

## 令和3年度 学術研究助成金〔社会実装研究〕実績報告書

令和 4 年 5 月 27 日

日本大学学長 殿

氏 名： 小 松 泰 喜  
資格・所属： スポーツ科学部・教授  
実施研究所： スポーツ科学部・スポーツ科学研究所

下記のとおり報告いたします。

### 1 研究課題

上田市鹿教湯地区での温泉とスポーツ・健康施策が及ぼす地域経済活性化への影響
---------------------------------------

### 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

研究代表者及び研究分担者

	氏 名	部科校・資格	役 割 分 担
研 究 代 表 者	小松泰喜	スポーツ科学部・教授	関係各所との連携協議、研究実施に向けた調整と研究の推進
研 究 分 担 者	小山裕三	スポーツ科学部・学部長・教授	研究組織の構築と管理
	加藤幸真	スポーツ科学部・専任講師	具体的運動プログラムの実施、運動プログラムの立案試案
	高橋亮輔	理工学部・准教授	具体的運動プログラムの実施
	難波秀行	理工学部・准教授	アンケートの実施とデータ解析
	岡野雄司	短期大学部・教授	データ入力とその管理

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
鹿教湯温泉旅館協同組合 上田市 リハビリテーションセンター鹿教湯病院	研究実施協力の連携、協議 研究実施協力の調整 人材の派遣や研究実施に関する協力

※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

研究の全体構想及びその中での本研究の具体的な目的について記述してください。

<区分>②概ね順調に進展している。

上田市の丸子温泉郷の中でも長野県上田市鹿教湯地区において、既存施設による具体的な健康施策を実践し、地域住民のみならず、そこを訪れる方々の健康支援を推進し、超高齢化社会における健康長寿延伸が現代社会の課題解決に貢献することを本研究の目的とした。3年間の研究期間を経て、社会資源の活用と産学連携により開発した運動プログラムを提供することにより、睡眠と心身の健康を含めた、療養効果やデータの蓄積により温泉と健康に関する研究の推進を図った。また、環境省の推進する新湯治プロジェクトに積極的に参加をし、温泉地で過ごす効果の把握にも協力を行った。

社会実装としては、上述の目的から地域社会に対し、大学との連携協力がスポーツ科学の視点による種々の取り組みにより、繰り返し宿泊をする利用者が増え、地域経済活性化への誘導となり、温泉地の新たな環境づくりへの啓発として、地域資源の有効活用にスポーツ・健康が寄与することを期待する研究課題であると考えた。特に、かつて「健康の里」として賑わったにもかかわらず、入込客減少や温泉供給施設等の老朽化といった社会的課題解決への、有効な手段となる可能性を探求することも重要な取り組みとして実施した。

#### 6 当該年度の実施状況の概要

次の点について、具体的かつ明確に記述してください。

- ①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況
- ②進捗上の問題点と今後の対策

##### ① 当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況

一昨年度に対象者8月期15名、2月期10名に対し、運動プログラムの提供前後に主観的評価（幸福感、健康度、睡眠、運動器痛、運動能力、バイタルなど）、滞在中における睡眠段階の評価と合わせ、縦断的な成果の結果の一部についてフィードバックを行った。身体・精神的な機能評価とその結果を踏まえた運動介入による効果について、データ収集は順調であった。昨年度に引き続き当該年度である令和3（2021）年度も、前年の成果を踏まえ、具体的な健康施策を提言することを目標に、前年度、研究協力に同意をした参加者を中心に、同様のアンケートや、共同研究として実施している環境省全国「新・湯治」療養効果測定調査プロジェクトから、温泉に入浴された方々に対し、調査を継続する予定となっていた。また、本来運動プログラムについてはスポーツ科学の観点から過負荷の原則に従い、加速度トレーニング機器（パワープレートなど）を利用し、生体の適応性を利用した強度の運動を提供してきており、その成果についても、一定以上の負荷による効果を検討し、運動の強度、持続時間、頻度、期間などの適用量について再検討を行う予定としていた。

## 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）〕

## ② 進捗上の問題点と今後の対策

しかしながら、令和2年度は新型コロナウイルス感染症の影響により、研究実施等が困難であり、令和元年度の集積データに関して解析を推進し、さらなる分析等を継続している。その成果報告の一部は、昨年度実施報告書にも記載をしており、第4回温泉を活かした新しい健康づくりフォーラム（令和3年3月17日（水）13:30～15:45）

<http://www.env.go.jp/press/109076.html>にて実績と中間報告を行っている。本年度は本フォーラムも中止・終了となり、実践報告の議論や結果についても公表できていない。ただし、詳細な解析において、睡眠パラメータとして深睡眠の指標である徐波睡眠（ $\delta$ 波）では、運動の効果による睡眠回復として、総睡眠時間と徐波睡眠をパラメータに、実施未実施の比較に関する検討を行いノンREM睡眠中のN3時間の割合や睡眠潜時をパラメータとする検討を継続して実施している。また、睡眠時間による $\delta$ 波の出現時間を抽出し、LF/HF（交感神経機能の指標）を採用し、解析を進めている。

一方で、平成29年7月に「自然等の地域資源を活かした温泉地の活性化に関する有識者会議」により提言された、現代のライフスタイルにあった温泉地の過ごし方の提案に伴う、「全国『新・湯治』効果測定調査プロジェクト（環境省）」へ参画し、調査票を用いたアンケート形式による調査を本研究課題実施中に行った。事務局である「一般財団法人 日本健康開発財団」がこの調査結果をまとめ、性別を問わず、心身に一定の良好な変化（ストレスが少なくなった、疲労が少なくなったなど）があることが確認できており、年代別でその変化には違いが見られたとしている。また、温泉に入るだけではなく、温泉地で何らかのアクティビティ（登山、周遊観光など）を行うことが心身により良い変化をもたらしたとされる報告をしている。詳細は、全国「新・湯治」効果測定調査プロジェクト令和元年度調査結果としてweb siteでも公開している（chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.env.go.jp/nature/onsen/pdf/2-9-2\_p\_7.pdf）。令和2年度以降も引き続き、本調査を継続して温泉地の療養効果を把握するとともに、現在のライフスタイルにあった温泉地の新しい過ごし方を提案する「新・湯治」の取組を推進する予定であった。尚、「全国『新・湯治』効果測定調査プロジェクト」は平成30年度より実施し、この度3年分（11,830件）の結果がまとまり、報告がなされている（chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.env.go.jp/nature/onsen/pdf/5gaiyo.pdf）。

### 7 学会発表等

当該年度における研究成果の発表状況（学会発表，成果物展示，プレス発表等）について記入してください。  
要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月

### 8 著書・雑誌論文

当該年度における研究成果の発表状況（著書，雑誌等）について記入してください。  
著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所

### 9 本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

#### 10 その他の成果

環境省全国「新・湯治」効果測定調査プロジェクト3ヵ年調査結果（平成30年度－令和2年度）概要報告 chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.env.go.jp/nature/onsen/pdf/5gaiyo.pdf

#### 11 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況

名称	知的財産の種類	発明者 (考案者・創作者)	権利者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

## 1 2 今後の計画

実用化までの今後の計画について、当初計画からの変更点をふまえて記載してください。

令和元年度に実施した経験から、加速度計から得られる日中の身体活動強度と睡眠段階への影響の比較検討を行い、当該年度の運動プログラムの再考のための資料と実践に昇華させる予定であった。令和3年度は運動プログラムの改変には、研究分担者および研究協力者らと、プログラムの見直しを実施し、主観評価（幸福感、健康度、睡眠、運動器痛、運動能力、バイタルなど）の結果を含め、運動・生活指導を含めたプログラムとして提供を検討していた。また、これまでと同様に参加者に縦断的な成果をフィードバックする予定としていた。特に、睡眠と心身の健康の観点から、滞在中に睡眠段階の再評価も実施する予定としていた。これらの結果を踏まえ、提供する運動プログラムが普段から実践できるように、令和元年度同様、加速度計を装着し、地域資源を活用した運動プログラムの際にそれぞれの強度について再確認ができるような、認知行動療法的手法を用いた検討をすることとしていた。

本研究課題の成果により、温泉とスポーツ・健康施策を活かした結果から、運動プログラムによる運動強度と睡眠段階の改善との関係を明らかにすることとしていた。運動プログラムは最終的にはスポーツ科学の観点から、適切な負荷による生体の適応性を利用したプログラムとして運動の強度、持続時間、頻度、期間について検討した後、参加者へ縦断的な成果を令和3年度内に予定し、最終評価として参加者へフィードバックを実施することにより成果の検証をする予定であった。この点では詳細な解析から、スポーツ科学の観点から運動の効果による睡眠回復のパラメータの抽出として、睡眠時間による $\delta$ 波の出現時間やLF/HF（交感神経機能の指標）を採用し、解析を進めている。

鹿教湯地区における旅館・宿泊客のつながりを深め、高齢者だけではなく、各年齢層の人が「健康づくり」のために、地域に来訪することにより、地域経済活性化にもつながることを示唆するものと考えていた。当該年度で最終年を迎えたが、達成できなかった場合の対応策として、評価時期を年に複数回設けることとしていたが（令和元年度は8月期、2月期）、常に「官」、「産」、「学」の連携の下で参加者に働きかけることが可能な体制（鹿教湯温泉旅館協同組合、上田市（産業観光課を中心に）鹿教湯三才山リハビリテーションセンター鹿教湯病院）であったものの、実施を断念する結果となった。参加者は長期滞在者として高いリピーター率があることから県内者を対象として検討したものの、圏域ごとの新規陽性者数が不安定であり、それに伴い圏域で「新型コロナウイルス特別警報」が発出した状態での実施は困難と判断した。

その代替として今後の研究実施について、連携者（鹿教湯温泉旅館協同組合他）らと「令和5年度 長生きを喜べる長寿社会実現研究」への応募を検討し、研究支援を得たうえで研究実施を継続する予定としている。また、連携組織との共同研究の成果として本研究課題とは直接的ではないが、健康診断評価として検討をした早期アルツハイマー型認知症診断支援システム Voxel-based Specific Regional analysis system for Alzheimer's Disease（VSRAD）による研究成果を現在投稿中である（Confirming submission to Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management）。

## 令和元年度 学術研究助成金〔社会実装研究〕実績報告書

令和4年4月15日

日本大学学長 殿

氏 名： 綱 島 均

所属・資格： 生産工学部・教授

実施研究所： 生産工学部 生産工学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

IT 技術を活用した地方鉄道の高安全度化に関する研究

## 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

研究代表者及び研究分担者

	氏 名	部科校・資格	役 割 分 担
研 代 表 者	綱 島 均	生産工学部・教授	研究統括、軌道状態診断アルゴリズム開発、踏切高安全度化スマートホンアプリの開発
研 究 分 担 者	高橋 聖	理工学部・教授	踏切高安全度化制御システムの開発
	保坂 成司	生産工学部・教授	軌道の予防保全プログラムの評価
	望月 寛	理工学部・准教授	踏切高安全度化制御システムの開発
	山内ゆかり	生産工学部・専任講師	機械学習による診断アルゴリズム開発
	永村 景子	生産工学部・専任講師	踏切高安全度化のための現地試験と評価

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
1. 独立行政法人自動車技術総合機構 交通安全環境研究所	安全性、信頼性評価および鉄道事業者との調整
2. 株式会社京三製作所	システムの製作
3. 山形鉄道株式会社、銚子電気鉄道株式会社	実験フィールドの提供

※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

研究の全体構想及びその中での本研究の具体的な目的について記述してください。

車輪がレールで案内されて走行する鉄道にとって、軌道の安全管理は重要である。しかし、地方鉄道では、施設の経年劣化が著しい一方で、費用の確保や技術力の維持が難しく、十分な検査が行えない事業者も少なくない。このような問題を解決するためには、地方鉄道の営業車両の走行データを一括収集・管理し、軌道の状態を診断・予測するセンターが有効であると考えられる。これにより、多くの地方鉄道事業者における軌道保守に関する問題を解決できるものと考えられる。また、地方鉄道では、遮断機も警報器もない第4種踏切が多くあり、踏切の安全対策が喫緊の課題となっている。

本社会実装研究では、地方鉄道の安全性を向上させるため、IT技術を活用して、1) 予防保全による軌道の高安全度化、2) 踏切の高安全度化、を達成するための技術開発を実施する。本研究では、軌道状態診断システムと踏切警報システムの情報伝送・分析機能を共通・共有化することで、コストの大幅な削減を実現することが可能である。

#### 6 当該年度の実施状況の概要

次の点について、具体的かつ明確に記述してください。

- ①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況
- ②進捗上の問題点と今後の対策

##### (1) データセンターの増強と複数路線における車両走行データの自動収集

山形鉄道に設置し検証を行った小型プローブ装置1台を、銚子電鉄車両へ移設し、データセンターと銚子電鉄車両を、京三製作所本社サーバを経由して、携帯電話回線で接続する。また、銚子電鉄用のデータサーバ1台を追加設置する。山形鉄道および銚子電鉄車両の位置、速度、動揺データをリアルタイムで伝送し、収集データを一元管理する。

進捗状況：銚子電鉄車両用小型プローブ装置1台を新規製作し、2020年11月に銚子電鉄車両へ搭載を完了した。データセンターにおいて、山形鉄道、銚子電鉄の2路線に対して、列車の位置、速度、動揺データをリアルタイムで伝送し、収集データを一元管理できるようになった。コロナウイルス感染拡大の影響により、日大生産工学部、京三製作所、交通安全環境研究所のいずれも出張ができず、銚子電鉄車両への設置が6ヶ月遅れたため、銚子電鉄の動揺データ収集が計画から6ヶ月遅れることになった。この6ヶ月間のデータ収集を、令和3年度に実施し、必要となるデータ収集を完了した。

(達成度 100%)

## 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）〕

## （2）軌道常時診断システムの運用

山形鉄道、銚子電鉄において自動収集したデータを分析、診断し、軌道状態を適宜フィードバックして、軌道の予防保全を実施してもらう。保守結果をセンターで評価し、鉄道事業者に報告する。

進捗状況：山形鉄道に対して定期的に軌道状態の変化を報告し、軌道保守へのフィードバックを実施した。銚子電鉄に対する分析を令和3年4月に実施して、令和3年5月から6月に第1回の報告会議を実施した。その後も、山形鉄道、銚子電鉄における車両動揺データを継続的に収集しており、定期的な軌道状態診断を行っている。

（達成度 100%）

## （3）列車接近警報スマホアプリの改善

平成30年度に実施した実験から明確になった問題点を改善したスマホアプリを開発し、実装する。

進捗状況：プロトタイプของ スマホアプリを開発し、実装を行った。令和2年度は、コロナウイルス感染拡大の影響により、日大生産工学部、京三製作所、交通安全環境研究所のいずれも出張ができず、また、山形鉄道からも訪問の自粛を要請されたため、現地での問題点の抽出が十分実施できなかった。未実施部分については、令和3年度に実施を行い、スマホアプリの開発を完了した。

（達成度 100%）

## （4）列車接近警報システムの実証実験（4種踏切対応）

銚子電鉄沿線、山形鉄道において、4種踏切に対応した列車接近警報システムの実証実験を実施する。

進捗状況：令和2年12月に、山形鉄道における第4種踏切において、プロトタイプของ スマホアプリの動作確認を実施した。その結果、列車接近警報の基本機能は確認できたが、接近時の時間のばらつきが大きく原因究明が必要であることがわかった。コロナウイルス感染拡大の影響により、日大生産工学部、京三製作所、交通安全環境研究所のいずれも出張ができず、また、山形鉄道からも訪問の自粛を要請されたため、実証実験を前記の1回しか実施できなかった。令和3年度においては、現地での実証実験を複数回実施し、高精度で列車接近警報をスマートホンに提示できることを実証した。山形鉄道の複数の踏切において十分な機能確認を行えたため、銚子電鉄での実証試験は不要となった。

（達成度 100%）



(5) その他のマイルストーンに対する進捗状況

- 1) 鉄道技術連合シンポジウム(J-Rail2020) (東京), 日本機械学会交通・物流部門大会(TRANSLOG2020) (東京) において成果を発表する。
- 2) 国際鉄道シンポジウム Railway2020 (欧州) においてこれまでの成果を発表する。

進捗状況：シンポジウムが 2022 年 9 月に延期されたため、成果発表が行えなくなった。代替として、令和 3 年 11 月に開催された鉄道技術国際会議(STECH2021) (幕張メッセ, オンラインのハイブリッド開催) にて成果を発表した。

(達成度 100%)

- 3) 最終的な成果発表として、鉄道工学リサーチ・センターが主催する第 3 回 NU-Rail Innovation を日本大学生産工学部において開催する。この際に、データセンターの見学会を実施し、開発したシステムの一般公開を実施する。

進捗状況：津田沼キャンパスへの入構が規制されたため、令和 3 年度の実施を見送った。令和 4 年 5 月 26 日に開催される鉄道技術展・大阪において日本大学生産工学部鉄道工学リサーチ・センター シンポジウム「未来につなげる地方鉄道」として成果発表を行う。データセンターの見学会については令和 4 年度に実施を予定する。

(達成度 100%)

## 7 学会発表等

当該年度における研究成果の発表状況（学会発表、成果物展示、プレス発表等）について記入してください。  
要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
Hiroya Ohki, Hitoshi Tsunashima, Tetsuya Takata, Seigo Ogata	9th International Symposium on Speed-up and Sustainable Technology for Railway and Maglev Systems (STECH2021)	Data-driven track irregularity estimation technique using car-body acceleration	2022 年 11 月 25 日
Hitoshi Tsunashima, Yuya Suzuki, Tetsuya Takata, Seigo Ogata	9th International Symposium on Speed-up and Sustainable Technology for Railway and Maglev Systems (STECH2021)	Development of track condition monitoring system for regional railways	2022 年 11 月 25 日

## 8 著書・雑誌論文

当該年度における研究成果の発表状況（著書、雑誌等）について記入してください。

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆 者	著書名・雑誌名／論 文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Hitoshi Tsunashima and Masashi Takikawa	Monitoring the Condition of Railway Tracks Using a Convolutional Neural Network	Recent Advances of Wavelet Transform and Their Applications	2022 年 2 月 27 日	IntechOpen, 10.5772/intechopen.102672

## 9 本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

## 10 その他の成果

## 11 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日
情報処理装置、情報処理方法、及びプログラム	特許	綱島 均他	日本大学	特願 2021-165026	令和3年 10月06日	

## 1.2 今後の計画

実用化までの今後の計画について、当初計画からの変更点をふまえて記載してください。

実用化に向けた具体的なマイルストーン

### (1) データセンターの運用

令和4年度以降もデータセンターを長期的に稼働させ、軌道状態診断を実施して、山形鉄道および銚子電鉄に対して、診断結果を高頻度にフィードバックする。また、踏切位置において列車の接近を知らせ、注意を喚起するシステムの社会実験を計画し、警報を発出するタイミングを最適化する。

### (2) 研究成果発表計画

2022年度：

- 1) 鉄道技術連合シンポジウム(J-Rail2022) (東京) において成果を発表する。
- 2) 令和4年5月26日に開催される鉄道技術展・大阪において日本大学生産工学部鉄道工学リサーチ・センター シンポジウム「未来につなげる地方鉄道」として成果発表を行う。

### (3) 実用化計画

2022年度以降は、鉄道工学リサーチ・センターにおいてデータセンターの管理運営を行い、交通安全環境研究所、京三製作所と連携して、山形鉄道、銚子電鉄の軌道状態診断を継続する。さらに、システムの低コスト化が可能なスマートフォンを活用した診断システム(科研費により研究実施中、2020年度から2022年度)の開発と連携させて、多くの地方鉄道事業者が採用可能なシステムに進化させる。また、山形鉄道において、4種踏切に対応した列車接近警報システムの社会実験を実施し、実用化を目指す。京三製作所においては、本研究成果をもとにビジネス展開を予定している。

## 令和3年度 学術研究助成金〔社会実装研究〕実績報告書

令和 4年 5月 7日

日本大学学長 殿

氏 名： 森岡一朗

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

GOD-POD-UnaG 法を用いた血中アンバウンドビリルビン自動測定機器の開発

## 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

研究代表者及び研究分担者

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	森岡一朗	医学部小児科学分野・教授	研究開発統括、機器開発
研 究 分 担 者	長野伸彦	医学部小児科学分野・准教授	機器開発、新生児血液検体収集
	岡橋 彩	医学部小児科学分野・助教	機器開発、新生児血液検体収集
	桃木恵美子	医学部小児科学分野・助教	新生児血液検体収集

連携組織

組 織 名	役割分担
アトムメディカル社	企業側の開発を統括
Baebies 社	機器開発
シノテスト社	試薬開発担当

※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

研究の全体構想及びその中での本研究の具体的な目的について記述してください。

新生児のビリルビンによる脳障害（ビリルビン脳症）は脳性麻痺や心身障害の主要因の一つで、少子化時代の我が国において克服すべき疾患である。我々は、血中のアルブミンと結合していない非抱合型ビリルビン（アンバウンドビリルビン，UB）を測定すれば、この脳障害の発症を高率に予測できることを明らかにしてきた。現在の UB 測定機器は、1980 年代に開発された吸光度測定を用いたグルコースオキシダーゼーペルオキシダーゼ法，[GOD-POD 法]，UB アナライザー，アローズ社、大阪）である。しかし、この GOD-POD 法を用いた血中 UB 測定は、抱合型（直接）ビリルビンやヘモグロビン（溶血）の血液では誤値が生じるという臨床で大きな問題であり普及には至っていない。我々は新しく GOD-POD 法と非抱合型ビリルビンと特異的に結合して蛍光を発するタンパク質（UnaG）を組み合わせることにより、抱合型ビリルビンやヘモグロビンの影響を受けずに微量血中の UB を測定することができる画期的な方法を確立した（GOD-POD-UnaG 法：特許第 6716108 号、2020 年 6 月 12 日）。本研究では、この GOD-POD-UnaG 法を用いた自動測定機器を開発し、実用化を行う。

本装置が Point-of-care の体外臨床検査診断として実用化されれば、現在では見逃してしまうビリルビン脳症発症のハイリスク新生児が検出できるようになる。そして、世界中でビリルビン脳症という脳性麻痺や心身障害の発症抑制に大きく貢献できる。脳性麻痺や心身障害児は生涯に渡って療育や福祉支援が必要であり巨大な医療費や福祉費用がかかっている。その費用を減少させることができ、医療経済上、大きな効果となる。

#### 6 当該年度の実施状況の概要

次の点について、具体的かつ明確に記述してください。  
①当初の研究計画，具体的なマイルストーンに対する進捗状況  
②進捗上の問題点と今後の対策

2019 年度にアトムメディカル社および米国のノースカロライナ州にある Baebies 社を連携組織として進め、その結果、Baebies 社の保有する Digital Microfluidics 技術と GOD-POD-UnaG 法を組み合わせた機器の実現性ができた。通常診療で測定され血中 UB 濃度がわかっている実際の新生児の血清を用いた定量性の確認を行うために、2020 年 3 月 20 日に日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会へ申請書を提出した。2020 年 6 月 19 日付で承認を得た（RK-200414-2）。

2020 年度は、新型コロナウイルスの流行が大きく影響したが、シノテスト社と共同開発している UnaG 生産のためのプロトコルの作成および生成までが完了できた。

特例措置の 2021 年度は、UnaG と新生児血清を Baebies 社へ送付して Digital Microfluidics 技術と組み合わせたカートリッジキット作成を行った。現在、米国で行っているキットの検証結果の要点を次に示す。進捗上の問題点と今後としては、測定精度がまだ十分でなく、修正研究が継続している。

また、米国の Baebies 社での機器及びカートリッジキットの検証がまだ完了していないため、国内に逆輸入しての検証や薬事承認プロセスが残されている。



図1 現在、製作中の機器及びカートリッジキット

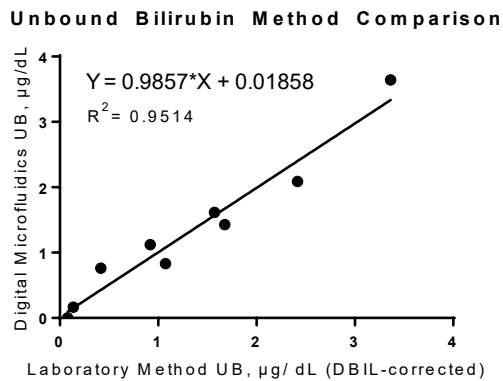


図2 開発中の機器と既存の UB アナライザー（アローズ社、大阪）の相関関係  
両者に非常に良い相関関係があることを確認できた。

#### A. 既存の UB アナライザー（アローズ社、大阪）

N = 4	MEAN	REPEATABILITY SD	REPEATABILITY CV
UB	0.46 µg/dL	0.008	1.8%
TB	15.73 mg/dL	0.33	2.1%

#### B. 開発中の機器

N = 7	MEAN (RFU <sub>s</sub> )	REPEATABILITY SD	REPEATABILITY CV
UB	118.64	21.66	18.3%
TB	478.33	41.36	8.6%

表1 測定精度の検証

既存の UB アナライザーは、SD 及び CV 値は低値であるが、開発中の機器は、臨床検査として必要十分な SD 及び CV 値には至っていない。

CV, 変動係数; RFU, raw fluorescence unit; SD, 標準偏差; TB, 総ビリルビン; UB, アンバウンドビリルビン

## 7 学会発表等

当該年度における研究成果の発表状況（学会発表、成果物展示、プレス発表等）について記入してください。  
要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
Morioka I, Elderbroom J, Basmajian M, Krishnamoorthy M, Boso M, Sista R, Schutzman DL, Wong RJ, Stevenson DK, Bhutani VK, Pamula V <u>森岡一朗</u>	Pediatric Academic Societies Meeting 2021	Unbound (free) bilirubin assay for novel point-of-care newborn bilirubin screening panel	2021.4
<u>森岡一朗</u>	第 65 回日本新生 児成育医学会総 会・学術集会	早産児の黄疸管理にアンバウ ンドビリルビン測定は必要か (共催セミナー)	2021.5
<u>森岡一朗</u>	第 65 回日本新生 児成育医学会総 会・学術集会	なぜ早産児の黄疸管理が重要 なのか? (スポンサード公開 教育セミナー)	2021.5
奥村彰久, <u>森岡一朗</u> , 荒井 洋, 早川昌弘, 日下 隆, 丸 尾良浩, 國方徹也, 熊田聡 子	第 65 回日本新生 児成育医学会総 会・学術集会	早産児ビリルビン脳症患児の 新生児期の検査値	2021.5
土方みどり, 長野伸彦, 今 泉隆行, 青木亮二, 香山一 憲, 清宮綾子, 加藤亮太, 岡 橋 彩, 高橋 滋, <u>森岡一朗</u> <u>森岡一朗</u>	第 65 回日本新生 児成育医学会総 会・学術集会	極低出生体重児における高直 接ビリルビン血症の発症頻度 とその発症関連因子の前方視 的検討	2021.5
<u>森岡一朗</u>	第 63 回日本小児 神経学会学術集会	アンバウンドビリルビンを用 いた早産児のための新黄疸治 療基準による黄疸管理	2021.5
秋本卓哉, 長野伸彦, 今泉 隆行, 青木亮二, 土方みど り, 不破一将, 清宮綾子, 加 藤亮太, 岡橋 彩, <u>森岡一朗</u>	第 57 回日本周産 期新生児医学会学 術集会	基礎疾患のない早産児におけ る胆汁うっ滞の発症頻度とそ の臨床像	2021.7
今泉隆行, 長野伸彦, 片山 大地, 原 康一郎, 秋本卓哉, 土方みどり, 不破一将, 青 木亮二, 清宮綾子, 岡橋 彩, <u>森岡一朗</u>	第 19 回日本新生 児黄疸管理研究会	在胎 30 週未満の早産児にお ける新基準を用いた黄疸管理	2021.10

## 8 著書・雑誌論文

当該年度における研究成果の発表状況（著書、雑誌等）について記入してください。



著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Iwatani S, Hirayama K, Izumi A, Ikuta T, Nagano N, Yoshimoto S, <u>Morioka I</u>	Time-fixed glucose oxidase-peroxidase method for measurement of serum unbound bilirubin levels / Clinical Laboratory	68 (2) doi: 10.7754/Clin .Lab.2021.21 0617.	2022 年 2 月	Clinical Laboratory Publications GmbH
Okumura A, Kitai Y, Arai H, Hayakawa M, Maruo Y, Kusaka T, Kunikata T, Kumada S, <u>Morioka I</u>	Magnetic resonance imaging findings in preterm infants with bilirubin encephalopathy beyond three years of corrected age / Pediatric Neurology	121 pp. 56-5	2021 年 8 月	Elsevier
Okumura A, Ichimura S, Hayakawa M, Arai H, Maruo Y, Kusaka T, Kunikata T, Kumada S, <u>Morioka I</u>	Neonatal jaundice in preterm infants with bilirubin encephalopathy / Neonatology	118 (3) pp. 301-9	2021 年 3 月	Karger Publishers
Okumura A, Kitai M, Arai H, Hayakawa M, Maruo Y, Kusaka T, Kunikata T, Kumada S, <u>Morioka I</u>	Auditory brainstem response in preterm infants with bilirubin encephalopathy / Early Human Development	154 pp. 105319	2021 年 3 月	Elsevier
Kishi I, Nagano N, Katayama D, Imaizumi T, Akimoto T, Fuwa K, Aoki R, Hijikata M, Kayama K, Kato R, Okahashi A, <u>Morioka I</u> <u>Morioka I</u> , Nakamura H	Successful treatment of hyperbilirubinemia by monitoring serum unbound bilirubin in an extremely preterm infant with bacterial infection / Clinical Laboratory	67 (1) pp. 183-6	2021 年 1 月	Clinical Laboratory Publications GmbH
<u>森岡一朗</u>	Treatment criteria for infants with hyperbilirubinemia in Japan / Seminars in Perinatology 【新生児の“びじゅある”モニタリング】経皮黄疸計 / With NEO	45 (1) pp. 151352	2021 年 2 月	Elsevier
<u>森岡一朗</u>	【新生児医療における ME 機器 -正しい使い方とトラブルシュー	34(1) pp. 64-9	2021 年 1 月	メディカ出版
<u>森岡一朗</u>	【新生児医療における ME 機器 -正しい使い方とトラブルシュー	51 (10) pp. 1504-7	2021 年 10 月	東京医学社

課題番号	社19-009
------	---------

岩谷壮太、黒川大輔、 森岡一朗	【テイング】光治療器 / 周産期 医学 医師と看護師における早産児 ビリルビン脳症の認知度の違い / 周産期医学	52 (1) pp. 125-9	2022 年 1 月	東京医学社
--------------------	--	---------------------	---------------	-------

9 本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

1 0 その他の成果

1 1 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

## 1 2 今後の計画

実用化までの今後の計画について、当初計画からの変更点をふまえて記載してください。

まだ、米国での開発研究が続いているため、国内での検証実験や薬事承認のプロセスは、未だ行えておらず、残された今後の課題および計画としては、以下がある。

- 1) 日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の規定を順守し、日本大学医学部附属板橋病院総合周産期母子総合医療センターに入院した黄疸発症新生児の通常診療で採取された血清の残余を 100 検体確保している（抱合型（直接）ビリルビンやヘモグロビン（溶血）含まない）。その際、通常の保険診療で測定された血中 UB 濃度（既存の UB アナライザー、GOD-POD 法（アローズ社、大阪）で測定したデータも収集し、比較検討する。その一致率および相関関係を示す解析結果が、体外診断用医薬品の承認基準となることを確認している（厚生労働省医薬食品局長，平成 27 年 1 月 20 日通知 薬食発 0120 第 1 号）。相関関係は、相関係数と相関式を求め、評価は相関係数が 0.9 以上、相関式は  $y=1.0x + 0$  に近い結果となることで行う。
- 2) その他の解析として、
  - (ア) 新血中 UB 自動測定機器で測定した血中 UB 濃度の精度を検証する。変動係数 (CV) は 5% 未満となることを確認する。
  - (イ) 日内変動分析および日間変動分析：同一検体を用いた繰り返し測定（6 回以上）を行い、CV を求める。測定者によるばらつきの検討：医師、研修医、看護師、検査技師が繰り返し測定（6 回以上）を行い、CV を求める。
  - (ウ) 既存の UB アナライザーの欠点である抱合型（直接）ビリルビンやヘモグロビン（溶血）含有の血清検体を新血中 UB 自動測定機器で測定し、測定値に影響がないことを確認させる。評価は、そのほかのパラメータである総ビリルビン/アルブミン比と比較することで確認できる。
- 3) 以上の成果に基づいて、アトムメディカル社とともに薬事承認申請を行う。体外診断医薬品・医療機器として承認されれば、保険診療点数の確保のための申請を行う。

## 令和3年度 学術研究助成金〔社会実装研究〕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

重症アレルギー疾患患者に対する抗 IgE 抗体治療のコンパニオン診断薬の開発

### 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

研究代表者及び研究分担者

	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	総括, Free IgE 測定系の確立, 臨床データ収集と解析
研 究 分 担 者	権 寧博	医学部／教授	喘息患者の臨床データ収集と解析, Free IgE 測定系の確立
	木澤靖夫	薬学部／教授	Free IgE 測定系の確立
	高橋恭子	生物資源科学部/教授	Free IgE 測定系の確立
	丸岡秀一郎	医学部／准教授	喘息患者の臨床データ収集と解析
	葉山惟大	医学部／助教	蕁麻疹患者の臨床データ収集と解析

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
株式会社シノテスト	Free IgE 測定用酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) の最適化と ELISA の分析法バリデーションの評価

※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： ①】・【達成度： 85%】

#### 5 研究目的

研究の全体構想及びその中での本研究の具体的な目的について記述してください。

我が国の全喘息患者（300 万人）のなかで高容量吸入ステロイド薬と長時間作用性 $\beta$ 刺激薬等の長期管理薬の併用でも効果不十分な難治性喘息は、約 34～35 万人いる。この患者の治療費は全喘息患者の治療費の七割を占めているため難治性喘息患者の医療費の削減が喫緊の課題である。難治性喘息患者の治療薬として使用されているヒト化抗 IgE 抗体（omalizumab）は、日本での売上額は 50 億円であり、患者の 1 カ月の医療費は 30 万円にもおおよび、投与中の薬剤減量の目安となる biomarker は存在せず年余に渡り投与されている。従って副作用の頻度も上昇する。さらに、我が国で慢性特発性蕁麻疹と診断された患者の中で重症患者は 5～6 万人と推定されており、omalizumab は重症患者に適応があり、その患者の約 7000 人に年余に渡り投与されており、その減薬方法は確立されていない。我が国にて今秋に omalizumab は、既存薬で効果が不十分な重症花粉症の適応となり、その患者数は国内に 200～300 万人いると推定されている。

既に私達は、omalizumab の投与中の薬剤減量の目安となる biomarker の測定系を実験室レベルで確立しており、今回企業との共同研究によってさらに感度が高く安定した測定系（コンパニオン診断薬）を確立させ、保険収載を目指すことを本研究課題の目的とする。

社会実装研究を行うことによる具体的な効果

このコンパニオン診断薬によって重症喘息、重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者への omalizumab 投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の頻度が減少する。omalizumab の投与量を漸減あるいは、中止できれば我が国の医療費削減に結び付く。

#### 6 当該年度の実施状況の概要

次の点について、具体的かつ明確に記述してください。  
①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況  
②進捗上の問題点と今後の対策

本研究課題は、2つの段階に分けて進めた。

第一段階：高感度 free IgE 測定系（コンパニオン診断薬）の確立；（株）シノテストとの共同研究

第二段階：free IgE 測定系のバリデーションの評価による実用化（保険収載）

#### **第一段階：高感度 free IgE 測定系（コンパニオン診断薬）の確立；株式会社シノテストとの共同研究**

私達の実験室レベルで確立した酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）の最適化を行うことを目的とし、使用する ELISA の方式は間接法を用いた。

## 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）

（株）シノテストから、ELISA の最適化の方法のアドバイスと実際の技術面の提供をしてもらい ELISA の最適化という第一段階の目標をクリアできた。

具体的には以下の実験を行った。

### 1. ELISA の最適化

最適化手順では、抗体・サンプル・バッファーなどを種々の濃度（希釈度）で試験することが非常に重要であった。

#### 1-1. プレートに固定化するリコンビナント可溶性 FcεRIα鎖濃度の最適化

(1). リコンビナント可溶性 FcεRIα鎖をプレートに固定化するが、種々濃度のリコンビナント可溶性 FcεRIα鎖 (0.03~0.50 μg/well) を含むコーティングバッファーを調製した。リコンビナント可溶性 FcεRIα鎖は、CHO 細胞に FcεRIα鎖を強制発現させて、その細胞上清を concentrator により濃縮後、抗 FcεRIα鎖抗体 (clone CRA1) と affinity column を用いて精製した。ウエスタンブロットリング法 (WB) で精製を確認した。

(2). 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。

(3). シグナルとバックグラウンドを確認した。

その結果、リコンビナント可溶性 FcεRIα鎖の至適濃度は 0.50 μg/well (PBS で希釈) であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて 16 時間であった。

#### 1-2. ブロッキングバッファーの最適化

(1). 種々のブロッキング溶液（種々の濃度の FBS/PBS, BSA/PBS）を調製した。

(2). それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。

(3). シグナルとバックグラウンドを確認した。

その結果、ブロッキングバッファーの最適条件は、PBS/0.5% Casein Wash Buffer は、PBS/0.05% Tween-20 と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて 16 時間であった。

#### 1-3. サンプル濃度の最適化

(1). サンプルのマトリックスに極力近い標準希釈液を調製した。

(2). それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。

(3). 標準曲線で適切なダイナミックレンジを確認し、サンプルの希釈直線を確認した。

(4). スパイク回復または希釈直線試験を行った。マトリックス効果を示す干渉物質の除去を行った。

その結果、血清を Sample Diluent (PBS/0.05% Tween-20, 0.5% Casein) で希釈し、オマリズマブ投与前は血清を 40 倍希釈。オマリズマブ投与後は血清を 10 倍希釈が至適条件であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて 16 時間であった。

#### 1-4. 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

#### 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）

- (1). 種々の濃度の検出抗体（種々の clone や polyclonal の HRP 標識抗 IgE 抗体）を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲内の濃度に設定した。各種酵素複合体結合抗 IgE 抗体として clone 4F4, clone 1A2, clone 4C3, clone M94176, polyclonal 抗体を用いた。
- (2). 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。
- (3). シグナルとバックグラウンドを確認した。

その結果、検出抗体は、HRP

標識マウス抗ヒト IgE 抗体 clone M94176（Fitzgerald Industries International, North Acton, MA, USA）と決定し、検出抗体を PBS/0.5% Casein で 1/1000 に希釈が至適条件と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25°Cにて 1 時間であった。

#### 1-5. シグナル検出の最適化

- (1). サンプル中の抗原想定量や、使用機器による抗原検出能力に基づいて、基質を選択した。
- (2). 作業溶液をプレートへ添加して、ELISA を実行した。
- (3). 抗原が全ダイナミックレンジにわたり確実に検出可能か検討した。

#### 1-6. 希釈標準液の最適化

- (1). 種々濃度の酵素複合体を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲に対応した濃度に設定した。
- (2). 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。
- (3). シグナルとバックグラウンドを確認した。

その結果、TBS (Sera Care, Milford, MA, USA) を用いて至適インキュベーション温度と時間は、25°Cにて 30 分であった。

以上より高感度 free IgE 測定系（コンパニオン診断薬）は、確立できた。

#### 第二段階：free IgE 測定系のバリデーションの評価：小臨床試験

1. 日本大学医学部附属板橋病院 臨床研究倫理審査委員会に小臨床試験の新規申請をし、承諾を得た。

外来に通院中で omalizumab 治療を開始した重症慢性特発性蕁麻疹患者 61 名の治療効果と free IgE 値の関係を調べた（末梢血 2 ml を omalizumab 投与前後の 2 回採血させていただいた）。

#### 2. ELISA の分析法バリデーション

検査法としての保険収載を目指すため、重症慢性特発性蕁麻疹患者の血清を用いて、第一段階で開発した ELISA の分析法バリデーションを評価した。

分析法バリデーション試験は以下の省令やガイダンスに従った。

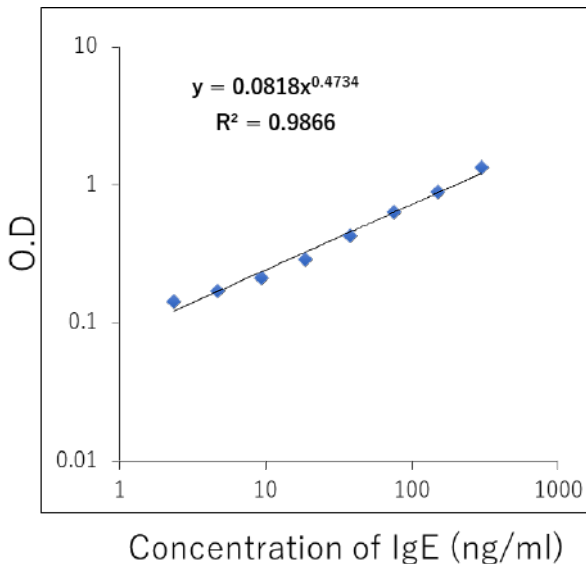
- ・厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成 9 年 3 月 26 日、一部改正 厚生労働省令第 114 号 平成 20 年 6 月 13 日）準用

## 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）

・「トキシコキネティクス（毒性試験における全身的曝露の評価）に関するガイダンスについて（平成 8 年 7 月 2 日薬審第 443 号）」準拠

以下の項目について評価した。

## 2-1. 検量線の作製



検量線の作製には immunoCAP 総 IgE (#10-9387-10 ファディア社) を用いた, 300 ng/mL から 150 ng/mL, 75 ng/mL, 37,5 ng/mL, 18,75 ng/mL, 9.375 ng/mL, 4.688 ng/mL, 2.344 ng/mL と段階希釈して使用した(図 1). Human myeloma IgE (Meck Millipore, Darmstadt, Germany) を検量線の作製に用いた場合に比較して immunoCAP 総 IgE (#10-9387-10 ファディア社) の方が感度がよかった。

図 1 free IgE ELISA の検量線

## 2-2. 定量下限の決定

定量下限は, 検量線から 2.344 ng/mL と決定した。

## 2-3. 日差再現性

sample #	1回目free IgE測定値 (IU/ml)	2回目free IgE測定値 (IU/ml)
N96	102.89732	95.6919546
N99	207.93215	325.946815
N101	41.487436	47.3377897
N102	952.29925	1181.83206

表 1 は, 1 週間の間隔をあけて 2 回同一のサンプルの free IgE 値 (IU/ml) を測定した結果である. N は normal healthy control (健常人) を指す. 健常人 4 名において日差の再現性は確認できた。

表 1 free IgE 測定値の日差再現性

## 2-4. 感度

Human myeloma IgE (Meck Millipore, Darmstadt, Germany) を検量線の作製に用いた場合に比



## 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）

較して immunoCAP 総 IgE（#10-9387-10 ファディア社）の方が感度がよかった。検量線スタンダードの最小値の 1/2 である 1.17 ng/mL を感度とした。

## 2-5. 確認アッセイ

omalizumab 投与前の慢性特発性蕁麻疹患者の free IgE 値 (pre free IgE) は、血清 IgE 値に相当するので受託臨床検査会社であるエスアールエル株式会社 (SRL) に外注しその測定値 (pre total IgE) と比較したところ、図 2 の如く相関係数は 0.8198 であった。

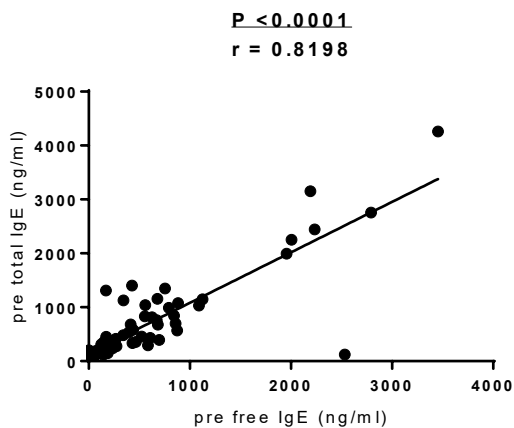


図 2 pre free IgE 値と pre total IgE 値の相関

## 2-6. 抗体価算出

3.4 ng/mL は 1 IU/mL に相当し抗体価は IU/mL で表した。

## 2-7. 凍結融解安定性

サンプル番号	濃度(IU/ml) 凍結サンプル	濃度(IU/ml) 凍結融解サンプル
C197	367.422291	176.426263
C208	260.443437	120.592118
C216	571.457588	104.143648
C226	142.474057	69.7607231
C242	172.595234	74.6027514

表 3 の如く、凍結サンプルと凍結融解を繰り返したサンプルでは測定値に大きな差が認められ、測定には -20°C 以下で凍結保存したサンプルでなければならないことが明らかとなった。

表 3. 凍結融解安定性

### 3. omalizumab 投与前の free IgE 値 (pre free IgE) と total IgE 値 (pre total IgE) と omalizumab 治療効果の関連に関する解析

omalizumab 投与前 1 か月間の平均 UAS7 で評価した。図 3 のようにそれぞれ UAS7①, UAS7

〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）

②から UAS7⑦と記載した. 平均 UAS7 が 6 以下を responder, 6 より大きい場合を non-responder とし, responder と non-responder の 2 群間において free IgE 値と total IgE 値に有意差があるかどうか評価した. 図 4 のように pre free IgE は pre total IgE と比較してより早期に omalizumab の有効性を評価できた. また, pre free IgE と pre total IgE は両者とも 3 か月以降の omalizumab の有効性を評価できた。

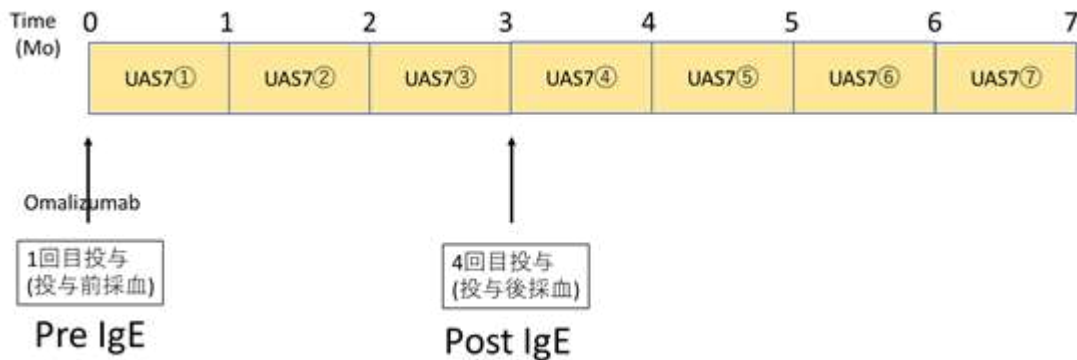
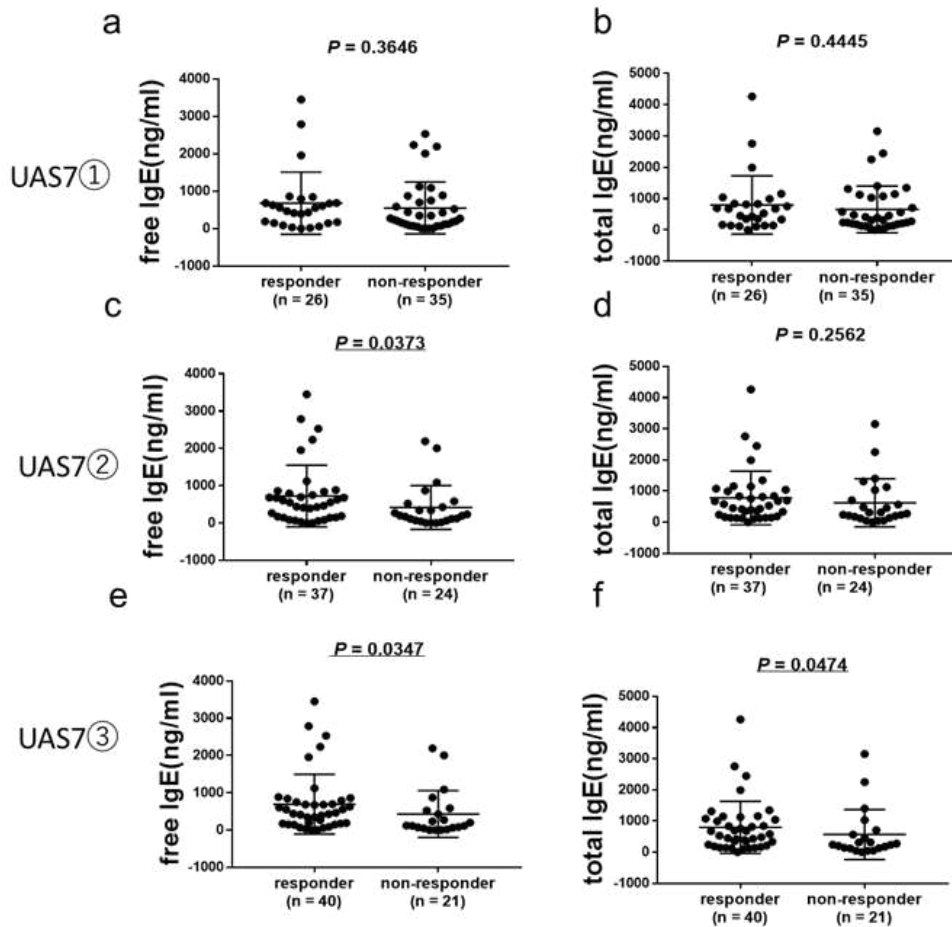


図 3 採血のタイミングと omalizumab 治療プロトコール



〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）

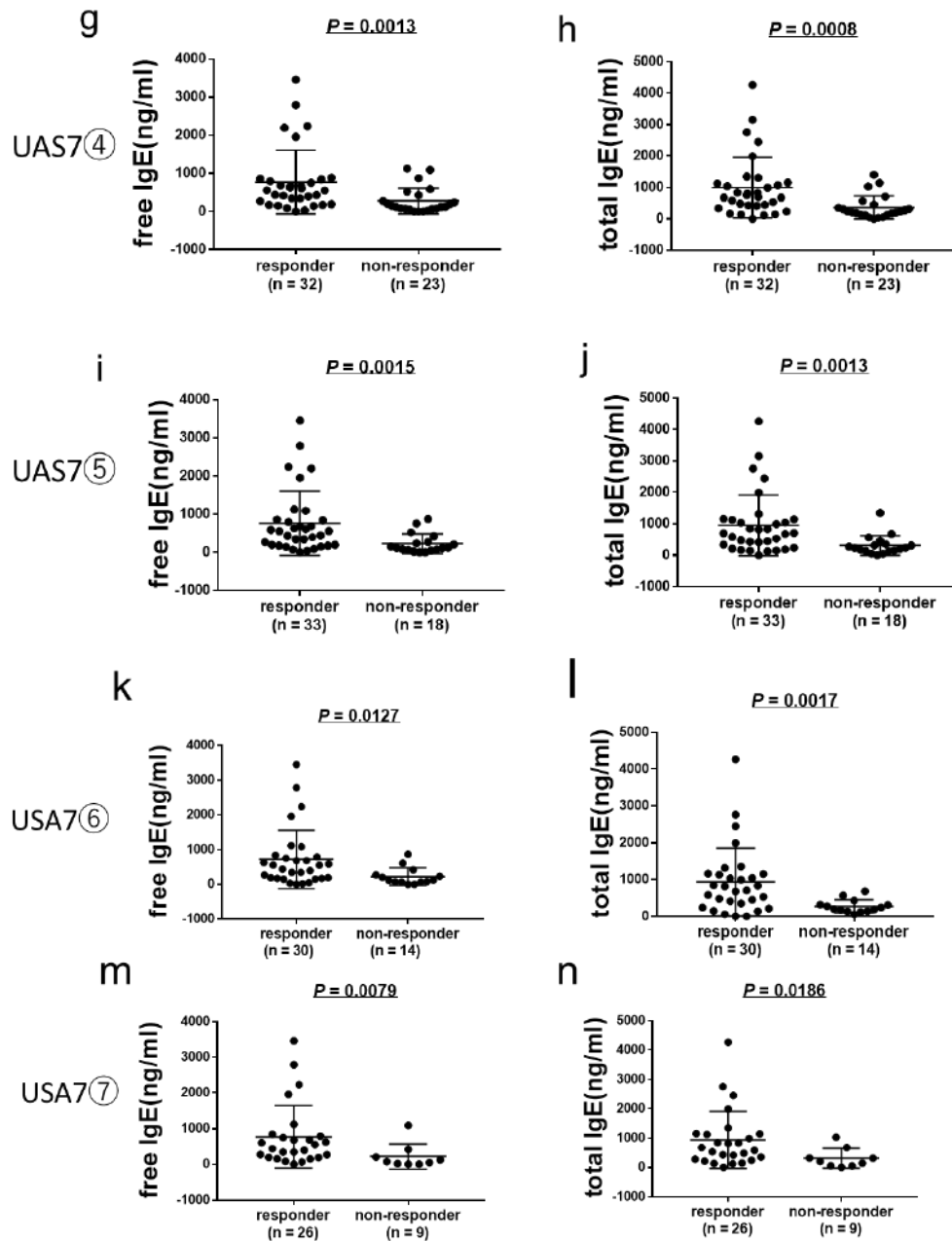


図4 responder と non-responder の 2 群間において free IgE 値と total IgE 値の比較

#### 4. post free IgE と post total IgE の相関関係

post total IgE は、post free IgE と omalizumab-IgE の複合体の和であるので図 5 の如く post free IgE が高ければ post total IgE は高くなるが相関係数は 0.5059 であった。

〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）

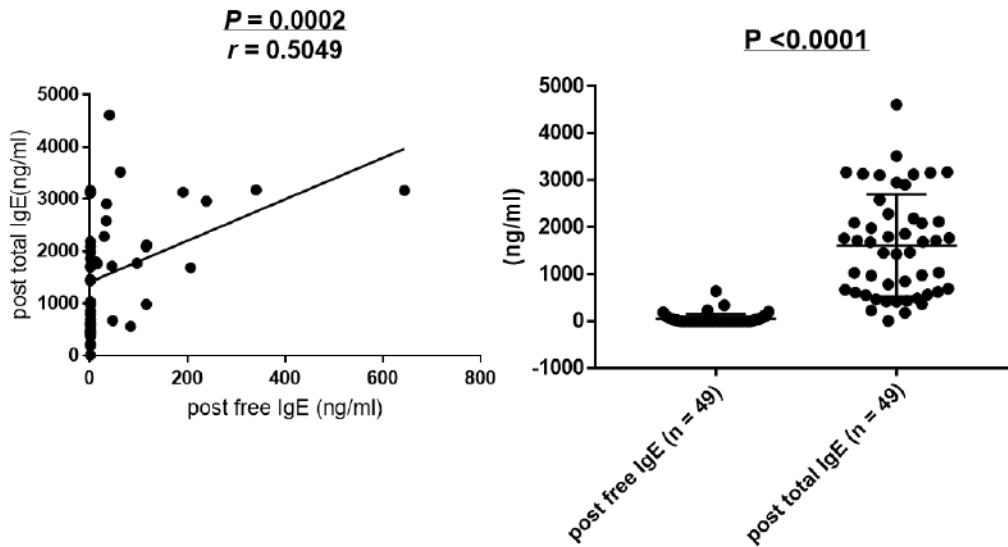


図5 post free IgE と post total IgE の相関関係

#### 5. pre free/total IgE と post free/total IgE の関係

free IgE は omalizumab 治療によって有意に低下し、一方、total IgE は有意に増加した（図6）。

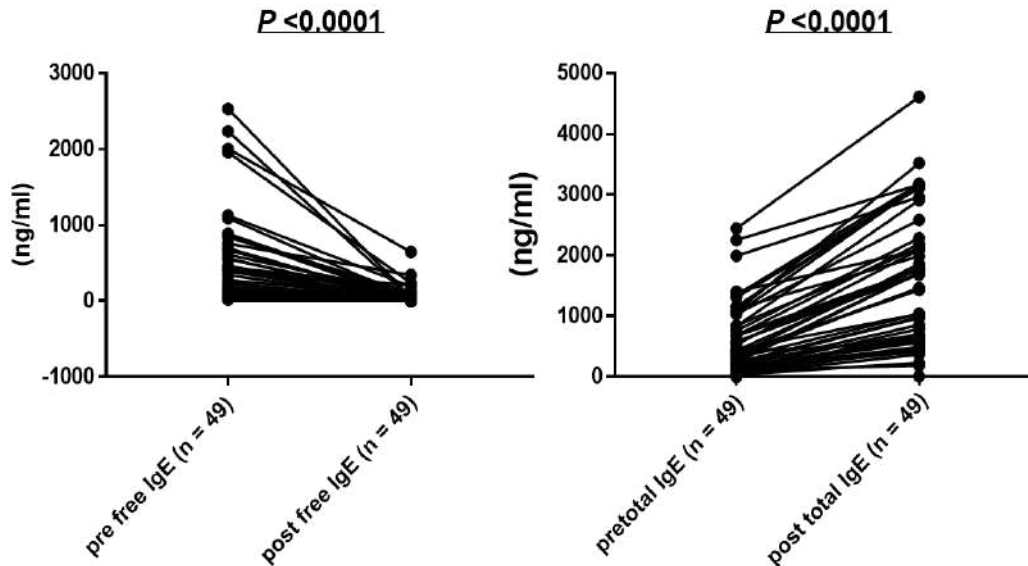


図6 pre free/total IgE と post free/total IgE の関係

#### 6. omalizumab 投与4か月目以降における post free IgE および post total IgE の non-responder と responder 間の有意差検定

post free IgE および post total IgE が omalizumab 投与4か月目以降における治療効果を判定

## 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）

できるかどうか調べるために non-responder と responder の 2 群間の post free IgE および post total IgE を比較解析した. post free IgE は UAS7⑦において non-responder で有意に低値であった (図 7g). post total IgE は, UAS7④と⑦において non-responder で有意に低値であった (図 7b と g). したがって, むしろ post free IgE が低いことが omalizumab の治療効果がないことを示す結果となった.

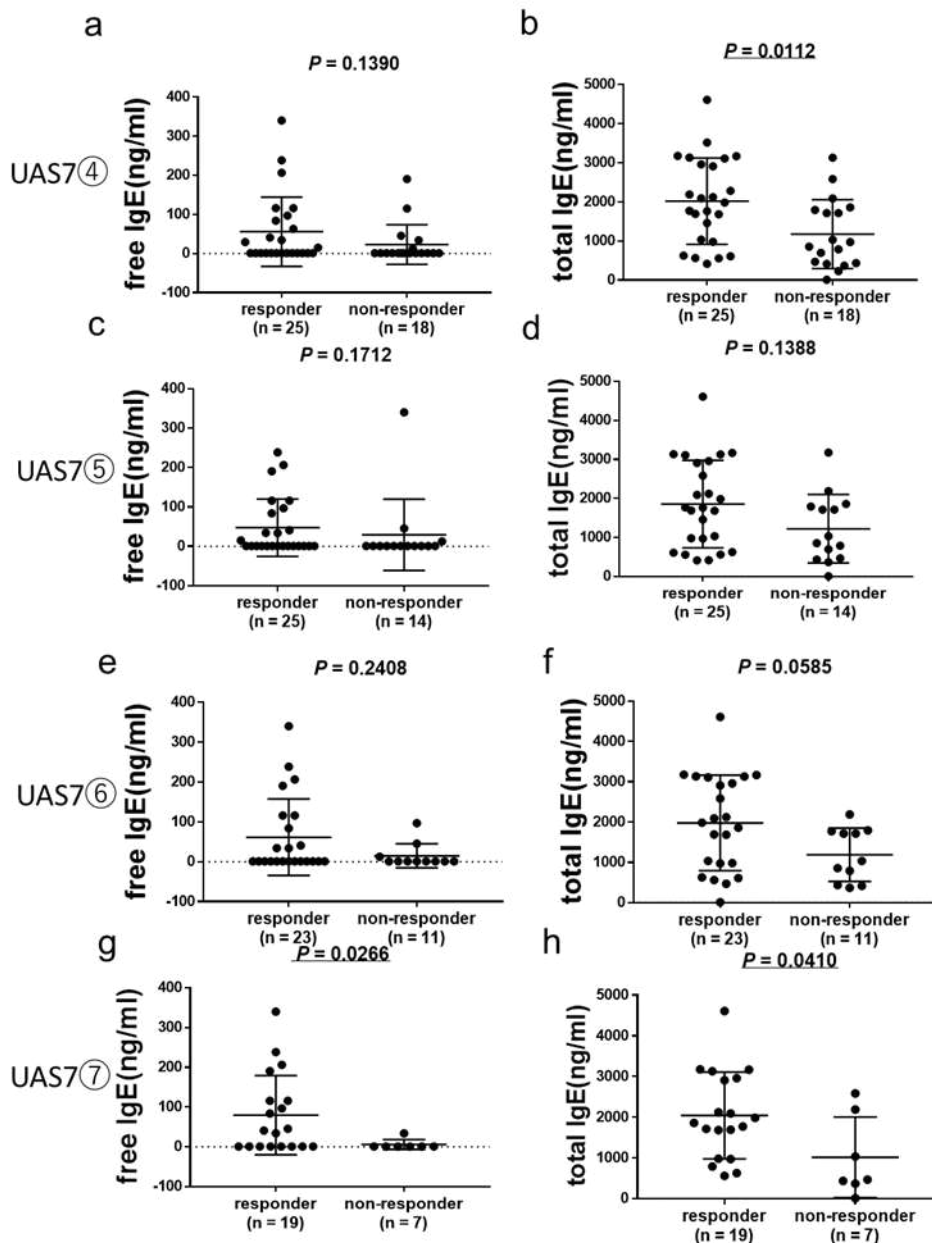


図 7 omalizumab 投与 4 か月目以降における post free IgE および post total IgE の non-responder と responder 間の有意差検定

## 7 学会発表等

当該年度における研究成果の発表状況（学会発表、成果物展示、プレス発表等）について記入してください。  
要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
岡山吉道, 豊島翔太, 伊崎聡志, 葉山惟大, 中村亮介	第 70 回日本アレルギー学会学術大会	抗 IgE 自己抗体の検出	2021.10.10
豊島翔太, 丸岡秀一郎, 曾田香織, 伊藤亮治, 山田志保, 岡山吉道, 権寧博	第 70 回日本アレルギー学会学術大会	ヒト化自然免疫型喘息モデルを用いたベンラリズムブの治療効果検討	2021.10.8
田杭真帆, 豊島翔太, 三木寿美, 伊東真奈, 武富芳隆, 葉山惟大, 坂本朋美, 村上誠, 藤田秀樹, 照井正, 岡山吉道	第 70 回日本アレルギー学会学術大会	リピドミクスを用いたアトピー性皮膚炎患者の脂質プロファイルの解析	2021.10.8
伊東真奈, 田杭真帆, 遠藤嵩大, 豊島翔太, 三木寿美, 武富芳隆, 葉山惟大, 坂本朋美, 村上誠, 照井正, 藤田秀樹, 岡山吉道	第 70 回日本アレルギー学会学術大会	慢性突発性蕁麻疹患者血漿中の脂質メタボリックの病態への関与	2021.10.10

## 8 著書・雑誌論文

当該年度における研究成果の発表状況（著書、雑誌等）について記入してください。

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Toyoshima S, Sakamoto- Sasaki T, Kurosawa Y, Hayama K, Matsuda A, Watanabe Y, Terui T, Gon Y, Matsumoto K, Okayama Y	J Allergy Clin Immunol/ miR103a-3p in extracellular vesicles from FcεRI- aggregated human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells	147(5): 1878- 1891, 2021	2021 年 5 月	Elsevier
Mishima S, Kashiwakura J, Toyoshima S, Sasaki- Sakamoto T, Sano Y, Nakanishi K, Matsumoto K, Okayama Y	Sci Rep/ Higher PGD <sub>2</sub> production by synovial mast cells from rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients via miR-199a- 3p/prostaglandin synthetase 2 axis	11(1): 5738, 2021	2021 年 5 月	Nature portfolio
Nishimori N, Toyoshima S, Sasaki- Sakamoto T, Hayama K, Terui T, Okayama Y	Allerol Int/Serum level of hemokinin-1 is significantly lower in patients with chronic spontaneous urticaria than in healthy subjects	70(4): 480-488, 2021	2021 年 10 月	Elsevier

Takasato Y, Kurashima Y, Kiuchi M, Hirahara K, Murasaki S, Arai F, Izawa K, Kaitani A, Shimada K, Saito Y, Toyoshima S, Nakamura M, Fujisawa K, Okayama Y, Kunisawa J, Kubo M, Takemura N, Uematsu S, Akira S, Kitaura J, Takahashi T, Nakayama T, Kiyono H	Mucosal Immunol/ Orally desensitized mast cells form a regulatory network with Treg cells for the control of food allergy	14(3): 640-651, 2021	2021 年 5 月	Nature
Fukuda T, Toyoshima S, Yamada S, Kurosawa Y, Okayama Y, Maruoka S, Gon Y	Allergy/ Enzymatic activity of ACE2 regulates type 2 airway inflammation in mice	76(6): 1913- 1917, 2021.	2021 年 6 月	Wiley

9 本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

日本大学および日本大学医学部プレスリリース「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」HP 2021.02.25



学校法人順天堂大学プレスリリース「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」順天堂大学 HP 2021.02.25

PRITIMES プレスリリース「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」2021.02.25

All About News プレスリリース「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」2021.02.25

ニッポンふるさとプレス 「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」2021.02.25

Rakuten Infoseek News 「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」2021.02.25

Excite News 「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」2021.02.25

@Dime「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」2021.02.25

B to B プラットフォーム業界チャンネル「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」2021.02.25

あとぴナビブログ「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」2021.02.25

医薬ニュース.com「アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明」2021.02.25

10 その他の成果  
特になし。

1 1 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日
慢性皮膚疾患の検査キット、及び慢性皮膚疾患の評価方法	特許	岡山吉道, 田杭真帆, 照井正, 伊 東真奈, 豊 島翔太, 村 上誠, 武富 芳隆, 三木 寿美	学校法人日 本大学	特願 2020- 153097 号	令和 2 年 9 月 11 日	

## 1 2 今後の計画

実用化までの今後の計画について、当初計画からの変更点をふまえて記載してください。

第一段階の高感度 free IgE 測定系(コンパニオン診断薬)の確立に関して様々なアドバイスをしてくれた(株)シノテストが、実用化後のこのコンパニオン診断薬の市場が大きくなり、収益に見合わないという会社側の判断で撤退した。しかしながら、検査法としての保険収載を目指し、第一段階で開発した ELISA の分析法バリデーションを評価し、連携組織に関して現在数社とコンタクト予定である。

第二段階の free IgE 測定系のバリデーションの評価に関して

ヒト化抗 IgE 抗体 (omalizumab)は、血清中の IgE を捕獲し、さらにマスト細胞や好塩基球の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI)に結合した IgE をも解離させ捕獲することを機序とした抗体療法である。omalizumab に結合していない free の IgE がアレルギー疾患の病態に関与しているの、理論的には、この free の IgE を 0 にすればよい訳である。しかしながら、慢性特発性蕁麻疹においては omalizumab 治療によって free IgE が 0 に近づいても治療効果がない群が存在し、その慢性特発性蕁麻疹患者群の病態には IgE が関与していないことが示唆された。

重症喘息においては、omalizumab による治療後の血清 free IgE 値が 25 ng/mL 以下になる群が omalizumab の治療効果がみられる群であることを私達も確認している。今後重症喘息患者において omalizumab による治療効果と治療後の血清 free IgE 値との関係を明らかにすることによって治療効果が有効となる free IgE 値が明らかとなり重症喘息への omalizumab 投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の頻度が減少できると思われる。

今回の私達の慢性特発性蕁麻疹患者での結果では、このコンパニオン診断薬によって慢性特発性蕁麻疹に対する omalizumab の早期の治療効果が判定できることが明らかになった。しかしながら慢性特発性蕁麻疹患者においては omalizumab 治療後の free IgE の測定によって omalizumab の投与量を漸減あるいは、中止できるかの判定はできないことが分かった。

## 令和3年度 学術研究助成金〔社会実装研究〕実績報告書

令和 4年 4月 25日

日本大学学長 殿

氏 名： 上田 賢志

所属・資格： 生物資源科学部・教授

実施研究所： 生物資源科学部・生命科学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

微生物酵素を活用した神経伝達物質の簡易定量キット

## 2 研究期間

令和2年度～令和3年度 / 令和 年度

\* 令和2年度～令和4年度

## 3 研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏 名	部科校・資格	役 割 分 担
研 究 代 表 者	上田賢志	生物資源科学部・教授	研究総括・キット用途拡大のための酵素生産菌の探索と性状解析
研 究 分 担 者	西山辰也	生物資源科学部・助教	キットの最適化と用途拡大のための酵素の特性解析

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
株式会社エンザイム・センサ 代表取締役 日下部 均 〒305-0047 茨城県つくば市千現 2-1-6 つくば研究支援センター	キットの商品化と事業展開

課題番号	社 20-1502
------	-----------

※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

ヒトの神経伝達において信号物質として機能することが知られる  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を簡易測定する酵素キットを開発し実用化することを目的とする。

グルタミン酸が興奮性の伝達物質であることに対し、その  $\alpha$ -カルボキシル基が取り除かれてできる GABA は、抑制性の伝達物質として機能する。抗不安、血圧低下、睡眠調節等、ヒトの精神状態の鎮静化・安定化に正に作用することから、GABA の血中濃度は躁病・うつ病等の精神疾患の指標として用いられる。また、最近では高 GABA 含量の食品はヒトの精神的安定に効果的とされ、注目を集めている。さらに、動物腸内に共生する細菌に GABA を生産するものが存在し、それが宿主動物におけるストレス耐性に関わっている可能性が指摘されはじめている。本研究では、様々な試料中の GABA 濃度を簡便に定量する汎用キットを開発することを通じて農産物をはじめ様々な試料中の GABA 含量が手軽に測定できる技術基盤を確立、新たな産業の創出を後押しする。

#### 6 当該年度の実施状況の概要

次の点について、具体的かつ明確に記述してください。

- ①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況
- ②進捗上の問題点と今後の対策

##### 1. キットの生産と販売開始

本研究によって開発、完成した GABA 測定キットは、昨年度に (株) エンザイムセンサから「GABA ミエール」として販売を開始した。以来、トマトを対象にした測定の用途を中心に利用が拡大し、一般向けの販売が軌道に乗りつつある。

また、昨年度に開設した本学学内向けのウェブサイトを通して測定モニターの募集を行い、数件の応募を受け付けて実施した。測定した試料については信頼度の高い測定結果を得ることに成功した。GABA 量を増強した味噌については、当初味噌由来の色素によって測定が阻害される可能性が考えられたが、問題なく測定できることも判明し、用途の拡大に繋がった。

トマト以外の様々な野菜ならびに果実試料についても、液体クロマトグラフィーを用いた従来の測定法との比較を通じてキットによる測定の有効性を検証した。その結果、多くの試料については問題なく使用できることが判明した一方で、柑橘類では測定が阻害されるケースが見られ、阻害要因の特定とそれに対する対策を今後検討する必要性が生じた。

〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）〕

## 2. 他のアミノ酸の定量を可能にするトランスフェラーゼの探索と実用化

特異的に反応する酵素を用いることで GABA の定量法と同様の手段が他のアミノ酸についても適用できることから、特に定量法の確立に実効性が見込まれるアミノ酸数種について、ひきつづきそれらを基質とするトランスフェラーゼを生産する微生物の探索を実施した。昨年度精製に成功したフェニルアラニンに特異的に作用するトランスフェラーゼについて、そのアミノ酸配列と生産菌の全ゲノム情報をもとに遺伝子を同定することに成功した。

昨年度完成させ特許申請を行ったアスパラギンおよびアスパラギン酸の酵素定量キットについては、特許が承認され公開された。本キットについても野菜を主とする実サンプルを用いた測定試験を行い、従来法と比較してその精度を検証した。

## 7 学会発表等

当該年度における研究成果の発表状況（学会発表、成果物展示、プレス発表等）について記入してください。  
 要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
西山 辰也 他	日本農芸化学会 2022 年度仙台大会	アスパラギン酸トランスアミナーゼを利用したアスパラギン酸測定キットの開発	2021 年 3 月 20 日
日下部 均	日本放線菌学会 2022 年度大会	放線菌酵素を利用したアミノ酸測定キットの紹介（企業展示）	2021 年 9 月 18 日

## 8 著書・雑誌論文

当該年度における研究成果の発表状況（著書、雑誌等）について記入してください。  
 著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
日下部 均	化学と生物／アミノ酸測定に適した酵素の発見と測定キットの開発～誰にでもできるアミノ酸の測定	59 巻 10 号	2021 年 10 月	日本農芸化学会
Nishiyama et al.	Sci Rep. Organocatalytic activity of granaticin and its involvement in bactericidal function	In press	2022	Nature publishing group

## 9 本研究課題に関するその他の発表（新聞、一般雑誌掲載等）

日経バイオテク「日本大、微生物由来の「有機触媒」を相次ぎ発見」  
 (2021.10.29)(<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/news/p1/21/10/28/08763/>)

## 10 その他の成果

特になし

## 11 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況



名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	公開年月日
アミノ酸の測定方法、及びそのためのキット	特許	日下部 均、 ウォロトリ アルシステ スティアニ ンディア、 西山辰也、 上田賢志	日下部 均	特 開 2021- 52703(P2021- 52703A)	令 和 元 年 10 月 1 日	令 和 3 年 4 月 8 日

## 1 2 今後の計画

実用化までの今後の計画について、当初計画からの変更点をふまえて記載してください。
--

### 1. アスパラギン／アスパラギン酸測定キットの実用化

本年度に特許が成立したアスパラギン／アスパラギン酸測定キットについて、先行したGABA測定キットと同様の実用化を向け、実証実験と有効性の試験を継続する。また、特異性や安定性の向上のための改良を重ねることで汎用性の高いキットとしての完成を目指す。

### 2. 他のアミノ酸測定キットの開発

上記のキットと同様の酵素反応の連携によるアミノ酸の簡易定量キットを開発する。これまでに実施してきたアミノトランスフェラーゼ生産菌のスクリーニングを継続し、基質特異性と安定性が高い酵素の生産菌取得を試みる。得られた生産菌とその酵素については、本研究で実施した通りの手順でその遺伝子を特定し、組み換え酵素の生産とそのキットへの適用性を精査する。有効性が確認されたものについては特許を取得すると同時に、その実用化に向けた試験と改良を重ねる。

### 3. その他の酵素センサーの開発

上記の一連のアミノ酸定量システムは、放線菌由来のグルタミン酸オキシダーゼに連携することで構築するものであるが、それ以外にも特に特定の化合物に対するオキシダーゼ活性を有する酵素をセンサーとして活用し、その検出・定量手法を確立することも目がけた探索研究を実施する。すでに本研究でも開始し、候補が見つかっているいくつかの酵素についてはその精製と遺伝子の同定、組み換え体の作出を通じて特性を精査し、そのセンサーとしての利用に繋げる。

## 令和3年度 学術研究助成金〔社会実装研究〕実績報告書

令和 4年 5月 9日

日本大学学長 殿

氏 名： 松本 太郎

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

脱分化脂肪細胞調製キットの開発

## 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

研究代表者及び研究分担者

	氏 名	部科校・資格	役 割 分 担
研究代表者	松本 太郎	医学部・教授	研究の総括・キットの最適化
研究分担者	副島 一孝	医学部・教授	キットの性能評価に関する脂肪組織の採取
	檜村 勉	医学部・准教授	キットの性能評価に関する脂肪組織の採取
	李 予昕	医学部・准教授	キットの性能評価に関する品質管理試験・非臨床有効性試験
	風間 智彦	医学部・助教	キットの最適化、キットの性能評価に関する細胞製造・非臨床有効性試験

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
株式会社サンプラテック	DFAT 調製キットの製造担当
日水製薬株式会社	DFAT 基礎培地の製造担当

※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 %】

令和 3 年度に予定されていた研究計画は、ほぼ計画通りに実施された。また本研究にて最適化を行った DFAT 製造用ゼノフリー培地に関しては、本学より特許出願するに至った。研究成果についても順次発表がなされた。以上より、概ね順調に進展していると自己評価した。

#### 5 研究目的

研究の全体構想及びその中での本研究の具体的な目的について記述してください。

再生医療によく用いられる間葉系幹細胞 Mesenchymal stem cell (MSC)は患者自身の体から調製できるが、患者の年齢や病状により細胞の品質にばらつきが生じやすいといった問題点がある。MSC による細胞治療を普及させるためには、簡便・安価に大量調製可能で、患者を選ばず均質で安定した性能を示す MSC 製造技術の確立が望まれる。脱分化脂肪細胞 Dedifferentiated fat cell (DFAT)は、成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養して作られる MSC に類似した多能性細胞である。DFAT は少量の脂肪組織から均質な治療用細胞を大量に作る事ができることから、低コストで実用性の高い再生医療の細胞源として期待できる。研究代表者らは、日本大学医学部リサーチセンター細胞加工施設(CPF)において臨床グレードの DFAT 製造法を確立し、重症下肢虚血患者を対象とした自家 DFAT を用いた血管再生細胞治療の臨床研究を実施中である。またより簡便・効率的に DFAT 調製を可能とする「天井培養フラスコ」を開発し、製品化するに至っている。さらにこの天井培養フラスコを主要構成パーツとし、高効率で安価に DFAT を製造できる「DFAT 調製キット」の開発に着手している。

本研究の目的は、この DFAT 調製キットの最適化を行い、最も効率良く安定的に DFAT を製造できる調製キットを完成させる。そして、この調製キットを用いて製造した DFAT の規格試験や非臨床試験を行い、品質や性能が担保された DFAT が再現性よく調製できることを確認する。これらの研究を通じて本調製キットにて製造した DFAT の品質、安全性、有効性が治験水準に到達していることを確認し、最終的に企業への導出を目指す。本調製キットを完成させ社会実装させることにより、均質で安定した性能を示す臨床グレード DFAT を一般の細胞加工施設でも簡便に製造できるようになる。将来的には現在先行している MSC を用いた細胞治療の大部分をより安全・安価なものとして普遍的に発展させる可能性がある。

#### 6 当該年度の実施状況の概要

次の点について、具体的かつ明確に記述してください。

- ①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況
- ②進捗上の問題点と今後の対策

##### ①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況

令和 3 年度は、当初の研究計画に従い、(1) DFAT 調製キットの最適化、および、(2) DFAT 調製キットを用いた最終製品の製造、の 2 項目を実施した。

##### (1) DFAT 調製キットの最適化

マイルストーン： DFAT 調製キットを完成させる。(達成時期： 2021 年 10 月)

外科手術時に廃棄される脂肪組織を用いて DFAT 調製キットの各構成パーツ及び試薬類の選

## 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）〕

定及びそれらの性能を評価した。成熟脂肪細胞単離用チューブに関しては、廃液用チューブと酵素処理用チューブの試作品を委託製造した。これらの試作品を使って実際に成熟脂肪細胞の単離を行い、チューブに付属するトランスファーキャップの形状や寸法などの最適化を行った。天井培養フラスコに関しては、再現性よく DFAT を製造・回収できる脂肪細胞の播種手順やトリプシンによる細胞剥離手順を確定した。DFAT 調製用培地に関しては、臨床研究で使用している 20%ウシ胎仔血清（FBS）含有培地に比べて、DFAT の誘導効率および増殖効率に優れた基礎培地およびヒト以外の動物由来成分を含まない（ゼノフリー）血清代替物を複数候補より選定した。そして脱分化培養および拡大培養に適した血清代替物の至適濃度範囲を決定した。これらゼノフリー培地に関する発明に関し、令和 4 年 3 月に NUBIC を通じて特許出願を行った（発明の名称：ヒト脱分化脂肪細胞の製造方法及びヒト成熟脂肪細胞からヒト脱分化脂肪細胞を製造するための培地、出願番号：特願 2020-052876）。この培地と天井培養フラスコを用いて脂肪細胞の播種細胞数、培地交換時期、継代培養時期などを検討し、DFAT 製造に最適な条件を確定した。最終製品を凍結保存するために必要な凍結保護液と凍結保存容器に関しては、複数の市販品や研究用試作品を使って、凍結解凍後の DFAT の生存率、フラスコへの接着率、接着後の細胞増殖能などを比較検討した。そして DFAT 凍結保存に最も適した凍結保護液および凍結保存容器を決定した。この凍結保護液と保存容器を用いて実際に DFAT を一定期間凍結保存後、解凍し特性解析を行った結果、解凍後も DFAT 特有の細胞表面マーカーを発現し、接着能と増殖能を維持していることが確認された。以上より令和 3 年度中に当該年度の達成目標である DFAT 調製キットの最適化を完了することができた。

## (2) DFAT 調製キットを用いた最終製品の製造

マイルストーン：DFAT 調製キットを用いて最終製品を製造し、その規格を決定する。（達成時期：2022 年 3 月）

本研究の実施に先立ち臨床研究計画書を作成し、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会にて審査を受け実施承認を得た（RK-220111-1）。健常ボランティア（1 例）から採取した皮下脂肪組織（10 mL）から、DFAT 調製キットを用いて、最終製品の試験製造（コールドラン）を行った。同時に製造工程の各段階における工程内管理試験および最終製品の規格試験の実施項目およびその基準値を決定した。そして実際に健常ボランティアから製造した最終製品の生細胞数、生細胞率、細胞純度などがこの規格に適合していることを確認した。これらの実施状況より当該年度のマイルストーンはほぼ達成され、順調に進捗したと思われる。

## ②進捗上の問題点と今後の対策

健常ボランティア脂肪組織から DFAT 試験製造を行う臨床研究に関して、実施承認を得るのに時間がかかり、令和 3 年度は 1 例のみの実施にとどまった。当初計画では令和 4 年度中に 10 例実施する予定であるが、再現性を確認することが主目的であることから、5 例程度でも達成できると思われる。このため予定症例数の削減を検討する。また令和 4 年度に予定している最終製品を用いた非臨床安全性試験や非臨床有効性試験に関しても、動物実験委員会等で実施承認を得るまでに時間がかかる可能性があるため、遅延が生じないように実験計画書の作成等の事前準備を早期より行う予定である。

## 7 学会発表等

当該年度における研究成果の発表状況（学会発表、成果物展示、プレス発表等）について記入してください。  
要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
<u>松本太郎</u>	再生医療 JAPAN2021	脱分化脂肪細胞による低コスト・低侵襲細胞治療	2021年 10月
澤田浩克, <u>松本太郎</u> , 他	第36回日本整形外科学会基礎学術集会	脱分化脂肪細胞(DFAT)の細胞採取部位による分化指向性の評価	2021年 10月
富塚孔明, <u>松本太郎</u> , 他	第36回日本整形外科学会基礎学術集会	脱分化脂肪細胞(DFAT)由来エクソソームの解析とその作用	2021年 10月
<u>副島一孝</u> , <u>榎村勉</u> , <u>風間智彦</u> , <u>松本太郎</u>	第21回日本再生医療学会総会	皮膚再生医療の現状と展望	2022年3 月
富塚孔明, <u>松本太郎</u> , <u>風間智彦</u>	第21回日本再生医療学会総会	脱分化脂肪細胞に由来するエクソソームの特性および機能解析	2022年3 月
御子柴郁夫, <u>風間智彦</u> , <u>松本太郎</u> , 他	第21回日本再生医療学会総会	ラット反回神経切除モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFA)声帯内移植の効果	2022年3 月
<u>李予昕</u> , <u>松本太郎</u> , 他	第21回日本再生医療学会総会	IL2rg 欠損ブタを用いた新たな in vivo 造腫瘍試験の可能性	2022年3 月
野呂知加子, <u>松本太郎</u> , 他	第21回日本再生医療学会総会	幹細胞移植治療のための血管新生を抑制または促進する因子の定量分析	2022年3 月
萩倉一博, <u>風間智彦</u> , <u>松本太郎</u> , 他	第21回日本再生医療学会総会	皮膚組織修復過程における脱分化脂肪細胞の関与	2022年3 月

## 8 著書・雑誌論文

当該年度における研究成果の発表状況（著書、雑誌等）について記入してください。  
著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
--------	-------------	-----	----	---------

Shimazaki T, Matsumoto T, et al.	Biology/Quantitative analysis of factors regulating angiogenesis for stem cell therapy.	10 巻・11 号	2021 年 11 月	MDPI
Tanimoto K, Kazama T, Matsumoto T, et al.	Regenerative Therapy/ Phenotypic and functional properties of dedifferentiated fat cells derived from infrapatellar fat pad.	19 巻	2022 年 1 月	Elsevier・JSRM
Akita D, Kazama T, Matsumoto T, et al.	Materials/ Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells facilitates periodontal tissue regeneration of class II furcation defects in miniature pigs.	15 巻・4 号	2022 年 2 月	MDPI

9 本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

10 その他の成果

松本太郎，加野浩一郎：日本大学全学共通科目「自主創造の基礎」授業用ビデオ，日本大学の教育・研究を知る 学部横断型共同研究 2022 年 3 月

11 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日
ヒト脱分化脂肪細胞の製造方法及びヒト成熟脂肪細胞からヒト脱分化脂肪細胞を製造するための培地	特許権	松本太郎 風間智彦 長岡悠紀	日本大学	特願 2020-052876	令和 4 年 3 月 29 日	

12 今後の計画

実用化までの今後の計画について，当初計画からの変更点をふまえて記載してください。

本研究成果を確実に社会実装するためには，緻密な特許戦略が必要である。すでに国際特許取得に至っている「脱分化培養容器」に関する特許や，令和 3 年度に出願した「ゼノフリー培

地」に関する特許は、DFAT の臨床応用を広く普及させるために重要な特許であると思われる。今後、本研究成果を元に、「DFAT 調製キット」に関する特許を出願することや、ゼノフリー培地成分中の脱分化誘導に必要不可欠な物質を絞り込んで知財化することにより、さらに強固で有効性の高い特許を取得していく。

また実際に「DFAT 調製キット」を使い、一般の細胞加工施設で安定した品質の DFAT が再現性良く製造できるかを確認することは、本研究成果の社会実装を加速するために重要なステップであると考えている。このため、細胞加工受託を行う CDMO(Contract Development Manufacturing Organization)企業と協議し、令和 4 年度より本調製キットを使った DFAT 製造を委託製造する予定である。すでに数社の CDMO 企業と秘密保持契約を締結し、委託製造に向けた準備を進めている。

また DFAT 細胞医薬品を社会実装するためには、安定した多額の研究資金が必要となる。このため NUBIC とも協調し、DFAT 細胞医薬品開発を行う大学発ベンチャーの設立を目指す。この過程において厚生労働省が主催する創薬ベンチャートータルサポート事業(MEDISO)の支援を受ける予定である。同時に細胞医薬品開発を共同で行う再生医療関連企業やファウンダーであるベンチャーキャピタルとのマッチングを引き続き行う。令和 4 年度は企業とのマッチングの機会として、BioJAPAN2022 に日本大学から出展を予定している。