副産物である double-stranded RNA (dsRNA) 刺激が腸管上皮細胞に作用して innate immunity の担い手としての human β -defensin 2 (hBD-2) の産生を促進するか否かについて検索するものである。発現増強が認められたならば、dsRNA のレセプターとして知られる Toll-like receptor 3 (TLR3) 等が hBD-2 の誘導にどのように関与しているかを検索し、さらにレセプターの下流でいかなるシグナル伝達系が活性化されているのかという点についても検索する。	
4 研究の概要	HT-29 細胞を通法に従って培養する。実験に供する細胞は dsRNA 刺激 1 日前に新たに培養皿に撒き培養する。細胞が培養皿に付着していることを確認後、dsRNA を段階的に 1, 10, 100, 1000 μ g/ml の濃度に分けて HT-29 細胞に作用させる。同時に dsRNA での刺激時間を 3, 6, 12, 24 時間として培養する。培養後の細胞から total RNA を QIAGEN 社製の RNA extraction kit を用いて精製し、定量後 cDNA の合成を行い RT-PCR により dsRNA の産生の有無について検索する。一方、HT-29 における TLR の発現についても同様の方法で検索を行う。この実験で human defensin の発現が確認されたならば、刺激に用いる dsRNA の至適濃度と至適作用時間を決定し、以後の実験の条件を設定する。至適条件の決定後、dsRNA のシグナル伝達経路に関して検索する。すなわち、dsRNA のレセプターと考えられている TLR3 の発現を減弱させたときの dsRNA 刺激に対する human defensin の発現の変化について検討する。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

部科校名：総合科学研究科

氏名：茂呂 周

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究の結果、dsRNA を HT-29 に作用させることにより hBD-2 の産生を起こさせることが出来た。

この induction 効果は濃度および時間依存性であり、それぞれ 100 $\mu\text{g/ml}$ および 3～5 時間にピークを認めた。

次に、dsRNA 刺激が HT-29 細胞によりどのように検知されるかという点について検索した。dsRNA のレセプターとしては TLR3 が知られており、またこれまでの研究から HT-29 が TLR3 を発現していることが明らかになっていることから、TLR3 の関与について検討した。TLR3 に対する特異的抗体による HT-29 の前処理を行ったところ dsRNA による hBD-2 の発現は大幅に抑制された。また TLR3 に対する small inhibitory RNA (siRNA) を transfection することにより、dsRNA 依存性の hBD-2 産生が抑制された。以上の結果は、dsRNA 刺激は HT-29 の発現する TLR3 により認識されていることを示すものであった。

更に TLR3 の下流でいかなるシグナル伝達系が働いているかということに関して検索した。HT-29 に予め luciferase assay のレポーター-plasmid を transfection し、48 時間後に dsRNA 存在下、非存在下で培養し、luciferase 活性を測定した。その結果、dsRNA 存在下で約 1.8 倍の増強が認められた。この結果は、TLR3 の下流で NF- κ B family がシグナル伝達に関与していることを示唆するものであった。そこで、この結果を確認する目的で、同様に刺激を行った HT-29 から核抽出液を精製し、核移行の見られる NF- κ B family について Clontech 社製の TransFactor kit により検索した。その結果、p65 および p50 において優位に核移行の増加が認められ、これら 2 つの分子による heterodimer がシグナル伝達に主体的に関与していることが明らかとなった。

以上の結果から、dsRNA 刺激は HT-29 において hBD-2 の産生を誘導することが解った。またこの反応は HT-29 の有する TLR3 により感知され、NF- κ B family の p65/p50 の heterodimer の核移行を惹起することにより伝達されることが明らかとなった。今後更に p65/p50 のリン酸化の変化やこのリン酸化を司る IKK 分子の挙動などについて検索していきたいと考えている。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 4月 13日

日本大学 総長 殿

氏 名 野呂 知加子



所属・資格 生産工学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究 / <input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人) / 一般研究(共同) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	ヤマトヒメミズ再生・生殖系を活用した環境バイオセンサーシステム開発	
3 研究の目的	本研究は、ヤマトヒメミズ <i>Enchytraeus japonensis</i> の再生・生殖系を用いて、様々な環境ストレスに対する個体レベルの環境バイオセンサーシステムを構築することを目的とする。環境感受性が高いことが想定される再生・生殖系に関わる反応の分子メカニズムを解明し、それらの分子群の発現変化を指標とした環境ストレスモニタリング法を開発する。具体的には、環境化学物質や酸化物質、微量元素、温度等に対する環境ストレス応答を、蛍光タンパク質発現などによりイメージング検出できる遺伝子導入個体（光る環境バイオセンサーミズ）を作り、環境ストレスのスクリーニング系として活用することを目標とする。（図1）	
4 研究の概要	近年世界中に様々な合成化学物質があふれ、それに伴い、生態系や人体への影響が深刻である。たとえば環境ホルモン、ホルマリンなどの化学物質や種々のアレルギー誘発物質、食物や飲料水に含まれる有害元素などは、微量であっても人体に重大な影響を及ぼす。こうした環境化学物質の生物への影響について、そのメカニズムの詳細はまだ明らかになっていない。本研究で使用するヤマトヒメミズは碎片分離と再生による無性生殖を行う環形動物である（図2）。体長は1cmほどで透明な体を持ち、実験室のシャーレ中の寒天上で飼育できる。このミズの無性生殖子孫は皆遺伝的に同一のクローンであるので、環境化学物質の個体検定系として最適である。また、飼育条件によっては有性生殖も誘導できるので、発生工学的遺伝子操作も可能である。本研究では、ヤマトヒメミズの無性（再生）および有性生殖の2つのライフサイクルを実験系として使い分け、様々な環境ストレスに対する個体レベルでの反応分子解析システムを開発するための基礎研究を行い、このシステムを応用したバイオセンサー開発について検討した。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

※ホームページ等での公開の (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： 野呂知加子

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

ヤマトヒメミミズの再生・生殖系を用いた環境応答分子解析システムの確立をめざして、環境化学物質のうち、重金属および環境ホルモンを例として、再生に与える影響について試験を行った。

実験1： [方法] ヤマトヒメミミズをメスで切断するか、もしくは電気刺激によって体を断片化する。3-4時間寒天培地上に置き傷口の修復を待ってから、96穴の1穴毎に1断片を入れた。各穴に緩衝液を入れ、試験用化合物の種類と濃度を変えて添加した。再生は25℃では4日ほどで終了するので、その過程を観察し、化合物による影響を検討した。効果の見られた化合物については再生・発生のマーカー遺伝子の発現に影響があるかどうか、RT-PCRを用いて調べた。[結果] 各物質各濃度について10穴試験して平均的な結果を記載した。硝酸鉛 ($8.85\text{-}0.278\times 10^{-6}\text{M}$) または塩化亜鉛 ($15.3\text{-}0.477\times 10^{-6}\text{M}$) を添加した場合について、これまでに知られている正常再生過程と比較した形態変化についてまず観察した。硝酸鉛、塩化亜鉛を与えた環境下では、再生を完了するのに187時間およそ8日間と、通常より倍の時間がかかった。また、硝酸鉛、塩化亜鉛ともに全ての濃度で断片から再生し1個体となったが、濃度が上がるにつれて再生する数は減った。再生しない状態とは、1個体になる前に死亡してしまうか、生きてはいるがほとんど形をとどめていない状態である。これらの物質添加により、切断後から再生芽が成されるまでの時間は通常と変わらないが、次の段階である頭部の形成が遅延することが分かった。形状態形態変化が観察された個体について、再生に関わる遺伝子の発現変化を調べている。(図3)

実験2.: メタロチオネイン遺伝子等重金属反応遺伝子の上流プロモーターとGFPのマーカー遺伝子を連結してヤマトヒメミミズ卵に導入し、重金属に反応すると光る遺伝子組換え個体を作成する。その前段階としてベクター設計と手技を確立するための予備実験を行った。また卵を採取するための有性化誘導について、より効率的な方法を探索試験した。従来法では飼育密度を下げるにより卵が得られることがわかっているが、栄養状態など、他の条件について検討した。

実験3： 環境ホルモンとして知られている化学物質が、ヤマトヒメミミズの再生および生殖系に与える影響について検討した。実験方法は実験1と同様であるが、試験に用いた環境ホルモンはBisphenolA、Octylphenol、Nonylphenolで、濃度はBisphenolA $2.19\text{-}8.76\mu\text{M}$ 、Octylphenol $2.42\text{-}9.69\mu\text{M}$ である。メダカや鯉の環境ホルモンに対する影響試験は $5.25\mu\text{M}$ 前後で行っているため、それを基準に濃度を決定した。また、BisphenolA、Octylphenolは脂溶性であり両極性溶媒であるDMSOに溶かして添加したので、controlとしてはDMSOのみ添加を用いて比較検討した。[結果]顕微鏡で形態観察を行ったところ、1日目に再生芽が形成されて2日目再生芽が伸長するまでは大きな影響はなかったが、3日目から影響が見られ、Octylphenol添加の方がBisphenolA添加に比べて、再生芽の伸びが悪かった。またどちらの物質も効果は濃度依存的であり、濃度が高い方が再生芽の伸びが悪く、全身状態も悪くなる例も見られた。形態変化が観察された個体について、再生に関わる遺伝子の発現変化を調べている。

これらの結果を踏まえ、このシステムを応用したバイオセンサー開発の試験的検討を行っている。

部科校名： 生産工学部

氏名： 野呂知加子

研究の結果 (つづき)

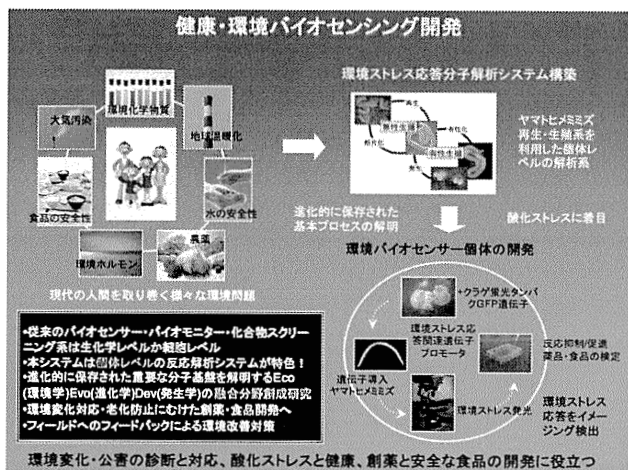


図1 環境バイオセンサー開発全体構想

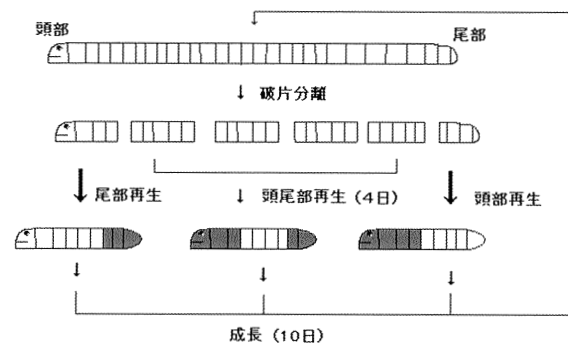


図2 ヤマトヒメミミズの無性生殖

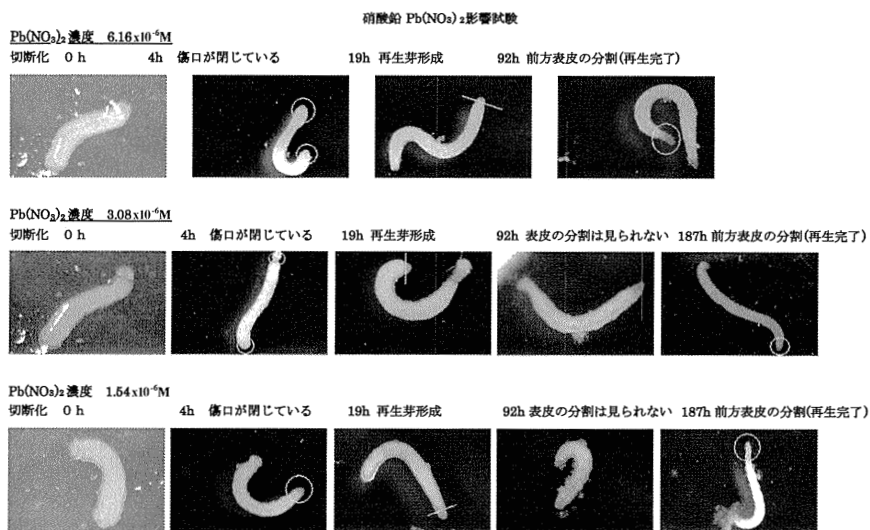


図3 実験結果の例 硝酸鉛添加の再生に対する効果

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 30日

日本大学 総長 殿

氏 名 佐藤 睦 浩



所属・資格 東北高校・教諭

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/ <input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人)/一般研究(共同)/総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	IT を利用した高校物理の能動的授業実践に関する研究	
3 研究の目的	学校教育において、児童生徒の理科離れが問題になっている。私たち高校教員にとって、高校の現場での授業や課外活動などで、科学に対する生徒の興味関心喚起し、科学的な考え方や知識を身につけさせたりする、科学リテラシー教育は大変重要である。その方法として、ITを利用した教材を利用した授業形態の研究や授業実践は、前述の理科離れの防止や科学教育に役立つものと考えられる。	
4 研究の概要	(1)ITを利用し、いろいろな科学的認識を持った生徒を前提にした、生徒が能動的に学習 (Active Learnig) できる授業研究及び実践 (2) Matematica ver.6を用いた物理分野の授業研究及び実践	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)		

※ホームページ等での公開の 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：東北高校

氏名：佐藤睦浩

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

研究の概要

(1) 「Active Learning」を授業で活用するための、情報収集および予備実験を行った。生徒のリアルタイムの反応を見るための工夫や、授業の定着度を数値で表すための方法を確認した。今年度（20年度）は、実際の授業では行えなかったが、今年度の調査を利用し、次年度に授業で実践しようと考えている。

(2) Mathematica ver.6を用いた物理分野の授業研究及び実践

今年度の3年生を対象にした特別講座（2008.12～2009.1）で、理系生徒の希望者について、数式処理ソフト「Mathematica」を用いて授業を行った。授業形態は講義、演習、テーマ決定、テーマに沿った実習、発表という流れで行った。演習の内容に若干プログラミングの考え方も入れた。生徒の最終的なテーマの内容は、数理的な内容（陰関数のグラフ化など）が主であったが、高校の数学や物理を利用した発展的な内容の講座には大変興味を持って取り組んでいたようである。