

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 4年5月12日

日本大学学長 殿

氏 名： 羽尾 裕之

所属・資格： 医学部・教授

実施研究所： 医学部・ 総合医学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

術中迅速病理診断における遺伝子変異・マーカー分子簡易検出技術の実用化に向けた研究

## 2 研究期間

令和 元 年度 ～ 令和 2 年度

※令和 元 年度 ～ 令和 3 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	羽尾 裕之	医学部・教授	研究の統括・論文執筆
研 究 分 担 者	橋本 伸哉	文理学部・教授	SATIC 法における検出法開発
	吉野 篤緒	医学部・教授	脳腫瘍症例の検体提供
	角 光一郎	医学部・助教	脳腫瘍症例の検体提供・解析
	浅野 正岳	歯学部・教授	口腔腫瘍症例の検体提供
	久山 佳代	松戸歯学部・教授	口腔腫瘍症例の検体提供
	末光 正昌	松戸歯学部・専任講師	口腔腫瘍症例の解析

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 70%】

#### 5 研究目的

Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SATIC)法により、迅速かつ簡便に病理組織切片上で遺伝子変異の同定やマーカー分子の発現を検出する。

- 1) これまで日本大学板橋病院・日本大学病院・日本大学歯学部附属歯科病院・日本大学松戸歯学部附属病院にて手術により採取・保管されている悪性リンパ腫や口腔内悪性腫瘍の病理組織検体を用いて、SATIC 法による既知の遺伝子変異やマーカー分子の発現の検出を試みる。
- 2) 多様な悪性度を示す脳腫瘍(神経膠腫)においては 1p19q 共欠失, isocitrate dehydrogenase 1/2 gene (*IDH1/2*), *TP53*, *ATRX*, *TERT*などの遺伝子変異が知られている。これらの遺伝子変異がすでに同定されている日本大学板橋病院・日本大学病院における過去の脳腫瘍の手術標本を用いて、SATIC 法での遺伝子変異の検出感度を検証する。
- 3) 以上の検証を踏まえて、悪性リンパ腫・口腔内悪性腫瘍・脳腫瘍の術中迅速病理診断において、術中に提出された検体を用いて SATIC 法にて遺伝子変異やマーカー分子の検出を行う。

#### 6 研究概要

手術中に行われる術中迅速病理診断(医学部・羽尾 本間, 歯学部・浅野, 松戸歯学部・久山 末光)は、手術によって採取された検体から 10~20 分程度の時間内で凍結組織切片を作製し、形態学的な所見から診断を行うものである。脳腫瘍など手術前に生検が困難な症例においては、迅速病理診断によって悪性度の評価が行われ、術式決定の重要な情報となる(医学部・吉野)。しかし神経膠腫など一部の脳腫瘍は腫瘍の発生起源細胞や悪性度の判断が形態学のみでは困難であることが知られている。また悪性リンパ腫などの血液腫瘍や口腔内悪性腫瘍も術中迅速診断での形態学的評価に限界がある(医学部・相澤, 歯学部・浅野, 松戸歯学部・久山, 末光)。さらに迅速診断で作製される凍結組織切片は通常ホルマリン固定パラフィン包埋切片と比較し、標本の品質の低下が不可避である。そのため、時として診断に苦慮する症例も経験される。病理診断の精度の向上には従来の形態学的検索とともに、バイオマーカーの発現や遺伝子変異が重要な情報となる。しかし、これらの分子生物学的解析にはシーケンサーなどの高額で大型の機器が必要で、解析にも一定の時間がかかり、現在の技術では術中迅速診断という限られた時間内で結果を得ることは不可能である。

我々は、本学で研究・開発が進められている Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SATIC)法(文理学部・栗原、橋本、藤田)を術中迅速病理診断に応用すること

を考えた。SATIC 法は分析対象物と検出試薬を混ぜ等温下で放置するだけで標的となる分析対象物を蛍光発色によって検出が可能な測定系である。

この SATIC 法による標的分子の検出を病理診断に提出された検体に対して行い、検体中の遺伝子変異やマーカー分子の存在を同定する。SATIC 法の検出には大掛かりな機器や高額な試薬は不要であるため、本技術の開発によって装置化と術中迅速診断における普及が大いに期待できる。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

1. 本研究の推進にあたり、日本大学医学部「ヒトゲノム・遺伝子解析研究」審査申請を行った。本申請では対象疾患として以下の疾患と遺伝子を挙げた。審査により許可番号 275-0 として令和元年 7 月 24 日に許可された。承認された研究期間は当初、令和元年 7 月 24 日から令和 3 年 3 月 31 日までであったが、コロナ禍の特例措置申請により、研究期間の延長が認められ、令和 4 年 3 月 31 日までとなった。

脳腫瘍：diffuse astrocytoma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma, diffuse midline glioma, pilocytic astrocytoma

骨軟部腫瘍：giant cell tumor, nodular fasciitis, solitary fibrous tumor, low-grade fibromyxoid sarcoma, myxofibrosarcoma, liposarcoma

口腔内腫瘍：squamous cell carcinoma, leukoplakia,

唾液腺腫瘍：adenoid cystic carcinoma, mucoepidermoid carcinoma, acinar cell carcinoma

*H3F3A, IDH1R132H, BRAFV600E, H3K27M, telomeric associations, MYH9-USP6 fusion gene, NAB2-STAT6 fusion gene, FUS-CRE-B3L2 fusion gene, NF1, MDM2, CDK4, FUS-DDIT3 fusion gene, tp53, tp16, CDKN2A, PIK3CA, NOTHC1, FAT1, KRAS, EGFR*

また本申請に当たっては研究協力依頼書により文理学部 化学科 バイオ分析化学 栗原研究室、歯学部 口腔科学系 病理学分野研究室、松戸歯学部 病理学 研究室を共同研究施設として申請し承認された。

2. 研究目的(1) 悪性リンパ腫や口腔内悪性腫瘍の病理組織検体を用いて、SATIC 法による既知の遺伝子変異やマーカー分子の発現の検出を試みる。

口腔内悪性腫瘍において約半数で認められる p53 遺伝子変異について、SATIC 法での遺伝子変異の検出が可能かどうか、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS, Ca9-22, HSC4 を用いて変異の検出感度について検討している。これらの細胞株での結果を受けて、今後は動物モデルや共同研究施設である歯学部および松戸歯学部保存されている検体を用いて、SATIC 法での病理組織切片上での変異の検出の可能性を検討する。これらの検討結果により術中迅速診断の際に形態学的に反応性変化か腫瘍性変化か判定が困難な症例について、より精度の高い診断が可能となる。

3. 研究目的(2) 日本大学板橋病院・日本大学病院における過去の脳腫瘍の手術標本を用いて、SATIC 法での遺伝子変異の検出感度を検証する。

## 〔7 研究結果（つづき）〕

脳腫瘍において生じる遺伝子変異の検出の可能性について検討するため、ヒト由来脳腫瘍細胞株 T98G (p53 変異型), A172 (p53 野生型) を用いて、遺伝子シーケンスによる変異の確認を検討している。これらの細胞株を用いて、脳腫瘍細胞株においても SATIC 法で遺伝子変異の検出が可能かを今後文理学部と共同で研究を推進する。さらに、これらの細胞株での結果を受けて、今後は過去に採取され保存されている脳腫瘍検体 30 症例の腫瘍検体の一部から組織切片を作製し、免疫染色にて検出可能なものの遺伝子変異の有無について検討する。これらの染色結果を検証するため、保存検体から DNA を抽出して遺伝子シーケンスにて変異の確認を行う。これらのヒト検体から、組織切片上での SATIC 法による遺伝子変異の検出感度を検証する。

## 4. 骨軟部腫瘍における遺伝子変異の検出の可能性について

さらに今回、骨軟部腫瘍の遺伝子変異の検出として、骨巨細胞腫で高率に認められる遺伝子変異 H3F3A の SATIC 法による変異検出の可能性を検討する目的で、手術症例の選別とこれらの腫瘍の変異の有無について免疫染色でスクリーニングした。今後、さらに遺伝子シーケンスにて変異の確認を行ってから、SATIC 法での病理組織切片上での変異の検出の可能性について検討する。

## 5. 口腔細胞診検体における SATIC 法応用の可能性について

通常 SATIC 法では、抽出した核酸におけるターゲット遺伝子の検出をチューブ内で行う。一方、細胞診検体において SATIC 法が応用可能かは報告されていない。そこで、口腔細胞診検体にて SATIC 法が応用可能か否か検討することを目的とした。尚本研究は松戸歯学部倫理委員会にて承認を得ている (EC20-027 号)。細胞診において SATIC 法を行う上で重要なことは、細胞診検体に検出可能な状態の核酸が存在していることである。本研究では、DNA と比較してコピー数の多い mRNA を検出対象に考えている。現在、日本臨床細胞学会より「がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針\_20210604.pdf」が公開されており、細胞診検体における DNA の保存状態については詳細に検討された結果が公開されている。しかし RNA の細胞診検体における保存状態については不明な点が多い。そこで、細胞診検体における RNA の保存状態について検討を行った。検体は、研究同意のえられた対象者から通法に従いオーセレックス®ブラシ RT (BD 社) を用いて口腔粘膜細胞の擦過を行い採取した。採取した細胞は、速やかに各種細胞診固定液に浸漬固定した。細胞診固定液には、病理染色用溶剤エタノール 100 (武藤化学社) を用いて調整された 95% アルコール、ThinPrep 固定液 (ホロジック社)、SurePath 固定液 (BD)、TACAS GYN Vial25 (MBL 社)、LBC プレップ (武藤化学社) を用いた。細胞診検体固

## 〔7 研究結果（つづき）〕

定後、RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE（インビトロジェン社）を使用し totalRNA の抽出を行った。抽出した totalRNA は Qubit4.0(サーモフィッシャー社)を用いて濃度の計測と IQ 値の計測を行った。その後、一部のサンプルを用いて PrimeScript IV 1st strand cDNAsynthesis Mis を用いて cDNA を作製した。作製した cDNA を用いて qPCR を行った。qPCR は、TaqMan Fast Advanced Master Mix を用いた TaqMan assay と、Thunderbird SYBR qPCR MIX を用いた CYBR Green Assay を行った。TaqMan assay では、probe primer として GAPDH93bp と GAPDH157bp を使い、CYBR Green assay では、Forward primer に 5'-ACGTAGCTCAGGCCTCAAGA-3' Tm=64.0、Reverse primer に 5'-GCTGCGGGCTCAATTTATAG-3' Tm=63.4 を使用した（amplicon size: 113）。結果、totalRNA 濃度と IQ 値（カッコ内）は、95%アルコール：130 ng/uL（測定不能）、ThinPrep：49.2 ng/uL（8.0）、SurePath：130 ng/uL（8.5）、TACAS：48.8 ng/uL（6.2）LBC プレップ：130ng/uL（6.6）となった。

TaqMan assay（95%アルコール）では  $\Delta Ct$  値が、GAPDH93bp：28.394、GAPDH157bp：30.921 となった。CYBR Green assay（SurePath）では、37.807 となった。

一般的に細胞診に使用されているいずれの固定液においても totalRNA の抽出を行えることが確認できた。また IQ 値は高値を示すものもあった。IQ 値とは、smallRNA と largeRNA の比率により変動し、分解が進んだ RNA では低値を示し、高品質な RNA の場合には高値を示す（レンジ：0-10）。細胞診固定液において致命的な断片化は生じていないことが確認できた。また、核酸の検出についても、qPCR を用いた限りでは、細胞診検体においても少なくとも 157bp までの長さのものは検出可能であることが確認された。これらの結果から、SATIC 法が細胞診検体を用いた mRNA の検出に使用できる可能性が示唆された。

制限事項として、本研究では細胞診検体における RNA の保存状態にフォーカスした検証を行っているため、通常の実験で行われるコントロールを設けていない。今後、RNAlater 等を用いたコントロールを立て、細胞診検体における RNA 保存状態の詳細な検討も必要であると考えている。

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 4年 4月 12日

日本大学学長 殿

氏 名： 和田 平  
所属・資格： 薬学部・准教授  
実施研究所： 薬学部・薬学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

アディポネクチンによる体内時計制御機構の解明

## 2 研究期間

令和 元年度 ～ 令和 2年度

※令和 元年度 ～ 令和 3年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	和田 平	日本大学薬学部/准教授	統括、培養細胞実験 マウスの管理及び解析
研 究 分 担 者	内山武人	日本大学薬学部/教授	アディポロン及びその誘導体の合成・精製
	鈴木正泰	日本大学医学部/教授	ヒト血液の採取及び解析

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 100%】

#### 5 研究目的

我が国ではシフトワーカー及び長時間労働者の数が急増しており、これらの労働者の健康問題がクローズアップされている。シフトワークによる肥満、糖尿病などの代謝性疾患の発症メカニズムについては不明な点が多いが、体内時計の変調の関与が示唆されている。体内時計の変調が代謝性疾患の発症に関連していることが明らかにされているが、体内時計の変調による代謝性疾患の発症メカニズムの詳細は不明な点が多い。近年、臓器連関を媒介する液性因子として、脂肪細胞から分泌される”アディポネクチン”が注目を集めている。アディポネクチンはその受容体を介して、糖・脂質代謝促進作用のみならず、抗がん作用などの様々な機能を示す生理活性物質である。申請者は、初代肝細胞を用いた検討より、アディポネクチン受容体作動薬が時計遺伝子の発現量及び振幅を低下させることを見出した。このことは、アディポネクチンシグナルの活性化は肝細胞の体内時計を直接的に制御することを示している。そこで本研究は、体内時計の変調に起因した生活習慣病の発症メカニズムを、代謝調節因子であるアディポネクチンによる体内時計システム制御の観点から明らかにする。

#### 6 研究概要

本研究ではアディポネクチンを体内時計とエネルギー代謝とを結ぶ因子として捉え、アディポネクチンによる体内時計制御機構を明らかにするとともに、体内時計システムの変調に関連した疾患の予防及び治療法の開発のための科学的エビデンスを提供することを目指す。そのため、本研究期間内に以下のことを明らかにする。(1)アディポネクチンによる肝臓の体内時計制御機構を明らかにする。概日時計を同調させた初代肝細胞を用いて、アディポネクチンシグナルによる体内時計メカニズム機構の解析を行う。また、アディポネクチン受容体作動薬(アディポロン)に体内時計調節作用が認められたことから、種々のアディポロン誘導體ライブラリーを化学合成法により構築し、より高いアディポネクチンシグナル活性を示す誘導體を探索する。(2)アディポネクチンによる体内時計システムを介したエネルギー代謝制御機構を明らかにする。アディポネクチンによる肝臓の体内時計制御及び時間依存的なエネルギー代謝制御について Adn(-/-)マウスを用いて検討する。(3)シフトワークマウスにおける体内時計システムの異常へのアディポネクチンの関与を明らかにする。シフトワークマウスの肝臓における時計遺伝子の概日リズムの位相のずれならびに振幅の増大と血中アディポネクチン量の減少との関連性について検討する。(4)シフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度の変動について検証する。日本大学医学部附属板橋病院の看護職員及び受診患者を被験者として、シフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度を測定する。



## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

**(1)アディポネクチンによる肝臓の体内時計制御機構**

肝臓の実質細胞である肝細胞において、アディポネクチンはその受容体 AdipoR1 及び AdipoR2 を介して AMP キナーゼ(AMPK)及び核内受容体 PPAR $\alpha$ を活性化してエネルギー代謝制御を調節している。そこで、アディポネクチンによる体内時計制御を明らかにする目的で、マウス初代肝細胞を作製し、アディポロンを処理して時計遺伝子の発現量を測定した。デキサメタゾン処理により概日リズムを同調させたマウス初代肝細胞の時計遺伝子発現量の概日リズムは、アディポロン処理により振幅の減少が見られた。また、アディポロンを処理したマウス初代肝細胞において、*Srebp1c*, *Fas* などの脂肪酸代謝関連遺伝子の発現量の低下が見られた。さらに、アディポロン処理により、*Hmg-coa reductase*, *Acta2*, *Ldlr* などのコレステロール代謝関連遺伝子発現量の低下が認められた。

アディポネクチンシグナル活性を介した脂質代謝関連遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにするため、アディポネクチンシグナルの阻害剤を用いて検討した。アディポロン処理による脂質代謝関連遺伝子の発現低下は、AMPK の阻害剤の処理により回復した。一方、PPAR $\alpha$ 受容体のアンタゴニストを処理したマウス初代肝細胞において、アディポロンによる脂質代謝関連遺伝子の発現低下の改善は見られなかった。これらのことから、アディポネクチンシグナルによる脂質代謝関連遺伝子の発現量およびそのリズム性の調節は AMPK を介して行われていることが示唆された。

種々のアディポロン類縁体ライブラリーを化学合成法により構築し、より高いアディポネクチンシグナル活性を示す誘導体を探索したところ、アディポネクチンシグナル活性の増加および持続性の増大を示す誘導体 A,B を見出した。さらに、総合研究の中で申請者らは、シフトワークなどの体内時計攪乱を是正する化合物のスクリーニングを目的として、*Bmal1* 遺伝子のプロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するベクターを安定過剰発現させた線維化細胞(NIH3T3)及びヒト肝がん細胞(HepG2)を樹立した。

**(2)アディポネクチンによる体内時計システムを介したエネルギー代謝制御機構**

総合研究初年度及び2年目において、*Adn*(-/-)マウスを用いてアディポネクチンによる糖脂質代謝制御の時間依存性について検討した。なお、活動リズムは体内時計に支配される内因性のものであることから、本研究では恒暗条件下で行い、時間を Circadian Time(CT)で示す。ま

ず、はじめに *Adn*(-/-)マウスの行動パターン及び摂餌量について検討したところ、CT10~18にかけて摂餌量の増加が見られた(図1)。また、CT13~24にかけて活動量が多くなる行動パターンはいずれのマウスにおいても認められたが、*Adn*(-/-)マ

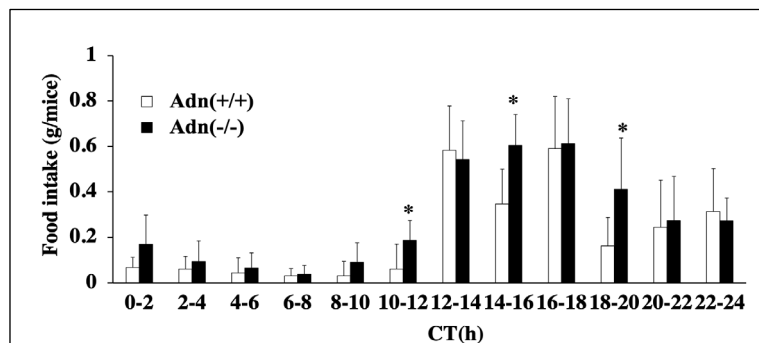


図1 *Adn*(-/-)マウスにおける摂餌量の日内変動

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

ウスにおいて摂餌量の変化が見られた時間での活動量に違いが見られた。

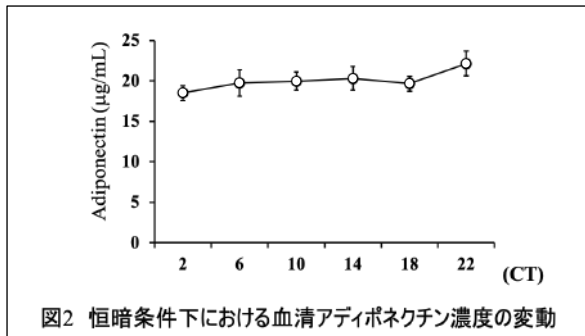
次に、肝臓の体内時計遺伝子発現量へのアディポネクチンの影響を検討したところ、Adn(-/-)マウスの肝臓において *Cry*, *Per*, *Rev-erb* など時計遺伝子関連発現量の概日リズムに変調が見られた。一方、肝臓と同様にアディポネクチン受容体が多く発現している骨格筋ならびに脂肪組織においては、時計遺伝子発現量の概日リズムには大きな違いは認められなかった。

肝臓は脂質代謝制御において中心的な役割を担っていることから、Adn(-/-)マウスの血中脂質濃度を測定した。Adn(+/+)マウスの血中総コレステロール濃度は1日を通して一定であるが、Adn(-/-)マウスにおいて日内変動が認められた。また、HDL コレステロール濃度は血中総コレステロール濃度のそれぞれのマウスの日内変動と類似していた。一方、LDL コレステロール濃度はいずれのマウスにおいても日内変動が認められたが、CT2-CT6においてAdn(-/-)マウスのLDL コレステロール濃度の低下が認められた。また、血中トリグリセリド濃度の日内変動においてアディポネクチン遺伝子の欠損の影響は見られなかった。さらに、総合研究3年目において、血中LPL活性を測定したところ、いずれのマウスにおいてもCT2-10に高く、CT14-22に低くなる日内変動が見られたが、両群間に違いは見られなかった。それらに加えて、血中遊離脂肪酸濃度では、Adn(+/+)マウスにおいて日内変動が見られたが、Adn(-/-)マウスにおいて日内変動が消失した。本研究の予備的検討において、CT10のVLDL分泌能はCT22に高くなる日内変動を示すが、アディポネクチンの欠損によりその増加は消失した。これらの結果より、アディポネクチンは脂質代謝制御の日内変動の調節に関与していることが示唆された。

そこで、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現量を解析したところ、Adn(-/-)マウスにおいて脂質合成関連遺伝子 *Srebp1c* 及び *Fas* 遺伝子発現量の増加及び概日リズムの異常が認められた。また、SREBP1のプロセッシングを抑制する *Insig2a* 遺伝子の発現量がAdn(-/-)マウスにおいて著しく減少していた。これらの結果から、アディポネクチンはSREBP活性を介した *de novo* の脂肪酸合成の時間依存的な制御を通じて、血清トリグリセリドの恒常性維持に関与していることが示された。また、Adn(-/-)マウスにおいて *HMG-CoA reductase*, *Abca1* 遺伝子発現量の増加及び *Sr-b1* 遺伝子発現量の低下が認められた。したがって、アディポネクチンは、肝臓のコレステロール代謝関連遺伝子の時間依存的な発現制御を介して、血清総コレステロール濃度を一定に保つ制御因子であることを明らかにした。申請者は予備的検討においてVLDL分泌能の日内変動がAdn(+/+)マウスにおいては見られたが、Adn(-/-)マウスでは日内変動が消失することを示した。そこで、アディポネクチンによるVLDL分泌能の日内変動の制御について明らかにするため、肝臓におけるVLDL分泌関連遺伝子の発現量を検討した。Adn(+/+)マウスでは、ApoB100及びMtp発現量は、CT22に発現ピークを持つ概日リズムを示したが、Adn(-/-)マウスにおいてはこれらの概日リズムは消失していた。さらに、Adn(-/-)マウスにおいて、これら遺伝子の転写調節因子であるPPAR $\alpha$ 遺伝子の発現量においても概日リズムの消失が確認された。以上の結果より、アディポネクチンは時間依存的なPPAR $\alpha$ 遺伝子の発現制御を介してVLDL分泌を調節していることを明らかにした。

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

総合研究3年目に、アディポネクチン濃度及びその受容体発現量の恒暗条件下における日内変動について検討した。血清アディポネクチン濃度はCT2に低くCT22に高くなる変動が見られた。アディポネクチン受容体はAdipoR1及びAdipoR2に加えて、T-cadherinも受容体として機能することが報告されている。そこで、アディポネクチン作用が知られている肝臓、骨格筋ならびに脂肪組織におけるこれら受容体の発現量の日内変動を測定した。AdipoR1発現量は、肝臓、骨格筋ならびに脂肪組織において日内変動は見られた。AdipoR2では、肝臓(CT22)、骨格筋(CT18)、脂肪組織(CT18)に発現量が高くなる日内変動が見られた。T-cadherin発現量は、骨格筋、脂肪組織において日内変動は見られた。一方、肝臓においてT-cadherin遺伝子の発現は見られなかった。



ここまでをまとめると、アディポネクチンは肝臓における代謝機能を時間依存的に制御していることが明らかになった。

### (3)シフトワークマウスにおける体内時計システムの異常へのアディポネクチンの関与を明らかにする。

マウスの明暗周期を6時間ずつ前進させることで、C57BL/6Jマウスからシフトワークマウスを作製した。明暗条件下でのアディポネクチン濃度は、通常飼育マウスでは1日を通して一定であったが、シフトワークマウスでは明期及び暗期前半に低下することが示された。そこで、シフトワークマウスにおけるアディポネクチン濃度の低下による肝臓の体内時計システムへの影響を検討した。シフトワークマウスの肝臓において、*Clock*, *Bmal1*, *Rev-erb* 発現量は通常飼育マウスと同様のリズム性を認めたが、発現量の増加が見られた。一方、*Per1* 発現量の概日リズムの前進、*Cry1*, *Cry2* 発現量の概日リズムでは後進が見られた。さらに、*Per2* 発現量の概日リズムにおいては振幅の低下が認められた。これらのシフトワークマウスの肝臓における時計遺伝子の発現変化へのアディポネクチンの関与について解析している。

### (4)シフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度の変動について検証する。

本研究は、日本大学医学部倫理委員会の承認を得た後に実施された。東京都内の病院に勤務する20-65歳の重篤な身体的・精神的疾患を持っていない者(医師、看護師、薬剤師、事務職など)を対象とした。97名が参加し、DNA抽出を行えた88名を解析対象とした。

年齢、性別、シフトワーク(以下SW)の有無、睡眠の状態(Pittsburg ~: PSQI)を質問紙を用いて調査した。同日の午前中に採血も行った。血中アディポネクチン濃度はELISA法にて測定した。血液検体から得られたDNAよりCLOCK遺伝子の多型(rs1801260)、BMAL1遺伝子の多型(rs7950226)をgenotypingした。質問紙中の入眠時刻と起床時刻より睡眠中央時刻(Midpoint of sleep time: MS)を算出し、個人の時間指向性(クロノタイプ)とした。

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

・まず初めに、シフトワーカーにおける血中アディポネクチン濃度を測定した。

解析対象とした 88 名の血中アディポネクチン濃度の平均値は  $12990 \pm 5867$  ng/ml であった。シフトワーカー (SW+) は 50 名、非シフトワーカー (SW-) は 38 名であった。SW-群 ( $14731 \pm 5144$  ng/ml) は SW+群 ( $11666 \pm 5144$  ng/ml) に比較しアディポネクチン濃度が有意に高かった ( $t=-2.5$ ,  $df=86$ ,  $p<0.001$ )。アディポネクチン濃度は、男性 ( $10019 \pm 3902$  ng/ml) に比べ女性 ( $15828 \pm 6054$  ng/ml) で有意に高かった ( $t=-5.37$ ,  $df=75.6$ ,  $p<0.001$ )。SW+群に比較し SW-群で女性の割合が高かった ( $\chi^2=16.97$ ,  $df=1$ ,  $p<0.001$ ) ことから、SW の有無と性別を独立変数、アディポネクチンを従属変数とし、2 要因の分散分析を行ったところ、性別の主効果がみられた ( $F(1, 84)=20.63$ ,  $p<0.001$ )。一方、SW の有無の主効果はみられなかった ( $F(1, 84)=0.14$ ,  $p=0.71$ )。以上から、性差を考慮すると SW の有無はアディポネクチン濃度に影響していなかった。

・血中アディポネクチン濃度と時計遺伝子多型との相関関係について解析を行った。

CLOCK 遺伝子多型に基づき、C アレル保因者 (C+:23 名) と非保因者 (C -:65 名) に 2 群化した。BMAL1 については、G アレル保因者 (G+:58 名) と非保因者 (G -:30 名) に 2 群化した。それぞれの多型について、アディポネクチン濃度に差があるか t 検定を行なったが、差は認めなかった (CLOCK:  $t=0.71$ ,  $df=86$ ,  $p=0.48$ , BMAL:  $t=1.34$ ,  $df=86$ ,  $p=0.18$ )。

・アディポネクチン濃度と睡眠中央時刻との相関関連について検討した。

全対象では、アディポネクチンと年齢との間に正の相関、BMI と MS との間に負の相関を認めた。また、MS と年齢との間に負の相関を認めた。SW の有無別の検討では、SW+群においては、アディポネクチンと BMI および MS との間に負の相関を認めた。また、MS と年齢との間に負の相関を認めた。一方、SW -群においては、アディポネクチン濃度は年齢との間に負の相関を認めたのみに留まった。

・SW によるアディポネクチンへの性別、BMI、年齢、睡眠中央時刻への影響

これまでの結果から、アディポネクチンは性別、年齢、BMI、MS と関連することが明らかとなった。そのため、これらの要因とアディポネクチンとの関係を全対象および SW の有無別に検討した。全体では、上記の要因のうち、性別、年齢、BMI がアディポネクチンと有意な関係を締示した。SW の有無別の検討では、SW+群においては、性別、MS がアディポネクチンと関連した。一方、SW -群においては、性別、年齢がアディポネクチンと関連した。BMI については、傾向を認めた ( $p=0.061$ )。

アディポネクチンは性差があることが明らかとなっており、女性の方が有意に高い。今回の結果も同様であり、性別の影響が強いことが示された。SW の有無によってアディポネクチンに有意差があったが、SW-群では女性が多かったことから、これを考慮して検討した場合、SW の有無によるアディポネクチン濃度の差は認めなかった。

性別の他に年齢、BMI もアディポネクチン濃度と関連していた。具体的には、年齢が上がるとともにアディポネクチンは高くなっていた。一方、BMI については高くなるとともにアディポネクチンは低下していた。さらに、アディポネクチンは個人の睡眠時間指向性とも関連するこ

## 〔7 研究結果（つづき）〕

とが示され、夜型になるほどアディポネクチン濃度が低下することが示された。SW+群においては夜型になるほどアディポネクチン濃度が低下することが見出されたが、同様の関係はSW-群では認めなかった。このことから、夜型指向性の強い個人では、シフトワークに従事することによって代謝異常のリスクが高まりアディポネクチンが低下する可能性が示唆された。夜型の個人では、社会的ジェットラグによる睡眠不足が生じやすいことが知られている。体内時計がずれやすい個人では、シフトワークによって代謝系の異常が生じやすいと考えられる。今後、シフトワーク従事による疾患リスクを考える際、クロノタイプの視点をもつことが重要である可能性が示唆された。

総合研究2年目は、新型コロナウイルス感染症が流行により、予定していた臨床研究のボランティアの募集の遅延、海外出張による国際学会を通じた情報交換の中止により当初の計画よりも遅れてしまったため、特例設置の許可を得て1年間の研究期間を延長して行った。

## [競争的資金申請への準備状況及び外部研究費の獲得]

本研究より得られた結果を基盤として、外部研究費に積極的に申請を行い、これまでに日本私立学校振興・共済事業団 2020年度 学術振興資金を獲得した。また、本年度の研究の一部は、“アディポネクチンによるエネルギー代謝の概日リズム制御”という題目で日本薬学会第141年会（広島）（2021）において口頭発表を行った。さらに Adn(-/-)マウスに関するこれまでの結果については、現在、論文投稿中(Submitted)である。これらの研究の発展を踏まえ、今後、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED)、武田報彰医学研究助成、科学研究費助成事業・基盤研究（A）などの”外部研究費の申請を行う予定である。

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 4年 4月 8日

日本大学学長 殿

氏 名： 古賀 徹

所属・資格： 通信教育部・教授

実施研究所： 通信教育部・通信教育研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

戦後教育改革期における政官民アクターの三者関係に関する研究

## 2 研究期間

令和 元年度 ～ 令和 2年度

※令和 元年度 ～ 令和 3年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担	
研 代 表 者	古賀 徹	通信教育部／教授	全体のとりまとめ、史料デジタル化、速記史料復元担当	
研 究 分 担 者	末富 芳	文理学部／教授	史料の閲覧と複写、整理作業の管理	
	古川 隆久	文理学部／教授	教育－社会・政治関係の理論的整理	
	中澤 瞳	通信教育部／准教授	人物研究・政治思想の考察	
	富士原 雅弘	国際関係学部／准教授	史料の閲覧・複写、史料整理	
	香川 七海	法学部／准教授	史料の閲覧・複写、史料整理	

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 90 %】

#### 5 研究目的

本研究では、1945年から50年代にかけての戦後教育改革期における政官民（政党・文部省・諸教員団体）の三者（間）関係に注目して分析を進めることで、戦後日本の教育発展の歴史を捉え直すことを試みる。具体的には、(A)政治家・政党関係史料、(B)官僚・文部省関係史料、及び(C)教職員組織関係史料の3種類の史料を突き合わせていくことで、教育改革をめぐる諸事件に関する政治過程を描き出していく。

この時期に関する教育史研究の成果としては「政一官」の二者間について注目したものが多くを占め、(C)に関するものは少ない。しかもその少ない先行研究においても、その過程における教育現場からの陳情や協議、交渉、あるいは反発などの衝突については二次史料（新聞記事等）を用いて断片的に扱った論考が散見されるのみであった（大田編1976、貝塚・藤田2015など）。それを「史料」研究という基礎的作業からはじめて政官民アクターの関係性に注目した研究を進め、戦後教育の発展の歴史を新たな像で描き直そうというのが本研究の目的である。

#### 6 研究概要

本研究は5に記したように戦後教育改革期における政官民（政党・文部省・諸教員団体）の三者（間）関係に注目して分析を進める。従来の研究において、この政官民アクター三者関係を含めた「よりリアルな歴史像」を描くに至らなかった理由は三つある。(1)「現在」との連続性の問題があり「過去の出来事」として客観的に整理されるに至っていなかったという難しさと、(2)史料の公開・活用が未だ十分に進んでいないという史料的な制約、(3)教育学研究者の教育学的な関心のせいで、当時の政治（政治的事件や政治構造）や社会（社会意識やイデオロギー）との関連があまり考慮されてこなかったことである。

(1)については、近年になって様々な研究者によって1950年代の教育史研究が進められ、その成果が示されるようになってきた。戦前からの教育会に注目した梶山雅史・白石崇人らの著作や、50年代の法制度改正に注目した米田俊彦による研究、そして広田照幸を中心として精力的に進められている日本教職員組合に関する研究成果がその代表的なものである。本研究は、広田の日教組研究と資料（史料）面および問題意識が重なる部分がある。広田の科研費研究グループを中心に収集・整理されたデータも活用させていただきながら、未整理の教育運動系史料をデジタル化し分析していく。

## 7 研究結果 (4,000字以上記入のこと)

二年間の研究機関をコロナ禍ということで延長を認めていただき、三年間の時間をかけて「史料」に直面していくことができた。この状況下において直接に集まって議論する機会がくれなかった分をオンラインでのやりとりと、データをクラウド上で確認しあう手順をとることで「共同研究」を進めることができた。各学部の異なる事情はありながら、研究分担者からエフォートとして時間を提供していただいたおかげである。またアルバイト大学院生とプロジェクトで雇用した研究所研究員に協力していただいたおかげで、地方の出張や教育会館地下倉庫に積まれた文書資料の整理を進めることが可能となった。

具体的な研究の結果(成果)について記しておきたい。前述(6項)広田照幸の科研グループと連携しながらデジタル史料の撮影(そのための史料の選定と確認、発注から納品後の再確認)を行い、文理学部内(教育学科)に収めた史料の目録化を進めた。日教組結成前の戦前期教員団体たる「帝国教育会」関連の資料を含む、「雑・帝国教育会」というブロックの史料や当時の手帳類を中心に撮影を進めた。帝国教育会という名称で箱に収められていたが中身は日教組内部の「各部」文書資料類である。各種の通知や大会・委員会の議事資料(配付されたもの)や議事録(記録されたもの)が中心である。1960年代の分も含めて収集したことで、「50年代」のその後や周囲の状況も理解することが可能となる。「発文書」という発信元原稿・草案類を整理し、これを目録化や論文化することができた(後述)。なお、この広田科研のメンバーは他大学の研究者も含み、彼らと連携をすることで令和4年度科研費基盤研究(B)の採択につながっている。本研究(総合研究)は大型外部研究費採択をも目的に含んでいるが、学内の研究分担者にこの外部(他大学)からも研究に加わっていただくことで、さらに研究計画が具体的なものとなった。直接の研究成果ではないが、これも結果として明記しておきたい。この他大学研究者とは2021年8月の日本教育学会(第80回大会)でラウンドテーブルを設定し、80名ほどの参加者を得て議論をすることができた。研究代表者(古賀)は司会および指定討論を行い、他の分担者も聴衆として加わっていただいた。ここでは広田ほか(布村・宇内・高木)が報告者となったが、このうち布村・高木に科研費Bに参加していただくこととなった。

研究成果報告書を2冊作成した。(1)では論文集として①富士原「第1回全国教研の開催をめぐる日教組内部の議論と決定過程」、②松嶋哲哉(研究所研究員)「教員労働組合としての労働協約」、③香川「福岡県教職員組合・学力テスト反対闘争」および④古賀「日本教職員組合「公文書綴」について」の4編を収めた。(2)は資料集として古賀が「公文書綴」の改題を作成し、内容レベルの目録化を行い、それにあわせて「発文書」レベルの史料を公開している(前掲)。

論文(1)の論点を整理しておきたい。①は「日教組」が労働組合なのか教員の「職能団体」なのかという重要な議論が含まれている。富士原は今回の研究で得た内部資料を駆使することで、教員研究集会を提案する側の意図と、それに反対(あるいは)賛成する側のそれぞれの論理を分析のテーマとしている。従来は偏向的で誘導的に機能していたのではないかといった単純化された語られ方であったが、日教組内部の史料を使うことで、新しい視点を提示している。



## 〔7 研究結果（つづき）〕

②で扱われるのは「労働協約」という労働組合・団体としてこの当時もっとも重要な意味をもった文書が、どのように取り交わされ、どのように反故にされていくのか、その背後の政治状況を追うことで迫っていく。三者のアクター間をみることで実際のやりとりを再現していくのが本研究の目的であり、文相や文部省（当時）との往復（交渉）が描き出されていく。

③では“いわゆる「学テ」問題”を扱い、また中央交渉ではなく地方レベル（単組）と地方行政との関わりを論じている。裁判の判例をもとにメディアや住民の理解を含めた闘争の形態をリアルに論じていく。この「地方—中央」（日教組でいえば全国組織と地方の単組レベル組合）の組織の問題がからんでくる。例えば地域色、政党色、男女比や学校文化などの多様性がある。本研究テーマでも大切な課題となってくる。

④は組織資料（しかし私文書）としての「公文書綴」として整理された資料群に注目した。本研究では三者間として「政党・政治家」「文部省や他の省庁、地方行政機関」と「教員組織」との関係をみるので、日教組と文部大臣や文部官僚、あるいは東京や地方行政官との手続き・交渉などの往復文書を見ることになる。まず全体を整理して、発文書の「発番号」（整理番号）の意味を解説し、その「綴じ方」や「教組によって作成された目次の作成方法」などの特徴について解説を行った。その後、その具体的な交渉の性格を読み取る。結論としては、文書のやりとりを「公文書」と名付けていることでも想像がつくとおりに、形式的にオフィシャルなものとしてだんだんと洗練されていくことがわかった。つまりは公共機関等との往復において、その組織内文書規定のようなまとめかた自体が完成してくる。まさに「組織化」されていくという一面もみてとれた。さらに以上の「公文書綴」を目録化し、その方法や意義を説明し、一部の史料を「再現」して公開したものが(2)となる。

以上のように成果報告書を記したが、これらや口頭発表（ラウンドテーブル）以外にもオンラインで検討会・研究会を行い、議論を交わすことで「総合的な研究」として幾分か成果に結びついていったのだと考える。もちろん、コロナ禍により研究計画は大きく影響を受けて、地方教組の史料や地方教育会の記録類については行き着けなかった。地方の大学に残る政治家関係の文書類はみにいくことができたが、すでに整理されているものが中心となる。書庫や十分に整理されていない状態の史料をさらに探すことについては、次の作業として継続していきたい。

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和4年4月22日

日本大学学長 殿

氏 名： ソコロワ山下 聖美

資格・所属： 芸術学部・ 教授

実施研究所： 芸術学部・ 芸術研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

日本人の「南方」経験の再検討ーグローバル化時代の新しい歴史像の構築にむけてー

## 2 研究期間

令和 2 年度～令和 3 年度 / 令和 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 表 者	ソコロワ山下聖美	日本大学芸術学部／教授	「南方」派遣作家の言説分析。全体の統括。
研 究 分 担 者	石川徳幸	日本大学法学部／准教授	「南方」地域で発行された邦字新聞と、その発行を担った新聞人の分析。
	伊藤雅俊	日本大学国際関係学部／助教	日系インドネシア人の史料分析。
	鳥海早喜	日本大学芸術学部／准教授	「南方」に関する政策の写真分野からの分析。
	町田祐一	日本大学生産工学部／専任講師	「南方」への移動の推進を、民間言論人及び職業指導所における実態から分析。

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： 3 】・【達成度： 80%】

#### 5 研究目的

本研究の目的は、外地（「南方」）と内地（日本）をめぐる「還流」を視座に据え、グローバル化社会に寄与する歴史像を構築することにある。今日地球規模で進むグローバル化の中において、複雑な地政学的影響による社会変動を知的に把握し、国際的な枠組みの中で様々な課題に向き合う相互理解に基づく実践力を構築していくためには、相互理解を深めるコミュニケーションツールとネットワークの形成が重要である。中でも、インドネシアのように過去様々な歴史的かかわりを持つ国々や地域との関係については、歴史的理解を前提とする人文・社会科学的な学術的知見の蓄積が、その素材として欠かせない。近年、インドネシアは日本への留学生や外国人労働者の受け入れといった側面で交流はより深まりをみせている。学術的知見を隣接する他の学問領域へ波及させるだけでなく、教育を含めた幅広い社会的還元によって活用することが、本研究の大きな目的である。

#### 6 研究概要

本研究のテーマは、1920年代から1950年代における「南方」と内地（日本）の人びとの「還流」がもたらした歴史的意義を検討することである。

対象は、いわゆる戦前期におこなわれた南進政策にともなう国策移民だけではなく、自由移民や一時的な出稼ぎ労働者とその推奨者、文学者、ジャーナリスト、2世・3世の人々、写真家などの人々である。これらの人々が、外地における多様性のある日本人社会の形成と、それらが内地（日本）との関係において果たした役割を、戦前・戦時・戦後の様々な立場における人びとの経験から明らかにするものである。

対象時期については、「南方」への移動が本格化した大正時代（1920年代）から、戦後に残留兵を中心とした日系インドネシア人のコミュニティが形成された1950年代を設定した。対象地域は戦前期日本において「南方」（ないしは「南洋」）と呼称された地域、とくに戦前の早い時期から日本人社会の形成がみられ、戦後においても日系人社会が発達したインドネシアを中心に扱う。

研究成果の共有と定着化については、各自の個別研究を継続したうえで、インターネットに研究状況の進捗を公開することを予定している。研究成果を定期的に研究会で検討を繰り返し、後述するインドネシアにおける気鋭の日本研究者の全面的な協力をえたうえで、批判と検討を重ね、学術知見の国際性を担保して研究成果として国内外に広く公表していく。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

令和3年度もまた、2年度に引き続き、コロナウィルスの世界的流行により調査研究のための渡航が不可能となったため、当初予定していたインドネシア国立図書館にての資料収集などを行うことができなかったが、国内で遂行できることに集中して取り組んだ。具体的には以下のようなになる。

### 1) インターネットでの進捗状況の公開

令和2年度に開設したホームページにおいて、幅広く情報提供を募るとともに、昨年度より引き続き、研究報告や進捗状況を公開した。[\(https://rjse.upstory.biz/\)](https://rjse.upstory.biz/)

### 2) 国際シンポジウムの開催

国際シンポジウム「日本人の「南方」経験の再検討」(2021年12月4日 オンライン開催)を実施した。本シンポジウムでは、本研究の分担研究者以外にも国内・国外から専門家を招き、テーマにそった多様な報告がなされた。具体的な研究成果報告内容は以下となる。

第一部においては、石川徳幸准教授の司会のもとに、ソコロワ山下聖美教授の「挨拶」に続き、メダン州立大学歴史教育学部の Ichwan Azhari 教授による「スマホとアチェにおける日本の遺構である防空壕—その状態と利用と記憶—」(ビデオ収録)が基調講演として公開された。解説は伊藤雅俊助教が担当した。

続いて、町田祐一専任講師が「三平将晴(三平晴道、美平晴道)の「修養ビジネス」—戦時下の大日本海外青年会(海外発展)、敗戦後の希望社(結婚相談・孤児支援)を中心に—」を報告した。この報告は戦時下に「南方雄飛」を唱えた大日本海外青年会を設立した、三平将晴(三平晴道、美平晴道)について、「修養ビジネス」という観点から、戦時・戦後の活動を検討するものであり、戦前には「南方雄飛」を説き、戦後は「結婚」「孤児支援」、そして最後は奨学金、海外発展支援を、会員制度を前提とした出版事業による情報提供によって会員の目的を支援する「修養ビジネス」を展開したその活動は、当時の日本社会において様々な活路を見出そうとする民衆の欲望、希望を反映したものであったことを明らかにし、三平のような人物と事業を検討することで、戦時下の「南方」へ憧れ、敗戦後に新たな豊かさを目指した日本の民衆の営みを、これまでにない角度から提示することができた。

次に、同朋大学文学部人文学科・金山泰志専任講師による「大正期における日本の南方教育」の報告が行われた。この報告では、大正期の小学校教科書(地理・歴史・国語・修身)と、当時の教師用指導書や参考書を史料に、「南方」教授の実態を明らかにし、大正期においても、地理、歴史、国語という教科を通し、「南方」に関する教育は尋常小学校において行われていたことが確認できた。太平洋戦争期より、「南方」への関心が低かったと考えられる大正期においても、「南方」に関する教育が、小学校レベルにおいて一定程度提供されていたと結論づけながら、今後の課題として、大正期より前の明治期の南方教育の実態の解明を挙げ、この点の検討により、「近代日本の南方教育」という大きな枠組みを示すことができるようになるであろうという展望を示した。

続いて、京都先端科学大学教育開発センター・後藤多恵講師による「「南方」の経験と日本語教育—スマトラ・マラヤとの関わりを中心に—」の報告がなされた。この報告では、日本語教育という側面から南方経験の新たな側面の考察が行われた。

続いて、伊藤雅俊助教による「日系インドネシア人二世の日系人意識—残留日本兵の子どもである—」の報告がなされた。この報告では、北スマトラ州メダンに居住している日系二世の語りを紹介しながら、彼ら彼女らの日系人意識の根底に横たわっているものは、「残留日本兵の子ども」であるという事実とそこから生ずる揺るぎない誇りであることを示している。日本に対する想いを抱きながら生きる日系二世たちを詳細に報告し、戦後76年を迎えた2021年現在、彼ら彼女ら大半の年齢は50代・60代であるとして、残留日本兵の「南方」経験は日本人の知らない場所で、次代に受け継がれていることを明らかにした。

第二部においては、町田祐一専任講師の司会のもとに国内外からの研究成果報告がなされた。

まずは、インドネシア大学大学院日本地域研究科・Susy Ong 専任講師による「新聞記事に見る蘭領インドの初期日本商業移民」の報告がなされた。吉田春吉『南洋渡航案内』（1914年）多田恵一『南洋渡航案内』（1917年）、南洋協会『南洋渡航案内』（1918年）、越村長次『南洋渡航須知』南洋協会台湾支部（1919年）などの史料を紹介しながら、そこに記される言説を読み解き、インドネシアにおける初期日本商業移民の姿を明らかにした。

続いて、ソコロワ山下聖美教授による「〈南方〉への移動と還流の果て—林芙美子『浮雲』を読みながら—」の報告がなされた。この報告は、文学の側面から当時の南方への移動と環流を検討したものであり、「文化工作」の役割も担い南方に従軍していた林芙美子（1903～1951）の長編小説『浮雲』（1951年）において描かれる、日本から〈南方〉への移動と環流の姿を考察するものであった。南方・インドシナからの引揚げ者・幸田ゆき子をヒロインとする『浮雲』においては、作品の至るところで戦時中の南方が回想されること、ゆき子と林務官・富岡兼吾が出会い、男女の深い仲となった舞台である南方・インドシナのドラットを中心に、作品の舞台は日本から南方へ、南方から日本へとめまぐるしく動き、これらの移動と環流が作品自体の構造となっていること、読者は日本と南方の間に展開されるめまぐるしい行き来を目の当たりにしながら、両者の対比を考えざるを得なくなることを指摘し、林芙美子と南方体験の根源的な深いつながりを明らかにした。

続いて、鳥海早喜准教授による「『アサヒグラフ』撮影者調査の追加報告と山端祥玉らからみた南方」の報告が行われた。鳥海准教授は本共同研究において写真分野からの考察や史料の複写・デジタルデータ化に関わる部分を担当しており、今後に向けた課題や問題点の発掘について明らかにした。1、『アサヒグラフ』撮影者調査の追加報告について、2、インドネシア残留元日本兵の写真集調査について、3、山端祥玉からみた南方について、4、オランダを介した日本とインドネシアの交流、というような方向性であるが、いずれのテーマについても重視したいのは、「なぜインドネシアと関わりをもつことになったのか」、「なぜ日本に帰ったのか、もしくはなぜ帰らなかったのか、帰れなかったのか」というような当事者達の主観的な要素や感覚的な部分であり、時代によって常識も国と国との関係性も異なり、安易に現代と比較考察す

ることはできないが、その時代を生きた人たちが何を思いインドネシアと交流を結び、何を後世に残そうとしたのかを知るための調査研究を今後も行っていきたい、と結んだ。

続いて、石川徳幸准教授による「戦前の「南方」における日本人社会と新聞―佃光治の『爪哇日報』創刊をめぐる―」についての報告がなされた。この報告では、オランダ領東インドで創刊された最初の日本語新聞である『爪哇日報』について、その歴史的意義が考察され、まず、移民メディアの類型やその社会的機能に関する知見を整理した後、近代新聞の成立要件に照らして『爪哇日報』が創刊に至るまでの歴史的背景を明らかにした。そのうえで、初代社長である佃光治をはじめ、『爪哇日報』の黎明期を支えた新聞人の業績を詳らかにすることで、同紙が当時の日本人コミュニティにおいて果たした役割を考察するための予備的研究を整えた。

最後に、京都芸術大学文明哲学研究所・牛田あや美准教授による「戦前における子供たちにとっての南方 Southern for children before World War II」についての報告がなされた。この報告では、戦前の子供雑誌においてどのようなかたちで「南方」が描かれていたのかについて、詳細に検討された。戦前の子供雑誌からみた南方のイメージをプロパガンダのみで論ずるのではなく、多層的な文章や絵、漫画によって形成された過程を今こそ検証する時期になっていると結び、今後の研究テーマへとつなげた。

以上のように、テーマに沿った多様な研究成果報告が行われ、活発な意見交換が交わされたことにより、今後のさらなる研究の方向性が確固となった本シンポジウムの意義は大変深いと結論づけられる。

### 3) 報告・論文集 vol.2 の作成

令和2年度より引き続き、3年度も「日本人の「南方」経験の再検討―グローバル化時代の新しい歴史像の構築にむけて―報告・論文集」を作成した。各研究者は、シンポジウムの発表要旨を執筆・掲載した。また、石川准教授は論文「オランダ領東インドにおける日本御新聞の成立」を発表し、1920年に創刊された「爪哇日報」の題材として「南方」の日本人社会形成期における日本語新聞の発生とその役割について考察した。また、伊藤助教は史料紹介として「福祉友の会発行の『月報』―日系インドネシア人―世らの記録―」を発表した。

以上のように、「インターネットでの進捗状況の公開」「国際シンポジウムの開催」「報告・論文集 vol.2 の作成」を通して、各研究者が各分野からのアプローチで開拓した「南方」についての知見と情報を共有することができた。

総合すると、当初目標に掲げていた以下の三点、すなわち

- ①戦前期の日本において「南方」地域への出稼ぎや移民は、いかにして拡大したのか。「南方」における日本人コミュニティの形成過程や、日本内地における斡旋事業を明らかにする。
- ②戦時期の日本は「南方」地域において、いかなる「文化工作」を実践したのか。いわゆる「文化工作」の実態を明らかにし、現地にもたらした影響とともに、「文化工作」に携わった日本人の戦後の活動への影響を詳らかにする。
- ③戦後の日本と「南方」地域の関係において、日系人コミュニティが果たした役割はいかなるものであったのか。戦前からの移民や残留兵によって形成された「南方」におけるコミュニテ

イの実態を明らかにし、現地における当該コミュニティの位置づけと日本との関係をどのように維持したのか（ないしは維持し得なかったのか）を詳らかにする。

ことを達成するために、国内において出来る限りのことを行い、それに伴う成果を得られたと考えている。

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 4年 5月 2日

日本大学学長 殿

氏 名： 齊藤 健

所属・資格： 理工学部・教授

実施研究所： 理工学部・理工学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

次世代型エッジ処理が可能な NU ブレインチップの開発とロボットへの実装

## 2 研究期間

令和 2年度 ～ 令和 3年度

※令和 年度 ～ 令和 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	齊藤 健	理工学部・教授	研究統括, ブレインチップ(脊髄神経系および深層学習型)の設計開発およびロボットの開発
研 究 分 担 者	内木場 文男	理工学部・教授	昆虫型マイクロロボットおよび脊髄神経系ブレインチップの開発
	佐伯 勝敏	理工学部・教授	中枢神経系ブレインチップの設計開発
	金子 美泉	理工学部・助教	深層学習型ブレインチップの開発
	武藤 伸洋	工学部・教授	ネットワークロボットシステムの開発
	見坐地 一人	生産工学部・教授	ロボットの解析

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。



#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：①当初の計画以上に進展している。】・【達成度：100%】

#### 5 研究目的

本研究は、3つの学術的「問い」に対し答えるべく、世界初の技術を開発する事が目的である。3つの学術的「問い」は、「ロボット技術、AI技術で世界に注目される競争力を得るにはどのような研究を展開するべきか」、「ノイマン型から脳型のAI技術への転換として、アナログ高集積化回路による、Nihon University (NU)ブレインチップがキーデバイスとして提案できるか」、「社会ニーズに答えうるレベルのシーズを日本大学で育てられるか」である。研究代表者、研究分担者による3種のNUブレインチップを独自のロボットに実装することは、他の研究機関では実現が難しく、高い学術的独自性と創造性を兼ね備える。また、日本大学の持つロボットおよびAIに関するシーズを育て、日本学術振興会などの学外の大規模資金獲得の際の研究の柱とする。また、本研究を礎とし、将来的には日本大学の持つシーズを、ニーズを抱える企業との協働にて、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)や科学技術振興機構(JST)による大型プロジェクトの立ち上げを目指すものである。

#### 6 研究概要

本研究では次世代型AIとして、エッジ処理が可能なNUブレインチップを開発し、ロボットに実装する。NUブレインチップをオリジナルのロボットに実装することで、日本大学発の新たな産業革命が実現し、世界的なインパクトを与える可能性がある。本研究では、NUブレインチップの開発とプラットフォームとなるオリジナルのロボットの開発を同時に行う。

##### (1) NUブレインチップの開発

研究代表者および研究分担者(内木場、佐伯、金子)は、生物の脳を構成する神経細胞の電気的な活動を、アナログ回路で模倣したモデルを用いて、生物の脳の情報処理を集積回路化し、脳型の情報処理が可能なNUブレインチップを実現する。NUブレインチップを以下の3種類に分け、開発を同時に進める。

(1)-a.脊髄神経系ブレインチップ(研究代表者および研究分担者：内木場)

(1)-b.中枢神経系ブレインチップ(研究分担者：佐伯)

(1)-c.深層型ブレインチップ(研究代表者および研究分担者：金子)

##### (2) ロボットの開発

NUブレインチップを搭載するロボットについても開発を進める。また、開発においてはロボットのモデル解析を適時行い(研究分担者：見坐地)、設計開発にフィードバックをかける。

(2)-a.昆虫型ロボット(研究代表者および研究分担者：内木場)

(2)-b.4足動物型ロボット(研究代表者)

(2)-c.ネットワークロボット(研究分担者：武藤)

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

「4 現在までの達成度」に記載した通り、当初の計画以上に進展した。具体的には本研究を発展させ、研究当初の予定になかった医学部との共同研究を基に、第4期 理事長・学長特別研究(令和3年度応募)に「未来医療の実現に向けた知識横断的医療機器・システム開発研究」と題して応募した。残念ながら採択とならなかったが、現在、令和4年度 日本大学特別研究に応募するために準備を進めている状況である。また、科研費などの外部資金への応募も積極的に行った。研究最終年度である令和3年度の研究結果を、「6 研究概要」に記載した項目ごとにまとめる。

### (1) NU ブレインチップの開発

#### (1)-a. 脊髄神経系ブレインチップ(研究代表者および研究分担者：内木場)

研究代表者および研究分担者の内木場が進めている、動物の脊髄神経系に学んだブレインチップを実現した。既に世界最小であるミリメートルサイズの昆虫型ロボットに搭載し、コンピュータプログラムの不要な歩容の生成を実現しているが、引き続き高機能化を実施した。また、回路基板に実装したニューロ回路をセンチメートルサイズの動物型ロボットに搭載し、歩容の発現に成功したので、ニューロ回路の集積回路化を行った。脊髄神経系ブレインチップは、中枢神経系に負荷をかけることなく基本的な歩行動作を生成可能であり、まさにエッジ処理である。

本年度の研究結果として研究代表者および研究分担者内木場は、昆虫型ロボット用および動物型ロボットの脊髄神経系ブレインチップを計7種類試作し納品した。測定の結果、設計通りの動作をおこなったのでロボットに実装を進めている状況である。特に X-fab を用いて特殊なプロセスで作製した脊髄神経系ブレインチップは、新駆動方式である静電モータの 60V 駆動に対応し、昆虫型ロボットへの直接実装が可能となった。

本研究の結果を基に、研究代表者は3件の査読付きの国際会議、3件の査読付きの国内会議を含む計12件の口頭発表をおこなった。また、論文誌に研究の成果を記載した<sup>[1]</sup>。さらに、査読付きの英文著書のチャプターとして研究の成果を纏めた<sup>[2]</sup>。現在、3件の英文論文誌を執筆中である。

[1] 森下 克幸, 加藤 真也, 武井 裕樹, 齊藤 健, “センサへの入力強度に応じて発振周波数が変化する受容細胞モデルの開発” 電気学会論文誌C, 142/1, pp. 33-39, (2022年1月1日)

[2] Katsuyuki Morishita, Shinya Kato, Yuki Takei, Ken Saito, “Development of a Receptor Cell Model for Artificial Life” Handbook of Research on New Investigations in Artificial Life, AI, and Machine Learning, Chapter 1, IGI Global, (2021年2月9日)

本研究の結果を基に、研究分担者の内木場は国際会議を含む4件の口頭発表をおこなった。また、2件の論文誌に採録された<sup>[3-4]</sup>。

[3] Mikihito Hayakawa, Kenji Takeda, Motokuni Ishibashi, Kaito Tanami, Megumi Aibara, Minami Kaneko, Ken Saito, Fumio Uchikoba, “Pulse-type hardware neural network mimicking spinal cord function” Biomimetics, Artificial Life and Robotics, 26, pp.450-456, (2021年8月3日)

## 〔7 研究結果（つづき）〕

[4] Kenji Takeda, Mikihito Hayakawa, Motokuni Ishibashi, Minori Ishihara, Takumi Ishihama, Megumi Aibara, Minami Kaneko, Fumio Uchikoba, “The walking and running control of a human musculoskeletal model using a low-power consumption hardware central pattern generator model” International Journal of Advanced Robotic Systems, 19/ 1, online, (2022 年 3 月 2 日)

## (1)-b.中枢神経系ブレインチップ(研究分担者：佐伯)

研究分担者の佐伯は、上記の脊髄神経系ブレインチップと比較してより高度な情報処理である、記憶・学習が可能な中枢神経系ブレインチップの開発を行った。特に、ニューロン間の結びつきの強さの変化、すなわち、シナプス可塑性をブレインチップに導入した。本研究期間では、シナプス可塑性を利用したネットワーク構造の基本構成をアナログ高集積回路で実現した。

本年度の研究結果として研究分担者の佐伯は、国際会議を含む 8 件の口頭発表を行った。また、1 件の論文誌に採録された<sup>[5]</sup>。

[5] 佐々木芳樹, 佐伯勝敏, “自動補正機構を有するパルス形カオスニューロンモデル” 電気学会論文誌C, J104-C/ 8, pp. 233-239, (2021 年 8 月 1 日)

## (1)-c.深層型ブレインチップ(研究代表者および研究分担者：金子)

研究代表者は、現在主流であるコンピュータ上で計算を行う深層学習を、アナログ高集積回路で実現する。本研究期間では、層間のニューロン間の結びつきの強さが自由に設定可能であることをアナログデジタル混合回路で実現した。但し、学習による結びつきの強さはコンピュータの計算結果をそのまま用い、深層型ブレインチップ単体での学習は行わない。研究分担者の金子は、現在主流であるコンピュータ上で計算を行う深層学習の研究を進め、深層型ブレインチップと比較検討した。

本年度の研究結果として研究分担者の金子は、コンピュータ上で計算を行う深層学習の研究を進め、小型のデバイスに実装を進めている。また、歯学部や生物資源科学部との研究連携を進めている状況であり、1 件の口頭発表を行った。また、1 件の論文誌をまとめた<sup>[6]</sup>。

[6] Yuriko Igarashi, Shintaro Kondo, Minami Kaneko, Megumi Aibara, Fumio Uchikoba, “Application of a Deep Learning Artificial Intelligence System for Individual Tooth Identification” International Journal of Oral-Medical Sciences, 20/ 2, pp. 98-108, (2021 年 10 月 20 日)

## (2) ロボットの開発

研究分担者の見坐地は本研究による成果を用いて医学部との共同研究に発展させ、手術動作の解析を実施している。その他のロボットの開発結果を以下に記載する。

## (2)-a.昆虫型ロボット(研究代表者および研究分担者：内木場)

研究開始までに世界最小の昆虫型ロボットのプロトタイプが完成している。しかし、熱収縮を用いた電力消費量が多いモータを使用しているため、静電気力を用いた低消費電力のモータに変更するなど、より一層の小型化、高機能化に向けて引き続き研究を行った。

## 〔7 研究結果（つづき）〕

本年度の研究結果として研究代表者および研究分担者内木場は、査読付きの国内会議 1 件を含む 3 件の口頭発表を行った。コロナ禍によりクリーンルーム内のパーツ作製が困難であったが基礎研究を充実させ、昆虫型ロボットの完成に向けて研究を進めている状況である。現在、査読付きの国際会議や論文誌への投稿を進めている。

## (2)-b.4 足動物型ロボット(研究代表者)

一般的なサーボモータ、センサを搭載した 10cm 程度の小型ロボットの開発を行った。本研究成果として、馬をベースにした 4 足動物型ロボットシステムの開発に成功した。動物は体形に独自性があるため、動物の種類を変化することにより歩容も変化する可能性がある。引き続き、猫型、犬型、ラクダ型など様々な 4 足歩行型ロボットを開発する。

本年度の研究結果として研究代表者は、既に開発していた馬をベースにしたプロトタイプロボットに加え、猫型の 4 足歩行ロボットを開発し、今後、研究成果を学会発表する状況である。

本研究の結果を基に、研究代表者は 2 件の口頭発表を行った。また、査読付きの英文著書のチャプターとして研究の成果を纏めた<sup>[7-8]</sup>。

[7] Yuki Takei, Katsuyuki Morishita, Riku Tazawa, and **Ken Saito**, “Active Gaits Generation of Quadruped Robot Using Pulse-Type Hardware Neuron Models” Biomimetics, Chapter 2, INTECH, (2021 年 6 月 9 日)

[8] Yuki Takei, Katsuyuki Morishita, **Ken Saito**, “Quadruped Robots With Bio-Inspired Gait Generation Methods Using Sole Pressure Sensory Feedback” Handbook of Research on New Investigations in Artificial Life, AI, and Machine Learning, Chapter 2, IGI Global, (2021 年 2 月 9 日)

## (2)-c.ネットワークロボット(研究分担者：武藤)

ネットワークロボットは有線もしくは無線によるネットワーク化が必要であり、ロボットの台数の増加によりネットワークへの負担が大きくなる。正にエッジ処理が必要なプラットフォームであることから、ネットワークロボットへの NU ブレインチップ実装に向けた検討を進める。

本年度の研究結果として研究分担者の武藤は、ネットワークロボット関する研究として、複数の遠隔作業支援ロボットの制御方法の開発、モーションキャプチャを利用した操作インタフェースの開発を行った。本成果を用いて医学部との共同研究に発展させ、現在ロボット遠隔操作システムに対する研究を行っている。

## 研究助成金の申請・採択状況について

本助成金の研究結果を利用し、令和 3 年度は「第 4 期 理事長・学長特別研究」および「日本学術振興会(JSPS)による令和 4 年度科学研究費助成事業 基盤研究 A および基盤研究 C」に応募し、研究分担者(内木場)による基盤研究 C のみ採択となった。現在、令和 4 年度 日本大学特

## 〔7 研究結果（つづき）〕

別研究に応募するために準備を進めている状況であり、令和 5 年度科学研究費助成にも応募予定である。以下に令和 3 年度中に行った研究助成金の申請・採択状況の詳細を記載する。

## (1) 第 4 期 理事長・学長特別研究

本研究の研究代表者および研究分担者(内木場, 金子, 武藤, 見坐地)が研究協力者として、研究課題「未来医療の実現に向けた知識横断的医療機器・システム開発研究」の申請書を提出した。残念ながら次点として採択には至らなかったが、学内研究者による研究チームの立ち上げができた。現在、研究分担者として令和 4 年度 日本大学特別研究に応募するために準備を進めている状況である。

## (2) 日本学術振興会(JSPS)による令和 4 年度科学研究費助成事業 基盤研究 A

研究代表者(齊藤)が基盤研究 A の研究代表者として申請書を提出した。2022 年度から 2024 年度までの研究期間で予算 48,934 千円を計上し、大学の研究者計 3 名で「iPS 細胞由来の脳オルガノイドを搭載したロボットシステムの開発」を計画した。残念ながら採択には至らなかったが、昨年度の書面審査の結果は C(小委員会における採択されなかった研究課題全体の中で、上位 50%に至らなかった)であったが、今回は B(小委員会における採択されなかった研究課題全体の中で、上位 21%～50%に位置していた)であった。次年度以降は申請書の内容を大幅に変更して挑戦する計画である。

## (3) 日本学術振興会(JSPS)による令和 4 年度科学研究費助成事業 基盤研究 C

研究分担者(内木場)が基盤研究 C の研究代表者として申請書を提出し採択された。2022 年度から 2024 年度までの研究期間で配分額は 4,290 千円である。研究課題は「人工脊髄 IC と人工筋肉を用いた 2 足歩行システムの研究開発」である。

# 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 4年 5月 9日

日本大学学長 殿

氏 名： 阿部 雅紀  
所属・資格： 医学部・教授  
実施研究所： 医学部・総合医学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

免疫性腎炎に対する DFAT 細胞療法の治療効果と安全性の検討
---------------------------------

## 2 研究期間

令和2年度 ～ 令和3年度

※令和4年度 (※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること)

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	阿部雅紀	医学部・教授	研究の総括
研 究 分 担 者	丸山高史	医学部・准教授	研究遂行の計画、評価
	清水諭	医学部・研究医員	DFAT 細胞治療の実施、研究結果の解析
	福家吉伸 【令和4年3月31日退職】	医学部・准教授	DFAT 細胞治療による組織的な評価
	逸見聖一郎	医学部・助教	DFAT 細胞治療による組織的な評価

※ホームページ等での公開 (☑可・☐否) いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：③】・【達成度： 80%】

#### 5 研究目的

我々は腎障害モデル動物に脱分化脂肪細胞(以下 DFAT)を静脈投与した結果、腎臓に DFAT が到達しないにもかかわらず腎障害が改善していることを見出した。その機序として投与した DFAT から排出される何らかの液性因子が関与している可能性が予想され、今回その機序の解明を今年度に行い、更には将来的にヒトにおいて慢性的な腎障害の新たな治療方法の開発、現在社会問題化している透析患者数増加の改善に繋がる研究を行うことが目的である。以下に具体的内容を記す。

本学生物資源科学部の加野らは皮下成熟脂肪細胞を脱分化させ DFAT を得る技術を開発、特許化した(特願平 10-378013)。DFAT は再生医療の移植細胞原として骨、軟骨、筋、上皮および神経細胞などに分化転換させる技術の開発や間葉系幹細胞と同等の性質を有している事も解明してきた(Matsumoto et al. J Cell Physiol 2008)。この間葉系幹細胞は体内に障害が起きた際に障害部位に集積して障害部位を修復するのに寄与するという報告が散見されており、これを応用してこの間葉系幹細胞を体内に移植して様々な疾患を治療する試みが基礎実験のみならずヒトにおいても例えば脳梗塞治療などに既に臨床応用され始めている。間葉系幹細胞は一般に骨髓などから作製され、その際の侵襲も強くまた一度の処理で得られる間葉系幹細胞も限られたものであることが課題であった。これに対して DFAT は間葉系幹細胞と同等の性質を持ちながら局所麻酔下に 1 g の脂肪組織を採取出来れば細胞の性質上、その後大量調製が可能であるため、侵襲や組織破壊が非常に少なく、心不全や高齢患者からも採取・調製が可能である。さらにまた癌化などのリスクも他の移植細胞原と比べても格段に少なく、まとめると安価で安全で低侵襲であり大量調整が可能であり、間葉系幹細胞による疾患治療の移植細胞原として非常に期待の持てる治療ツールである。一方現在、慢性進行性腎障害への根治的治療法は皆無に等しく、透析患者数の増加にもつながり社会問題化されており新しい治療法が期待されている。またヒトの慢性進行性腎障害を起こす疾患のうち、慢性腎炎の治療はステロイド療法が主体であるが、特に ANCA 関連腎炎は繰り返し再発し、最終的には末期腎不全、最悪死に陥る最も予後不良疾患の一つである。我々は DFAT 細胞移植によりこの ANCA 腎炎モデル動物の進行性腎障害に対する作用を検討し、DFAT による免疫抑制作用を介して、腎炎モデルの病態を改善する事を見出した。(Maruyama et al. Stem Cell Res Ther 2015)。また平成 27 年～29 年度の科学研究費(15K09280)「進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞移植治療の開発」にて免疫抑制作用に TSG-6 の発現が関与している事を見出した。しかし我々のこれまでの複数回の検証では DFAT 細胞移植において静脈投与された DFAT は殆ど肺にトラップされ、障害臓器の腎臓への集積は確認されず、上記のような現象が DFAT と障害臓器である腎臓と直接の細胞

### 〔5 研究目的 (つづき)〕

間インターアクションがない環境でどのように引き起こされるのか、細胞分子レベルでは依然不明のままであった。一方、興味深いデータとして、この DFAT の培養上清中に、細胞間コミュニケーションに関与するエクソソームが高純度に確認され、その内部に T リンパ球の増殖抑制や制御性 T 細胞分化抑制に関わるとされる miRNA が確認され、DFAT の分泌するエクソソームは種々の免疫調整作用を有するというデータを我々の研究室は得た。その内容として T 細胞の増殖を制御する作用が報告されている miRNA-20a-5p、miRNA-17-5p、ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞の分化誘導する miRNA-26a-5p、miRNA-100-5p、Th17 細胞への分化誘導を抑制する miRNA-20b-5p の発現をエクソソーム内に確認している。この *in vitro* の結果より *in vivo* においても DFAT 移植がエクソソームにという液性因子を通じて免疫調整を発揮する可能性は十分にある。本研究では DFAT 投与による病態改善の機序をエクソソームを含め改めて検証するとともに、抽出されたエクソソーム投与で細胞投与と同等に病態が改善するかを検証して将来の慢性腎臓病治療の開発の一助となることを目的とする。

## 6 研究概要

我々は平成 27～29 年度の科研費(15K09280)、平成 30～令和 2 年度の科研費(18K08255)により予後不良の ANCA 腎炎を始め免疫性腎炎が脱分化脂肪細胞(DFAT)移植で改善する事を見出した。抗炎症物質 TSG6 の発現やマクロファージの M1 から M2 へ形質転換による抗炎症物質産生等、移植による免疫調整作用が機序として考えられた。一方我々の研究室は DFAT から分泌されたエクソソームが免疫調整作用に関与している結果を得た。そこで目的として DFAT 移植後の血液中エクソソーム分泌量について、更に内部の発現物質について検討する。腎炎改善の機序をこれらの結果で明らかにして、細胞を直接移植するよりも安全で確実な治療法開発につなげる。方法として、SCG マウスに DFAT を移植後、血液中のエクソソームを抽出して分泌量について、内部の RNA 抽出し miRNA の発現解析を網羅的に行う。その後エクソソーム内に発現して腎炎を改善させると思われる物質の投与やエクソソーム自体の投与で病態の改善がみられるか検討する。以下その具体的方法を簡潔に記す。

### 1) 実験に使用する SCG/ThpNkc マウスの繁殖

SCG/ThpNkc マウスは他のマウスと違い、生命力の弱いマウスである。発売元も大阪のメーカーであり輸送が必要であった。そのため同マウスを輸送後は体力低下でそのまま死亡することもまれでなく、実験で使用する場合は輸送後、良好な環境におきその後繁殖した次世代マウスを使用することが必要になった。また繁殖後も本マウスは約 8 週齢より糸球体腎炎および血管炎を発症するため、雌親の授乳が困難であるため、ddy マウスを同時期に同数交配し里親として使用した。5 週齢の SCG/ThpNkc マウスを一週間の順化期間後、繁殖し、実験用マウスを作成する。繁殖では 1 回の繁殖で約 5 頭の出産が予想される事から、実験に使用する 41 頭を得るためにはメス 9 頭の交配が必要となった。

### 2) 7 週齢の SCG/ThpNkc マウスに ddy マウス由来 DFAT をそれぞれ $1 \times 10^6$ 個/頭、 $1 \times 10^5$ 個



## 〔6 研究概要 (つづき)〕

/頭、 $1 \times 10^4$ 個/頭の割合で各4頭ずつ静脈より細胞移植を行った。更に移植後の体内分布を検討する為、PKH26GL でラベルした DFAT を  $10^5$ 個/頭の割合で移植した。

3) 細胞移植後1カ月飼育した。その間1週間おきに体重測定、畜尿を施行した。1日尿蛋白量と定性試験にて潜血反応の経過を観察した。

4) 移植1カ月後、ddy マウス由来 DFAT を移植した群では生化学的検査として血液中の BUN、Cre、ANCA、ANA、WBC、CRP、IL-1、6、8、TNF- $\alpha$ 、TSG-6 濃度を ELISA 法で測定した。腎臓と肺について Real-time PCR 解析、Western blot 法を用いて免疫制御分子として TSG-6・IDO を、Th1-type cytokine として IFN- $\gamma$ ・TNF- $\alpha$  を、M1 マクロファージ関連サイトカインとして MCP-1・IL-6・IL-12 を M2 マクロファージ関連サイトカインとして CCL17・IL-4・IL-10・mannose receptor の発現の変化を観察した。これにより DFAT 細胞移植が免疫系のどの部位に作用するかを考察した。

5) 免疫毒性として代表的なのが移植片対宿主病(GVHD)である。この症状として代表的な皮膚病変(手のひらや足の裏、四肢や体幹の赤い斑点の有無、全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ、脱落の有無)、消化器病変(食欲低下、嘔吐、下痢等)、肝臓病変(黄疸や意識障害)などが移植後の実験動物に診られないか注意深く観察した。以上の結果を踏まえて免疫性腎炎への DFAT 細胞移植療法について効果の有無や作用機序、免疫毒性を中心とした安全性について多角的に判断した。DFAT 投与細胞数、DFAT 投与期間などの細胞治療としてのデータを蓄積し、DFAT 移植の最適治療条件を確立した。

6) DFAT から分泌されるエクソソームについて実験計画について以下の通りとした。In vitor の系として DFAT を培養してその培養上清中においてサイズ排除クロマトグラフィー法を用いてエクソソームの回収を行った。培養上清(DMEM) 15ml を 15ml tube で  $4^{\circ}\text{C}$ 、1500 g、15~30分遠心、15ml tube の上清 2ml を 2ml tube(1Sample 各9本)へ移し、 $4^{\circ}\text{C}$ 、10000 g、10分遠心、Amicon 限外濾過フィルター(Cut off100kDa)を用いて、MilliQ Water 15ml をいれて 4000 g、10分遠心し、フィルターの前処理を行い、100kDa Amicon Ultra-15 に c) の 15ml DFAT 培養上清を加えた。以上より絵得られた DFAT 培養上清濃縮液 0.5ml を qEV カラムの上から注入し抽出した。メイワフォーシス株式会社のナノ粒子マルチアナライザーを使用して培養上清、血清中、肺組織、腎組織中の miRNA について測定を行った。In vivo の系として以下のとおり計画した。移植1カ月後、メイワフォーシス株式会社製の qEV オートマチックフラクションコレクター(AFC) およびエクソソーム抽出キット(qEV)を用いて血液のエクソソームを抽出する。抽出産物がエクソソームであることを確認するために走査電子顕微鏡観察およびウェスタンブロット法によるエクソソーム特異的マーカーである CD63 のバンドについて発現解析を行う。エクソソームの存在を確認後、SeraMir<sup>TM</sup> Exosome RNA Amplification Kit (SBI、SeraMir) を用いて total RNA を抽出し、バイオアナライザ(Bioanalyzer RNA6000 Pico) で total RNA の解析、並びに Agilent Technology 社製のオリゴ DNA マイクロアレイを用いて miRNA について我々の予備実験の結果を始め更に網羅的解析を行う。得られた miRNA をリアルタイム RT-

## 〔6 研究概要 (つづき)〕

PCR 法を用いてその発現を確認する。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

移植後の DFAT の体内分について、PKH26GL でラベルした DFAT は投与後 1 時間において DFAT の肺でのトラップが確認され、その他の臓器への分布は認めなかった。間葉系幹細胞が傷害臓器に集積して傷害臓器が修復される内容の既報があるため、腎臓の周囲または腎臓の内部に DFAT の存在が見られることを予想していたが、静脈注射された DFAT はほぼすべてが肺にトラップされている結果であった。肺の抹消血管径と DFAT の細胞径は後者の方が大きく物理的に肺を突破することが出来ないのかもしれないが、既報では同様の実験で障害の腎臓に間葉系幹細胞が集積していると報告しているものもあったが我々の結果はその限りではなかった。その後 1 週間、2 週間と徐々に肺にトラップされ DFAT 数は減少していったが、この間その他の臓器への移行は認めなかった。

移植細胞数については  $1 \times 10^5$ /個投与した群が最も生存率、治療成績が良く今回の結果ではこの方法が最適と考えられた。以下データは DFAT を  $1 \times 10^5$ /個投与した結果について述べる。生存率については DFAT を移植した群が治療 4 か月後 100% だったのに対して移植しなかった疾患群が 66% と低下しており、移植したことによる生存率の改善を認めた。蛋白尿については腎炎群よりも DFAT 投与群の方が蛋白尿の改善を認めた。腎臓組織の評価として、組織 GIS(糸球体障害指数)は腎炎群と比較し、DFAT 投与群で有意な低下を認めた ( $P=0.018$ )。一方、尿細管の障害度を表す指数である TIS では腎炎群および DFAT 投与群において有意な差は認めなかった。腎機能の評価として、血清 BUN 値と血清 Cr 値について腎炎群と DFAT 投与群で差を認めなかった。また ANCA 腎炎発症時に上昇する血清 MPO-ANCA 値は腎炎群と比較し、DFAT 投与群で低下傾向であったが、有意な差は認めなかった。腎臓での TSG-6 の mRNA 発現は腎炎群と比較し、DFAT 投与群において有意な発現の亢進 ( $P=0.041$ ) を認めた。TSG-6 の発現を免疫組織学的に観察した。染色性は腎炎群と DFAT 投与群で糸球体において同等であった。一方、腎間質での TSG-6 の染色性は、腎炎群と比較し、DFAT 投与群において、近位尿細管と遠位尿細管の両方において亢進を認めた。また CD44 の発現は、DFAT 投与群で低下傾向であった。免疫調整物質である IL-10 の発現は DFAT 投与群で増加傾向であり、PGE2 の発現は、腎炎群と比較し、DFAT 投与群で増加傾向であった。IL-1 $\beta$  の発現は両群で差を認めず、TNF- $\alpha$  の発現は腎炎群と比較し DFAT 投与群で低下傾向であった。また M1 マクロファージのケモカインである MCP-1 の蛋白発現は、腎炎群と比較し、DFAT 投与群において有意な発現低下 ( $P=0.04$ ) を認めた。M2 マクロファージに発現するケモサイトカインである CCL-17 の蛋白発現は、腎炎群と比較して DFAT 投与群で有意な発現亢進 ( $P=0.04$ ) を認めた。real-time PCR 法で ICAM、VCAM においては両群に優位な発現の差を認めず、脾臓細胞における Activated Treg の発現は両群に有意差を認めなかった。

## 〔7 研究結果（つづき）〕

ここまでの結果をまとめると移植された間葉系幹細胞と類似する DFAT が免疫性腎炎を改善する機序として、抗炎症作用をもつ TSG-6 の発現亢進と、M1 マクロファージから M2 マクロファージへの形質変換の誘導が病態の改善に関与していると考えられた。また DFAT についての催奇形性であるが、肺には DFAT がトラップされた後も肺への腫瘍形成などは認められず、現時点での DFAT による催奇形性は認められなかった。

移植による免疫毒性の一種である GVHD を考える手のひらや足の裏、四肢や体幹の赤い斑点の有無、全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ、脱落的有無といった皮膚病変や、食欲低下、嘔吐、下痢等の消化器病変、黄疸や意識障害といった消化器病変などが移植後観察されることは無かった。

これらより、DFAT の細胞移植が難治性の自己免疫性腎炎に治療効果、副作用の両面から考えても臨床応用が可能であることが示唆されたと考えた。

我々の結果では DFAT 細胞移植により TSG-6 の発現が更新してそれが免疫抑制作用を示すことが腎障害改善のメカニズムの概略であるが、この TSG-6 がどのような形で発現が更新して更に免疫抑制についてどのような役割を担っているかはいくつかの報告があるが、まだ完全には解明できていない<sup>1,2)</sup>。

また近年、間葉系幹細胞由来のエクソソーム分泌により種々の効果が得られることが報告されている<sup>3,4)</sup>。この DFAT も間葉系幹細胞の一種であり、今回の治療効果のメカニズムがエクソソームによる免疫調整作用である可能性は十分あり得ると考えた。

エクソソームについての結果を以下に記す。DFAT の培養上清中や治療マウスの血清内にエクソソームについて検討した。SEC 法による細胞外小胞抽出キット (qEV) で DFAT 培養上清中のエクソソームを回収した結果、 $6.38 \times 10^9$  個/ml の豊富なエクソソームが確認された。TSG6 に関係ある miRNA として既報では、miR214-5p、miR-1247-3p、miR-326-5p、miR204-3p、miR-23b-3p などがある<sup>5,6)</sup>。今回の我々の検証でも miR-23b-3p は DFAT および培養上清投与の両方において腎と肺、血清共に発現亢進を認めており既報どおりの結果であり同エクソソームが DFAT 細胞移植によりまたは DFAT の培養上清中に産生されそれが肺、腎臓に作用してさらには TSG-6 の産生亢進、組織修復に寄与した可能性があり得る。miR214-5p は既報ではその発現が低下してそれにより TSG-6 が亢進すると報告されている。我々の結果では DFAT 移植により血清や腎臓でその発現が低下していたのは既報どおりであったが肺においてはその逆に発現が亢進していた。miR-326-5p は既報ではその発現が亢進するとされている。我々の結果では腎臓ではその発現が亢進も肺ではむしろ低下していた。miR204-3p も既報では亢進すべきであるが我々の結果では血清、腎臓、肺共に低下を認め既報とは逆の結果であった。miR-1247-3p は既報では亢進すべき遺伝子であるが我々の結果では血清では亢進していたが腎臓、肺は低下していた。既報と違う点は今後検討の余地があるが miR-23b-3p は我々の結果は既報と同一であり、TSG6 を更新させるメカニズムとしてこの遺伝子が最も寄与している可能性があり、DFAT を

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

直接細胞移植しなくても培養上清中にこの miRNA の発現が確認できれば、培養上清の投与でも効果が得られる可能性があると考えられた。

さらに既報には無い TSG6 に寄与する miRNA として DFAT の治療を行った個体に比して無治療の個体よりも miR-23a-3p、miR-30a-5p が肺、腎臓とも発現が亢進しており、miR-181a-5p が低下している結果が得られた(図 1)。TSG6 発現亢進につながる既報にはない新規の miRNA の可能性があり注目すべき結果であり今後頭数を増やして結果の蓄積を行っていく予定である。

DFAT の細胞治療において当初は腎臓に直接投与を行い、腎臓を改善することを当初は考えて動物モデルでは腎動脈から直接投与することも行っていた。ある程度の効果はそれでも得られたが、ヒトにそれを行うことを考えると侵襲が大きくそこで静脈による全身投与を別に行った結果腎臓に直接投与するよりも治療成績が良好で、侵襲も腎臓に直接投与するよりもはるかに少なくより臨床応用できる可能性が高いと考えられた。しかし投与された DFAT がほとんど肺でトラップされ腎臓に到達しないにも関わらず腎症が改善する機序の詳細が不明で、臨床応用するためにもその探索は必要と考えて DFAT を静脈から投与することを前提に研究を継続した。過去の我々の経験では細胞を静脈に投与した場合に DFAT ではその数によっては肺に塞栓が起きたためか、注射後すぐに死亡する動物モデルが観られた。間葉系幹細胞をヒトに投与して疾患を投与する場合、ヒトでも同様のことが過去にも報告されておりその安全性を担保することが臨床応用では絶対的に必要である。そこで今回 DFAT から産生される DFAT よりはるかに微小で塞栓の可能性はほぼ皆無でその点で安全性が遥かに高いエクソソームによる治療を考えて今回の結果を得た。特定のエクソソームを今後作成する技術は現在は無いが今回の我々の研究で例えば DFAT の培養上清中に既報の miR-23b-3p や今回我々が見出した miR-23a-3p、miR-30a-5p が確認され、その培養上清中のエクソソーム注射を行えばその後抗炎症、免疫作用を有して治療メカニズムの本態と考えている TSG6 の発現を亢進させて、細胞の直接投与よりも安全に治療が行える可能性が今回の研究で示唆されたものであると考える。

尚、今回コロナ禍の影響もありマウスの供給が思った時期に届かないこともあり実験が予定よりも遅延したため、今年度になりさらにマウスの供給を受けて今までの得られた結果の再検証や、疾患改善に必要なエクソソームをより選択的に回収する試みとして DFAT を疾患群に注射後の血清中のエクソソームを回収、保存してそれを新たに疾患群に投与した場合、今までよりも劣らないもしくは良好な治療成績が得られるかを検討する予定で現在マウスの供給を待っているところであります。新しい結果が出ましたら追ってご報告申し上げます。今回研究の機会を与えて頂きました本学のすべての関係者の方々に心より感謝致申し上げます。

	解析 No.	Test(分子)	Control(分母)	$\Delta\Delta Ct$ ( $\text{Log}_2 [\text{Test}/\text{Control}]$ )	Fold Change ( $[\text{Test}/\text{Control}]$ )	Reguration	
mmu-miR-23a-3p	G1	No5 kidney	No4 kidney	-0.92	1.89	1.89	up
	G2	No5 lung	No4 lung	-0.18	1.13	1.13	up
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.89	1.85	1.85	up
	G4	No6 lung	No4 lung	-0.05	1.04	1.04	up
mmu-miR-30a-5p	G1	No5 kidney	No4 kidney	-0.65	1.57	1.57	up
	G2	No5 lung	No4 lung	-1.10	2.14	2.14	up
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.55	1.46	1.46	up
	G4	No6 lung	No4 lung	-0.98	1.97	1.97	up
mmu-miR-181a-5p	G1	No5 kidney	No4 kidney	0.14	0.91	1.10	down
	G2	No5 lung	No4 lung	0.38	0.77	1.30	down
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.18	1.13	1.13	up
	G4	No6 lung	No4 lung	0.26	0.84	1.20	down

(図 1)

## 【参考文献】

- 1). Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein ameliorates chronic liver damage by promoting autophagy formation in mice. Sihyung Wang, Chanbin Lee, Jieun Kim, Jeongeun Hyun, Minso Lim, Hyuk-Jin Cha, Seh-Hoon Oh, Yung Hyun Choi and Youngmi Jung. *Exp Mol Med.* 2017 Sep 22;49(9):e380. doi: 10.1038/emm.2017.140.
- 2). TSG-6 Downregulates IFN-Alpha and TNF-Alpha Expression by Suppressing IRF7 Phosphorylation in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. L. Kui, G. C. Chan, and P. P. W. Lee. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:7462945. doi: 10.1155/2017/7462945. Epub 2017 Mar 6.
- 3). Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. DONALD G. PHINNEY<sup>a</sup> MARK F. PITTENGER<sup>b</sup>. *Stem Cells.* 2017 Apr;35(4):851-858. doi: 10.1002/stem.2575. Epub 2017 Mar 10.
- 4). Secretomes from Mesenchymal Stem Cells against Acute Kidney Injury: Possible Heterogeneity. Kenji Tsuji, Shinji Kitamura, and Jun Wada. *Stem Cells Int.* 2018 Dec 16;2018:8693137. doi: 10.1155/2018/8693137.
- 5). Upregulated TSG-6 Expression in ADSCs Inhibits the BV2 Microglia-Mediated Inflammatory Response. Yang Hu, Gaigai Li, Ye Zhang, Na Liu, Ping Zhang, Chao Pan, Hao Nie, Qi Li, and Zhouping Tang. *Biomed Res Int.* 2018 Nov 21;2018:7239181. doi: 10.1155/2018/7239181. eCollection 2018.
- 6). Bone marrow-derived humoral factors suppress oxidative phosphorylation, upregulate TSG-6, and improve therapeutic effects on liver injury of mesenchymal stem cells. Takashi Miyaji, Taro Takami, Koichi Fujisawa, Toshihiko Matsumoto, Naoki Yamamoto and Isao Sakaida. *J Clin Biochem Nutr.* 2020 May;66(3):213-223. doi: 10.3164/jcbn.19-125. Epub 2020 Mar 6.

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和4年4月4日

日本大学学長 殿

氏 名：辻 泰弘

資格・所属：教授・薬剤師教育センター

実施研究所：薬学部・薬学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

疾患の解明と個別化投与を成功に導く人工知能と薬物動態の異分野融合アプローチ

## 2 研究期間

令和2年度～令和3年度

※令和2年度～令和4年度（※特例措置により上記期間を変更している場合に記入すること）

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 代 表 者	辻 泰弘	薬学部・教授	● 研究計画の立案および実施などの研究総括 ● データ集 ● 情報集約と総合的な解析・情報発信
研 究 分 担 者	細野 裕行	理工学部・教授	● 人工知能を利用した情報の解析 ● 研究実施で生じた問題の解析
	松本 宜明	薬学部・教授	● 薬物動態解析 ● 人工知能を組み込んだ投与設計モデルが患者治療に及ぼす影響の調査 ● 研究結果の妥当性の評価
	関 弘翔	理工学部・助教	● 人工知能を利用した情報の解析 ● 研究実施で生じた問題の解析

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 80 %】

#### 5 研究目的

薬物治療の最終ゴールは、患者における医薬品の有効性・安全性を担保することである。非臨床データからヒトへのブリッジング、患者集団という不均一な集団における薬剤応答性の個人間の変動を解明することは大きな課題である。このような状況下、情報科学と生命科学の分野に革命が起こっている。それが人工知能 (AI)、特に深層学習 (ディープラーニング) と呼ばれる技術の登場である。ディープラーニングは、人間の脳を作っている神経経路の基本部位であるニューロンとシナプスの働きにヒントを得て作り上げられたニューラルネットと呼ばれる数学モデルである。そのニューラルネットを多層に、そして複雑な経路として積み上げ、大量のデータを使い学習させることにより、これまで専門家による分析や匠の経験に頼っていた特徴抽出やパターン認識分析を自動的に行うことが可能になってきた。しかし、多くの AI は高精度な反面、予測モデルは複雑であり、出力の根拠 (生命科学としての根拠) を明確に提示することが困難である。そこで申請者らは、AI のブラックボックス性を改善できれば、疾患の特定や薬剤選択に科学的根拠に基づく理由付け・裏付けが可能になると仮説を立てた。

本研究の目的は、臨床試験データおよびリアルワールドデータ (RWD) を基盤に『薬物体内動態』と『深層学習手法』を新機軸とし、画期的な医療機器プログラムを開発することである。

#### 6 研究概要

##### 網羅的な医療情報と AI を融合する異分野横断型研究

本研究は、個別化医療に AI の技術を応用する足掛かりとなることが期待される。海外に先駆け 2 課題に取り組み、疾患の解明と次世代の薬物個別化投与設計手法を実現する。

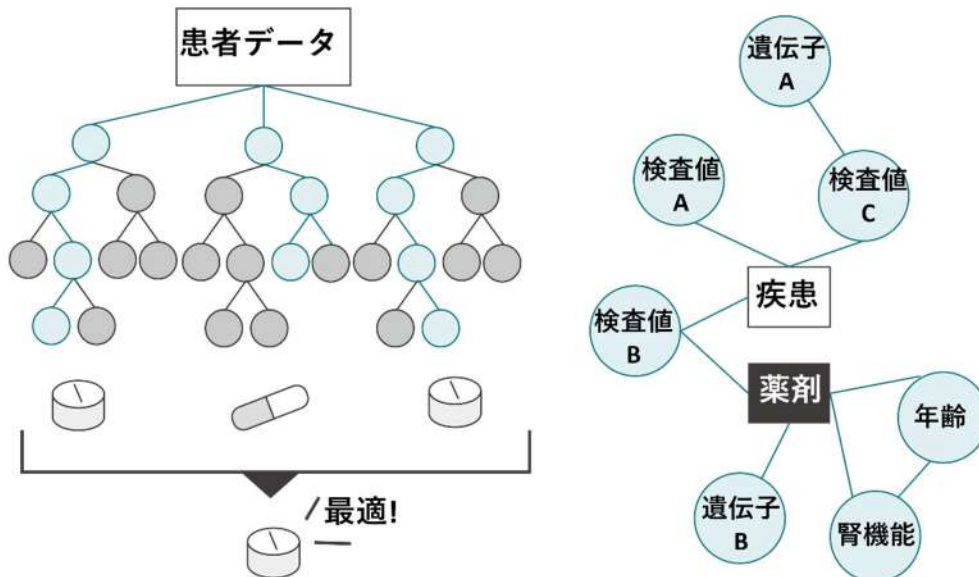
- ①ランダムフォレストを用いた疾患の原因に関する共変量探索と至適投与薬剤の提案 (令和 2 年度)
- ②ディープラーニングによる薬物血中濃度・治療効果の個別化モデル (令和 3 年度)

令和 2 年度は当初の計画通り、「①ランダムフォレストを用いた疾患の原因に関する共変量探索と至適投与薬剤の提案」に焦点をあて 2 つの研究課題を実施した。令和 3 年度はさらに研究を発展させ「ディープラーニングによる薬物血中濃度・治療効果の個別化モデル」の課題に取り組んだ。研究全体の概要図を次頁に示す。

①ランダムフォレストを用いた疾患の原因に関する共変量探索

ランダムフォレストを応用して  
至適薬剤・疾患関連因子を探索

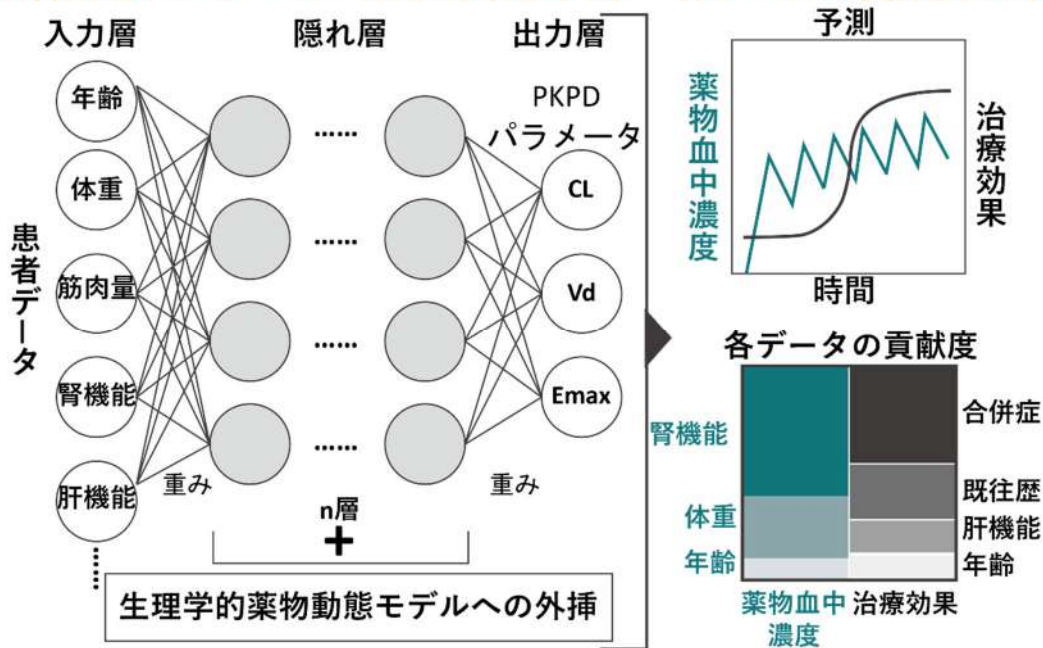
最適薬剤の判断根拠や  
疾患に関わる因子を可視化



②ディープラーニングによる薬物血中濃度・治療効果の個別化モデル

ニューラルネットワークを応用して  
薬物動態パラメータ・治療効果を予測

予測結果に対する  
各データの貢献度を可視化





## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

令和 2 年度は当初の計画通り、「①ランダムフォレストを用いた疾患の原因に関する共変量探索と至適投与薬剤の提案」に焦点をあて 2 つの研究課題を実施した。

### ①-1 機械学習に基づく分類木を用いたリネゾリド誘発血小板減少症予測

リネゾリド誘発性血小板減少症を予測する投与早期の予測因子及びカットオフ値を機械学習の一つである分類木により同定した。本研究の成果は以下の学術雑誌に掲載された。Takahashi S, Tsuji Y, Kasai H, Ogami C, Kawasuji H, Yamamoto Y, To H, Classification tree analysis based on machine learning for predicting linezolid-induced thrombocytopenia J Pharm Sci 110(2021), 2295-2300, 2021.5<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.02.014>

### ①-2 ビッグデータを用いた 2 型糖尿病治療薬の併用効果の検証

2 型糖尿病治療薬の第一選択薬として繁用されているメトホルミンが他剤の有効性(あるいは安全性)の反応に、どの程度影響しているのかを 355,400 人の医療情報データから包括的に数理モデル解析した。本研究の成果の一部は第 42 回日本臨床薬理学会学術総会(2021 年)で発表し、優秀演題賞を受賞した。現在は英語論文執筆に取り掛かり令和 4 年度前期の投稿を目標としている。

令和 3 年度は前年度からさらに研究を発展させ当初の予定通りに「②ディープラーニングによる薬物血中濃度・治療効果の個別化モデル」の研究を実施した。最初に述べておくと、本研究の実施途中で患者情報(診療情報)データの欠損値の取り扱いやデータのバラツキをどのように処理するか課題が生じた。そこで研究期間の延長申請を事前に行った。令和 4 年度は患者情報データの特徴を学習し疑似データを生成する試みまで行う予定である。具体的には以下の取り組みに着手することを計画している。

①Generative Adversarial Networks (GAN)を応用して疑似患者データ生成

②次元削減手法の UMAP を応用して実患者データと疑似患者データの類似具合を可視化

## ②ディープラーニングによる薬物血中濃度・治療効果の個別化モデル

### 背景

コンピュータ技術の発達に伴い、ビッグデータや複雑な数理モデルを扱うことが可能となり、人工知能やそれを支える機械学習などのコンピュータ/データサイエンスは飛躍的に進歩した。医療領域においては、CT やレントゲン等の医療画像や患者情報を用いた疾患の診断、創薬、およびドラッグリポジショニング等への利活用に対して注目が集まっている。数は限られているものの、ファーマコメトクスにおいても人工知能および機械学習を応用した研究例が報告されている。例として、山下らは母集団薬物動態解析に gene expression programming を応用することで共変量探索を自動化することが可能であり、またより当てはまりの良い有意なモデルが構築されたと報告した。その他にも、決定木などのツリー系統のアルゴリズムや人工ニューラルネットワーク (artificial neural network, ANN) を応用した事例が報告されている。

現在の人工知能ブームの契機は、深層学習 (deep learning, DL) が可能になったことであると

知られている。DL は、生物の神経伝達系を模倣した機械学習モデル、ディープニューラルネットワーク (DNN) を用いた機械学習法である。DNN は、ANN における隠れ層を多層化 (ディープに) したモデルであり、これらのモデルは、入力層、隠れ層、および出力層の 3 種類の層で構成される。各層にはニューロンと呼ばれる複数のユニットが存在し、重み付けした各ユニットの値の合計が次層へと渡される。ANN および DNN を用いることで、誤差逆伝播により各データの特徴を自身で学習することが出来る。これにより、画像データなどの特徴抽出が難しいデータにおける解析精度が向上した。

ANN および DNN をファーマコメトリクスに応用することで、これまでは発見できなかったデータの特徴を見つけ出し、薬物血中濃度および有効性・副作用の予測精度を向上させることが可能であると期待される。一方で、これらの機械学習モデルは、ファーマコメトリクスに応用する上で二つの大きな欠点を抱えている。一つ目は、入力から出力までの過程がブラックボックス化されてしまうため、モデルの解釈可能性が著しく低下してしまうことである。医学・薬学的に妥当なモデルとなっているかの判断が難しく、実際の医薬品開発や医療現場で活用するには問題がある。二つ目は、時系列データの取り扱いが難しいことである。ファーマコメトリクスでは、経時的な薬物動態・薬力学の変動を主に取り扱う。Recurrent neural network などの ANN および DNN で時系列データを取り扱う技術も存在するが、モデルはより複雑になり、解釈可能性は更に低下してしまう。ANN を薬物血中濃度の予測に応用した事例は、既に山村らにより報告されているが、採血タイミングが固定されており、限られたタイミングにおける薬物血中濃度しか予測することが出来ない。

モデルの解釈可能性はモデルの予測精度が上がるほど低下する傾向にあり、DL だけではなく、近年汎用されているアンサンブル学習や勾配ブースティング法においても問題となっている。そこで、出力に対する各特徴量 (入力値) の貢献度を数値化する手法の一つとして SHAP が提唱されている。SHAP は、協力ゲーム理論における shapley 値を機械学習における各特徴量の貢献度を算出する手法として拡張したものである。SHAP 値は、各特徴量を加えた場合とそうでない場合の予測値の差、すなわち各特徴量を加えることによる影響を全ての組み合わせについて求め、平均を取ることで算出される。SHAP 値を算出することで、どの特徴量が予測値の出力に対して影響が大きいのか、およびその影響の正負を知ることが可能である。

## 目 的

本研究の目的は、(1) ニューラルネットワークを経時的な薬物動態の予測に応用する手法を開発し、その有用性を評価すること、(2) SHAP を応用することで、解釈可能な透明性のある人工知能モデルを開発することの 2 つである。

## 方 法

比較対象のモデルとして、シクロスポリンの母集団薬物動態モデル (popPK model) を採用した。患者数は 36 名、薬物血中濃度の採血ポイント数は 89 ポイントであった。既報における最終モデルは、1 次吸収過程を含む 1 コンパートメントモデルであり、クリアランスの共変量とし

て患者の年齢および体重が組み込まれていた。被験者の基本情報および検査値を ANN の入力とし、クリアランス (CL) を出力した。ANN によって推定された CL および既報の分布容積および吸収速度定数の値を 1 次吸収過程を含む 1 コンパートメントモデルの式に代入し、薬物血中濃度の予測値を算出した。薬物血中濃度の予測値と実測値の誤差を算出し、誤差逆伝播法により ANN のパラメータ (重み) を更新した。誤差の評価には mean squared error (MSE) を用い、パラメータの更新には Adam を使用した。また、学習にはミニバッチ法を適用した。ANN-PK model の学習および検証には、Python 数値計算統合環境である Anaconda 3 version 4.8.5 (Anaconda, Inc., Austin, Texas) の下で Python version 3.7.9 を使用した。また、ディープラーニングのフレームワークとして、PyTorch version 1.7.0 (<https://pytorch.org/>) を使用した。ANN によって出力された CL に対する各入力値 (患者情報) の影響を評価するために、学習済みモデルに Kernel SHAP を適用し、SHAP 値を算出した。Kernel SHAP の実行には、shap (version 0.36.0) モジュール内の KernelExplainer を使用した。

## 結果

最終的な ANN model を **Figure 1** に示す。最終的な ANN model における中間層は 3 層であり、各中間層におけるニューロンの数は、一層目が 30 ユニット、二層目および三層目が 60 ユニットであった。中間層における活性化関数には、parametric rectified liner unit を使用した (23)。比較対象の popPK model および最終 ANN-PK model における GOF plot はいずれのモデルにおいても  $y = x$  に対してプロットは均等に分布し、 $y = x$  上に収束していた。

RMSE は、popPK model において 41.1 ng/mL、ANN-PK model において 31.0 ng/mL であった。また、決定係数は pop PK model において 0.932、ANN-PK model において 0.961 とい

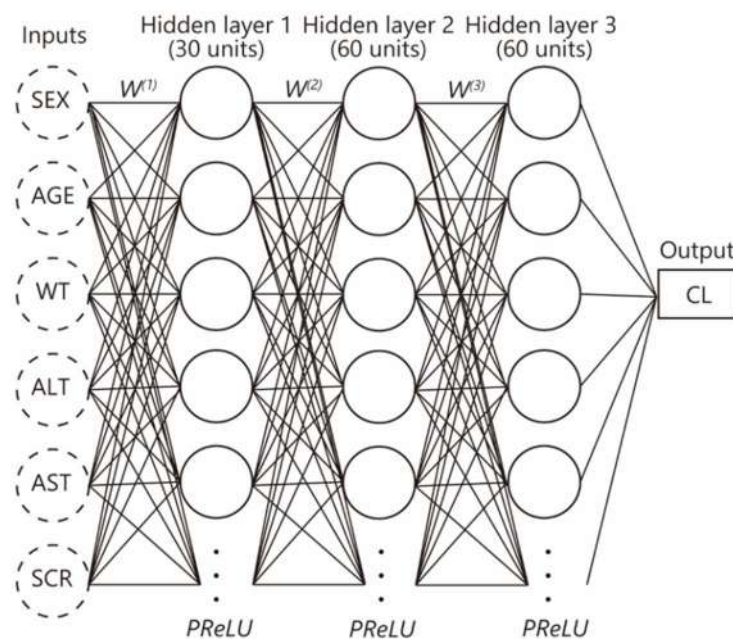


Figure 1 Structure of final artificial neural network (ANN) model

The number of hidden layers in final ANN model was three, and each layer was consisted with 30, 60, and 60 units of neuron. Activation function in hidden layers was parametric rectified liner unit (PReLU).

SEX, sex; AGE, age (year); WT, body weight (kg); ALT, alanine aminotransferase (IU/L); AST, aspartate transaminase (IU/L); SCR, serum creatinine (mg/dL);  $W^{(n)}$ ,  $n^{\text{th}}$  weights in ANN model; PReLU, parametric rectified liner unit.

れのモデルにおいても 1 に近い値を示した。**Figure 2** は各 SHAP 値をプロットしたものであり、赤いプロットは入力の値が大きいことを、青いプロットは値が小さいことを表す。AGE は SHAP 値が負の範囲に赤いプロットが多く、AGE が大きいほど出力される CL の値が小さいことが示された。一方で、WT は SHAP 値が正の範囲に赤いプロットが多く、WT が大きいほど出力される CL の値が大きいことが示された。

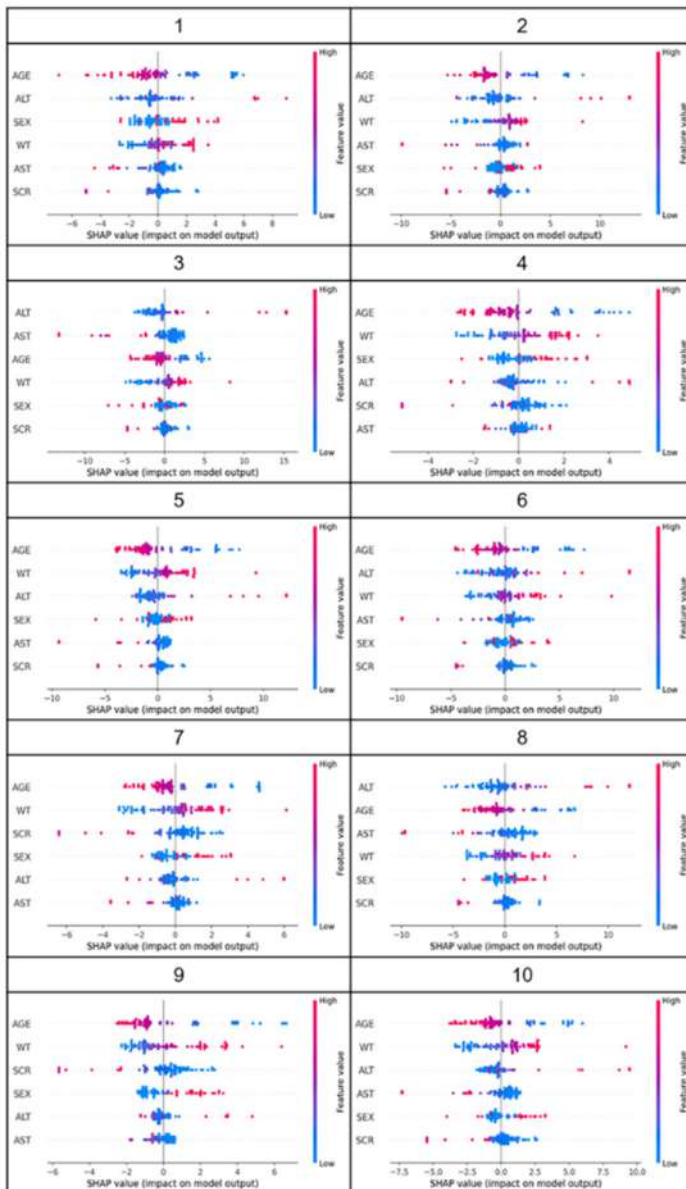


Figure 2 Summary plots of Kernel shapley additive explanations (SHAP) in 10 of 36 training

Influence of each input on estimating clearance (CL) in 10 of 36 training is shown as colored plot. Red or blue plots represent higher or lower values of inputs. If the red plot exists on positive range of SHAP values, the higher CL value was output with the higher input value.

ALT, alanine aminotransferase (IU/L); AST, aspartate transaminase (IU/L); AGE, age (year); WT, body weight (kg); SEX, sex (1 for male, and 0 for female); SCR, serum creatinine (mg/dL)

結 論

本研究で構築した ANN-PK model は、時系列データを取り扱うことが可能であり、従来の popPK model と比較して高い予測精度を示した。また、SHAP を応用し PK パラメータの出力に対する各入力値の貢献度を算出することで、構築したモデルの科学的な妥当性を評価することが可能であった。

4,200 文字（図 2 枚含まず）

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和4年5月6日

日本大学学長 殿

氏名： 佐藤 佑介

所属・資格： 商学部・准教授

実施研究所： 商学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

アスリートのための次世代型バーチャルリアリティ・トレーニングシステムの開発

## 2 研究期間

令和3年度 ～ 令和4年度

※令和 年度 ～ 令和 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

	氏名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	佐藤 佑介	商学部・准教授	研究の統括 生理・心理指標評価
研 究 分 担 者	水島 宏一	文理学部・教授	VRトレーニングの作成と応用 アスリートのパフォーマンス評価
	西川 大輔	スポーツ科学部・教授	アスリートのパフォーマンス評価 選手へのフィードバック
	遠藤 幸一	商学部・准教授	VR用映像撮影の統括 VR環境の構築
	高寄 正樹	生産工学部・准教授	脳活動、生理指標の解析と評価
	深見 将志	商学部・准教授	VR環境の構築 VRを利用した選手への介入
	越澤 亮	経済学部・専任講師	脳活動評価と統計処理

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度：40%】

#### 5 研究目的

本研究では、アスリートが競技大会でより良いパフォーマンスを発揮するための心理的スキルの獲得を目指し、自由に移動可能な VR 空間を利用したトレーニング法(iVRTS)を開発する。以下、本研究の具体的な目的である。

1. 実際の競技会場を自由に移動可能な VR 空間を構築する。
2. 構築された VR 環境が、アスリートの生体情報におよぼす影響を明らかにする。
3. iVRTS が実際の競技場面においてどの程度有効であるかを評価する。

令和 3 年度は iVRTS の開発を目指すために 1. と 2. の目的達成を目指した。

この研究を推進することは、メンタルトレーニングの問題として挙げられる「トレーニングが実践される場面と、緊張をとまなう実際の競技場面の乖離」(笹場ほか, 2016) の解決につながる事が期待される。

#### 6 研究概要

スポーツにおけるバーチャルリアリティ(以下、VR とする)に関わる研究は、急速に拡大している (Neumann et al., 2018)。VR により現実では再現不可能なトレーニング場면을構築することができるからであろう。本研究チームも VR をアスリートのパフォーマンス向上に生かすべく、研究を進めている。具体的には、このシステムを利用し、アスリートの心理的スキルを向上させるための研究である。VR を利用したメンタルトレーニングは、アスリートのパフォーマンス向上につながる可能性をもつ。しかしながら、VR 空間を自由に移動可能なシステムを利用したトレーニングは未開発であり、それによるトレーニング効果についても十分にわかっていない。

本研究では、自由に移動可能な VR 空間を利用したトレーニング法(次世代型 VR トレーニングシステム: Innovative Virtual Reality Training System)(以下、iVRTS とする)を開発する。iVRTS による心拍変動や眼球運動、脳活動等の生理心理学的指標(以下、生体情報とする)を測定し、この新たな手法がアスリートの緊張や集中といった心理状態に生じさせる変化を明らかにする。将来的には本研究で得られた成果を、バイオフィードバック法を用いたトレーニング手法へ応用することを見据えている。本学に所属するアスリートの競技力向上に資するばかりでなく、アスリートらが科学的根拠に基づいて安全にスポーツに取り組める環境の実現に寄与することが期待される。

## 7 研究結果 (4,000字以上記入のこと)

令和3年度には、研究計画通りに①実際の競技会場を利用した自由に移動可能なVR環境の構築と②構築されたVR環境下での生体情報の取得を試みた。これらの目的を達成することにより、令和4年度にはiVRTSを利用した介入研究を行う計画である。

令和3年度初旬から研究計画通りに研究環境を整え始め、予定通りにVR空間の構築や実験、研究成果の発表を行うことができた。令和3年度の研究結果は、以下の研究方法を通して得られた。

### 1. VR空間構築のために撮影された環境

撮影は有明体操競技場で行われた。また、日本大学商学部の教室も撮影された。

全方位が撮影可能なビデオカメラ(QooCam 8K)を利用し、3m以内の範囲において撮影を行った。撮影された場所は、選手席付近等であった。

### 2. 撮影とVR空間構築の手順

撮影に先立ち、VR空間を構築するために必要な情報(会場サイズ等)が計測された。それらの準備の後に、所定の範囲を撮影した。

撮影された映像を利用し、VR空間を構築した(ソリッドレイ研究所社製)。構築されたその空間は、ヘッドマウントディスプレイ(以下、HMDとする)(HTC社製VIVE)を介して視聴可能となった。

2台のベースステーションを利用することにより、HMD着用者(VR視聴者)の実際の動きとVR空間上での動きが同期された。つまり、HMD着用者は、構築されたVR空間内の移動を体験することができた。

### 3. 生体情報の取得に関わる実験

#### ① 参加者

参加者は、健常な男子大学生10名(男子大学生群)と男子体操選手12名(男子体操選手群)であった。実験について説明し、参加への同意を得たうえで実験を行った。実験時の様子等から、一部の参加者は分析対象者から除外された。なお、本研究は日本大学商学部研究倫理審査委員会の承認を受けて実施された。

#### ② 実験環境

実験は日本大学商学部の教室にて行われた。この教室は、VR空間としても構築された場所である。

#### ③ 実験手順

参加者は生体情報を取得するために必要な準備を行った。この間、参加者はほとんどの局面において着席した状態であった。今回、取得された生体情報は3つであった。1つ目は、心拍変動であった(ADI社製)。2つ目は、発汗であった(ADI社製)。3つ目は、脳活動であった(ant neuro製)。

それらの生体情報に加え、心理指標の測定のために二次元気分尺度も利用された。

実験の内容等について改めて説明された後、参加者は実験装置等を着用することによるストレス反応を低減させるために5分程度の安静状態を確保した。



## 〔7 研究結果（つづき）〕

その後、2段階にわたって実験課題が行われた。1段階目は、HMDを装着していない状態（VRを視聴していない状態）での座位の保持であった（以下、実験前安静とする）。2段階目は、座位状態でHMDを装着し、VR映像を視聴する試行であった。視聴したVR映像は2種類であった。1つは、コントロール条件である実験前安静と同じ空間をVRで再現したものであった（以下、VR課題（教室）とする）。もう1つは体操競技場をVRで再現したものであった（以下、VR課題（体操場）とする）。いずれの課題であっても、参加者は頭部を動かし、周囲を自由に見回すことが認められた。

2種類のVR条件は、順序効果を考慮しカウンターバランスをとった。各課題の時間は5分であった。この時間は、体操選手が競技大会において演技を待つおおよその時間から算出した。

## ④ データ分析

各変数についてデータ処理を行った後、交感神経、副交感神経、発汗、 $\alpha$ 波の含有率、 $\beta$ 波の含有率が算出された。合わせて、活性度等の心理指標も計算された。

交感神経と副交感神経は、心電図（胸部双極誘導法）（サンプリング周波数1kHz）から取得された。心電図R-R間隔をLorentz plot法で分析し、交感神経機能としてCSI（cardiac sympathetic index）値を算出し、副交感神経機能としてCVI（cardiac vagal index）値を算出した（Toichi et al., 1997；水落ほか，2001）。発汗の計測には皮膚電気活動（GSR）（サンプリング周波数1kHz）が利用され、皮膚コンダクタンスが算出された。脳活動として、脳波が記録された（サンプリング周波数1kHz）。頭皮上31カ所からCPz電極を基準とした。インピーダンスは20k $\Omega$ 以下とした。common average referencesに基準を変換し、fast Fourier transform（FFT）を実施後、3-30Hz中の $\alpha$ 波帯域（8-13Hz）、 $\beta$ 波帯域（13-30Hz）の含有率を算出した。心理指標として二次元気分尺度が利用された。主観的な活性度（快適な興奮と不快な沈静を両極）、覚醒度（興奮と沈静を両極とする覚醒水準）、安定度（リラクセーションの指標、快適な沈静と不快な興奮を両極）、快適度（快と不快を両極とする覚醒水準）を求めることができる。

それらの変数について、体操競技経験（対応なし：男子大学生群・男子体操選手群）×課題（対応あり：実験前安静・VR課題（教室）・VR課題（体操場）の2元配置分散分析を行った。

これらの方法を通して研究を展開し、以下の2つの研究結果を得た。1つは、実際の競技会場を利用し、移動可能なVR空間を構築したことである。東京オリンピックの競技会場にもなっている有明体操競技場で、実際に体操競技の器械器具が設置されている状況をVR空間として再現した。構築された空間は、この競技場の中央付近であり、男子鉄棒の側方に位置していた。HMD着用者はその空間内で身体や頭部を動かすことにより、競技会場内を自由に眺め見ることができた。撮影からVR空間を構築するまで一連の手続きにより、VR空間構築までの手順も確立された。

そのようにして構築された環境下において視聴者に生じる生体反応を取得することもでき

〔7 研究結果 (つづき)〕

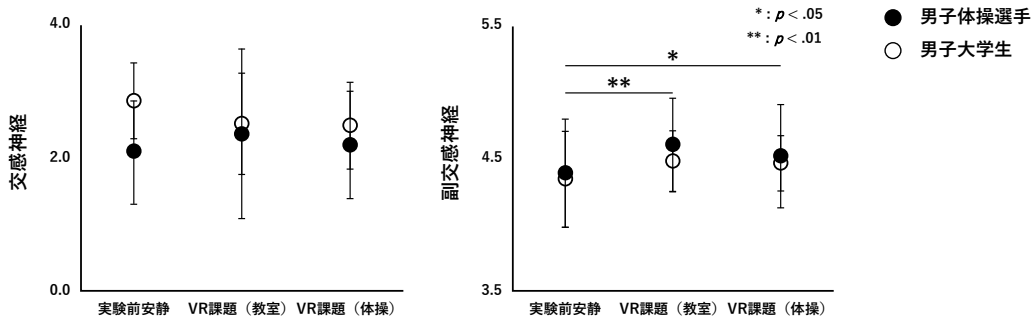


図1 交感神経と副交感神経の平均値と標準偏差

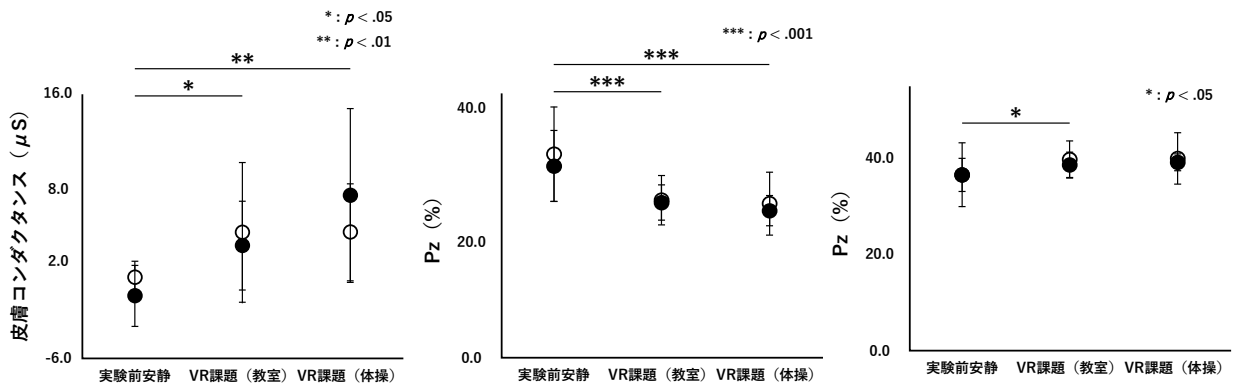


図2 皮膚コンダクタンスの平均値と標準偏差

図3 α波 (左) およびβ波 (右) の含有率 (Pz) の平均値と標準偏差

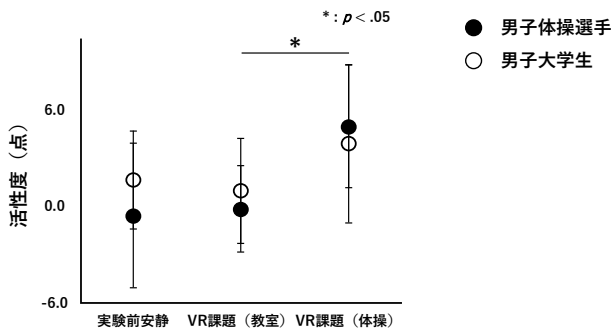


図4 二次元気分尺度 (活性度) の平均値と標準偏差

た。その結果の一部を示したのが図1から図4である。

すべての結果において、課題間に主効果が認められた。体操競技経験の主効果および体操競技経験と課題間の交互作用に有意な差はみられなかった。

副交感神経と発汗 (皮膚コンダクタンス) およびβ波の含有率は、実験前安静よりもVR課題の方が有意に高値を示した。α波の含有率は、VR課題よりも実験前安静の方が有意に低値を示した。二次元気分尺度の活性度では、VR課題 (教室) がVR課題 (体操) よりも有意に低値を示した。

## 〔7 研究結果（つづき）〕

これらの結果、①心拍変動から副交感神経系活動の亢進、②発汗から交感神経系活動の亢進、③脳活動から $\alpha$ 波含有率の低下、 $\beta$ 波含有率の増加、④心理指標から活性度の増加が確認された。これらは、本システムを利用したVR空間が、参加者に心理的变化を生じさせることができることを示している。具体的には、今回のVR環境はリラックスしながら集中した状態を喚起したといえよう。実際の競技会場を基に構築されたVR環境が、参加者の緊張や集中の度合いに影響を与えるのであれば、この環境をメンタルトレーニングに応用することにより、実際の競技場面に汎化されやすい心理的スキルを向上させることができるかもしれない。

今回のVR環境を構築し、それを利用した実験を展開することによってこの環境の改善点も見出された。それは、より競技場面に近い会場でVR空間を構築することの必要性である。VR視聴時に競技経験が自律神経活動に影響を与える可能性（深見，2018）が指摘されているものの、本研究におけるすべての変数について群間の主効果は認められなかった。つまり、今回視聴したVR空間が、男子体操選手にのみ作用するようなものではなかった可能性がある。競技特有のストレス反応を喚起させるためにも、より競技場面に近い環境においてVR空間を撮影したり、他の感覚刺激（深見，2018）を利用したりすることが、その解決策として挙げられる。また、計画通りに生体反応に変化を生じさせることには成功したものの、それは緊張を喚起するというものではなかった。より競技場面に近い環境を利用してVR空間を構築することは、この点からも重要であろう。すでにそれらの課題解決に向けた取り組みも展開している。令和3年度には、世界体操競技選手権大会を利用し、大会中の競技会場をVR空間として構築することを実現している。

令和4年度にはiVRTSの効果を検証するためにも、このシステムを利用した介入研究を押し進める。この研究を展開することは、iVRTSのもつ3つの利点を際立たせる。1つ目は、時間や場所、体調を選ばずトレーニングが可能である点である。2つ目は、疲労や負傷を気にすることなくトレーニングが可能である点である。たとえ負傷していたとしても、このシステムを利用してトレーニングを行うという選択肢が広がる。3つ目は、「緊張をとまなう実際の競技場面」を繰り返しトレーニングすることが可能となる点である。この点については、繰り返し同じ場면을視聴することにより戦略の理解や技術の向上を目的としたイメージトレーニングとしての機能へと波及することが期待される。

さらに本研究では、主たる研究結果とは別に副次的な成果を得た。それは、VR空間を利用した競技大会の記録である。具体的には、今回は東京オリンピック・パラリンピック競技大会の体操競技が開催された有明体操競技場と北九州市で開催された世界体操競技選手権大会の競技会場をVR空間として構築することができた。オリンピックや世界選手権大会といった貴重な機会や環境をレガシーとして記録することができたことは、本システムのもつ可能性を拡張するものであると思われる。

これらの研究結果の一部は、日本アプライドスポーツ科学会で発表した。準備段階から成果を社会に発表するまでに至った点で、「概ね順調に進展している」と判断することができる。しかしながら、学術論文として発表するまでに至らなかった点で、現段階での達成度を「40%」と

## 〔7 研究結果（つづき）〕

評価した（令和3年度の計画が完全に達成された場合を50%とする）。新型コロナウイルス感染症が想定よりも拡大したことにより実験準備からその実施に時間を必要としたことが論文執筆の遅れにつながった要因として挙げられる。令和4年度には、計画通りの研究を展開することに加え、令和3年度の研究結果を論文として社会に発信することとする。

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 4年 4月 20日

日本大学学長 殿

氏 名： 羽田野 剛司

所属・資格： 工学部・教授

実施研究所： 工学部・ 工学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

量子コンピュータ実現のための量子ドット素子の高集積化の研究

## 2 研究期間

令和3年度 ～ 令和4年度

※令和 年度 ～ 令和 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	羽田野 剛司	工学部・教授	研究統括、ナノギャップ電極作製、電気伝導測定
研 究 分 担 者	高瀬 浩一	理工学部・教授	ボトムアップ式量子ドット作製
	出村 郷志	理工学部・助教	走査型プローブ顕微鏡による量子ドット作製

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 50%】

#### 5 研究目的

本研究の目的は、トップダウン方式とボトムアップ方式という2つの異なる電子素子作製方法を融合させ、量子コンピュータの実現に向けた量子ドットの高集積化技術を新たに確立することである。従来のシリコンを用いた大規模集積回路(LSI)の(トップダウン方式)微細加工技術は限界に達し、これ以上のLSI、つまりコンピュータの高性能化が困難となっている。そのため、従来のコンピュータとは全く異なる動作原理で動作する量子コンピュータが近年注目されている。その量子コンピュータを実現することができる電子素子の候補の1つが量子ドットである。量子ドットは、従来の電界効果トランジスタと異なり、電子を1個単位で制御できる。また、LSIを構成する電界効果トランジスタと親和性が良いため、量子コンピュータ実現のための電子素子として最も有望であると考えられる。

量子ドットを量子コンピュータに応用するためには、量子ドットのサイズおよび配置を原子スケールで制御する必要がある。しかし、材料を微細化する、従来のトップダウン式の作製方法では、原子スケールで同じサイズの量子ドットを、原子スケールの精度で等間隔に配置することは極めて困難である。むしろ、原子スケールの精度で量子ドットのサイズおよび位置を制御するためには、原子及び分子を1つの単位として素子を構築するボトムアップ式が有効であると考えられる。そのため、我々は分子を直接用いる手法と原子を1個単位で制御可能な操作プローブ(STM)を用いる方法の2つのボトムアップ方式量子ドット作製手法を用いる。しかし、ボトムアップ式で作製した原子スケールの量子ドットを量子コンピュータとして利用するためには、量子ドットを外部測定回路への接続するナノギャップ電極作製技術を同時に確立する必要がある。このナノギャップ電極作製技術はボトムアップ方式のみで実現することが困難であり、従来のトップダウン方式をも利用する必要がある。従って、量子コンピュータ実現に向けた量子ドットの高集積化の研究には、原子及び分子サイズの素子作製を可能にするボトムアップ方式に精通した研究者とナノスケール素子の測定技術も有するトップダウン方式に精通した研究者の両者が必要である。この新規量子ドット作製技術及び高精度電気伝導測定と、低次元結晶構造を実現するナノ構造及び物質の開拓という2つの異分野の融合は、量子情報技術の確立に向けた新しいイノベーションを可能とする。

#### 6 研究概要

本研究の目的は、トップダウン方式とボトムアップ方式を融合させた新しい量子ドット作製技術の確立である。そのため、トップダウン方式とボトムアップ方式に対応する技術の確立とその2つの技術の融合が重要である。また、作製した量子ドット素子の電気伝導特性の解析も必要である。そのため、本年度は次の研究を行った。

- ① 電子線描画装置を用いた 100nm 程度のナノギャップ電極の作製
- ② 無電解めっき法を用いた 10nm 以下のナノギャップ電極の作製
- ③ ボトムアップ方式による量子ドットの作製
- ④ 走査型プローブ顕微鏡 (STM) による量子ドットの作製
- ⑤ 集積化された量子ドットの電気伝導特性の解明に向けた 2 重量子ドットの電気伝導特性の測定及び解析

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

### ① 電子線描画装置を用いたナノギャップ電極の作製

数 10nm サイズの量子ドットを複数集積させた多重量子ドットの電気伝導を測定するためには、100nm 程度の間隔を有するナノギャップ電極を実現する必要がある。100nm 程度のギャップ間隔

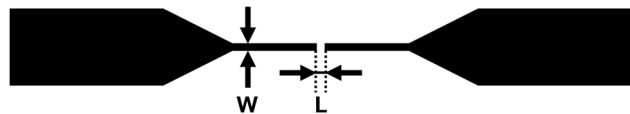


図 1. ナノギャップ電極の CAD パターン

を有するナノギャップ電極を作製するために、図 1 のような電極パターンを、CAD を用いて作成した。ここで、 $W$  は先端部の幅、 $L$  はギャップ間隔である。我々は、この電極パターンの電子

表 1. 電子線描画の結果

$L(\text{nm})$ \ / \ $W(\text{nm})$	100	150	200
150	×	○ (230nm)	○ (190nm)
200	×	×	○ (170nm)

線描画を行った。その結果を表 1 に示す。○はギャップ電極間に間隔が生じたことを示し、括弧内の数字は実際に生じた 2 つの電極間の距離 ( $L$ ) を示している。また、× は 2 つの電極が繋がったことを示している。

表 1 より、3 つの条件で 2 つのナノギャップ電極のパターンが繋がったことがわかる。電子線描画時に、試料に照射される電子はレジスト及び基板結晶内で散乱する。そのため、レジストに蓄積される電子線エネルギー量は直接照射分と散乱分の和となる。そのため、電子線描画パターンが変形する近接効果が生じる。この近接効果により、ナノギャップが繋がったと考えられる。

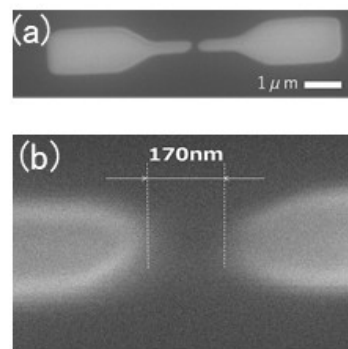


図 2. (a)  $L=200\text{nm}$ 、 $W=200\text{nm}$  の場合に形成されたナノギャップ電極の電子線描画パターンの走査型電子顕微鏡像。(b) (a) のナノギャップ電極の間隔部分を拡大した走査型電子顕微鏡像

残り 3 つの条件ではナノギャップが形成された。その中で最小のナノギャップが形成された条件  $L=200\text{nm}$ 、 $W=200\text{nm}$  の場合の走査型電子顕微鏡像を図 2(a)に示す。図のように 2 つの電極が繋がっていないナノギャップ電極が形成されている。この間隔を明確にするために、図 2(b)にナノギャップ電極の間隔部分を拡大した走査型電子顕微鏡像を示す。この図より 170nm 間隔のナノギャップ電極が形成されていることがわかる。170nm の間隔を有するナノギャップ電極は 100nm より少し間隔が広いが、量子ドットのサイズが大きい場合には十分な広さであり、また今後の電子線描画のより詳細な条件出しによりさらに間隔の短い 100nm 程度ナノギャップ電極の作製も可能である。

## ② 無電解めっき法を利用した nm スケールのギャップ電極作製

量子ドット素子の大きな問題は絶対零度付近でのみ動作することである。しかし、量子ドットのサイズを小さくすることにより、より高温での動作が可能となる。動作温度を上げるための最も有効な方法は、量子ドットのサイズを小さくすることである。そのため、数 10nm よりもさらに小さい(数 nm)量子ドットを作製することも我々の研究目標である。このような数 nm の量子ドットの電気特性を測定するためには、より狭い 10nm 程度の間隔を有するナノギャップ電極を作製する必要がある。このような狭い間隔のナノギャップ電極を作製するためには、自己停止機能を有する無電解金めっきが有効である。この無電解めっきを用いる方法は①の電子線描画を用いないボトムアップ方式の電極作製方法である。我々は、無電解金めっきを用いてギャップ間隔が 10nm 程度のナノギャップ電極形成を目指した実験を行った。

最初に無電解めっきを行うための間隔が 100nm 程度のナノギャップ電極を用意した(他研究グループより提供)。無電解金めっきは次の手順で行った。初めに、希ヨードチンキに金箔 1 枚を、超音波を用いて溶解した。次に、希ヨードチンキに金箔を溶かした溶液にアスコルビン酸を飽和するまで加え、静置した。その後、上澄み液を取り出し、アスコルビン酸をさらに加え、85°Cで 20 秒間加熱した。これをめっき液とした。加熱することにより、金箔を完全に溶解することができる。最後に、めっき液を純水により 1000 倍に希釈し、その希釈しためっき液に、ナノギャップ電極を作製した基板を浸漬させた。

図 3(a)に、無電解めっきを行う前の金で作製されたナノギャップ電極の走査型電子顕微鏡像を示す。ナノギャップ電極間は 100nm である。図 3(b)に、めっき後のナノギャップ電極の走査型電子顕微鏡像を示す。めっき前は 100nm であったギャップが、めっき後はギャップ間が狭くなっている。図 3(c)に、図 3(b)のナノギャップ電極を拡大した走査型電子顕微鏡像を示す。ギャッ

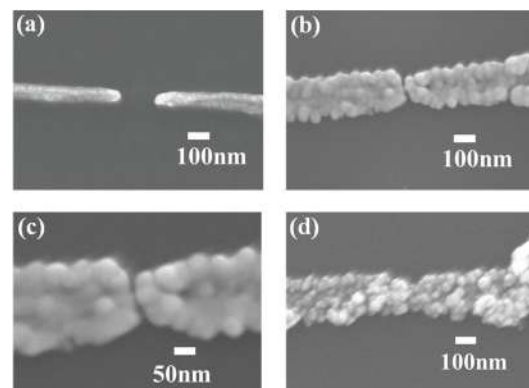


図 3.(a)めっき前と(b)のめっき後の金電極の走査型電子顕微鏡像。(c) (b)を拡大した走査型電子顕微鏡像。(d)金クラスターの吸着により電極が短絡した走査型電子顕微鏡像。



ギャップ間隔は 5nm 以下であった。比較のため、加熱処理を行わなかっためっき液に浸漬したナノギャップ電極の走査型電子顕微鏡像を、図 3(d)に示す。図より明らかなように、ナノギャップ電極は繋がっており、量子ドットを形成させるための電極間隔が形成されていない。この原因は、めっき液の加熱処理を行わなかったためであり、アスコルビン酸を追加した後の加熱処理が非常に重要であることを示している。

以上のように、ナノギャップ電極のギャップの間隔を、無電解めっきを用いることで 100nm から 5nm 以下まで狭くすることが可能である。これは、①のトップダウン方式と無電解めっき法を併用することで、約 200nm から 5nm 程度までの間隔を有するナノギャップ電極を自由に作製できることを示している。したがって、本研究目的であるボトムアップ方式で作製する量子ドットのサイズおよび集積化の個数に合わせて電極を形成し、その電気伝導特性を測定することが可能である。

### ③ ボトムアップ方式による量子ドットの作製

当該研究目的の達成には、ナノメートルサイズの半導体ドットを規則正しく並べる必要がある。これを達成するために、ポリスチレン球をマスクとして用いるポリスチレンリソグラフ法によるナノ構造体の作製を実施する。図 4(a)は、ポリスチレン球を理想的な六方細密構造に配列させた模式図である。このような状況を作り出し、半導体材料をその上から成膜すれば、ポリスチレンの隙間に半導体が堆積する(図 4(b))。このうち、ポリスチレン球を除去することで図 4(c)のような半導体量子ドットを得ることができる。ポリスチレン球には、1 $\mu$ m から 20nm にわたる様々な大きさのものがあるが、今回は、比較的自己組織的にポリスチレン球が整列しやすい 200nm のものを購入して使用し、六方細密的に整列したポリスチレン球の整列を目指している。

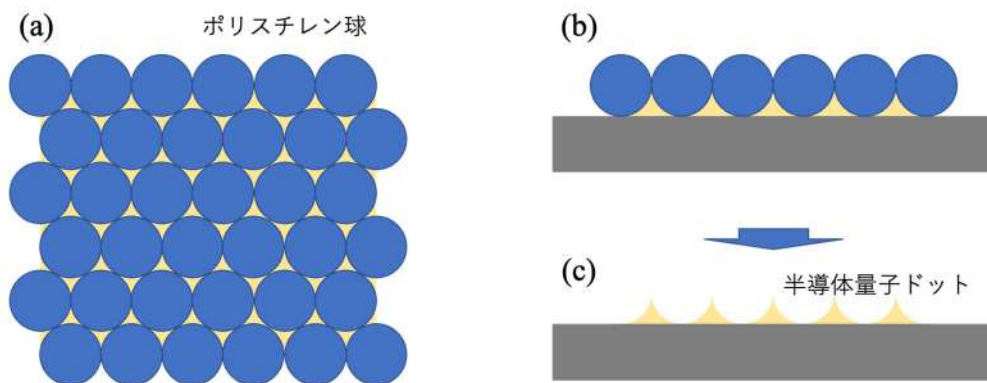


図 4 ポリスチレンリソグラフ法 ポリスチレンの六方細密配列図(a)とその断面図(b)およびポリスチレン球を除去して得られる半導体量子ドット(c)

半導体量子ドットを得るためには、ポリスチレン球が 1 層のみで配列することが重要であり、このような配列を可能とするパラメータは、(1) 基板の表面状態、(2) ポリスチレン球溶液の濃度、(3) 溶液を基板に分散させるときのスピンの回転数などである。本研究では、

自然酸化膜つきシリコン基板を基板に用い、表面は、ピラニア洗浄により水素終端している。スピンドーターの回転数を 200 rpm に設定し、ポリスチレン溶液を滴下後、660 rpm まで徐々に高くしてポリスチレンの配列を試みている。図5は、作製したポリスチレン膜の走査型電子顕微鏡像である。概ね1層のみで膜は構成されているが、部分的にポリスチレンの存在しない場所が確認できる。また、六方細密的に揃っていない。さらなる、条件の最適化が望まれる。

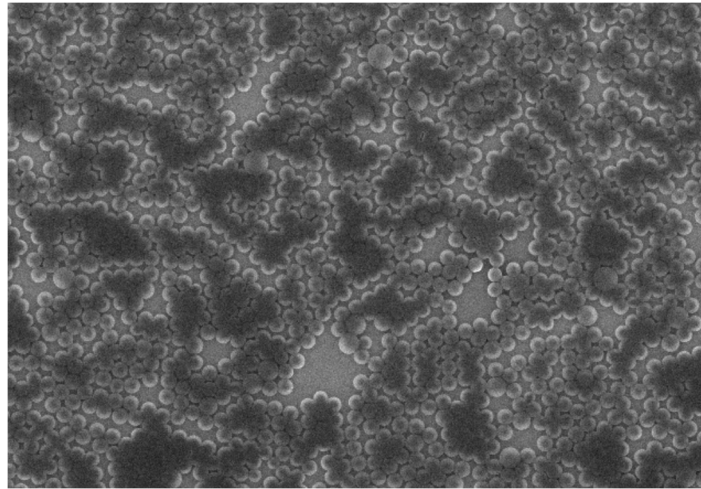


図5 ポリスチレン球分散膜の走査型電子顕微鏡像

今回、作製を試みる半導体は、InSb であり、その成膜は、分子線エピタキシー装置を用いて実施する予定である。現在、セル温度と膜厚の関係が求められたところであり、今後は、ポリスチレン球上へこの半導体を堆積させる。

#### ④ 走査型プローブ顕微鏡(STM)による量子ドットの作製

本研究では、走査型トンネル顕微鏡 (STM) によるボトムアップ方式量子ドット形成を目指している。この研究の達成のために、(1) STM 測定環境の整備に加え、(2) 量子ドット形成が期待できる物質の開発を行った。

(1) に関しては、本申請予算を用いて、STM 測定装置本体の他に、測定に必要な He デュワー等の測定環境整備を現在までに進めている。今年度の前半までにはその環境を整備し、低温下における測定を実施する予定である。

(2) に関しては、研究対象物質である遷移金属ダイカルコゲナイド 1T-TaS<sub>2</sub> の単結晶育成を行った。この物質を低温状態にすると電荷密度波 (CDW) が形成されるが、この状態に STM からパルス電圧を印可すると分域構造が形成される。この分域構造を量子ドットとして利用出来るか調査するため、STM 測定が可能な純良かつ比較的大きなサイズの単結晶が必要である。また、この分域構造は S の一部を Se に置換すると自発的に形成され、Se 置換量と共に分域構造のサイズが変化することも知られている。これらの分域構造も STM により制御出来ることが期待されるため、1T-TaS<sub>2-x</sub>Se<sub>x</sub> 単結晶試料が育成できる条件の探索も行ってきた。化学気相輸送法により単結晶が得られる条件を探索した結果、炉内の温度勾配を詳細に制御可能な 3 ゾーン横型電気炉を用いることにより、Se 置換量を変えても数 mm 角の単結晶が育成できる条件を見出した。得られた試料の X 線回折測定の結果、Se 置換量の増加と共に格子定数  $c$  が一様に増加した。S イオンよりも Se イオンのイオン半径が大きいため、この格子定数の変化は Se イオンへの置換が行われていることを意味する。また、電気抵抗率測定において、CDW 状態の

形成に伴う絶縁的な振舞いが、Se置換量の増加と共に抑制される、過去の結果と一致する振舞いが確認できた。以上の結果からも、Se置換した単結晶試料の育成に成功したと考えている。今後は、得られた試料に加え、(1)で整備した環境を用い、分域構造の観測及び制御を行い、その制御に関する知見を得る予定である。

### ⑤ 集積化された量子ドットの電気伝導特性の解明に向けた2重量子ドットの電気伝導特性の測定及び解析

多重量子ドットの電気伝導特性の測定及び解析方法の確立は、我々が目指すトップダウン方式とボトムアップ方式を融合させた新しい量子ドット作製技術を用いて作製する、集積化された量子ドット素子の特性を解明するために重要である。そのため、量子ドット集積化の最小単位である2重量子ドット素子の電気伝導特性の測定及び解析を行った。この2重量子ドット素子は、研究代表者が従来から行っているトップダウン方式で作製した。

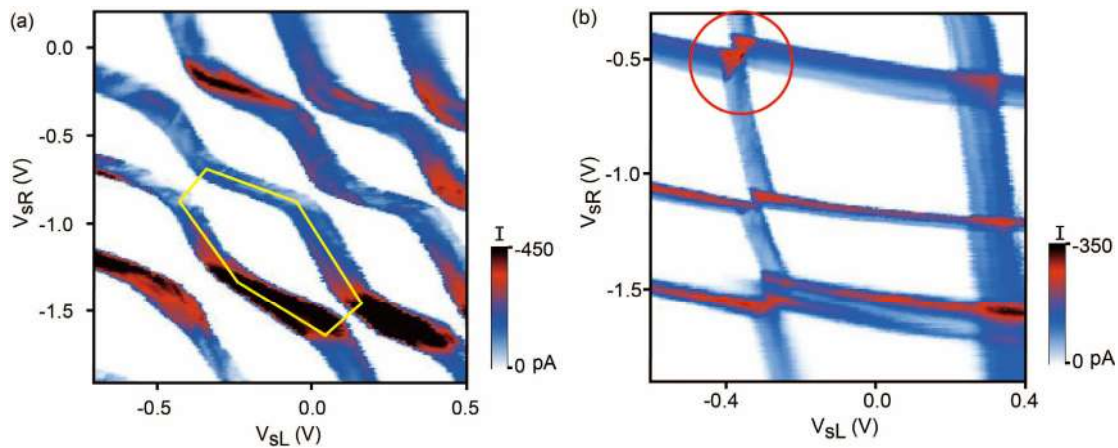


図6(a)並列2重量子ドットの安定度ダイアグラム。(b)磁場を印加した場合の並列2重量子ドットの安定度ダイアグラム。赤円内の2つの三角形は直列2重量子ドットの特徴を示している。

2重量子ドット素子においては、2つのドットが並列又は直列に接続される2つの種類があり、この異なる2つの接続により、電気伝導特性が全く異なることが知られている。今回作製した2重量子ドット素子は、2つのドットが並列に接続された構造を有する。図6(a)に、この2重量子ドットの2つのゲート電圧 $V_{SL}$ 、 $V_{SR}$ を変化させたときの電気伝導特性を示す。図において複数の六角形(図中の黄色い線で囲まれた領域はその1つの(ハニカム)構造の1つ1つは2つの量子ドット内の電子数が決まった状態(安定状態)であることを示している。そのため、このような図を安定度ダイアグラムと呼ぶ。図6(a)の安定度ダイアグラムは並列2重量子ドットの典型的な特性を示している。図6(b)に、この並列2重量子ドットに磁場を印加することにより測定した安定度ダイアグラムを示す。この図においては(a)と異なり、赤丸で示した領域に、赤色の2つの三角形が形成されている。この三角形の電流形状は、2つのドットが直列に接続

された(直列)2重量子ドット素子の典型的な特徴である。しかし、この図における六角形上のハニカム構造は典型的な並列2重量子ドットの特徴である。つまり今回の測定結果により、並列2重量子ドット素子の電気伝導特性において、並列及び直列の2つの異なる特徴が同時に現れることを世界で初めて立証した。したがって、本研究によって多重量子ドットの電気伝導特性の測定及び解析方法が確立しただけでなく、このような並列と直列の特性を同時に有する多重量子ドット素子を、我々が目指しているトップダウン方式とボトムアップ方式を融合させた新しい作製方法で実現することにより、高集積化した量子ドット素子の量子コンピュータを含めた新しい集積回路への応用が可能となると考えられる。この成果を論文として投稿し、採択された(T. Hatano, T. Kubo, S. Amaha, S. Teraoka, Y. Tokura, and S. Tarucha, 'Coexistence of parallel and series current paths in parallel-coupled double quantum dots in nonlinear transport regime', *Applied Physics Express* **14**, 105001 (2021))。また、この研究結果を含めた多重量子ドットの特性に関する招待講演を行った(羽田野剛司、'極低温環境下での多重量子ドットの電気伝導特性と量子ドット集積化に向けた課題', 2022年電子情報通信学会総合大会, オンライン, 2022年3月16日)。

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 4 年 5 月 3 日

日本大学学長 殿

氏 名： 岡山 吉道

所属・資格： 医学部・准教授

実施研究所： 医学部・総合医学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

アトピー性皮膚炎・慢性特発性蕁麻疹における細胞外小胞による病態制御機構の解明

## 2 研究期間

令和 3 年度 ～ 令和 4 年度

※令和 年度 ～ 令和 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	岡山吉道	医学部・准教授	マスト細胞実験, 細胞外小胞実験, 総括
研 究 分 担 者	高橋恭子	生物資源科学部・教授	マスト細胞実験, microRNA 実験
	木澤靖夫	薬学部・教授	薬理学的研究, 創薬研究
	藤田英樹	医学部・准教授	アトピー性皮膚炎・慢性特発性蕁 麻疹研究
	李 賢鎬	医学部・助教	マスト細胞実験
	丸岡秀一郎	医学部・准教授	ヒト化マウスを用いた疾患モデル の作製および病態解析

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 50 %】

#### 5 研究目的

生体の維持には細胞間のコミュニケーションが必須である。その方法としては、細胞同士の接着により刺激を伝達する機構やホルモン、細胞増殖因子、サイトカインや脂質メディエーターなどを細胞が分泌することに加え細胞が遊離する数十～数百ナノメートルのサイズの細胞外小胞がある。細胞外小胞は、遠隔の細胞間のコミュニケーションを媒介し、免疫応答や血液凝固などさまざまなプロセスに関与している。しかしながら、アレルギー・免疫疾患患者の血清中の細胞外小胞に含まれるタンパク質、核酸 (mRNA, microRNA [miRNA], ノン・コーディング RNA) や脂質が疾患の病勢によってどのようなダイナミックな変化を起こしているのかは、全く知られていない。今回、私達はヒトマスト細胞から IgE 依存性の刺激で分泌される細胞外小胞内の miR103a-3p が 2 型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cell: ILC2) に取り込まれ、IL-33 刺激による IL-5 産生を特異的に増強し、好酸球性炎症を増悪させること、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis; AD) 患者では血清中の細胞外小胞内 miR103a-3p 発現が有意に増加していることを見出した。マスト細胞から分泌される細胞外小胞はマスト細胞特異的なマーカーを発現していることも見出した。

そこで 2 つの方法を用いて全身性の皮膚炎症性疾患である AD と慢性特発性蕁麻疹 (chronic spontaneous urticaria; CSU) の病態を制御する細胞外小胞内 miRNA と脂質メディエーターを同定する。第一の方法は、AD と CSU の病態はマスト細胞の活性化が関与しているので前述の如くマスト細胞の細胞外小胞から解析して AD と CSU 患者での発現を確認し、その機能を解析する方法である。第二の方法は、AD と CSU 患者および健康人の血清中の細胞外小胞内 miRNA と脂質に関して疾患による相違、重症度による相違、治療・寛解によるダイナミックな変化を網羅的に解析することにより、細胞間ネットワークによる炎症増強を制御する標的となる miRNA および脂質メディエーターを同定し、これらが疾患特異的な増悪因子や改善因子となっているのかを *in vitro* 実験で確認する方法である。

最近、細胞外小胞を用いた治療法についての可能性も示唆されている。細胞外小胞の内部へ超音波照射やエレクトロポレーション法で抗がん剤、生理活性物質、siRNA などを内包させ目的の細胞へと送達するナノキャリアとしての応用研究が行われている。由来細胞の種類に応じて細胞外小胞の機能が生体にとって正に制御されるのかまたは負に制御されるのかが決まってくるので上記 2 つの方法で同定した標的分子の antagonist や agonist を細胞外小胞に内包させ、私達が開発したヒト化疾患モデルマウスを用いて、その効果を評価する。

## 6 研究概要

1. ヒトマスト細胞に IgE 依存性刺激, IL-33 刺激, substance P 刺激を行い遊離される細胞外小胞内の刺激特異的 miRNA を miRNA chip を用いてそれぞれ同定する.
2. 目的 1 にて同定した, miRNA が AD と CSU 患者の細胞外小胞内で健常人と比較して有意に増加しているのかを検討し, 増加しているものを選出する.
3. 目的 2 にて選出した, miRNA の機能を in vitro 実験で検証する.

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

(1) ヒトマスト細胞から IgE 依存性の刺激で分泌される細胞外小胞内の miR103a-3p が ILC2 に取り込まれ, IL-33 刺激による IL-5 産生を増強

IgE 非依存性および IgE 依存性アレルギー疾患におけるマスト細胞由来細胞外小胞中 miRNA の特徴と役割を調べるために, ヒトマスト細胞を刺激なし, IL-33, IgE および IgE と抗 IgE 抗体で刺激し, 細胞外小胞を単離した. 各々の細胞外小胞を IL-33 存在下の 2 型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cell: ILC2) と共培養し, 細胞上清中の IL-5 を測定したところ, IgE と抗 IgE 抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞は, ILC2 の IL-5 産生を有意に増強させた (図 1). さらに, IgE と抗 IgE 抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞中では, miR103a-3p の発現が有意に上昇していた (図 2).

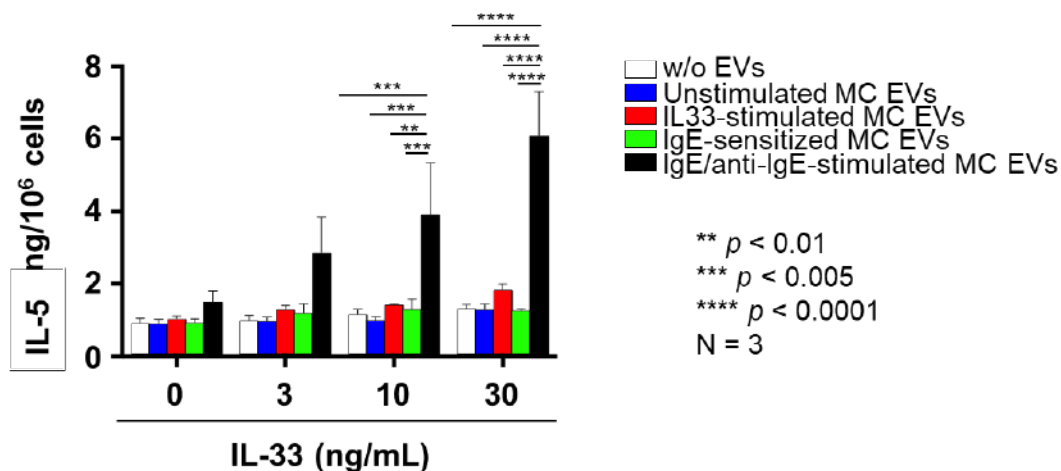


図 1 IgE と抗 IgE 抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞 は, ILC2 の IL-5 産生を有意に増強

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

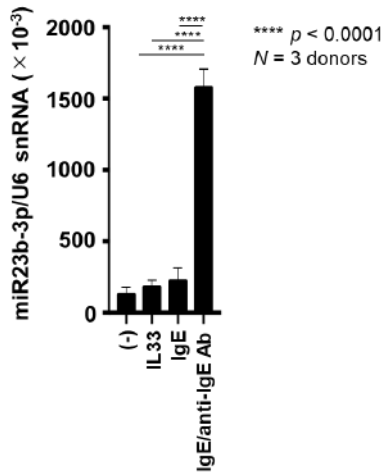


図2 IgE と抗 IgE 抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞中では、miR103a-3p の発現が有意に上昇

(2) マスト細胞由来細胞外小胞中 miR103a-3p による 2 型自然リンパ球, Th2 細胞からの IL-5 産生制御機序の解明

miR103a-3p mimic および miRNA mimic control (10 nM) を ILC2 に導入し、各濃度の IL-33 存在下で 3 日間培養した後、IL-5 と IL-13 の ELISA および mRNA の qPCR を行ったところ miR103a-3p mimic 導入 ILC2 において IL-5 産生が増強した (図 3)。

次に miR103a-3p mimic および miRNA mimic control を ILC2 に導入し、Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) および PRMT8 mRNA の発現レベルが低下するかどうかを検証するために、PRMT5 および PRMT8 の qPCR を行ったところ miR103a-3p mimic 導入 ILC2 において PRMT5 mRNA の発現レベルが低下した (図 4)。

miR103a-3p mimic および miRNA mimic control を ILC2 に導入し、ILC2 の GATA3 のアルギニン残基の脱メチル化の程度を解析したところ miR103a-3p mimic 導入 ILC2 において GATA3 のアルギニン残基の脱メチル化が促進されていた。

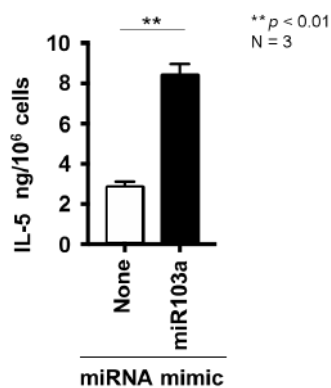


図3 miR103a-3p mimic 導入 ILC2 において IL-5 産生が増強



〔7 研究結果 (つづき)〕

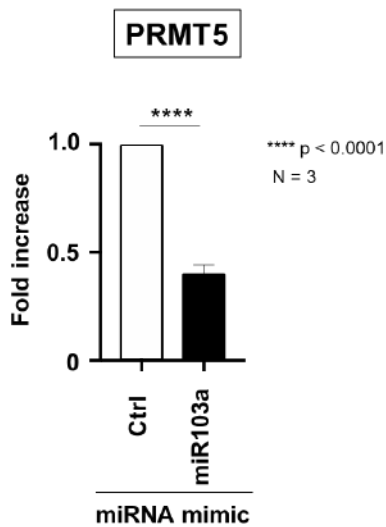
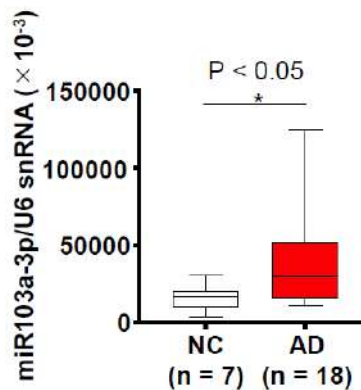


図4 miR103a-3p mimic 導入 ILC2 において PRMT5 mRNA の発現レベルが低下

(3) AD 患者では血清中の細胞外小胞内 miR103a-3p の発現が有意に増加していることを見出した (図5).

図5 AD 患者血清中での細胞外小胞内 miR103a-3p の発現増強



## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 4年 4月 5日

日本大学学長 殿

氏 名： 篠田 雅路

所属・資格： 歯学部・教授

実施研究所： 歯学部・総合歯学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

ロコモティブシンドローム予防を目的とした高齢者頭頸部慢性疼痛への包括的アプローチ

## 2 研究期間

令和 3年度 ～ 令和 4年度

※令和 年度 ～ 令和 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	篠田 雅路	歯学部・教授	研究総括および論文執筆 運動器疼痛モデルの作製, 疼痛強度, 行 動薬理学的解析
研 究 分 担 者	野間 昇	歯学部・教授	頭頸部運動器疼痛患者に対する分析疫 学的解析
	人見 涼露	歯学部・専任講師	光遺伝学的解析 行動薬理学的解析
	吉垣 純子	松戸歯学部・教授	三叉神経節ニューロン活性化候補分子 の生化学的解析
	大久保 昌和	松戸歯学部・専任講師	頭頸部運動器疼痛患者に対する分析疫 学的解析
	吉川 賢治	理工学部・准教授	高速液体クロマトグラフィーを用いた 微量成分分析

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 50%】

#### 5 研究目的

ロコモティブシンドロームは厚生労働省が策定する国の健康増進計画である「健康日本21」に取り上げられたことから、2016年の調査で一般認知度は47.3%と上昇している。日本では、ロコモティブシンドロームは「メタボ」や「認知症」と並び、健康寿命の短縮、ねたきりや要介護状態の3大要因のひとつと周知されているが、海外ではほとんど認知されておらず、研究が全く進んでいないのが現状である。さらに、加齢に伴う運動器疾患である変形性関節症、骨粗鬆症や脊柱管狭窄症などの病因に関する研究は整形外科領域で広く行われているが、ロコモティブシンドロームに直接関与する運動器疼痛の研究は少ない。特に、ロコモティブシンドロームに関連した頭頸部運動器疼痛に対し、臨床および基礎の両面からアプローチする包括的研究は皆無である。本研究では、ロコモティブシンドロームの原因となる高齢者の頭頸部運動器疼痛の実態やリスクファクターを調査分析するとともに、頭頸部運動器疼痛発症メカニズムの一端を明らかにすることを目的としている。

#### 6 研究概要

##### ① 高齢者の頭頸部運動器疼痛に対する臨床病態および発症要因の分析疫学的研究

日本大学歯学部附属歯科病院および日本大学松戸歯学部付属病院に来院した頭頸部運動器に異常を訴える患者を対象とする。患者の頭頸部運動器機能障害の程度を顎関節機能評価表および肩関節機能評価表を用いてアンケート調査する。さらに、頭頸部運動器の自発痛強度および圧痛閾値を計測し、客観的な頭頸部運動器機能障害の程度を評価する。アンケート調査結果および頭頸部運動器機能の客観的評価との相関・回帰分析を行う。これにより、頭頸部領域のロコモティブシンドロームのリスクファクターとその頭頸部運動器運動障害の病態および疼痛特性との相関を詳細に解析することができる。

##### ② 頭頸部運動器疼痛発症メカニズムの解明

頭頸部運動器疼痛モデル作製後、デジタル圧痛計を使用し、頭頸部運動器への機械刺激に対する逃避反射閾値の経時的变化を観察する。逃避反射閾値の有意な低下を確認後に三叉神経節および咬筋を摘出し、三叉神経節ニューロン活性化候補分子の衛星細胞における発現分布を免疫組織化学的手法にて、発現量をELISA法およびWestern blot法にて定量する。さらに、マイクロダイアライシスにて三叉神経節内液を回収し、ATPの咬筋内および三叉神経節内濃度を高速液体クロマトグラフィーにて測定する。

アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて三叉神経節内の衛星細胞に特異的にチャンネルロドプシンあるいはハロロドプシンを発現させる。頭頸部運動器疼痛モデル作製後、三叉神経節の衛星細胞活性をオプトジェネティクス技術により操作し、頭頸部運動器の疼痛発現状態を評価する。

## 7 研究結果 (4,000字以上記入のこと)

日本は超高齢社会を迎え運動器疾患が急増しており、要介護の主な原因の一つである。実際に、要介護者の約1/4は運動器障害がその直接の原因となっている。ロコモティブシンドロームは、「運動器の障害のために移動機能の低下をきたした状態」と新しく提唱された概念である。ロコモティブシンドロームでは骨・筋肉・関節・靭帯・腱・神経などから構成されている運動器に障害がおり、将来的に介護の必要性が高くなることが考えられる。現在、ロコモティブシンドロームの国内の推計患者数は予備軍を含めて約5,000万人を超えるとの報告があり、大きな社会問題となっている。ロコモティブシンドロームの原因となる運動器障害は高齢者に発症しやすいという特徴をもち、さらに筋骨格系の疼痛の慢性化および悪化がトリガーになることが知られている。研究代表者の専門領域である頭頸部領域の運動器疾患として知られる「顎関節症」は、高齢者に発症しやすく、顎関節や咀嚼筋に疼痛を発症して咀嚼・嚥下といったQOLの維持に大変重要な運動機能の低下をきたす。したがって、「顎関節症」は頭頸部領域のロコモティブシンドロームのトリガーとなり得ると考えられる。また、高齢者に多く発症する頭頸部領域の運動器疾患として知られる「五十肩（肩関節拘縮症）」もロコモティブシンドロームであり慢性的な疼痛を引き起こす。このような高齢者の頭頸部領域の運動器疾患に伴う機能障害や疼痛は、それぞれお互いに関係しあいながらマルチプルリスクファクターとなって、ロコモティブシンドロームに繋がり生活活動制限・QOLの低下・要介護が必要な状態へと移行することが報告されている。このようなことから、高齢者の頭頸部運動器疼痛の発症・増悪を抑制することによってロコモティブシンドローム予防が可能となり、ひいてはメタボリックシンドロームや認知症、うつ病などといった生活習慣病の予防につながると考えられる。しかしながら現在、ロコモティブシンドロームの原因となる高齢者の頭頸部運動器障害と疼痛に関する分析疫学研究や運動器疼痛発症メカニズムの解明を目指した基礎的研究は全くない。そこで本研究では、ロコモティブシンドローム予防を目指した高齢者の慢性疼痛に対する包括的アプローチを行うことを目的としている。以下に、今後の高齢化社会で問題となるロコモティブシンドロームの予防対策のブレークスルーになる可能性を秘めた令和3年度に得られた成果を報告する。

### ① 高齢者の頭頸部運動器疼痛に対する臨床病態および発症要因の分析疫学的研究

咀嚼筋筋膜痛症候群の病態解明および治療法の有用性を検討し確立するために、かみ合わせ日記、咀嚼筋マッサージを用いて、介入前後の症状の変化を調査した。被験者は、日本大学歯学部附属歯科病院（口腔診断科外来）および日本大学松戸歯学部付属病院（口・顔・頭の痛み外来）に来院した患者を対象とした。本研究のプロトコルは日本大学歯学部倫理委員会および日本大学松戸歯学部倫理委員会にて承認を得たうえで実施した。まず、患者の頭頸部の運動器（顎関節・咀嚼筋・頭頸部筋・肩関節）異常の現病歴、既往歴、習癖（くいしばり、歯ぎしり、偏咀嚼）、生活習慣（スポーツ、労働環境等）についてアンケート調査を行った。その結果、咀嚼筋に自覚症状の訴えない22人（男14人、女8人）のうち、初回または2回目来院時の検査で1.0Kgの触診で圧痛症状のあった群13人（平均25歳）と圧痛症状の無かった群9人（平均26歳）に分類し、理学療法（マッサージ）の前後で、各検査項目\*の変化を評価した。顎関節・咬筋・側頭筋・胸鎖乳突筋・肩甲上腕関節・肩鎖関節・三角筋・僧帽筋の自発痛強度および圧痛閾値は圧痛測定計（バト

ラーバルピーター) を用いて計測した。自発痛強度は Visual Analog Scale (VAS) にて患者が感じている疼痛強度を記録した。さらに 1 回目の検査後、かみ合わせ日記を記録させ、2 週間後に評価し、その後に筋マッサージ、顎の受動開口を指導し 2 週間行わせて 3 回目の評価を行った (図 1)。

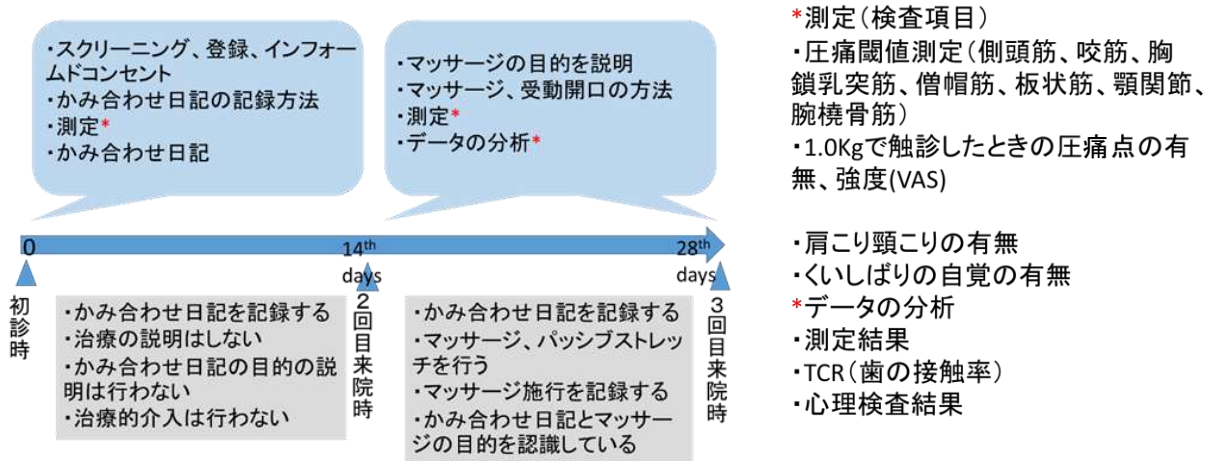


図 1 頭頸部運動器疼痛評価のタイムスケジュール

無意識の上下の歯の接触頻度 (摂食率: TCR) には、事前の咀嚼筋の圧痛の有無によって有意差はみられなかった。また、TCR は理学療法後に有意な変化を認めなかった。TCR の変化に関係なく、理学療法後は、事前に咀嚼筋に圧痛を認めた群でも、認めなかった群でも、腕橈骨筋を含むほとんどの筋において圧痛閾値の上昇を認めた。今回、圧痛のある群とない群で TCR に顕著な差が認められず、TCR の変化が咀嚼筋痛を生じさせていることを裏付ける結果は得られなかった。ストレッチを施していない筋 (腕橈骨筋) においても閾値が上昇したことは、この効果が筋の直接的な引き伸ばしによるのではなく、運動による中枢の脱感作の影響であることを示唆している。近年、運動により侵害刺激に対する痛覚感受性の低下が惹起することが報告されている。その機序として、オピオイドメカニズムと非オピオイドメカニズムといった内因性疼痛調節系が関与していると考えられている。オピオイドメカニズムとしては、 $\beta$  エンドルフィンの関与、非オピオイドメカニズムとしては報酬系の賦活やミクログリアの活性化が考えられるが現時点では明らかではない。令和 4 年度には、頭頸部運動器疼痛に対する内因性疼痛調節系の関与を詳細に解析する。

## ② 頭頸部運動器疼痛発症メカニズムの解明

### 1) 頭頸部運動器への機械刺激に対する逃避反射閾値の経時的変化

実験には Sprague-Dawley ラットを使用した。2%イソフルラン吸入麻酔下にて、エナメルでコーティングされた銀線を咬筋部皮膚に 2 本刺入し、咬筋部皮下の咬筋直上に銀線先端を設置した (極間距離: 10 mm)。なお、銀線の両端はコーティングが除去されており通電できる。銀線に電気刺激 (刺激間隔: 2000 msec、刺激パルス間隔: 10 msec、持続時間: 200  $\mu$  sec、刺激パルス数: 100 times、電圧: 10 V、60 分間/日) を 7 日間与えた (MMC 群)。銀線を設置し電

気刺激を行わない群を Control 群とした。十分にラットを慣らしたうえで咬筋直上への銀線設置前に、咬筋に側方よりデジタルフォンプライ (刺激プローブ径: 5 mm) 刺激を用いて圧刺激を加えた。圧刺激は 0 g より 20 g/s の速度で刺激強度を上げた。ラットが逃避行動を起こした最小の刺激強度を逃避反射閾値とし、電気刺激開始前および電気刺激開始後 24 日目まで毎日逃避反射閾値を測定した。電気刺激開始後 2 日目より、MMC 群の逃避反射閾値が Control 群と比較して有意に低下した (図 2)。MMC 群の逃避反射閾値の低下は電気刺激開始後 12 日目 (電気刺激終了後 5 日目) まで続いた。Control 群の逃避反射閾値に変化は認められなかった。以上より、①咬筋は連日の異常な収縮開始後 2 日目より圧痛が生じること、②その圧痛閾値の低下は約 80 g で頭打ちになること、

③異常な収縮を終了しても 5 日間は圧痛閾値の低下が継続することが示された。この結果から、異常な収縮による咬筋の圧痛閾値の低下は疼痛伝達系の可塑的变化によるものと考えられる。令和 4 年度は頭頸部運動器疼痛発症時の三叉神経節内の病態解析および三叉神経節ニューロン-衛星細胞機能連関の可塑的变化に対する光遺伝学的解析を行

い、頭頸部運動器疼痛発症メカニズムの詳細を解明する。

## 2) 遊出 ATP の咬筋内濃度測定

装置は島津製作所製 LC-20AT 型送液ポンプ、同社製 CTO-10A 型カラムオーブン、日本分光製 UV-2075 型紫外吸光検出器、同社製 LC-Net II/ADC 型記録計から構成される。分離カラムはジューエルサイエンス製 InertSustain AQ-C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm) を用いた。

リン酸を用いて pH 7.4 に調整した 50 mM リン酸水素二カリウム溶液を溶離液に用い、流量 1.0 mL/min で送液した。また、カラム温度は 40°C、1 回の測定における試料注入量は 100 μL、各成分の検出波長は 260 nm とした。

モデル動物から咬筋を取り出し、リングル液もしくはリン酸緩衝生理食塩水を用いて 30 分間洗浄を行った。ATPase インヒビターを添加した後、14000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、除タンパクを行った。得られた試料溶液を HPLC で測定し、ATP の分析を行った。

超純水、溶離液、リングル液を用いて希釈した ATP 標準溶液の経時変化を確認したところ、超純水で希釈した場合は 120 分、溶離液で希釈した場合は 60 分経過した段階でピーク強度が減少し始めた。一方、リングル液で希釈した場合、ピーク強度は直ちに減少し始めた (図 3)。

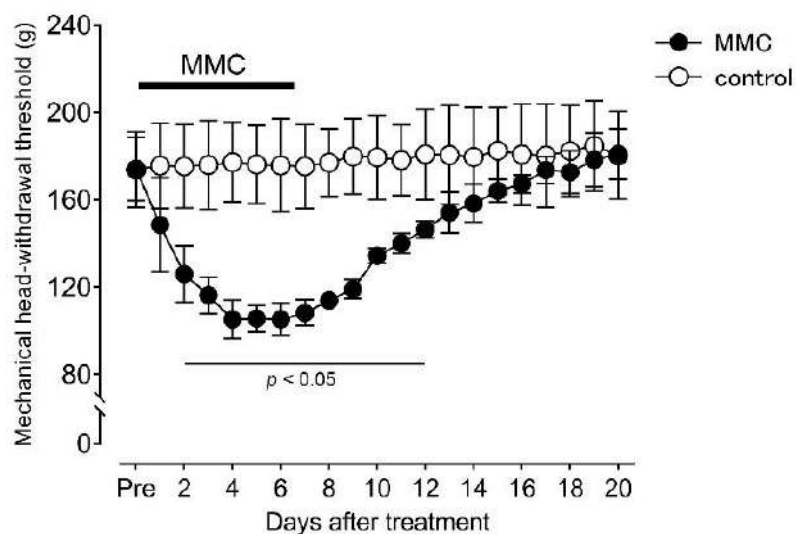


図 2 逃避反射閾値の変化

経時変化によって ATP から ADP および AMP に変化するため、測定日に標準溶液を調製し、直ちに測定を行う必要があることが分かった。

上に示す測定条件下にて、ATP 標準溶液の調製法の違いによって保持時間および検出感度がどのように変化するか確認すべく、4 種類の溶液（超純水、溶離液、リンゲル液もしくはリン酸緩衝生理食塩水）を用いて比較検討を行った。各溶液で希釈した 20 mg/L ATP 標準溶液のクロマトグラムを図 4 に示す。リンゲル液で希釈した ATP 標準溶液が最も保持時間が早く、高感度検出が可能であることが分かった。

リンゲル液またはリン酸緩衝生理食塩水で希釈した 0.1~0.8 mg/L ATP 標準溶液を用いて検量線を作成した。前者の決定係数は 0.9969、後者の決定係数は 0.9727 であり、前者の検量線が良好な直線性を示すとともに、より低濃度の場合でも精確な測定が可能であると見込まれることが分かった。

リンゲル液またはリン酸緩衝生理食塩水を用いて前処理した実試料（刺激群および非刺激群）中の ATP の分析に適用した。前者を用いて前処理したモデル動物の抽出液のクロマトグラムを図 5 に示す。刺激群由来の ATP のピーク強度が大きく変化したため、電気刺激を与えることで咬筋が収縮され、ATP が放出されたものと考えられる。一方、後者を用いて前処理したモデル動物の抽出液では、刺激群および非刺激群の ATP のピーク強度に目立った差は見られなかった。

令和 3 年度は、主に ATP の分析法の確立に主眼を置いて研究を行った。リンゲル液を用いて試料溶液を調製することで良好な検出感度を示したものの、経時変化の観点から難があることも同時に分かった。令和 4 年度はさらなる分析条件の条件検討を行う必要がある。

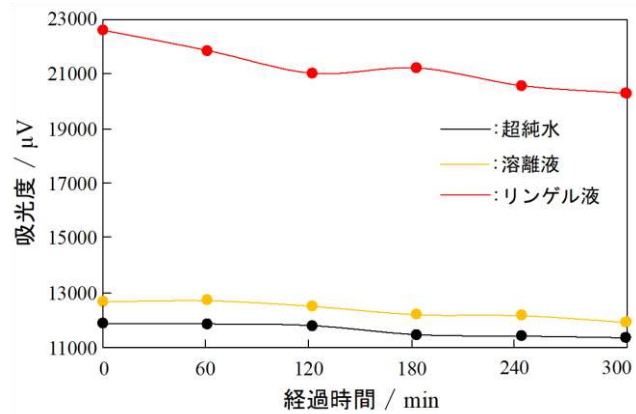


図 3 ATP 標準溶液の経時変化

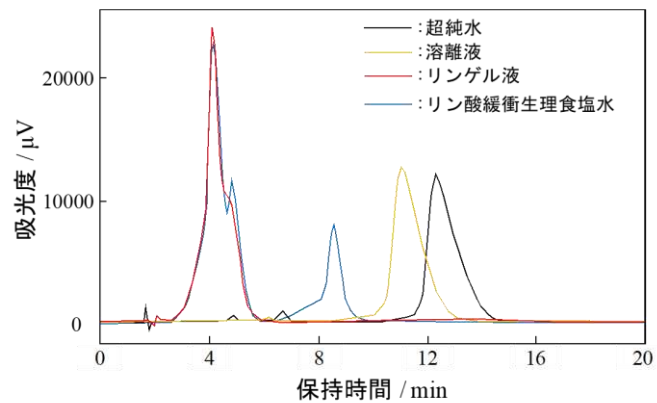


図 4 ATP 標準溶液のクロマトグラム

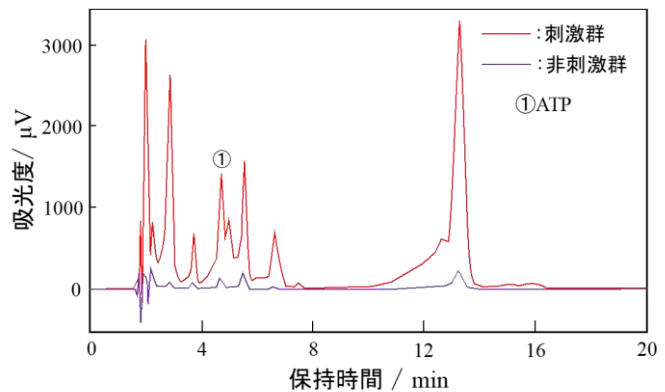


図 5 リンゲル液を用いて前処理した実試料のクロマトグラム

## 令和3年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 4年 4月 11日

日本大学学長 殿

氏 名： 今井 健一

所属・資格： 歯学部・教授

実施研究所： 歯学部・歯学総合研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

歯周病原菌誤嚥による呼吸器疾患発症と増悪の分子基盤確立と新規予防・治療法の提示

## 2 研究期間

令和3年度～令和4年度

※令和 年度～令和 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	今井 健一	歯学部/教授	研究の立案と統括 微生物相互作用研究
研 究 分 担 者	權 寧博	医学部/教授	呼吸器疾患の臨床及び口腔との関 連解析
	丸岡 秀一郎	医学部/准教授	臨床及び動物研究による呼吸器疾 患増悪機序の解明
	木澤 靖夫	薬学部/教授	マウスモデルを用いた解析及び薬 剤開発
	飯沼 利光	歯学部/教授	細菌叢解析と臨床研究データの統 計学的解析
	神尾 宜昌	歯学部/准教授	細菌とウイルスの分子生物学・免 疫組織学的解析
	高井 英樹	松戸歯学部/専任講師	唾液や喀痰等を用いた生化学的実 験及び細菌叢解析

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。



#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：②】・【達成度：60%】

#### 5 研究目的

人類の歴史は感染症との闘いの歴史と言われるように、エイズの蔓延や新型インフルエンザによるパンデミックなどが人類を脅かし続けている。SARS-CoV-2の爆発的な感染拡大は人類の社会生活を激変させてしまった。SARS-CoV-2感染者において、高齢者に加え慢性閉塞性肺疾患（COPD）や肺炎などの呼吸器疾患、及び糖尿病等の基礎疾患を有する人は、重症・死亡率が高いことが報告されている。いずれの疾患も下気道の入り口である口腔の病気“歯周病”と関連が深い疾患である。歯周病原菌が呼吸器疾患を悪化させる一方で、口腔衛生管理が肺炎やインフルエンザの発症とCOPD増悪の予防に有効であることから、COVID-19の重症化とその予防にも口腔衛生状態が深く関与している可能性が高い。世界に類を見ない早さで高齢化が進むわが国において、今後ますます増加する呼吸器疾患に対して、薬やワクチンに頼らない予防・治療法の開発は急務である。

本プロジェクトは、世界的問題となっているCOVID-19とCOPD、高齢者の死因第1位である肺炎、時にパンデミックを引き起こすインフルエンザ、及び喘息等の呼吸器疾患と口腔との関連に焦点を絞り、各疾患の発症と進行に及ぼす歯周病原菌の影響と口腔衛生管理をはじめとする新規予防・治療法開発のための分子基盤を確立することを目指す。

対象疾患は全て主に肺を場とする“炎症”で密接にリンクしているため、得られたデータを有機的に結び付け解析することにより、疾病の新たな解釈に繋がることも期待される。さらに、研究を通して、大学院生を含む若手研究者の育成と国民の健康増進、及び高騰する医療費の削減に繋がることも期待される。

#### 6 研究概要

上記目的を達成するべく、微生物・感染症学、歯周病学、呼吸器内科学、及び創薬学の専門家がグループを形成、「微生物-宿主相互作用」に加え、「細菌-ウイルスの微生物間相互作用」にも焦点を当て、口腔-呼吸器を軸とした下気道炎症研究を進めている。今年度は主に2つの課題、1.歯周病原菌による呼吸器疾患の発症と増悪メカニズムの解明と2.口腔衛生管理有効性の科学的根拠の立証のための基礎研究に関して研究を進めた。特に課題1.に関しては、COPDモデルマウスを作成、歯周病原菌*F. nucleatum*の気管内投与が、炎症細胞の増加と炎症性サイトカインおよび肺胞破壊因子の産生を誘導することで、肺胞腔を拡大させるのみならず、ムチンの過剰産生をも促進することを明らかにすることが出来た。また、唾液と共に誤嚥された歯周病原菌が呼吸器上皮のバリア形成の破壊を引き起こすことでCOPDや誤嚥性肺炎の増悪に関与している可能性も見出すとともに、歯周病原菌が、ACE2の発現を介してSARS-CoV2の感染性を高めることや、サイトカインストームを誘導し下気道の炎症を増強することにより、COVID-19の重症化に関与している可能性も報告することが出来た。さらに、課題2.に関しては、臨床研究を進めるための倫理書類が許可され、実際に歯科医による専門的口腔ケア前後の喀痰を採取し、炎症性細胞や炎症物質などの定量実験を進めているが、口腔ケアにより、誤嚥性肺炎の発症率が低下するとの興味深いデータが得られた。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

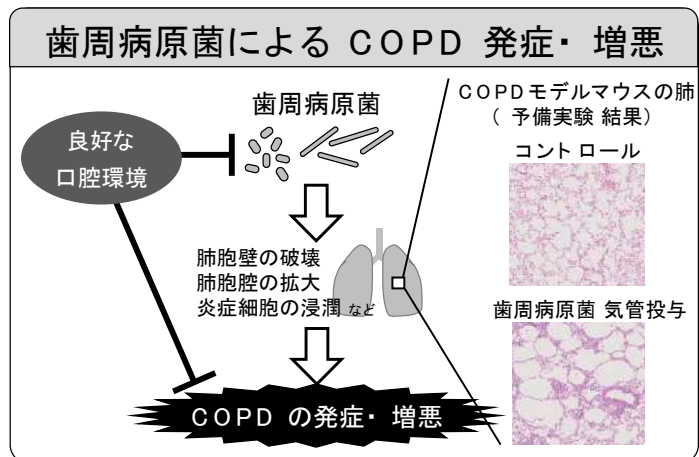
## ①歯周病原菌による呼吸器疾患の発症と増悪メカニズム解明に関する研究成果

## 1) 歯周病原菌が COPD の増悪に及ぼす影響 —モデルマウスを用いた解析—

近年 COPD による死亡者数が増加している。現在では世界の死因第 3 位となっており、世界的にその対策が喫緊の課題となっている。多くの臨床研究により歯周病と COPD との関連が報告されている。重度の歯周病罹患患者はそうでない者に比べ、COPD を発症する割合が 3.5 倍高いことや、歯周病の治療を行うことにより COPD の症状が改善することなどが報告されている。さらに、COPD 増悪患者の喀痰では歯周病原菌 *F. nucleatum* に対する抗体価が顕著に上昇しているのみならず、重症 COPD 患者の喀痰では *Fusobacterium* 属の細菌数が多く検出されることも示されている。したがって、*F. nucleatum* が COPD の増悪に影響を及ぼしていると考えられるものの、その分子基盤は不明である。そこで本研究では、エラスターゼ誘導肺気腫モデルマウスを用いて、*F. nucleatum* の気管内投与が COPD の増悪にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

マウス (C57BL/6) にブタ膵臓エラスターゼを気管内へ投与し、3 週間飼育することにより作製した肺気腫モデルマウスを用いた。肺気腫モデルマウスおよびコントロールマウスに加熱殺菌した *F. nucleatum* (ATCC25586 株) を  $1 \times 10^8$  CFU もしくは PBS を 7 日間連続で気管内へ投与し、最終投与後 1、3、7、42 日目に、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) 中の炎症細胞数、炎症性サイトカイン (TNF、IL6、CXCL1、CXCL5、CCL2、CXCL10)、プロテアーゼ (MMP12、MMP2) 及びムチン (MUC5AC) の遺伝子発現状態を調べた。

BALF 中の炎症細胞数を計測した結果において、肺気腫モデルマウスの *F. nucleatum* 投与群では、他の群に比べ有意に総細胞数、マクロファージ数、リンパ球数、好中球数が増加していた。炎症性サイトカインの遺伝子発現に及ぼす影響について検討した結果、最終投与後 1 日目および 7 日目における肺気腫モデルマウスへの *F. nucleatum* 投与群では、TNF の遺伝子発現が最も増加していた。一方、IL6、CXCL1、CXCL5、CCL2、CXCL10 の遺伝子発現は、*F. nucleatum* の投与により肺気腫モデルマウスおよびコントロールマウスのいずれにおいても同程度の増加を認めた。肺胞破壊因子である MMP12 および MMP2 の遺伝子発現を調べた結果、肺気腫モデルマウスにおいて *F. nucleatum* 投与群で MMP12 の遺伝子発現が最も強く誘導されたが、MMP2 の遺伝子発現は、コントロールマウスと同程度の変化であった。また、肺における MMP12 のタンパク質発現状態および BALF 中の perforin のタンパク質発現状態は、*F. nucleatum* の投与により、肺気腫モデルマウスおよびコントロールマウスのいずれも同程度の誘導を認めた。次に平均肺胞間距離を計測した結果、肺気腫モデルマウスにおける *F. nucleatum* 投与群では平均肺胞間距離が顕著に増加しており、肺胞腔の拡大を認めた。また、*F. nucleatum* 投与群では、他の群に比べ杯細胞の数が有意に増加していた。さらに MUC5AC の遺伝子発現が有意に増加しており、免疫染色像においても顕著な MUC5AC タンパク質の発現誘導を認めた。



## 〔7 研究結果 (つづき)〕

本研究により、肺気腫モデルマウスへの *F. nucleatum* 気管内投与は、炎症細胞の増加と、炎症性サイトカインおよび肺胞破壊因子の産生を誘導することで、肺胞腔を拡大させるのみならず、ムチンの過剰産生も促進することが明らかとなった。以上の結果は、COPD 患者の増悪時にみられる症状に類似していることから、*F. nucleatum* は COPD を増悪させる可能性を示唆している。

## 2) 歯周病原菌が肺のバリア形成と機能に及ぼす影響

歯周病が呼吸器の炎症、組織破壊を進行する上で *F. nucleatum* が呼吸器のバリア機能を破壊するのではないかと推察し、気管支上皮細胞とマウスを用いた実験を行なった。

トランスウェルプレートで気管支上皮細胞を培養し *F. nucleatum* を添加後、経上皮電気抵抗値(TER)の測定と、蛍光標識したデキストランを用いて細胞間隙径路の評価を行うことによりバリア機能を評価した (右図参照)。

実験の結果、*F. nucleatum* は時間及び濃度依存的に気管支上皮細胞における TER 値を低下させるとともに、実際にデキストランの透過性も促進されたことから、*F. nucleatum* により上皮細胞のバリア破壊が起こっていることが解った。同様の結果は、細胞株のみならずプライマリーヒト気管支上皮細胞を用いた実験でも得られた。次に、*F. nucleatum* によるバリア破壊のメカニズムを検討するため、バリア形成に関わる遺伝子 17 種の発現をスクリーニングした。その結果、*F. nucleatum* により Claudin1 や JAM-A 等のバリア形成に係る遺伝子の発現が低下することが認められた。さらに、マウスに *F. nucleatum* を誤嚥させた後、デキストランを投与することで肺におけるバリア破壊を検討した。その結果、マウスにおいても *F. nucleatum* により血清中のデキストランが検知されるとともに、肺胞切片において肺胞間距離の増加が認められたことから、歯周病菌の誤嚥により肺胞のバリア破壊が起こっていることが明らかとなった。現在、バリア形成遺伝子のノックダウン実験等により、歯周病原菌による肺胞バリア破壊のさらなる分子メカニズムの追及している。

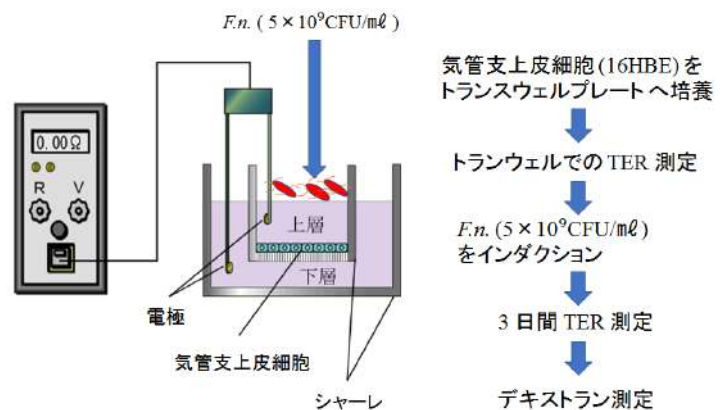
本研究より、唾液と共に誤嚥された歯周病原菌が呼吸器上皮のバリア形成の破壊を引き起こすことで COPD の増悪に関与していることが示唆された。本研究成果は、COPD のみならず肺炎や COVID-19 研究にも応用でき発展性に富む成果であると考えられる。

## 3) 炎症性サイトカイン産生と SARS-CoV-2 の受容体発現に及ぼす歯周病原菌の影響

誤嚥した口腔細菌が下気道に作用し SARS-CoV2 のレセプターである ACE2 とサイトカインストームの中心をなす炎症性サイトカインを誘導するのではないかと考え研究を行った結果、以下の成果を得て論文として発表することができた。

サイトカインストームに与える影響; *P. gingivalis* を種々の呼吸器上皮細胞に添加した結果、

## 気管支上皮細胞のバリア機能評価方法



## 〔7 研究結果（つづき）〕

菌量依存的に IL-8 と IL-6 の産生が強く誘導された。一方、*S. salivarius* 等のグラム陽性菌では認められなかった。*F. nucleatum* や *T. forsythia* 等によってもサイトカイン産生が誘導されたが、興味深いことに肺炎球菌による量と比較し数倍以上高かった。また、*P. gingivalis* の線毛もサイトカインを強く誘導することを見出した。同様の結果は、ヒト由来のプライマリー呼吸器細胞においても認められたが、ここでも *F. nucleatum* によるサイトカイン産生能が最も高かった。

ウイルス受容体 ACE2 に与える影響；菌体そのものでは、ACE2 の発現は顕著に起こらなかったが、*F. nucleatum* の培養上清で肺胞上皮細胞を刺激した結果、遺伝子及び蛋白レベルにおいて ACE2 の発現が強く認められた。その作用は、免疫染色実験においても確認できた。歯周病原菌の培養上清中には大量の短鎖脂肪酸が含まれているが、酪酸が ACE2 と炎症性サイトカインの誘導を担っていることが示唆された。

特に、口腔機能が低下している高齢者は慢性的に唾液誤嚥をしているため、歯周病原菌は、1)ACE2 の発現を介して SARS-CoV2 の感染性を高める、2) 炎症性サイトカインを誘導し下気道の炎症を増強することにより、COVID-19 の重症化に関与している可能性が示唆された。

今後、歯周病原菌による詳細な ACE2 の発現機序を検討する。具体的には、LPS や線毛 (FimA と Mfa1)、ジンジパイン等の関与を調べると共に、ウイルスの侵入を助ける TMPRSS2 (Transmembrane protease serine 2: II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ) の発現に関しても同様の実験を行う。また、口腔の細胞に SARS-CoV-2 が感染することが明らかになったので、頬粘膜や口腔底の細胞を培養し、歯周病原菌や病原因子による ACE2 や TMPRSS2 の発現誘導効果を調べる。さらに、実際の患者から唾液を採取し、口腔衛生状態の良し悪しが ACE2 や TMPRSS2 等の発現に及ぼす影響を検討する。

## 4) 歯周病原菌と喘息との関連研究

気管支喘息においても小児の齲歯の有無で喘息の重症度に差があるとする報告があるが、口腔細菌と喘息との関係は明らかになっていない。今年度、歯周病菌の気道内投与により、喘息が誘発されるか、及び口腔衛生が気管支喘息の発症や増悪の予防につながるかを評価する研究を開始した。8 週齢のマウス (C57BL/6J) に抗原として day0、7、14 に Ovalbumin を経気道投与した。day0、7 にアジュバンドとして熱処理して感染性がない歯周病原菌の死菌 (*F. nucleatum*、*P. gingivalis*、*Treponema denticola*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Streptococcus salivarius*) をそれぞれ投与した。day16 に安楽死処置後に BALF、血清、肺組織等を採取して各群の細胞分画を評価した。その結果、OVA 単独投与群や *P. gingivalis* 群、*T. denticola* 群、*S. salivarius* 群と比較して、*F. nucleatum* 群と *A. actinomycetemcomitans* 群で BALF 中の細胞分画で好酸球数の増強を認めた。以上の結果から、特定の歯周病菌が OVA とのアジュバンド効果で喘息を誘発する可能性が示唆されたため、今後詳細なメカニズム解析と臨床研究を進める予定である。

## ② 口腔衛生管理有効性の科学的根拠の立証のための基礎研究

## 〔7 研究結果（つづき）〕

近年、歯周病菌をはじめとする口腔細菌が誤嚥性肺炎などの呼吸器系疾患の原因となる一方で、口腔ケアがその予防に有効であることが広く知られるようになった。実際の医療現場では、口腔ケアは周術期の肺炎の発症を抑制し、入院期間の短縮と医療費の削減に大きく貢献している。しかし、なぜ口腔ケアが誤嚥性肺炎をはじめとする呼吸器系疾患の予防に有効なのか、そのメカニズムについては解っていない。そこで、歯科医による専門的口腔ケア前後の喀痰を採取し、炎症性細胞や炎症物質などを定量し比較することで、口腔ケアの有用性の機序を明らかにする研究を開始した。これまでに、38名の喀痰を回収し、唾液中のプロテアーゼ活性や炎症物質量を定量するとともに、次世代シーケンサーにより唾液中の細菌叢解析を進めている。専門的口腔ケアにより、誤嚥性肺炎の発症、及び再発率が低下するとの興味深いデータが得られているが、今後さらに症例数を増やして炎症物質量と病態・予後との関連解析を進めて行く予定である。

また、口腔環境が、肺炎起因菌やインフルエンザウイルスの感染そのものに影響を及ぼしている可能性があるため、口腔衛生状態が良好または悪い人の唾液を採取した後、唾液が呼吸器疾患の発症や増悪に関わる細菌とウイルスの感染性に及ぼす影響についても研究をスタートさせた。