

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和5年4月19日

日本大学学長 殿

氏 名： ソコロワ山下 聖美

所属・資格： 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	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／准教授	「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： ②】・【達成度：90%】

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・社会科学の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得たうえで、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4年度は従来の国内における研究活動に加えて、海外渡航制限の緩和により延期されていた海外調査を行った。ソコロワ山下教授と鳥海准教授は令和4年8月インドネシアを訪問した。目的はインドネシア国立図書館での資料収集、資料及び現地写真撮影であった。8月19日～21日に滞在したバンジャルマシンではマルタプウラ川の撮影及び小学校での文化交流を実施した。また、ランブンマンクラ大学及び博物館における調査・視察及び1970年代に日本人が建設したダムの調査を通して、戦中だけでなく、戦前戦後そして現代における日本とインドネシアの関係性についても考察する機会を得た。8月22日～25日に滞在したジャカルタではインドネシア国立図書館の新館及び旧館にて邦字新聞及び日本関係資料の調査を行った。また、旧図書館のアティカ氏に話を伺うことで資料目録の詳細を知ることが出来た。また、伊藤助教は令和4年8月20日～9月5日にインドネシア北スマトラ州メダンを訪問した。メダン滞在中、日系インドネシア人二・三世計9人と会い、日系一世が生きていた頃の話や日系人意識についてインタビュー調査を行うことができた。日系人に関する調査研究の他に、メダン州立大学の紹介でメダン市内に未だに残っている旧日本軍の防空壕の見学も行った。加えて、同大学院社会人類学研究科において、本共同研究の成果の一部を公開講座という形で報告する機会に恵まれた。

以上のフィールドワークをふまえた上で、本研究の締めくくりと、さらなる発展へ向けての準備を行った。成果は次のようになる。

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、研究報告や進捗状況を公開した。日本語・英語の表記に加え、インドネシア語表記も付け加えることにより、ローカルな情報収集にも努めるようにした。(https://rjse.upstory.biz/)

2) 国際研究会議の開催

国際研究会議「続・日本人の「南方」経験の再検討 今後の課題へ向けて」(令和4年12月3日)を実施した。本会議では、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、3年間の研究活動の報告を踏まえながら、今後の課題へ向けて発展的なテーマを話し合うことができた。

まずは、各研究者の成果としての書評報告が行われた。伊藤雅俊助教(日本大学国際関係学部)は、スーシー・オング著『Shakai Kaizo Seratus Tahun Reformasi Jepang 1919-2019

—Dari Demokrasi Ke Reformasi— Elex Media Komputindo』(2019年)について、町田祐一准教授(日本大学生産工学部)が、伊藤雅俊著『日系インドネシア人のエスノグラフィー —紡がれる日系人意識』(2022年)について、牛田あや美准教授(京都芸術大学文明哲学研究所)がソコロワ山下聖美著『林芙美子とインドネシア：作品と研究』(2022年)について、金山泰志専任講師(同朋大学文学部)と石川徳幸准教授(日本大学法学部)が鳥海早喜著『新興写真の先駆者 金丸重嶺』(2021年)について、それぞれ発表を行った。

続いて、研究報告が行われた。牛田あや美准教授（京都芸術大学文明哲学研究所）は、「北宏二の挿絵にみる南方」において、挿絵家・北宏二の作品を通じて南方の姿を新聞・雑誌はどのように描いたのか、プロパガンダの実態からその変遷を報告した。

スーシー・オング専任講師（インドネシア大学大学院）は、「1920年代から1930年代における南洋商業実習生制度及び商業移民推奨」において、豊富な資料を提示しながら当時における南洋商業移民についての報告を行った。

ソコロワ山下聖美教授（日本大学芸術学部）は「歌が伝えた南方叙情—「ブンガワン・ソロ」と林芙美子」において、1940年に作られたインドネシアのポピュラーソングであり、戦後の日本においても歌い継がれた「ブンガワン・ソロ」と林芙美子との関連を報告した。「ブンガワン・ソロ」はまさに、インドネシアから持ち帰った「文化」であり、戦後の世の中に、日本人の南方体験の記憶を語り継ぐ役割、また、南方の叙情をなつかしくせつなく想起させる役割を果たしてきたこと、従軍作家として南方体験に赴いた林芙美子の記憶や手帳にも、「ブンガワン・ソロ」の響きは刻印されていたことを明らかにした。

フィトリアナ・プスピタ・デヴィ専任講師（国立ブラビジャヤ大学）は、「戦時中インドネシアに派遣された日本女性作家の文学論—林芙美子を中心に」において、大東亜共栄圏における文化工作のため南方へ送られた作家の中から、特にインドネシアに派遣された女性作家に注目し、林芙美子を中心とし、林に同行した小山いと子、佐多稲子の文学作品の分析を報告した。

以上の研究報告がなされた後に、研究へのさらなる発展をうながす特別講演として、森山幹弘教授（南山大学）が「南方を目指して：日本におけるマレー語学習の始まり」についての報告を行った。日本におけるマレー語学習の歴史を振り返りながら、マレー語学習が戦争に翻弄されたことを指摘し、大東亜共栄圏の建設のために学ばれるようになったマレー語の諸相を当時の社会的背景やマレー語を使用する文化人の傾向を紹介しながら明らかにした。外地（「南方」）と内地（日本）をめぐる「還流」において言葉が果たす役割について、改めて考えさせられる講演であった。

以上のように、国内外の専門家が対面とオンラインで集い、意見を交換する場を持てたことにより、さらなる研究の発展が見込まれた。

3) 報告・論文集 vol.3 の作成

令和2、3年度より引き続き、4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③」を作成した。各研究者は、シンポジウムの発表要旨を執筆・掲載しつつ、論文も掲載された。内容は以下のようになる。

「はじめに」 ソコロワ山下聖美

「3年間の共同報告 日本大学学術助成金(総合研究)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— (令和2年度~4年度)研究報告」

ソコロワ山下聖美

〈書評報告要旨〉

「Susy ONG 著 Shakai Kaizo Seratus Tahun Reformasi Jepang 1919-2019—Dari Demokrasi Ke Reformasi— Elex Media Komputindo、2019年」伊藤 雅俊

「伊藤雅俊『日系インドネシア人のエスノグラフィー ―紡がれる日系人意識』(2022 年)」

町田 祐一

「ソコロワ山下聖美著『林芙美子とインドネシア：作品と研究』～パラレルワールド南方へようこそ～」牛田あや美

「鳥海早喜著『新興写真の先駆者 金丸重嶺』 金山 泰志

「鳥海早喜著『新興写真の先駆者 金丸重嶺』 石川 徳幸

〈発表要旨〉

「北宏二の挿絵にみる南方」牛田あや美

「1920 年代から 1930 年代における南洋商業実習生制度及び商業移民推奨」スーシー・オング

「歌が伝えた南方叙情―「ブンガワン・ソロ」と林芙美子」ソコロワ山下聖美

「戦時中インドネシアに派遣された日本女性作家の文学論 ―林芙美子を中心に」フィトリアナ・プスピタ・デヴィ

「南方を目指して:日本におけるマレー語学習の始まり」森山 幹弘

〈論文〉

“Sparkling Indonesia From the Eyes of Japanese Authors”フィトリアナ プスピタ デヴィ

「新聞メディアと子どもの関わりにおける一考察 ―『東印度日報』を手がかりとして」

伊藤景

「佐多稲子『南の女の表情』(1943. 4. 6)を中心に見る南進下のインドネシア」野中咲希

特筆すべきは本論文集において、国内外の若手研究者であるフィトリアナ・プスピタ・デヴィ専任講師（ブラビジャヤ大学）、伊藤景助教（日本大学芸術学部）、野中咲希研究員（日本大学）の論文を掲載し、新たなる研究の萌芽の可能性に寄与し、若手の育成にも貢献したことだ。フィトリアナ・プスピタ・デヴィ専任講師は研究報告とともに発表した本論文において、大戦中に南方に向かった日本の女性作家たちが、インドネシアをどのように描いているのかを、インドネシア人の視点から考察している。国外の若手研究者による分析が積極的に行われる機会を本研究が促したことは今後のさらなる広がりに向けて、大きな進展であったと思われる。また、伊藤景助教は本研究で収集した「東印度日報」「爪哇日報」「東亞日報」を足がかりとして、子供のメディアに注目しながら新たなる視点を提供している。野中咲希研究員もまた、南方の中に佐多稲子という女性作家を新たに掘り起こすという野心的な試みを行っている。若手研究者によるこうした挑戦は、今後のさらなる共同研究の開拓へと着実に進化していくことであろう。

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ィ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。

以上の点を達成するために、国内外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。

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 5年 5月 8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作用機序の検討

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	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
	逸見聖一朗	医学部・助教	DFAT 細胞治療による組織的な評価
	松本太郎	医学部・教授	再生医療に対する総括
	加野浩一郎	生物資源科学部・教授	DFAT に関する総括

※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

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。

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。今回この機序をより明確にすることを目的とする。更に今後腎障害を併発する適応疾患を拡大して検討して、透析患者を減らし人生 100 年時代をより健康年齢の長い充実した人生を送れるようにす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。

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 1×10^5 /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 1×10^5 /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 β の発現は両群で差を認めず、TNF- α 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。

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、脱落の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。

〔7 研究結果（つづき）〕

我々の結果では DFAT 細胞移植により TSG-6 の発現が亢進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亢進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^{1,2)}。

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^{3,4)}。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、 6.38×10^9 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^{5,6)}。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

〔7 研究結果（つづき）〕

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、本来令和3年度で終了のところを令和4度にわたり研究期間を延長をご許可頂き実験を継続致しました。マウスの個体数を増やして統計学的にも有意差がでるような結果であるかといった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ございました。しかし、前述の通り当マウスは疾患マウス故、寿命も短く、落下した衝撃でも死亡することもある、病弱であるため、非常に扱いが非常に難しいマウスでございます。繁殖も必ず成功するとは限りません。疾患マウスを直接搬入後その個体そのものを実験に使用すると搬入先である大阪からの長距離輸送のダメージで体調に影響が出来る可能性があり、搬入した個体を当施設で飼いならし、その後ペアリングのもとその代の仔マウスを里親の制度を用いて繁殖させて初めて実験に使用できるもので御座います。以前では5ペアから20~30頭以上の仔マウスを作成することに成功して、前述の通りの実験結果を得てまいりましたが、今回も同様の5ペアのマウスを購入し、導入の飼育を試みましたが結果5頭の仔マウスしか作成できず、販売元とも十分な連絡を取りましたが、十分な改善策は得られず、それ以降の実験の進行は困難な状態で研究資金が終了、1年を費やす結果となってしまいました。今後施行予定だった内容については新たに競争資金を得て実験の継続をしたいと思っております。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^a MARK F. PITTENGER^b. *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.

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和5年4月1日

日本大学学長 殿

氏 名：辻 泰弘
所属・資格：薬学部・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

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	辻 泰弘	薬学部・教授	<ul style="list-style-type: none">研究計画の立案および実施などの研究総括データ集積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	<ul style="list-style-type: none">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	<ul style="list-style-type: none">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	<ul style="list-style-type: none">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： 90 %】

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。令和 2 から 4 年度にかけ、2 つの課題に取り組み、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研究を実施してきた。

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

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

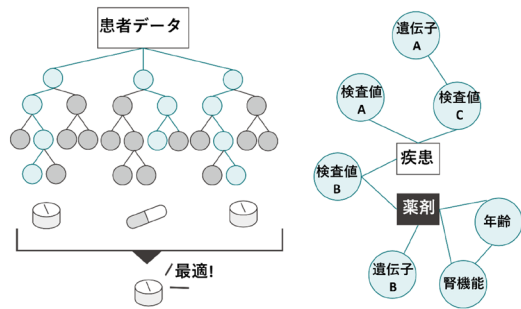
令和 2 年度は当初の計画通り、「①ランダムフォレストを用いた疾患の原因に関する共変量探索と至適投与薬剤の提案」に焦点をあて 2 つの研究課題を実施した。令和 3 年度はさらに研究を進展させ「ディープラーニングによる薬物血中濃度・治療効果の個別化モデル」の課題に取り組んだ。研究全体の概要を図 1 に示す。令和 4 年度は②ディープラーニングによる薬物血中濃度・治療効果の個別化モデルをさらに発展させ、以下の 2 つの研究成果を報告した。

1) 人工知能 (AI) 技術による医薬品開発試験の最適化

2) 多種疾患情報を用いた敵対的生成ネットワーク (GAN) による合成医療データの生成

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 最適薬剤の判断根拠や 至適薬剤・疾患関連因子を探索 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 予測結果に対する 薬物動態パラメータ・治療効果を予測 各データの貢献度を可視化

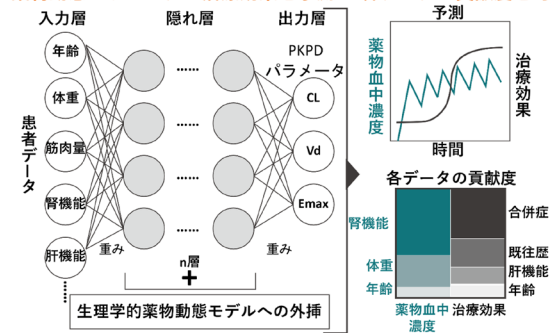


図1 研究全体の概略図

7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

令和2年度

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

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, 2295-2300, 2021.3

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。現在はリアルワールドデータ研究を取り扱う海外誌に投稿中である。

令和3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

1) 人工ニューラルネットワークを応用した薬物血中濃度予測モデルの開発

本研究で構築した人工ニューラルネットワーク薬物動態モデルは、時系列データを取り扱うことが可能であり、従来の数理モデルと比較して血中濃度の高い予測精度を示した。また、協力ゲーム理論を応用し薬物動態パラメータの出力に対する各入力値の貢献度を可視化することで、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。本研究の成果は以下の学術雑誌に掲載された。

Ogami C, Tsuji Y, Seki H, Kawano H, To H, Matsumoto Y, Hosono H, An artificial neural network-pharmacokinetic (ANN-PK) model and its interpretation using Shapley additive

explanations, *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 10(7), 760-768, 2021.7

令和 4 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

1) 人工知能 (AI) 技術による医薬品開発試験の最適化

【背景】深層学習をはじめとする人工知能 (AI) 技術の分野が目覚ましい発展を遂げ、医療分野においても画像や音声、自然言語のような様々な分野で利用されるようになってきている。臨床薬理領域においては、モデルや共変量の選択、コンパートメントモデルよりも高い精度での血中濃度の予測、薬物動態に影響するバイオマーカーの特定、治療効果が期待できる集団の特定などが報告されている。しかしながら、新薬の臨床開発において最も重要である臨床試験のデザイン立案を、AI で行った事例については未だ報告がない。開発医薬品のポテンシャルを最大限にまで引き出し、他剤との差別化などの特徴を明らかにできるような臨床試験を、的確にかつ必要最小限のコストで行うことが可能となれば、新薬開発の生産性の向上に直結する。

【目的】本研究は組み合わせ最適化問題に対応する人工知能技術である遺伝的アルゴリズム (GA) と臨床試験シミュレーションを組み合わせることで、ヒトでは思いつかないような画期的な試験デザインをコンピュータに立案させることを試みた。すなわち、臨床での用量反応関係に関する情報が未知の状況を想定した架空の薬物の第 2 相試験における用量群のアロケーション (適切な配分) について、コンピュータによる立案を行った。次に、生物学的同等性試験における採血計画の立案を行った。

【方法】プラセボ群に対して実薬群 5 用量 (10、25、50、100、150 mg) のいずれかが統計的に有意な有効性を示すように条件付けを行い、至適用量を推定するための用量反応試験を想定した。仮定した 6 パターンの用量反応プロファイルに対して、標準的な患者割付と遺伝アルゴリズムによる患者割付を比較検討し、総症例数が最少となる各用量群の例数設計を検討した。次にノンコンパートメントモデル解析 (NCA) の最高血中濃度 (Cmax) および最終定量観測時点までの血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) に一定以上影響を与えないという条件付けを行い、より少ない採血点数で同様の精度の NCA パラメータを得るための試験デザインを GA で導き出した。

【結果】GA が推奨したデザインの特徴の共通点として、最高用量の群に最も多く症例を割り付けている (平均 28%)、50 mg 群の割付割合は 150 mg 群の 1/3 程度と最も低い (平均 8%)、10 mg 群と 100 mg 群は平均 16% で、25 mg 群はそれよりも少し少なく平均 13%、プラセボ群の例数ももっともバラつきが大きく 14-23% (平均 18%) であった (図 2)。GA による試験デザインでは、標準的な採血回数を 9 回に削減しても Cmax および AUC は同等のシミュレーション結果となった (表 1)。

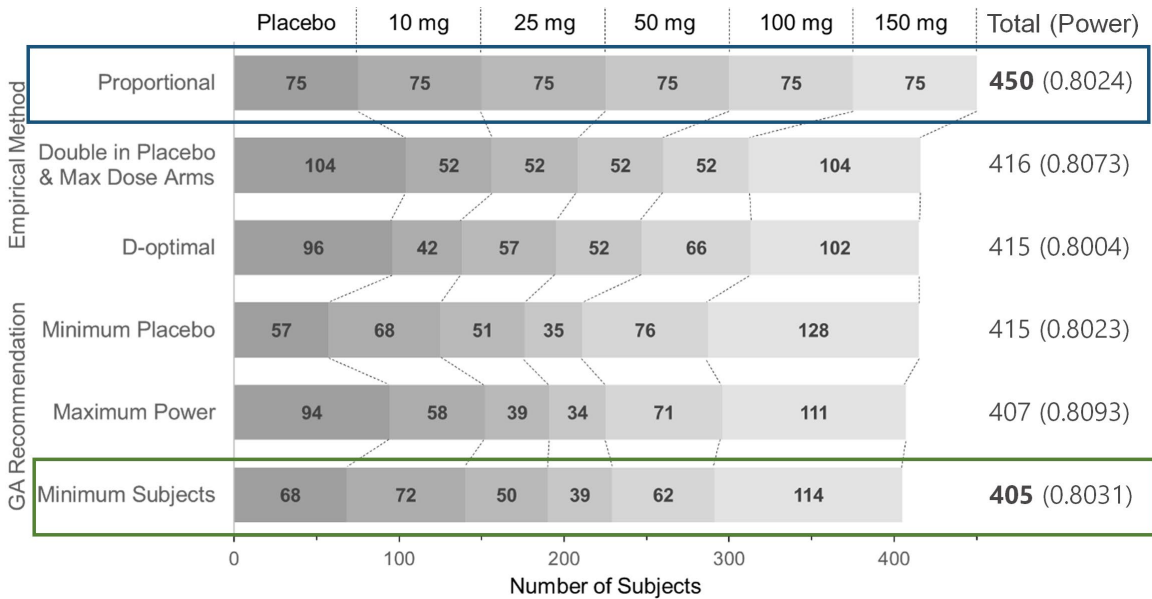


図2 遺伝アルゴリズムによる患者割付手法の最適化

表1 遺伝アルゴリズムによる採血回数の最適化

薬物動態パラメータ	シナリオ	採血回数	Mean ± SD	Median	Min, Max
C _{max} (μg/L)	標準的な試験計画	15	1491 ± 279	1491	1075, 2034
	遺伝アルゴリズムによる試験計画	9	1488 ± 277	1392	1075, 2034
AUC (μg·h/L)	標準的な試験計画	15	25449 ± 2448	25436	19526, 29704
	遺伝アルゴリズムによる試験計画	9	25472 ± 2506	25751	19436, 30345

【考察】標準手法と比較して人工知能が推奨する手法では、実薬投与群の患者数を10%削減できることが明らかとなった。また、人工知能を用いることで臨床試験の採血回数を既存の15回から9回に削減でき、患者の負担軽減につながることを示唆された。臨床試験のデザイン立案を人工知能に支援させることで、斬新な臨床試験のデザインが生まれる可能性を示すことができた。今後、医薬品開発における臨床試験においてAI技術の応用が進むことが期待される。

【成果報告】本研究の成果は以下の学術雑誌に掲載された。

Tsuchiwata S, Tsuji Y, Computational design of clinical trials using a combination of simulation and the genetic algorithm, *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, in press.

2) 多種疾患情報を用いた敵対的生成ネットワーク (GAN) による合成医療データの生成

【背景】近年、臨床薬理分野で採用されている Model Informed Drug Development (MIDD) アプローチは、化合物や疾患に関する非臨床と臨床の枠組みを超えた様々な情報やナレッジをモデルというプラットフォーム上での統合を可能とした。病態や薬剤のプロファイル及び影響する背景因子（共変量）を明らかにするだけでなく、それまでに得られたデータを統合解析するだけの後向きの解析戦略から、モデルに必要な情報を開発の各段階で計画的に取得するという前向きの解析戦略へのパラダイムシフトをもたらした。しかしながら、計画的なデータ収集をもってしても収集可能なデータには限界があるため、臨床開発の各ステージで都度更新・拡張し続けるモデルには、過去のデータや類薬の臨床経験より経験的に従うと考えられるモデル、もしくは生理学的・薬理的なメカニズムの模倣、あるいはそれを簡略化したモデルのように周辺情報を考慮したものを用いる必要がある。一方、AI は多くのデータからアウトカムを高精度に予測するためのモデルをコンピュータに構築（学習）させることができる。その際、モデルの前提条件となるような周辺情報は必ずしも必要でないが、学習には通常いわゆるビッグデータのような大量のデータが必要である。臨床試験をはじめとする医薬品開発では、試験条件に合致する対象患者の選定に難渋するケースが多く、対象例数を確保するために費やされる膨大な時間や資金が問題となっている。従って、医薬品開発における効率化（リスクやコストの軽減、スピードアップ）は喫緊の課題である。

【目的】本研究は、大規模な医療情報データから合成患者生成器を構築し、患者属性が制御可能な合成患者の生成を目的としている。そこで、敵対的生成ネットワーク（GAN）を用いることで医療情報データベースから年齢、性別、身長、体重、肝および腎機能に至るまで、患者を構成する特徴を学習できるという仮説を立て、多種疾患医療情報データを用いて GAN を学習し、臨床試験に適用可能とする合成患者の生成を試みた。

【方法】GAN の学習には、MDV（株）より購入した慢性腎臓病（695,424 名）、認知症（917,868 名）、2 型糖尿病（354,001 名）、肺がん（451,027 名）、リウマチ（370,527 名）、臓器移植（165,268 名）の 6 疾患データおよび（株）JMDC の健診受診者（12,099,049 名）を利用し、各データからランダムに 100 症例ずつ抽出したものを使用した。GAN の生成器は、患者属性として性別、年齢および BMI、臨床検査値として ALT、AST および SCR を生成するように構築した（図 3）。これらを用いて、損失関数や識別器の構造を変更した複数の条件で GAN を学習し、検証のために各パターンで 500 件の合成データを生成した。また、次元削減とクラスタリングを組み合わせることで実データと合成データとの類似度を算出し、類似度が高いエポックのものを最良の生成器として選択した。妥当性は各属性の分布および相関を用いて評価した。

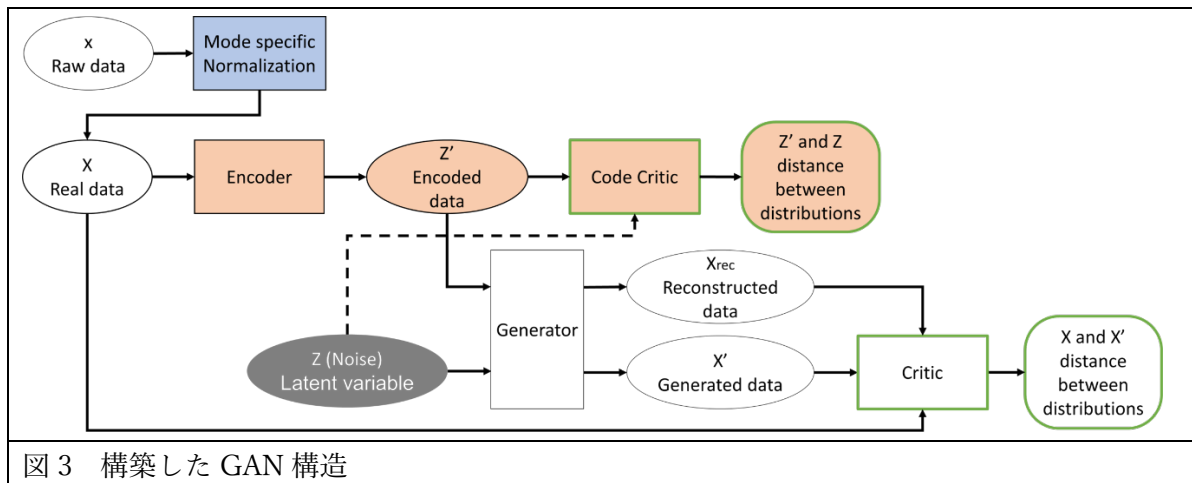


図3 構築したGAN構造

【結果と考察】GANの識別器にミニバッチ標準偏差を取り入れることで、生成の難しいALTおよびASTのモード崩壊を抑制する効果が見受けられた。さらに、類似度によりエポックを選択することで、生成した合成データのALTおよびASTがより実データに近い分布を持つことが確認できた。識別器にMSDを取り入れたGANを、多種疾患医療情報データを用いて学習した。次元削減およびクラスタリングを用いて最良なエポックを選択した。これによって、実データと合成データの近似性の可視化が可能になり、類似度が高い合成データを生成できた（図4）。

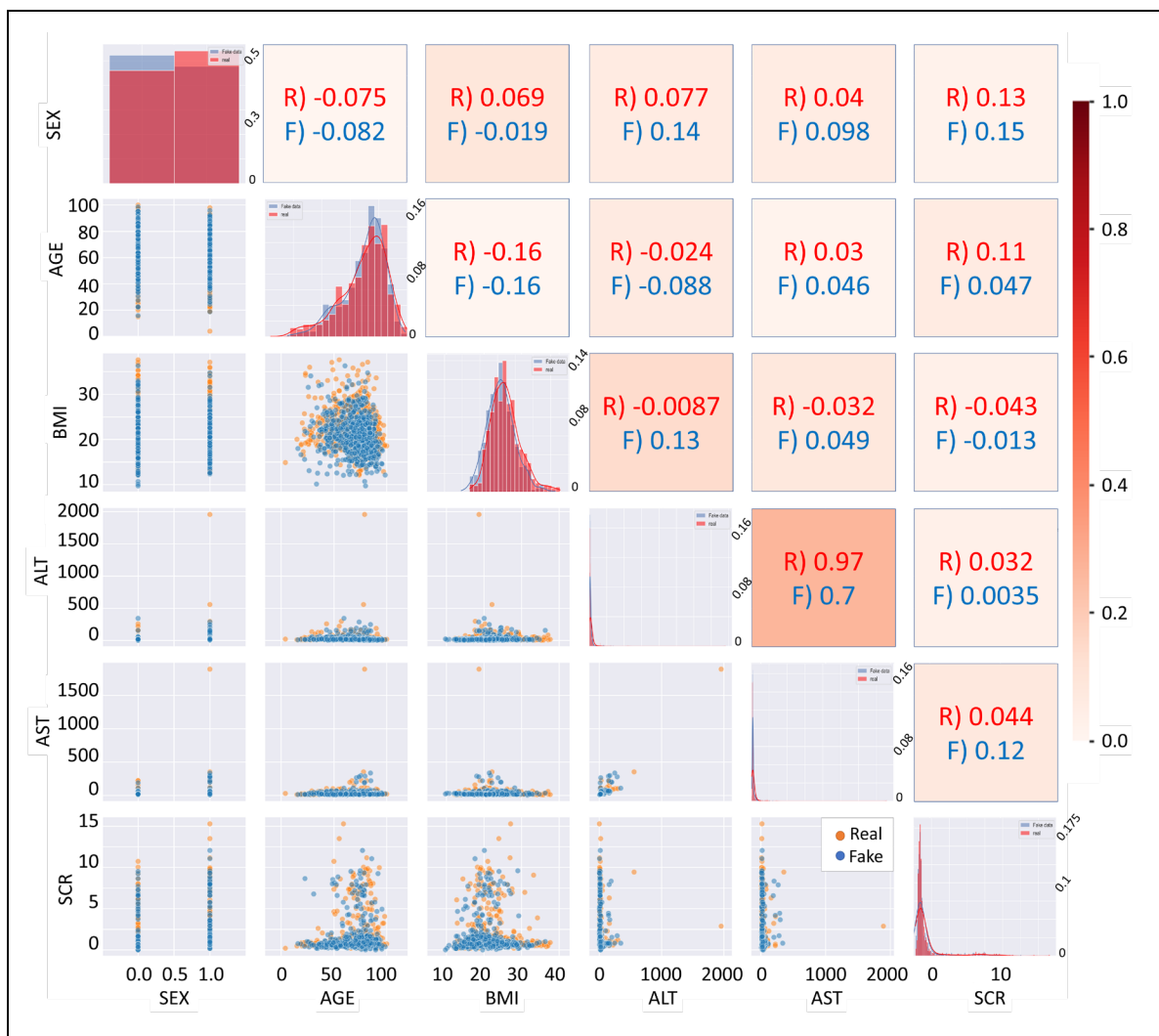


図4 GAN生成結果(分布と相関)

【成果報告】本研究は第43回日本臨床薬理学会学術総会(2022年)で発表し、現在海外誌へ投稿準備中である。また、本研究成果の一部は日本大学研究推進部産官学連携知財センターを通じて新規発明の出願を検討している(代表発明者:研究分担者_関弘翔)。

4,658文字(図表を含まず)

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和5年4月14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：

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3年度 ～ 令和5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：80%】

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 4 年度は iVRTS の効果を検証することにより、3. 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) の解決につながることを期待される。

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)を開発し、その有効性を検証する。具体的には、iVRTS による心拍変動や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。

令和 3 年度には、自由に移動可能な VR 空間の構築と、それをヘッドマウントディスプレイ(以下、HMD とする)を通して視聴した際の生体情報の取得に成功した。令和 4 年度には、このシステムをメンタルトレーニングに応用することを目指した研究を展開した。

7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

令和 4 年度には、研究計画通りに令和 3 年度に達成した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、②構築された VR 環境下での生体情報の取得を基に、③iVRTS が実際にアスリートの心的競技能力を高めることに寄与するかどうかを評価するための介入研究を展開した。

年度初旬から研究計画通りに準備を進め、予定通りに iVRTS の効果を検証する実験を展開することができた。その研究成果も学会にて発表した。以下、令和 4 年度の研究結果について、研究方法を含めて報告する。

1. 介入研究を実施するための VR 空間の構築

より実践的な介入研究を展開するために、選手が実際に大会を行う競技会場の VR 空間を構築することを、研究の初期段階とした。

令和 3 年度に確立された方法により、その環境構築のための撮影から処理までを行った。

撮影された競技会場は、四日市市総合体育館であった。その体育館を利用して VR 空間を構築した理由は、本研究の実験参加者が大学体操選手であり、その年度の全日本学生体操競技選手権大会の会場が、四日市市総合体育館だったからである。撮影された場面は、体操競技における鉄棒やあん馬といった各種目を利用したものであった。研究者らは、それらの種目の前で、選手が演技を開始する場面を想定した映像を撮影した (図 1 参照)。

それらの撮影が行われたのは、2022 年度 6 月に開催された当該体育館を利用した競技会時であった。

その後、その映像を基に研究者らが現有するシステムを利用して VR 空間を構築した。その VR 空間に令和 3 年度に収集した第 50 回世界体操競技選手権大会会場の環境音を組み合わせることにより、より没入感の高い環境を目指した。



図 1 実際の競技会場を利用して VR 空間構築のための撮影を行っている様子

2. iVRTS を利用した介入研究

① 参加者

参加者は、健常な男子大学体操選手 22 名であった。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。実験時のデータ欠損等から、2 名の参加者は分析対象者から除外された。参加者は、10 名の iVRTS 群と 10 名のコントロール群に分けられた。iVRTS 群は、構築

〔7 研究結果（つづき）〕

された VR を HMD を通して視聴しながら、リラクゼーション技法としての呼吸法を実践した。コントロール群は、呼吸法のみ実施した。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行われた。

② 実験環境

実験は日本大学文理学部サクラスポーツ & ジムナスティックスセンターで行われた。iVRTS 群は、そのなかに準備された 2 台のベースステーションのなかで HMD を着用した状態で VR を視聴した。コントロール群は、HMD を着用しなかった。両群ともに立位であった。

iVRTS 群が視聴した映像は、四日市市総合体育館におけるあん馬の目の前からのものであった。撮影された映像から、今回あん馬が選択された理由には、この種目特有の難しさが関係している。男子体操競技において、この種目のみ、ほとんどの局面において重力に抗いながら演技を行う必要がある。それゆえ、失敗が生じる可能性も高く、選手にとっては緊張が喚起されやすい種目であるからだ。

③ 実験手順

1 つの実験は 20 分程度で完了するものであったが、メンタルトレーニングの効果を検証することを目的とした介入研究であるため、トレーニング期間を設けた。

初日に、研究についての説明等をするとともに、メンタルトレーニングの技法のひとつである、リラクゼーション技法として呼吸法についての説明、練習を行った。呼吸法を選定した理由は、競技場面でのあがりや緊張に対する対処として呼吸の調節が行われていることや、リラクゼーション効果に関するエビデンスが十分に存在しているため、実用性のある技法とされているためである（鈴木、2008）。

その後、別日にメンタルトレーニングを開始し、それから 3 週間にわたり合計 4 回のメンタルトレーニングを行った。初日からメンタルトレーニング終了までは 4 週間であった。メンタルトレーニング開始時を初回 MT とし、そのトレーニング終了時を最終 MT とした。

1 回のメンタルトレーニングの内容は、iVRTS 群とコントロール群で異なった。

iVRTS 群は、HMD 着用後、最初に安静状態を 5 分間とった。その後、VR を視聴しながら呼吸法を 5 分間行った。コントロール群は、HMD を着用せず、安静状態を 5 分間とった後、そのまま呼吸法を 5 分間行った。メンタルトレーニングの時間を 5 分間に設定したのは、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がこの時間であったからであった。

メンタルトレーニングは、全日本学生体操競技選手権大会のおよそ 1 か月前から行われた。

それらのトレーニング中、トレーニング後に生体情報を取得した。それは、メンタルトレーニングの効果を検証するためであった。取得された生体情報は 2 つであった。1 つは、精神性発汗であり、もう 1 つは唾液であった。

精神性発汗は、eVu TPS（Thought Technology 社製）で測定された。摂取された唾液から α アミラーゼが、CUBE Reader（SOMA 社製）を用いて測定された。

精神性発汗（皮膚コンダクタンス）は、メンタルトレーニング中に計測され、 α アミラーゼはメンタルトレーニング後、10 分間の安静を挟んで測定された。

〔7 研究結果 (つづき)〕

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。測定後、精神性発汗と α アミラーゼは、それぞれ専用のソフトウェアを用いて分析され、皮膚コンダクタンスと α アミラーゼが算出された。

④ データ分析

算出された皮膚コンダクタンスと α アミラーゼについて、メンタルトレーニングの種類(iVRTS群とコントロール群)×トレーニング前後(初回MTと最終MT)で比較された。Kolmogorov-Smirnov 検定の結果、正規性が認められなかったため、それぞれの比較にはMann-WhitneyのU検定とWilcoxonの符号付順位検定を用いた。有意水準はBenjamini & Hochberg法により補正された。

⑤ 結果と考察

iVRTSを利用した実験を行い、以下の2つの実験結果を得た。1つは、 α アミラーゼに関わるものであり、もう1つは精神性発汗に関わるものであった。

α アミラーゼについて、iVRTS群でのみ初回MTよりも最終MTの方が有意に低下した。コントロール群には有意な変化は確認されなかった(図2参照)。 α アミラーゼは、ストレス反応を評価する1つの指標となる。この値が高いほどストレス反応が高いといえる。

他方、皮膚コンダクタンスで評価される精神性発汗には、どちらの群であったとしても有意な差は確認されなかった(図3参照)。しかしながら、皮膚コンダクタンスの時系列的变化を確認した場合、iVRTSを利用した場合にのみ、メンタルトレーニング開始直後からその値が上昇している様子がうかがえる。典型的な参加者のデータを示したのが図4である。この点については、今後さらに分析の方法を含め、分析に検討の余地がある。

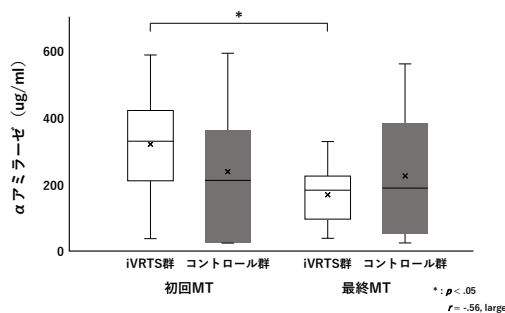


図2 各群・MT時における α アミラーゼのボックスプロット

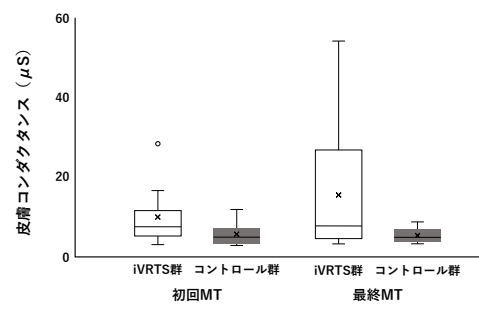


図3 各群・MT時における皮膚コンダクタンスのボックスプロット

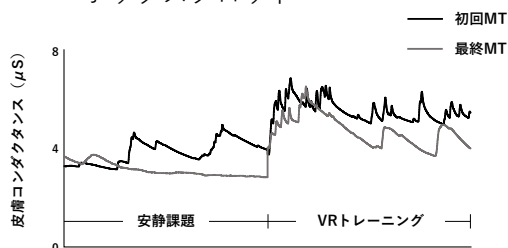


図4 皮膚コンダクタンスの時系列的变化(参加者1名)

〔7 研究結果（つづき）〕

これらの結果は、iVRTS を利用した VR と呼吸法を組み合わせたメンタルトレーニングが、体操選手のストレス反応を低下させることを示唆している。すなわち、iVRTS は心的競技能力の向上に寄与する可能性がある。

iVRTS がストレス反応を低下させるメカニズムとして、副交感神経系の活動が亢進したことが考えられる。精神性発汗が交感神経系による単独支配（坂本ほか，2018）である一方で、 α アミラーゼは、交感神経系と副交感神経系による 2 重支配（Edmonds et al., 2015; 新見，2018）であるからだ。副交感神経系の活動は精神性発汗には反映されないため、iVRTS を利用したメンタルトレーニングによってこの値に変化がなかったことは交感神経系の評価として考えるべきであろう。つまり、交感神経系の亢進などはないといえる。 α アミラーゼの値が有意に低下していたことから、iVRTS を利用したメンタルトレーニングにより副交感神経系の活動が優位な状態になったことが考えられる。

これらの通り、本研究において、呼吸法を取り入れたメンタルトレーニングにおいて向上させることが難しかったストレス反応に関わる心理的スキルが、iVRTS を利用することにより向上できることが示唆された。iVRTS を通して体験した大会会場が、視聴者に緊張を喚起させ得る状態を作り出し、その環境下において行われるメンタルトレーニングがストレス反応を低下させるスキルの向上に寄与した可能性がある。

いくつかの課題も考えられる。例えば、リラクゼーション技法として有効だといわれている呼吸法を行ったコントロール群では、ストレス反応が低下しなかった背景を検討することもその 1 つである。それは、iVRTS を利用したメンタルトレーニングに呼吸法を取り入れるか否かを検討することにもつながる。また、サンプルサイズと検定力も本研究の課題といえよう。これらは、トップアスリートを対象としたり、スポーツの現場との乖離をできるだけ埋めることを目指したりする研究にとっては避けられない課題である。この課題への対応としては、今後さらに研究データを積み重ねる必要が挙げられる。さらに、今後欠くことのできない課題は、iVRTS を利用したメンタルトレーニングの効果が、実際の競技場面で汎化されるか否かについて検討することである。

競技場面への応用可能性については、本研究課題での研究計画に組み込まれたものではないものの、すでにその研究を開始している。例えば、本研究参加者のうち、全日本学生体操競技選手権大会への出場した選手は、事前に iVRTS を利用したメンタルトレーニングを行った空間とおおよそ同じ場면을競技会で経験した。つまり、iVRTS を利用し、その後、実際の競技会に臨んだ最初のケースとなる。それらについてのデータ収集も始めているため、次ぐ研究課題として研究を発展させたい。

本研究は、新規のトレーニングプログラムの作成につながる。具体的には、緊張をとまなう実際の競技場面を、その競技会を迎える以前から VR を通して体験できることにある。そのような緊張が喚起される場面を、事前に繰り返し体験し、その環境に慣れたり、その環境においてメンタルトレーニングを実施したりすることにより、実際の競技場面での実力発揮に関わるスキルを高めることができる可能性がある。

〔7 研究結果（つづき）〕

このことは、スポーツ科学分野だけに留まるものではない。面接試験や音楽演奏など、人の緊張が喚起される場面のおおよそのものに、iVRTSは応用し得るだろう。本研究成果を基に、今後は学際的な研究につなげることも視野にさらに研究を遂行したい。

令和4年度の研究成果の一部は、日本アプライドスポーツ科学会で発表された。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、新型コロナウイルス感染症蔓延という社会状況のなか、諸所の研究計画の遅れにより、研究成果をより広く社会へ発信することができなかったことから、現段階での達成度を「80%」と評価した。研究期間を延長し、令和5年度には国際学会での発表と論文化を推し進める。前者の発表については、すでにその発表が採択され、7月に The 28th Annual Congress of the European College of Sport Science にて研究発表を行う予定である。

最後に、本研究プロジェクトの遂行にあたり、携わっていただいているすべての方、本助成金により最大限の研究支援をいただいている日本大学に心からの謝意を示したい。

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 5年 4月 14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： 80%】

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。昨年度行った研究成果を元に、本年度は次の研究を行った。

- ① 二酸化バナジウム(VO_2)微粒子を用いたトランジスタの電気伝導特性
- ② STM 測定環境の整備
- ③ 量子ドット形成に用いる試料の作製
- ④ 走査型プローブ顕微鏡(STM)による量子ドットの作製
- ⑤ 磁性元素を含まない酸化物半導体ナノ粒子における室温強磁性
- ⑥ 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解析のためのプログラム作成
- ⑦ 「量子物質の基礎と応用」勉強会の開催

7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

① 二酸化バナジウム(VO_2)微粒子を用いたトランジスタの電気伝導特性(羽田野、高瀬)

二酸化バナジウム(VO_2)は、約 340K という高い温度で金属-絶縁体遷移を引き起こし、抵抗値が大きく変化する物質である。この特徴を生かすことにより、高速な電流のオンオフ機能を有するトランジスタの実現が可能である。これまで VO_2 を用いたトランジスタは、数 $10\mu\text{m}$ という大きなサイズの実験結果は報告されている。しかし、 VO_2 を利用した大規模集積回路を実現するためには、サイズをさらに小さくする必要がある。また、100nm 以下のサイズにすることにより、電子の波動性に起因する量子効果を利用した量子効果トランジスタさらには量子コンピュータへの応用も期待される。そのため、我々は、100nm 程度の VO_2 粒子を用いてトランジスタを作製し、電気伝導特性を明らかにすることを目的として研究を行った。

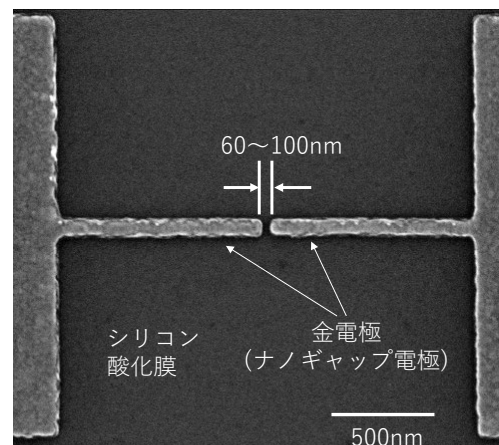


図 1 ナノギャップ電極の走査型電子顕微鏡(SEM)写真

我々は、以下の手順でトランジスタの作製を行った。

- (i) 厚さ 50nm のシリコン酸化膜(SiO_2)上に 60nm~100nm の間隔を有するギャップ電極を作製する(図 1)。
- (ii) VO_2 粒子をエタノールに入れ、超音波を用いて VO_2 粒子をエタノール内に均等に分散させる。
- (iii) VO_2 微粒子を分散させたエチルアルコールを基板上に滴下しエタノールを乾燥させ、ギャップ電極間に VO_2 粒子を配置し、トランジスタを完成させる。

トランジスタは 100nm サイズであり、形状を確認するためには走査型電子顕微鏡(SEM)での観測が必要である。しかし、電子線がトランジスタの電気伝導特性を劣化させる可能性がある。そのため、我々は、トランジスタの動作を確認することにより、トランジスタが形成されているかどうかを確認した。

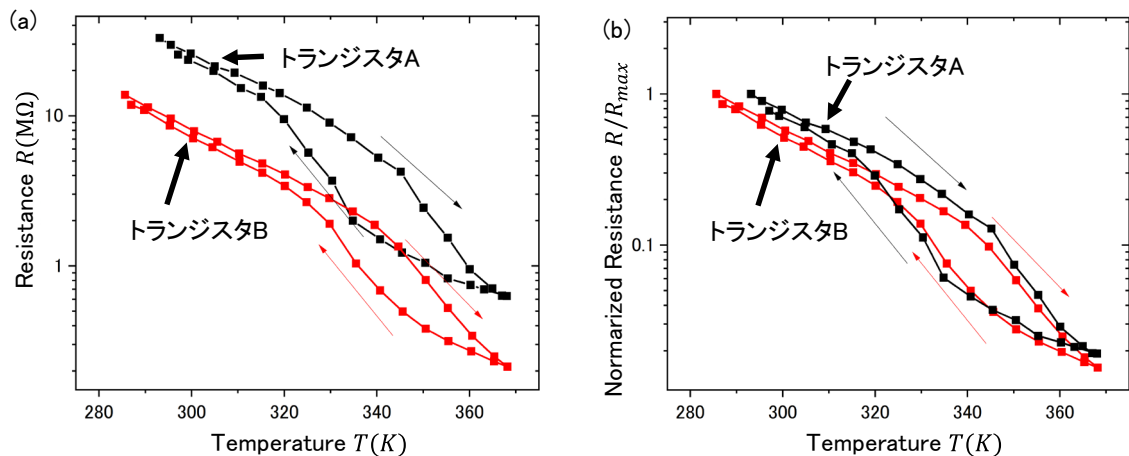


図 2 (a)トランジスタの抵抗値の温度依存性(b)トランジスタの抵抗値(最大抵抗値 R_{max} で規格化)の温度依存性

我々は、上記作製方法を用いてトランジスタを作製した。作製したトランジスタにバイアス電圧を印加すると、 VO_2 がギャップ電極内に配置されない場合、電流が流れない(抵抗値が無量大)。それに対して、 VO_2 がナノギャップ電極内に配置されると、電流が流れ、有限の抵抗値が観測される。我々は、作製した多数個のトランジスタを測定した結果、有限の抵抗値を有する2個のトランジスタを見出した。この2つの VO_2 トランジスタの抵抗の温度依存性を図2(a)に示す。黒線で示した抵抗値がトランジスタ A、赤線で示した抵抗値がトランジスタ B の特性である。ここで、抵抗値はバイアス電圧 100mV の時の値を用いた。また、黒と赤の矢印は温度の変化の方向を表している。図から明らかのように、2つのトランジスタ共に温度を 280K から 370K まで変化させると、抵抗値が約 2 桁変化していることがわかる。さらに、温度を上げた場合と下げた場合で抵抗の温度変化が異なるヒステリシス構造が現れている。これは、典型的な相転移の特徴であり、 VO_2 が金属-絶縁体相転移を起こしていることを表している。ここで、図の2つのトランジスタの抵抗値の温度変化を比較すると、抵抗の値は異なるが、グラフの形状が非常に似ている。そのため、それぞれのトランジスタの抵抗の最大値(R_{max})で抵抗値を規格化したときの抵抗

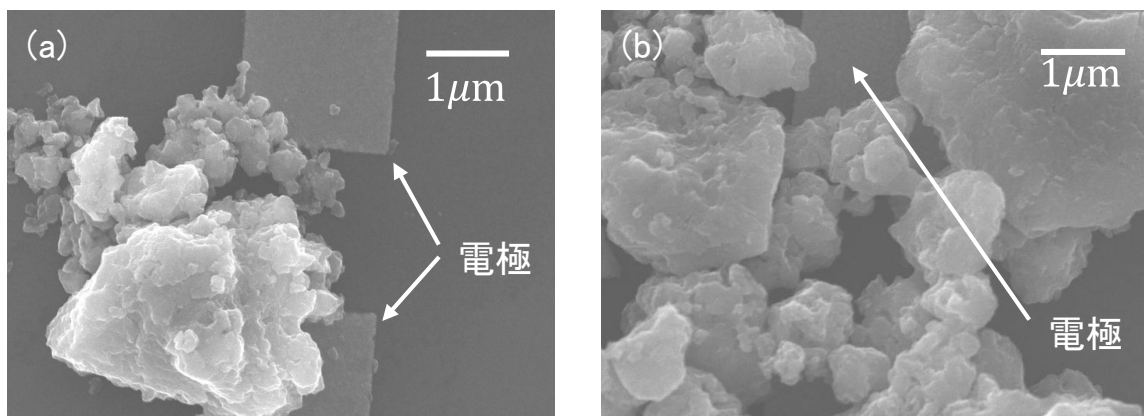


図 3(a)トランジスタ A の SEM 写真(b)トランジスタ B の SEM 写真

値の温度依存性を図 2(b)に示す。図から明らかなように、2つのトランジスタの温度依存性はほぼ一致する。このように2つの異なるトランジスタの抵抗値の温度依存性が、規格化することによってほぼ一致する原因を明らかにするため、トランジスタ A と B の SEM 観測を行った。

SEM でトランジスタ A と B を観測した写真を図 3(a)と(b)にそれぞれ示す。図より、どちらのトランジスタにおいても、ナノギャップ間に約 100nm 径の VO_2 粒子が配置されてトランジスタを形成しているのではなく、複数個の VO_2 粒子が2つの電極間に連続的につながり配置されることによってトランジスタが形成されていることがわかる。したがって、図 2(b)のように、2つのトランジスタの抵抗値の最大値で規格化したときの抵抗の温度依存性が一致する理由は、トランジスタを形成している VO_2 粒子の数が2つのトランジスタで異なるためであると考えられる。これまで、このような微粒子を用いたトランジスタの作製及びその電気伝導特性特定の報告例がないため、この研究成果についての論文投稿に準備を進めている。

② STM 測定環境の整備(出村)

ボトムアップ方式量子ドット形成には STM が必須のため、その実施環境を整備してきた。今年度は、本申請予算にて STM 制御用コントローラを整備した。また、特注パーツによる STM 本体の組み上げに加え、STM 駆動用の高速昇圧回路の作製、STM 測定用プローブ作製も行い、測定環境をほぼ整備することが出来た。これらの装置群を使用し、後述する試料を用いて、ボトムアップ方式による量子ドットの試作を行う予定である。

③ 量子ドット形成に用いる試料の作製(出村)

ボトムアップ方式による量子ドット形成に用いる試料として、低温でモット状態及び電荷密度波 (CDW) を示す遷移金属ダイカルコゲナイド 1T-TaS_2 に加え、これらの状態が抑制され、分域構造が形成される $1\text{T-TaS}_{2-x}\text{Se}_x$ 単結晶試料の育成を行ってきた。これまでに、3ゾーンを使用した化学気相輸送法から、数 mm 角の単結晶を得ることに成功している。今年度は、さらに Se 量の多い試料の育成を行い、最終的に $x=0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6$ の組成を持つ単結晶の準備に成功した。これらの試料は、CDW 状態が残っている試料から、完全に抑制できている試料までが準備出来た状態であり、実験等の進捗により、実験試料を様々に選択できる準備が整ったことを意味する。今後は STM 装置でこれらの試料を観察し、その分域構造を制御する条件を見出す予定である。

④ 走査型プローブ顕微鏡(STM)による量子ドットの作製(羽田野、出村)

遷移金属ダイカルコゲナイド 1T-TaS_2 は、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。この分域構造は量子ドットとして利用することが可能であるため、この手法が確立できればボトムアップ方式に量子ドットを作製可能となる。このような手法で量子ドットを作製するためには、 1T-TaS_2 をシリコン酸化膜に転写する必要がある。昨年度作製した 1T-TaS_2 の単結晶の光学顕微鏡写真を図 4(a)に示す。この 1T-TaS_2 の単結晶は、2次元結晶がファンデルワールス力によって

緩く結合した状態であるため、スコッチテープを使って容易に剥離し、原子1個分の厚さの単結晶を実現できる。図4(b)に、このスコッチテープを用いて、原子数個の厚さの単結晶に剥離し、シリコン酸化膜に転写したときの光学顕微鏡写真を示す。図のように、2次元結晶1T-TaS₂のシリコン酸化膜上への転写に成功した。今後、この転写された単結晶の厚さを原子間力顕微鏡などで確認する。さらに、昨年度確認した電子線描画装置を用いたナノギャップ電極作製方法を用いて、単結晶上にナノギャップ電極を作製し、STMによるパルス電圧を印可することで分域構造(量子ドット)作製を行う予定である。

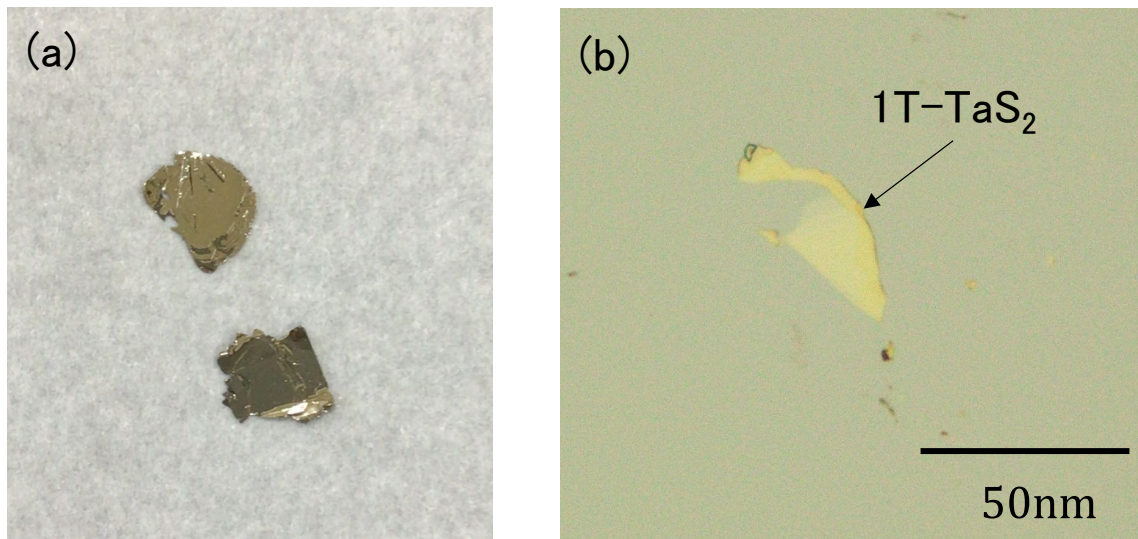


図4(a) 遷移金属ダイカルコゲナイド 1T-TaS₂ (b)シリコン酸化膜上に転写された遷移金属ダイカルコゲナイド 1T-TaS₂の光学顕微鏡写真

⑤ 磁性元素を含まない酸化物半導体ナノ粒子における室温強磁性(高瀬)

近年、磁性元素を含まない酸化物半導体ナノ粒子において室温強磁性の発現に関する報告が相次いでいる。このような酸化物半導体ナノ粒子を用いることにより、新しい量子ドットを実現することが可能である。しかし、この強磁性は、バルクでは観測されず、飽和磁化が粒径に依存することから、ナノ粒子特有の欠陥が磁気モーメントの起源であると考えられている。そこで、我々は、強磁性の発現が表面なのか、バルクであるのかを切り分けるために、酸化物相転移物質に注目し研究を行ってきた。当初、金属状態では、欠陥のもつ局在磁気モーメントはかき消されると予想したが、研究の結果、金属-絶縁体転移物質の場合、強磁性は、金属状態でも絶縁体状態でも発現し、母体材料が反強磁性体の場合でも、転移温度前後で強磁性は確認され、母体の物性に依存しないことが明らかになった。更に、強磁性の磁化は、母体の反強磁性と界面近傍で反強磁性相互作用を通して、互いに磁化を打ち消し合うことが確認された。また、TiO₂で見られる強磁性に対して、酸素中での昇温処理を施したところ、強磁性が完全に消失することから、酸素欠陥が強磁性の主たる要因であることが明らかになった。この他、特定の物質が島状成長することに注目し、SiO₂基板状にIn₂O₃アイランドを成長させた。その結果、200℃で成長させた

場合、100 nm 程度の粒状試料が形成され、これが強磁性を示した。400 °C、600 °Cと基板温度を上げていくと、島状結晶が生成され、島の大きさは大きくなったが、これらの試料は強磁性を示さなかった。この成果は、ナノ粒子で観測される強磁性を基板状に固定された試料で再現されたもので、今後、様々な測定を実施する予定である。

⑥ 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解析のためのプログラム作成(羽田野)

単一量子ドットは、量子計算の 1 量子ビットに対応する。そのため、2 重量子ドットは、量子ビットの操作を検証するための最小単位であると同時に、単一ドットでは実現不可能な新しい効果による特性が期待できる。そのため、我々は、2 重量子ドットの理論的な解析を行ってきた。これまで我々は、有償のプログラミング言語である Mathematica を利用して、2 重量子ドットの理論解析を行ってきた。しかし、Mathematica は高価で利用者が限定される。量子ドットの量子コンピュータへの応用に向けた研究が加速していくためには、2 重量子ドットの理論計算が誰でも行えるようなプログラムを作成する必要があると考えられる。

我々は、次のようにプログラムの書き換えを行った。

- (i) Mathematica で書かれた 2 重量子ドットの電流計算プログラムの一部を取り出し、Python 言語に変換する。
- (ii) 2 つのプログラミング言語による計算結果を比較し、その結果が一致することを確認する。2 つの結果が一致した場合は次のプログラムに進む。

上記の方法を用いてプログラム全てを Mathematica から Python へと変換した。すべてのプログラムを変換後に、2 つのプログラムを用いて電流のバイアス電圧及びゲート電圧依存性の数値計算を行った。その結果を図 5 (a), (b)に示す。図のように、計算結果は完全に一致した。今後

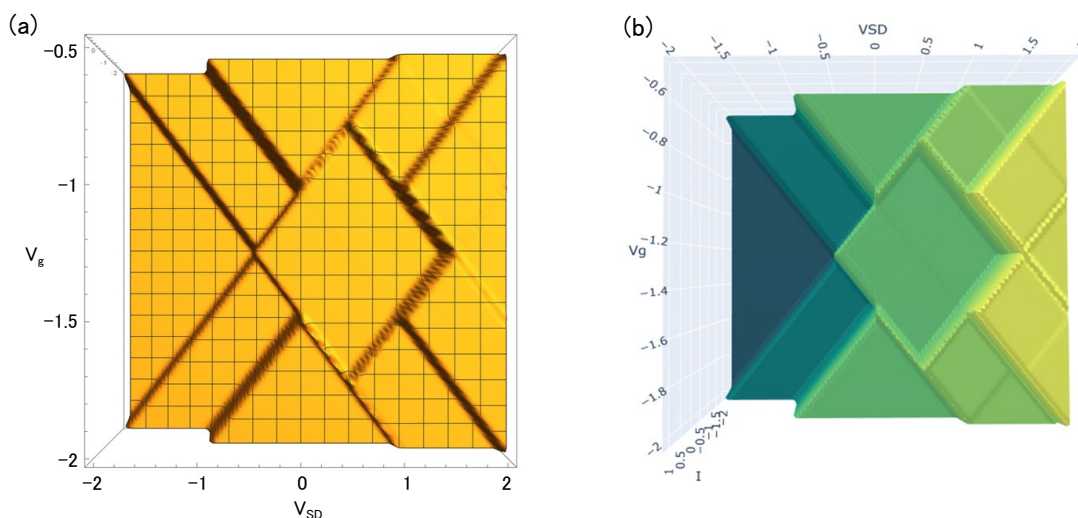


図 5(a) Mathematica による計算結果 (b)Python による計算結果

は、この Python で書いたプログラムが Web 上で誰でも使えるように、研究室のホームページを変更していく予定である。

⑦ 「量子物質の基礎と応用」勉強会の開催(羽田野、高瀬、出村)

我々は、トポロジカル超伝導体として注目されている塩化ルテニウム(α - RuCl_3)の単結晶の作製も行っている。トポロジカル超伝導体は、マヨラナ粒子が生成され、そのマヨラナ粒子を用いることにより量子コンピュータが実現することが理論的に報告されている。そのため、トポロジカル超伝導体をより理解するため、この分野の最先端で活躍されている大阪大学大学院基礎工学研究科の藤本聡教授を招待し、「量子物質の基礎と応用」という勉強会を 2022 年 9 月 6、7 日に日本大学理工学部で開催した。



図 6 「量子物質の基礎と応用」勉強会の風景

トポロジカル絶縁体に関する内容を基礎から応用まで話していただいた。日大関係者だけでなく他大学からも参加があり、およそ 30 名が参加する勉強会となった(図 6)。藤本先生にたいへん丁寧に話をしていただいたため、参加者からはこの勉強会は大変好評だった。

上記の研究成果以外に、本研究成果に関して学会で発表を行った。昨年度の研究成果である並列 2 重量子ドットにおける並列及び直列電流経路の共存の研究に関して、学会で発表を行った(羽田野 剛司, 久保 敏弘, 天羽 真一, 都倉 康弘, 樽茶 清悟, ‘並列 2 重量子ドットにおける直列電流経路の観測’, 第 70 回応用物理学会春季学術講演会 2023 年 3 月 18 日)。また、昨年度の研究を含めた、これまでの多重量子ドットの研究成果についての招待講演を行った(羽田野 剛司, ‘結合量子ドット(人工分子)の電気伝導特性’, 令和 4 年度日本表面真空学会東北北海道支部講演会, 2023 年 3 月 6 日)。

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 5年 5月 1 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：75 %】

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 患者および健常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

前年度の報告書にて、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したこと。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したこと。IgE 依存性刺激にてマスト細胞から特異的に発現が上昇し、AD 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た、miR103a-3p の機能を *in vitro* 実験で検証した。すなわち、miR103a-3p mimic および miRNA mimic control を 2 型自然リンパ球 (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。そこでその機序を検討した。

7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

miR103a-3p mimic 導入 ILC2 において IL-5 産生が増強した機序の解明.

ILC2 の IL-5, IL-13 の転写は GATA3 によって制御されていることが知られている. また, Hosokawa らは, GATA3 のアルギニン残基 261 の脱メチル化が IL-5 の転写を促進するが IL-13 の転写を促進しないと報告している (Hosokawa H, et al. J Biol Chem 2015; 290:13095-103). そこで miR103a-3p が ILC2 において GATA3 のアルギニン残基のメチル化に影響を及ぼすという仮説を立てた. miR103a-3p は protein arginine methyltransferase (PRMT) family の 4, 5 および 8 の 3' UTR に作用できることが in silico の検索から判明したのでこれら酵素が IL-33 刺激した ILC2 に発現しているかを検討した.

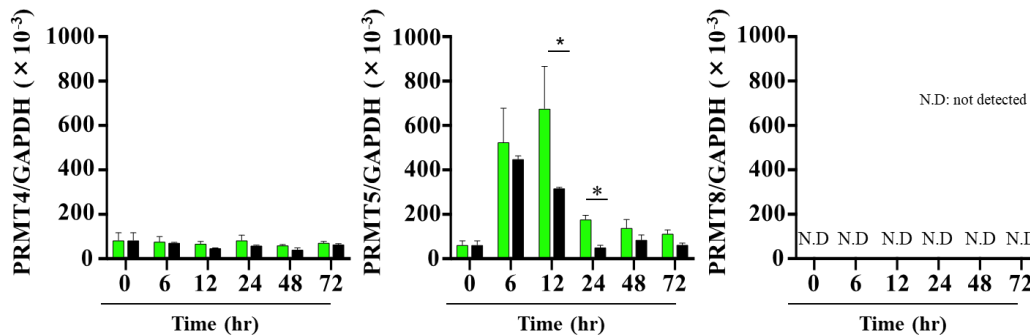


図 1. IL-33 刺激した ILC2 に発現する PRMT4, PRMT5 および PRMT8 に対する miR103a の影響. 時間は IL-33 刺激時間. 緑のバーが miR103a-3p の添加なし. 黒が添加あり.

図 1 の如く PRMT4 の発現は低く miR103a-3p の影響はなかった. PRMT5 は IL-33 によって発現が増強するが miR103a-3p の添加によって有意に発現が抑制された. PRMT8 は ILC2 において発現が見られなかった.

次に miR103a-3p の影響が PRMT5 への直接作用かどうか調べるためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行った PRMT5 の wild type と miR103a-3p 結合サイトを欠損させた PRMT5 を作製し miR103a-3p mimic あるいは nonsense miRNA mimic の影響を調べたところ miR103a-3p 結合サイトを欠損させた PRMT5 においては miR103a-3p によるルシフェラーゼ活性の低下が抑制され miR103a-3p の影響が PRMT5 への直接作用と確認された.

実際に IgE 依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞が IL-33 刺激した ILC2 に発現する GATA3 のアルギニン残基のメチル化に影響を及ぼすかどうかウエスタンブロッティング法を用いて検討した.

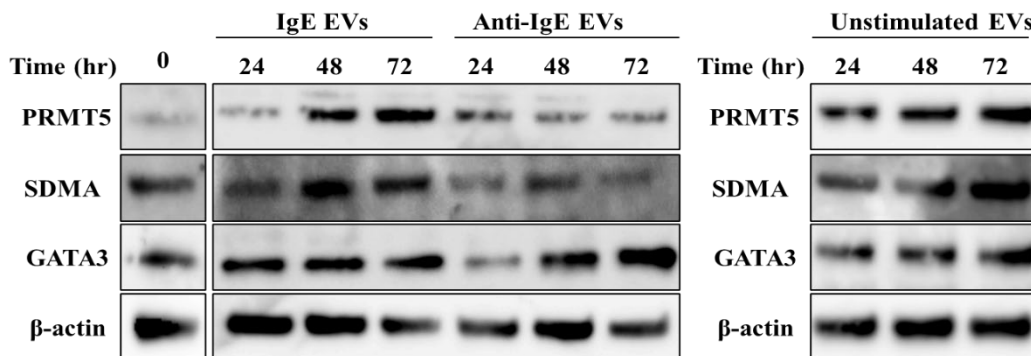


図 2. IgE 依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞の IL-33 刺激した ILC2 に発現する GATA3 のアルギニン残基のメチル化 (symmetric dimethyl-arginine : SDMA) と PRMT5 の発現に対する影響

IgE 依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞を IL-33 刺激した ILC2 に添加 24-72 時間後に GATA3 のアルギニン残基のメチル化 (SDMA) は減弱し PRMT5 の発現は低下した (図 2). GATA3 タンパクの発現量には影響はなかった.

次に miR103a-3p が直接 IL-33 刺激した ILC2 に発現する GATA3 のアルギニン残基のメチル化を減弱させるかを検討した.

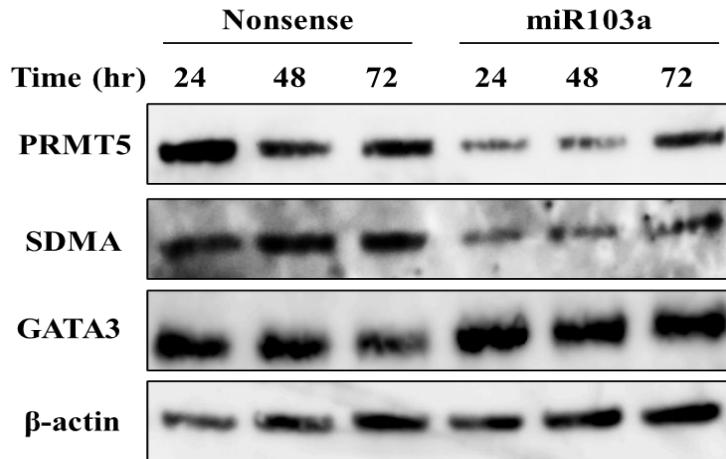


図 3. miR103a-3p の IL-33 刺激した ILC2 に発現する GATA3 のアルギニン残基のメチル化への影響

図 3 の如く miR103a-3p が直接 IL-33 刺激した ILC2 に発現する GATA3 のアルギニン残基のメチル化を減弱させ、PRMT5 の発現を低下させた.

最後に PRMT5 の発現を減弱させると IL-5 の産生が増加するかについて検討を行った.

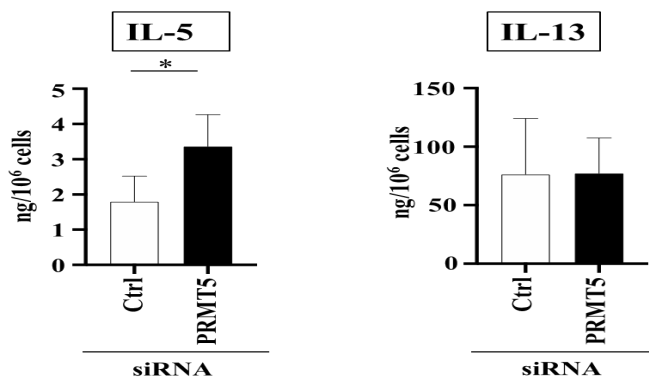


図 4. IL-33 刺激した ILC2 からの IL-5 産生に対する PRMT5 の発現低下の影響

IL-33 刺激した ILC2 に shRNA の技術を用いて PRMT5 の発現を低下させると図 4 のように確かに IL-5 の産生は増加するが IL-13 の産生には影響がないことが分かった.

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 5年 4月 1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：③】・【達成度： 60 %】

5 研究目的

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 2007 年に日本整形外科学会によって新しく提唱された概念である。高齢者の頭頸部領域の運動器疼痛は、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ると考えられる。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および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。

6 研究概要

咀嚼筋筋膜痛症候群と中枢性感作との関連を検討した研究はごく少数である。中枢性感作症候群のスクリーニングツールとして Central sensitization inventory (CSI) の有用性が示唆されている。咀嚼筋筋膜痛症候群患者と健常者の Temporal summation (TS)と CSI を用い、中枢性感作との関連を比較検討した。本研究に参加同意を得た咀嚼筋筋膜痛症候群患者および健康成人ボランティアを対象とした。初診時に Visual analogue scale (VAS)、両側咬筋および側頭筋の圧痛閾値、各筋の圧痛閾値をもとに算出した TS、CSI を用いた中枢性感作の評価を行った。TS 算出後、健常者群と患者群間の CSI スコアの比較検討を行った。患者群における VAS と病悩期間では、正の相関が認められた。咬筋の圧痛閾値は、患者群で低値であった。また CSI スコアは、患者群で高値であった。したがって、患者群では中枢感作が生じている可能性が高いことが示唆された。

ラット咬筋への電気刺激による咬筋過剰収縮モデル作製後、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変化を観察したところ、過剰収縮開始 2 日目より逃避反射閾値の低下がみられた。その逃避反射閾値の低下は、咬筋への ATP と ADP 受容体アンタゴニスト投与により抑制された。さらに、圧刺激を加えられた咬筋から遊出される物質をマイクロダイアライシスにて回収し、高速液体クロマトグラフィーにて ATP と ADP 量を測定した。過剰収縮開始 2 日目の咬筋からの圧刺激による ATP と ADP 遊出量は非過剰収縮群と比較して増加していた。したがって、咀嚼筋筋膜痛症候群患者でみられるような咬筋痛は、咬筋から遊出される ATP と ADP が侵害受容ニューロンを感作することにより発症する可能性が示唆された。

7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

メタボリックシンドロームや認知症、うつ病などの予防や治療法として運動の重要性はよく知られている。しかし、その運動の基本となる運動器そのものの健康に関する認識は必ずしも十分ではない。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こり、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。本研究では、咀嚼筋筋膜痛症候群患者は中枢性感作があるのか？どのような分子メカニズムで頭頸部運動器疼痛が発症するのか？を解明した。

中枢性感作 (Central Sensitization : CS) とは中枢神経系の過度な興奮によって、疼痛、疲労、集中困難及び睡眠障害などの症状を引き起こす神経生理学的徴候である。CS は線維筋痛症、複合性局所疼痛症候群及び慢性腰痛などの病態に関与していることが明らかになっていることから、慢性痛に対して、CS の概念を考慮した評価及び治療介入が必要である。近年、CS の評価として、自記式質問紙である Central Sensitization Inventory (CSI) がスクリーニングツールとして開発され、臨床的有用性が報告されている。顎顔面領域では顎関節症も含まれる。齶蝕、歯周病と並ぶ歯科 3 大疾患のひとつ特に咀嚼筋痛障害を主徴としたものを咀嚼筋筋膜痛症候群と呼ぶ。咀嚼筋筋膜痛症候群は歯や頭部などの咀嚼筋から離れた部位に関連痛を生じることがあり、歯原性歯痛と誤診されることがある。現在、咀嚼筋筋膜痛症候群と中枢性感作との関連を検討した研究はごく少数であるが、中枢性感作症候群のスクリーニングツールとして Central sensitization inventory (CSI) の有用性が示唆されている。そこでまず、咀嚼筋筋膜痛症候群患者と健常者の Temporal summation (TS) と CSI を用い、中枢性感作との関連を比較検討した。

被検者は日本大学歯学部附属歯科病院口腔内科受診中で本研究に参加することを同意した咀嚼筋筋膜痛症候群患者 (患者群) 11 名 (女性:9 名, 男性:2 名; 平均 52.4 ± 4.9 歳) および健康成人ボランティア (対照群) 12 名 (口腔領域に異常を認めず受療中の全身疾患を有さない者および年齢や性別が患者群と比較して隔たりがなく研究に自発的に協力を申し出ただいた教職員スタッフから抽出した。但し、大学院生、歯学部学生は除いている) とした。なお、国際疼痛分類第 3 版 (ICHD3) に基づいて咀嚼筋筋膜痛症候群患者であると診断した。

患者群と対照群に施行した検査および解析を以下に示す。

- ① 初診時の視覚的アナログ尺度 : Visual analogue scale (VAS) を測定した。VAS は被験者に長さ 10 cm の水平な直線の横線を見せ、左端が「痛みなし」、右端が「想像できる最大の痛み」であると説明したのち、現在感じている痛みの程度を線上に示してもらい、その長さをもって痛みの程度を数値化するものである。

〔7 研究結果（つづき）〕

- ② 両側咬筋および側頭筋の圧痛閾値を測定した。両側咬筋および側頭筋を高精度圧痛計（TDM-N, NEUTONE, Tokyo）を用いて圧刺激を与え、被験者が痛みを感じた圧力を圧痛閾値とした。
- ③ 両側咬筋および側頭筋における圧痛閾値をもとに、単発圧刺激時と10回連続圧刺激時のVASを測定し、その差をもってTSを算出した。
- ④ TS算出後、CSIを用いて中枢性感作の評価を行った。また、健常者群と患者群におけるCSIスコアの比較検討を行った。本研究では中枢感作の具体的な症状であるCSI：25項目を5件法（0：まったくない～4：いつも）に基づいて合計した。点数の高いほうが、中枢感作の程度が強いことを意味する。

患者群と対照群に施行した検査および解析により以下のことが明らかとなった。

- ① 患者群におけるVASと病悩期間では、正の相関が認められた。
- ② CSIスコアは、患者群がコントロール群と比較し有意に高値であった。
- ③ 咬筋の圧痛閾値は、左右側ともに患者群がコントロール群と比較し有意に低値であった
- ④ 患者群におけるCSIスコアとVAS、病悩期間、左右側咬筋・側頭筋の圧痛閾値には相関は認められなかった。
- ⑤ 病悩期間の長さに比例して、疼痛強度は増加する傾向にある。
- ⑥ 患側健側問わず、咀嚼筋筋膜痛症候群患者では圧痛閾値が低下することが示された。咬筋における圧痛閾値は有意差を認めたが、側頭筋には認められなかった。

以上より、CSIスコアは患者群がコントロール群と比較して有意に高値を示したことから、患者群は中枢感作を惹起する可能性が高いことが示唆された。さらに、中枢感作症候群には顎関節症が含まれるが、今回対象とした咀嚼筋筋膜痛症候群では筋の痛みと中枢感作に相関は認められなかったことから、筋の痛みが直接的に中枢感作に影響を及ぼしている可能性は低いことが示唆された。中枢感作は新しい概念であり、客観的な評価が難しい。しかし、咀嚼筋筋膜痛症候群を含めた疼痛性疾患が何らかの要因で治療抵抗性を示し、患者が苦しんでいるのが現実である。中枢性感作と咀嚼筋筋膜痛症候群の関連性が解明できれば、新たな治療法の選択や心理的介入への手掛かりとなると考える。

上記の臨床研究から咀嚼筋筋膜痛症候群の病因を解明するため、ロコモティブシンドロームと強い相関をもつ頭頸部運動器疼痛を特定し、その咀嚼筋疼痛モデルの作製を試みた。過去の我々の研究において既に、顎関節痛モデル、咀嚼筋痛モデル、僧帽筋痛モデルを確立しており、いずれかのモデル動物を採用（または若干の改変を加える）することになるため、頭頸部運動器疼痛モデル動物の作製は容易である。二本のワイヤー電極を咬筋筋膜上に設置し（Pain. 2008）、長期のブラキシズムを想定した咬筋の収縮（強縮）を起こさせるためパラメーター（60 min/day, Main interval: 2 Sec, Interval: 10 mSec, Duration: 200 μ Sec, Train: 100, 10V）で5日間電気刺激を毎日60分間行い、人為的にブラキシズムを発生させる。ブラキシズム開始後、覚醒下で咬筋への圧刺激による逃避反射閾値を計測する。すでに覚醒下における逃避反射閾値計測法は当講座で確立しており、解析に支障はない。電気刺激開始後1日目より咬筋へ

〔7 研究結果 (つづき)〕

の圧刺激による逃避反射閾値が有意に低下した。5日間の電気刺激後3日目まで咬筋への圧刺激による逃避反射閾値が有意に低下し続けた。よって、ブラキシズム開始後に遅発的に咬筋痛が発症し、その咬筋痛はブラキシズム終了後もしばらく続くことが分かった。

ブラキシズムによって咀嚼筋に蓄積する発痛物質の候補としてアデノシン三リン酸 (ATP) が挙げられる。電気刺激開始後または電極のみ設置後5日目に咬筋を摘出し、灌流されているリン酸緩衝液 (PBS) で満たされたシャーレ内に1時間静置した。その後、シャーレ上の咬筋に圧刺激を加え、シャーレ内のPBSを1ml回収した。高速液体クロマトグラフィーを用いて回収PBS内のATPおよびその代謝産物であるアデノシン二リン酸 (ADP) とアデノシン一リン酸 (AMP) を定量解析した。電極のみ設置群と比較し、電気刺激群において咬筋への圧刺激によるATP、ADPとAMPの遊出量が有意に増加した。

次に、ADPの受容体であるP2Y₁₂受容体アンタゴニストまたはP2Y₁₃受容体アンタゴニストを電気刺激開始後より咬筋へ連日投与し、咬筋への圧刺激による逃避反射閾値の変化を計日的に測定した。電気刺激による逃避反射閾値の低下は、P2Y₁₂受容体アンタゴニストまたはP2Y₁₃受容体アンタゴニスト投与により抑制された。

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を発現させる。保有するプラスミド (pAAV-EF1 α -AcGFP1) に対して、EF1 α とSK3 (small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel; 衛星細胞のマーカー) のプロモーター配列の組み替えを行う。SK3のプロモーター配列は既にクローニングされた情報を用いる。さらに、チャンネルロドプシンの配列を組み込んで、pAAV-SK3-ChR2-P2A-AcGFP1を作製する。生後4週目、イソフルラン麻酔下にて頭蓋骨に小さな穴をあけ、ガラス管を挿入しAAVを電子マイクロインジェクターを用いて、作製したAAVを連続的かつ超低速で三叉神経節に投与する。三叉神経節内へ注入されたAAVによって、SK3陽性細胞 (衛星細胞) に青色光応答性のイオンチャンネルであるチャンネルロドプシンを発現させる。三叉神経節に留置したワイヤレスオプトジェネティクスシステムの光ファイバーを用いて、三叉神経節へ青色光を照射することでSK3陽性衛星細胞を特異的に活性化できる。コントロール動物に対して継続的に三叉神経節に青色光を照射することでSK3陽性衛星細胞を特異的に活性化させた状態にし、咬筋への機械刺激に対する逃避反射閾値を測定した。三叉神経節への青色光照射1日後より、咬筋への機械刺激に対する逃避反射閾値が低下した。5日間の青色光照射後に、咬筋への機械刺激に対する逃避反射閾値の低下が3日間継続した。

以上より、電気刺激による咬筋の持続的収縮により生じる咬筋痛は、咬筋への圧刺激により放出されるATPの代謝産物であるADPのP2Y₁₂またはP2Y₁₃を介したシグナルによる一次ニューロンの興奮性増大が関与すると考えられる。さらに、その一次ニューロンの興奮性増大は三叉神経節の衛星細胞の活性化をもたらし、一次ニューロンの興奮性増大が持続することが示唆された。

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 5 年 4 月 7 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・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

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 3 年度 ～ 令和 5 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	権 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： 80 %】

5 研究目的

超高齢社会のわが国にとって、呼吸器疾患対策が喫緊の課題であることが、COVID-19 のパンデミックでさらに明白となった。SARS-CoV-2 感染者においては、高齢者に加え昨年世界死因の第3位となった慢性閉塞性肺疾患：COPD や肺炎などの呼吸器疾患、糖尿病、および心疾患などの基礎疾患を有する人の重症化・死亡率が高いことが知られている。いずれもが、“歯周病”との関連が深い疾患である。さらに、COVID-19 患者の肺や喀痰から歯周病原菌が検出されること、歯周病患者は 10~20 倍以上 COVID-19 の重症化と死亡率が高いことが報告された。また、COPD や肺炎においても、歯周病患者ではその増悪リスクが 4 倍以上高いことが臨床研究から明らかとなっている。以上の知見、また口腔と呼吸器とは気道に通じていることから、口腔の不衛生が呼吸器疾患の進展に悪影響を及ぼしていることは想像に難しくない。さらに、パンデミック下や震災時等においては、口腔ケアが後回しとなるため、歯周病原菌の誤嚥により下気道の炎症が悪化する可能性がある。

一方、口腔ケアを始めとする口腔衛生管理が、肺炎やインフルエンザの発症 COPD 増悪の予防に有効であることが知られている。しかし、口腔健康管理が呼吸器疾患の予防になぜ有効なのか？は未提示のままである。

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、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。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

歯周病学、微生物・感染症学、呼吸器内科学、及び創薬学の専門家がグループを形成、口腔-呼吸器を軸とした下気道炎症研究を進めている。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ているが、特に令和4年度は、これまでの歯学研究に欠けていた、ウイルス学という新たな視点を取り入れ「細菌-ウイルス相互作用」研究を進展させた。その結果、歯周病原菌 *F. nucleatum* 刺激が TMPRSS2 (SARS-CoV-2 が効率よく感染するために、ヒト細胞表面上に発現するプロテアーゼ) の発現を誘導すること、及び同じく歯周病原菌である *P. gingivalis* が SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質 S1 の開裂を起こすことを突き止めた。さらに、昨年報告した *P. gingivalis* による炎症性サイトカインの産生に、*P. gingivalis* の Mfal (短線毛) と宿主細胞の TLR-4 が深く関わっていることを見出した。さらに、ヒト化マウス呼吸器疾患モデルマウスの開発に取り組むと共に、昨年実験系を立ち上げた COPD モデルマウスを用いて、歯周病原菌による炎症性サイトカインとムチンの過剰産生機序を明らかにすることが出来た。課題2に関しては、実際に歯科医による専門的口腔ケア前後の喀痰における炎症物質の定量と解析が進んでいる。

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憎悪メカニズム解明に関する研究成果

コロナウイルスやインフルエンザウイルスなどの呼吸器関連ウイルスは、特定のプロテアーゼによりスパイクタンパクが切断されることで感染が可能となる「プロテアーゼ依存性ウイルス」である。SARS-CoV-2 の場合、スパイクタンパクが S1 と S2 に切断後、さらに S2 が切断することで感染可能となる (右図参照)。

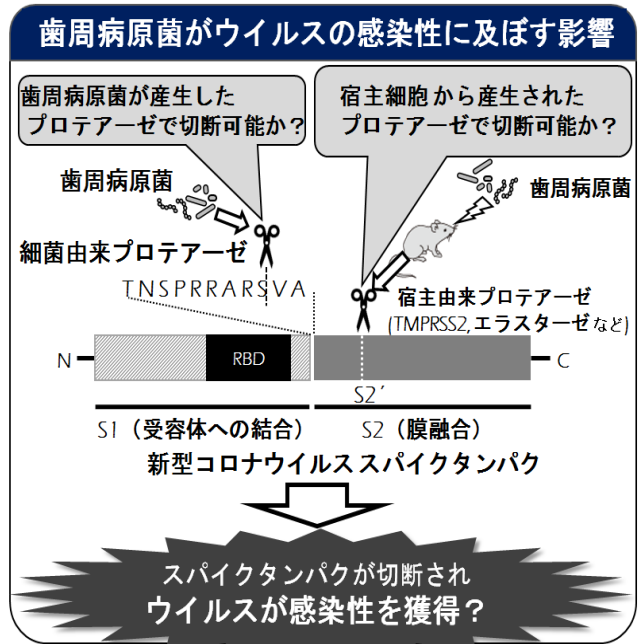
スパイクタンパクの切断に加え、コロナウイルスやインフルエンザウイルスが宿主細胞と膜融合するためには、宿主由来のプロテアーゼである TMPRSS2 によりスパイクタンパクが開裂されることが重要である。

歯周病原菌は多数のプロテアーゼを有するので、スパイクタンパクを直接切断できる可能性があるため、実験を行い以下の結果を得た。

1) 歯周病原菌 *F. nucleatum* 刺激は TMPRSS2 の発現を誘導する

呼吸器細胞株 (Calu-3 細胞) を *F.nucleatum* 培養上清により刺激した。その結果、用量依存的に TMPRSS2 の遺伝子発現が増加することを認めた。さらに、ウエスタンブロットによりタンパク質の増加も認めた。つぎに、*F.nucleatum* 培養上清が誘導する TMPRSS2 発現に関わるシグナル伝達経路を検索するため、MAPK 系の阻害剤 (p38 阻害剤 SB239063、JNK 阻害剤 SP600125、ERK 阻害剤 U0126)、及び NF-κB 阻害剤 BAY11-7082 を用いて検討した。その結果、NF-κB 阻害剤のみ *F.nucleatum* が誘導する TMPRSS2 の発現を抑制することを認めた。以上の結果から、*F. nucleatum* 刺激により NF-κB を介して TMPRSS2 の発現を誘導していることが示唆された。

TMPRSS2 はインフルエンザウイルスの増殖にも関わることが明らかにされている。そこで、SARS-CoV-2 の検討前に、インフルエンザウイルス感染に及ぼす影響について検討した。*F. nucleatum* で処理した Calu-3 細胞にインフルエンザウイルスを感染させた。その結果、*F. nucleatum* 処理細胞ではウイルスの増殖促進を認めた。さらに、TMPRSS2 阻害剤であるカモスタット存在下で *F. nucleatum* 処理細胞にインフルエンザウイルスを感染させた。その結果、カモスタット存在下では、*F. nucleatum* 処理細胞においてもウイルスの増殖促進を認めなかった。以上の結果から、*F. nucleatum* により TMPRSS2 の発現が促進され、ウイルス感染が促進した可能性が考えられる。現在、実際に歯周病原菌の刺激がウイルス感染を促進するかを調べるために、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質偽型レンチウイルスならびにインフルエンザウイルスを細胞に感染させた後、プラークアッセイと蛍光免疫染色を実施している。さらに、TMPRSS2 をノックダウンさせた場合、およびナファモスタ



ットなどの TMPRSS2 阻害薬で処理した場合のウイルス増殖状態を検討している。

2) 歯周病原菌 *P. gingivalis* による SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の開裂

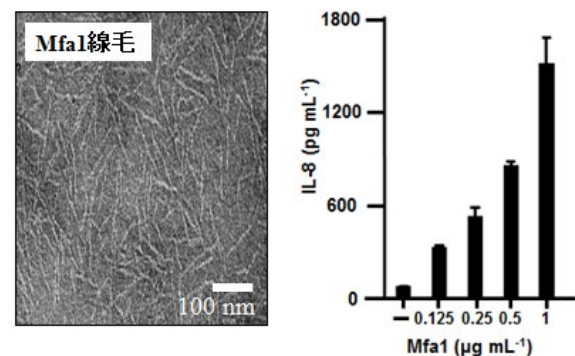
リコンビナント SARS-CoV-2 全長スパイクタンパク質を *P. gingivalis* 培養上清にて処理し、スパイクタンパクが開裂されるかを解析した。その結果、スパイクタンパクの開裂を認めた。この結果から、SARS-CoV-2 感染に *P. gingivalis* が関与していることが示唆された。SARS-CoV-2 のスパイクタンパクが開裂することによりウイルスの受容体 ACE2 に結合する。そこで、実際に ACE2 発現細胞に *P. gingivalis* 処理により開裂させたスパイクタンパクが結合するか否か、蛍光免疫染色により検討した。しかしながら、抗スパイクタンパク抗体が非特異的に細胞に付着し蛍光を発することがわかったため、現在実験条件、及び抗体の特異度検定などさらなる実験条件検討を行っている。

3) 歯周病原菌の線毛による炎症性サイトカインの産生誘導

P. gingivalis は、FimA (長線毛) と Mfa1 (短線毛) の二種類の線毛を有している。菌体の最外層に存在するため、細菌を誤嚥した場合、宿主細胞に最初に作用する病原因子と考えられる。FimA に関しては様々な生物活性が知られているが、現在注目されている Mfa1 に関しては研究がはじまったばかりで構造以外不明である。

これまでに、歯周病原菌が様々な呼吸器細胞において肺炎の中心的役割をなす炎症性サイトカインを強く誘導することを報告してきた。今年度は、歯周病原菌のどの病原因子が本作用を担うかを検討するため、Mfa1 とその受容体に注目し検討を行った。実験は、精製した FimA、Mfa1 及び LPS を気管支上皮細胞に添加し、IL-8 と IL-6 量を定量した。Mfa1 と Toll 様受容体 (TLR) との結合は、PC を用いた蛋白質相互作用解析を行うことにより検討した。また、TLR2 もしくは TLR4 を強制発現させた 293/TLR2 と 293/TLR4 細胞を用いて Luciferase assay を行った。さらに、TLR の中和抗体で前処理することにより、実際のサイトカイン発現における TLR の関与を確認した。

気管支上皮細胞に Mfa1 を添加した結果、IL-8 と IL-6 の遺伝子発現が強く誘導された(右図)。Mfa1 は濃度依存的に IL-8 と IL-6 の産生を誘導したが、FimA と LPS に関しては高濃度添加しても両サイトカインの産生に変化が認められなかった。Mfa1 は TLR2 と 4 の両方とそれぞれ異なる方向で結合する可能性があることが推察された。細胞実験の結果、Mfa1 は 293/TLR2 細胞において NF- κ B を活性化したが、TLR4 細胞では変化が認められなかった。さらに、TLR2 の中和抗体処理においてのみ、Mfa1 誘導性の IL-8 と IL-6 の産生が抑制された。

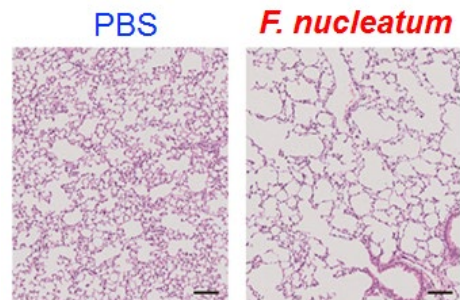


今回新たに、*P. gingivalis* の Mfa1 が IL-8 と IL-6 を誘導すること、その作用に TLR2 が深く関与することが明らかとなり、誤嚥性肺炎の発症において Mfa1 が重要な役割を担っていることが示唆された。

② 呼吸器疾患モデルマウスを使用した研究成果

歯周病原菌が COPD に及ぼす影響

令和 4 年度は、NOG マウスにヒトの CD34 を注入して得るヒト化マウスを使つての実験系の立ち上げを行うと共に、昨年実験系を確立させた慢性閉塞性肺疾患 (COPD) モデルマウスに *F. nucleatum* 死菌を経気道投与し解析を行なった。肺を採取し組織学的に解析した結果、COPD モデルマウスの肺胞腔が *F. nucleatum* の投与により拡大を認めた(右図)。COPD では、マクロファージ、好中球、リンパ球の増加を特徴とする炎症が存在し、その細胞数は COPD の重症度と相関する。そこで、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し細胞数を測定した。その結果、コントロールマウスに比べ、COPD モデルマウスでは、*F. nucleatum* 死菌の投与により、総細胞数、マクロファージ、好中球、リンパ球が増加しており、肺への炎症細胞の集積を認め COPD が重症化していることが示唆された。集積した炎症細胞からは、肺胞を破壊する因子を放出することから、MMP-12 およびパーフォリンの発現を調べた。その結果、肺組織の MMP-12 の遺伝子およびタンパク質発現、ならびに BALF 中のパーフォリンが *F. nucleatum* の投与により増加していることを認めた。以上の結果から、これらの因子の発現亢進により肺胞の破壊を引き起こしていることが示唆された。さらに、COPD 急性増悪に関わる炎症性メディエーターの肺における遺伝子発現量について解析を行った。その結果、*F. nucleatum* を投与したマウスにおいて、TNF- α 、IL-6、CXCL-1、CXCL-5 の遺伝子発現が亢進し、その発現はコントロール投与群に比べ、COPD モデルマウス投与群では、若干高い傾向を示した。上の結果から、*F. nucleatum* は COPD の増悪に関与することが示唆された。



COPD の増悪では、ムチンの過分泌が起こり、気道閉塞や、低酸素血症を招く。COVID-19 の死亡者においても、ムチンの過剰産生が報告されている。昨年、*F. nucleatum* の投与によりムチンのコア蛋白である MUC5AC の遺伝子発現が上昇することを見出した。そこで、肺組織切片をアルシアンブルー染色により、ムチンを実際に産生する杯細胞を検出したところ、*F. nucleatum* の投与により杯細胞の増加を認めた。さらに、MUC5AC を免疫染色により検出したところ、MUC5AC 蛋白の発現亢進を認めた。以上の結果から、*F. nucleatum* によりムチンの過分泌が起きていることが示唆された。

加えて、エラスターゼ発現に対する *P. gingivalis* や *F. nucleatum* の影響を調べた。エラスターゼはインフルエンザや SARS-CoV-2 感染促進にはたらくことが報告されている。マウス C57BL/6J に *P. gingivalis* を誤嚥させ、肺のエラスターゼの遺伝子発現を調べた。その結果、口腔細菌の誤嚥により mock を誤嚥させたマウスに比べ 16 倍の遺伝子発現を認めた。以上

の結果から、口腔細菌はエラスターゼの発現を誘導し、呼吸器ウイルス感染を促進させる可能性が示唆された。現在、*P. gingivalis* のジンジパイン（Rgp と Kgp）に着目、各々の欠損株を用いることで、エラスターゼ発現に関わるプロテアーゼの同定を進めている。

③ 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

世界に類を見ない超高齢社会のわが国では、呼吸器疾患の薬やワクチンに頼らない予防・治療法の提示と普及は急務であるが、その一つが安全で多くの人に応用できる口腔健康管理と考える。その一層の普及には、口腔の不衛生がどのように呼吸疾患を悪化させるのか？ 呼吸器疾患の予防に口腔ケアを中心とする口腔衛生管理がなぜ有効なのか？ の問いに対して、答えを出さなくてはならない。

そこで、昨年から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進めている。これまでに、昨年の 38 名に加え、20 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の定量を進めている。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すとともに、炎症細胞の解析も進めている。

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、その唾液自体を細胞に添加したりマウスに誤嚥させたりする研究を開始した。さらに、COVID-19 患者における口腔ケアの効果について、基礎研究で口腔細菌との関連性が見出された TMPRSS2 や炎症物質等の発現を調べることが出来るか否かの検討を進めている。

