

課題番号	総10-001
------	---------

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成23年4月25日

日本大学 総長 殿

氏名 岩井 奉信



所属・資格 法学部 教授

退職,転出の場合は, () 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="checkbox"/> 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	憲法の制度的枠組みが経済に与える影響に関する比較研究	
3 研究目的	本研究は、憲法が提供する制度枠組が経済にいかなる影響を与えているかについて、先進諸国間の比較を通じて、理論的、実証的に明らかにすることを第一の目的としている。同時に近年の政治経済体制の激変の下、日本国憲法の制度枠組がどのように経済発展の阻害要因となっているか否かを検証し、問題解決に向けて、あるべき日本国憲法の枠組みの方向性について、提言を行おうとするものでもある。	
4 研究概要	本研究は、上記の研究目的を達成するために、法学部及び経済学部の政治学、経済学、行政学、憲法学など研究者が学際的な研究体制を作り、理論的、制度的、実証的などについて、個別の学問的な領域を越え、多面的で体系的な研究を行うことに大きな意義がある。さらに単なる研究にとどまらず、憲法改正論に新たな論点を提供する提言的な研究であることが大きな特徴であり、日本大学の社会科学における学術研究が、いかに実社会に貢献できるかの可能性を探る研究でもある。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> 研究代表者 法学部 教授 岩井奉信 政治学 (研究統括、議会政治研究) 研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 経済学部 教授 浅田義久 経済学 (憲法と税制) 法学部 教授 池田実 憲法学 (憲法と公平性・効率性) 法学部 教授 岩崎正洋 政治各 (制度の国際比較) 法学部 教授 坂井吉良 経済学 (民主主義と経済政策) 法学部 准教授 高畑英一郎 憲法学 (憲法構造の比較研究) 法学部 教授 外山公美 行政学 (憲法と行政組織) 経済学部 教授 中川雅之 経済学 (憲法と公共部門) 	

※ホームページ等での公開の (可)・否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名： 法学部

氏名： 岩井 奉信

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究は、研究目的の欄で明らかにしたように、憲法が提供する制度的枠組みが、経済にいかなる影響を与えているかを、先進諸国間の比較を通じて、理論的、実証的に明らかにすることを第一の目的としている。同時に、現代における政治経済状況が激変する中で、わが国の憲法枠組が経済発展にとって、いかなる阻害要因になっているか、また、もし、そうだとしたら、憲法をいかに改訂していくべきであるかについて、提言しようとするものである。

かかる問題意識の下、法学部と経済学部から憲法学、経済学、政治学、行政学の中堅、若手研究者により研究組織を編成し、この課題について、多面的な研究を学際的に進めてきた。

本研究は、平成 21 年度、22 年度の 2 年間で予定するものであるが、2 年目となる平成 22 年度は、21 年度を通じて、各研究者が個別に行ってきた、文献研究や現地調査などをさらに充実させる一方で、それぞれの研究成果を踏まえ、研究会などでの研究発表や討議などを通じて、当初の問題意識をさらに共有し、その上で、研究課題を絞り込み、日本国憲法の制度枠組みが、具体的にどのように経済発展の阻害要因になっているかを、学際的、多面的に研究することに務めた。

これと並行して、政治と経済との関係についての国際的な比較を容易にするために、21 年度から作成を始めたデータベースの内容を充実することにも重点を置いた。このデータベースは、単に先進国のみならず、データが収集可能な世界の国々について、経済統計は当然として、選挙結果などの数量化がしやすいデータにとどまらず、政権交代や政党、議会制度など、質的データについても、可能な限り定量的なデータとして精力的に作成を行った。

このような政治と経済に関する体系的なデータベースは、1970 年代にアメリカのブルース・ラセットが行った各国の国力に関する計量分析の枠組みに沿って、データの収集や数量化が行われた。1970 年代以降、かかる政治と経済との相互関係に関する数量的な分析が、下火になり、かかるデータが作成されてこなかったことを考えると、本研究での利用に止まることなく、今後の政治と経済に関する分析に対し、極めて有意義なものであるということができよう。このようなデータベースの作成が可能になったのは、本部学術助成により、データの収集および入力に必要な資金が提供されたためであり、本研究のみならず、今後の二次的な利用により、さまざまな分析が行われるための基礎データを提供するという意味で、本研究の重要な成果のひとつであるということができる。

本データベースは、今後、データの補足およびクリーニングの確認を経た後、しかるべき時期に、学内及び、学外での利用が可能となるような形で、公開していくことを予定している。

一方、主たる研究テーマである憲法の制度枠組みと経済発展との関係については、研究者間の議論の結果から、さまざまな課題が浮き彫りになったが、特に関心を集めることになったのは、憲法が規定する政府をはじめとする政策決定システムの制度枠組みと税制のあり方であった。双方とも、わが国では、憲法を前提に、政府組織や税制について、法定主義が徹底されており、この点はアメリカやイギリス等の欧米諸国と、大きく制度枠組みが異なっている。

政府組織の場合、憲法における法定主義を基礎として、内閣法、国家行政組織法などの枠組みが強固なものとなっており、政府組織の改編は、当然のことながら、国会の議決を必要とするため、臨機応変に再編成することができない。たとえば、本研究が行われていた 2009 年にわが国では、政権交代が実現し、誕生した民主党政権は、国家戦略局と行政刷新会議のふたつの大臣を新設し、それに対応したふたつの官庁を創設することを試みたが、国会における与野党の勢力配置の関係から、その実現は困難を極め、2010 年の参院選で民主党が敗北を喫し「ねじれ国会」が現出した結果、政府組織の改編は絶望的なものになった。

これに対し、アメリカやイギリスの場合、憲法やそれに準じる法制度により、国家組織に関する基礎的な部分については、法定主義の下、政府組織の改編は議会の議決を必要とするものの、その運用は、日本に比べて弾力的である。先進国の事例を調査、研究した結果、その多くが政府組織のあり方については、議会の

部科校名： 法学部

氏名： 岩井 奉 信

研究結果 (つづき)

議決を要する法律事項として規定するのではなく、政府の裁量権の範囲で変更が可能な政令事項になっており、極端な場合、政権交代で、新たな内閣が組織されると同時に、省庁の再編成が行われる場合も散見されることがわかった。それは一方で、政府の政策運営やリーダーシップを強めると同時に、政権交代のインセンティブを高め、政権交代を意義深いものに行っていることがあきらかになった。

また、税制についても同様で、わが国では、財政の悪化に伴い、消費税の引き上げが、近年の大きな政治課題となっているが、そのためには、憲法が規定する租税法定主義にもとづき、租税法などの法律を国会で改正する必要があるが、それは「ねじれ国会」の下では、極めて困難なことになっている。

一方、欧米諸国においては、税率の決定は、政府組織の場合と同様に、政令事項となっており、政府が税率を一方的に変更することが可能である。事実、2010年にイギリスで政権交代が起きた時には、保守党のキャメロン政権は、選挙直後に付加価値税の税率を2011年1月から17.5%から20%に引き上げることを決定した。また、アメリカ、イギリスともに景気の動向に合わせて、消費税や付加価値税の税率を臨機応変にへんこうしている。欧米諸国における租税法定主義は、新税の導入などにおいては、厳しく規定されるのに対し、その定量的内容については、政府の裁量に委ねられるものになっており、景気や財政などの動向を睨んで、弾力的に税率が運用されている。

これに対し、日本の場合、長年にわたり、租税法定主義が厳格に運用されてきたため、税制の弾力性は極めて低くなっている。その結果、景気や財政の状況に応じた臨機応変な税率運用が不可能になり、税制は多くの場合、深刻な政治問題と化し、時の政局に翻弄されることになる。日本の財政赤字が膨大なものになった一因も、租税法定主義の厳格に過ぎる適用にあると考えることもできるのである。

これらを代表事例とした場合、日本の憲法枠組みに基づく厳格に過ぎる法定主義や法治主義は、経済政策の弾力性を失わせることになっているとすることができる。また、政府組織の再編についても、法廷主義が、その障害となっていることは明かで、結果的に日本の官庁官僚制を制度が保護し、結果として官僚主導の下での省庁の既得権益を擁護し、財政の弾力性を遺失させ、自由化、民営化、規制緩和など、近年の新自由主義的な市場を重視する改革を阻害し、日本の経済停滞の一因となっていることが指摘できる。同時に官僚主導から政治主導へという政治経済体制の変革をも難しくしていることが明らかにされたのである。

さらに大きな枠組みで見た場合、わが国の政策決定システムそのものも経済発展を阻害する要因となっている。それを象徴するものは、二院制をめぐる問題である。欧米の二院制を調査してみると、それぞれの二院制は、それぞれ独自の形態を取っているものの、政策決定を迅速性を的確性を担保する制度や運用が行われている。イギリスやドイツに代表的にみられるように、二院制の形態をとりながら、経済政策のような国家的な政策については、下院の優位が制度的に強く保障されていたり、あるいは事実上の一院制的に制度規定されていたり、また、イギリスのように、一定の条件の下で、上院が下院の決定を尊重する慣例が定着している場合もある。さらに再議決要件もハードルは必ずしも高くはない。

日本の場合、二院制における衆議院の優越は、極めて限定的であり、法律案については、衆参両院を通過しなければならず、ここでの参議院の役割は、極めて大きい。その結果、「ねじれ国会」が現出した場合、政府法案の成立は、難しく、政策決定過程は極めて不確実性が高くなるざるを得ず、そのため政府のリーダーシップも強く制約されることになる。

ここまでの比較研究の結果からみる限り、日本の憲法が規定する制度枠組みが、現代における政策決定、特に「時間との競争」であり、可処分時間が重要な意味を持つ経済政策の弾力的な決定を難しくしているといえる。この問題は、高度経済成長期のように、税収の自然増を背景に、政府部内における対立が大きくなり、また、衆参で自民党が多数派を制してきた安定した政治の時代においては、表面化することはなかった。しかし、1970年代以降、世界経済の構図が大きく変わり、国際間の経済的な競争が激化する一方で、国際的な経済協調も重要な意味を持ち、そのための弾力的な政策運営が必要な時代に入ると共に、制度枠組みそのものが日本経済にとって、阻害要因になっていることは明かである。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：法学部

氏名：岩井 奉信

研究結果（つづき）

以上のように、一部の事例をみても明らかな通り、日本の憲法にもとづく制度枠組は、現代において、経済発展を阻害する重大な要因になっていることは明かである。これを克服するためには、短期的には、租税法定主義に代表されるように、制度の基礎は国会での議決が必要な法律事項にしつつ、その内容については、弾力的な運用を可能にする政令事項に変更する必要がある。ただし、この変更は、法改正を必要とするため、現状においては、極めて困難である。また、長期的には、二院制に代表されるように、憲法が規定する国会制度や内閣制度などについて、抜本的な見直しが行われなければならない。特に二院制については、衆議院の優越の徹底や、再議決要件の緩和など、憲法の規定を改正する、すなわち憲法改正を必要とする。

このふたつの事例をみてもわかる通り、憲法改正は、日本政治を正常化するために不可欠であると同時に、日本の経済発展や財政の健全化、さらには社会保障の充実、官僚主導の脱却など、さまざまな問題解決の必要から避けては通れない、緊急の課題だと結論づけることができる。

平成 21 年度から 2 年間にわたる本部学術研究助成金を活用しての本研究は、これまで政治的マターとして扱われがちであった、日本経済の停滞の背景に、憲法の制度枠組みが深く関係している一端を明らかにすることができた。今後は、2 年間の研究による蓄積を基礎に、さらに憲法の制度枠組みが経済発展を阻害していると考えられる事例の研究を重ね、また、憲法改正を行わない場合の経済発展に対するリスク増加がいかなるものであるかを、さらに具体的かつ定量的に分析し、より具体的な形で、経済の分野から憲法改正を提言していくべく、メンバー全員で研究を重ね、まとまった研究成果を明らかにすると同時に、具体的に憲法改正を提言する書籍をまとめていく努力を継続していく予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成23年4月9日

日本大学 総長 殿

氏 名 稲葉陽二



所属・資格 法学部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	ソーシャル・キャピタルを考慮した高齢者に優しいまちづくりの研究	
3 研究目的	本研究はソーシャル・キャピタルを考慮した高齢者に優しいまちづくりについて、特に高齢者の健康に焦点を当てて研究する。具体的には、人々の中の絆であるソーシャル・キャピタルが健全であれば、主観的健康が良好であり、かつ抑うつ度が低い、という仮説を全国の20歳～79歳を母集団とする調査から検証する。	
4 研究概要	全国の20歳～79歳の男女4,000人を無作為に抽出し調査票を郵送、有効回答1,599票を得て、そのデータを解析した。また、この調査結果を、同様の質問で調査している2003年内閣府調査と比較し、この間のソーシャル・キャピタルの変化を検討した。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 稲葉陽二 研究総括・郵送調査実施 ・研究分担者 (役割分担) 菅野 剛 コミュニティのネットワークの研究・郵送調査実施・分析 中川 雅之 経済的合理性の検証 三橋 博巳 コンパクトシティの研究 矢野 聡 高齢者への対応・福祉政策 	

※ホームページ等での公開の(☑)・否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：法学部

氏名：稲葉 陽二

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1) 郵送法調査の概要

1-1 調査目的と設問

〔目的〕

外部性を伴う信頼・規範・ネットワークである社会関係資本を、一般的信頼、社会交流・社会参加の観点から明らかにする。併せて、社会関係資本と健康（主観的健康、抑うつ度）・所得格差（市町村別ジニ係数）との関連を検証する。社会関係資本には一般的信頼など認知的なもの、社会交流・社会参加の側面からみたネットワークなどの構造的なものに分かれるが、本調査はその双方を調査対象としている。

〔調査内容・設問〕

1. 他人への信頼、2. 日常的なつきあい、3. 地域での活動状況、4. 生活の満足度、心配ごと、組織への信頼、5. 主観的健康と生活での積極性、6. 寄付・募金活動 7. 腐敗行為に対する許容度、8. 回答者の属性

1-2 調査・実施主体 日本大学法学部 稲葉陽二研究室
アンケートの実施は社団法人新情報センターに委託

1-3 調査関連期間

調査票の検討 2010年4月～8月

調査実施期間 2010年9月6日～10月5日

1-4 調査方法 層化2段階無作為抽出郵送法（配付・回収とも）

1-5 母集団と調査対象者、対象者のサンプリング方法

〔母集団〕 全国の20才～79才の居住者

〔対象者〕 全国50地点における居住者4,000名

〔サンプリング方法〕 住民基本台帳からの無作為抽出法

1-6 調査配票数・回収数・回収率

〔配票数〕 4,000票

〔回収数〕 1,603票（うち有効1,599票、無効4票）

〔有効回収数〕 40.0%（1,599票／4,000票）

1-7 調査実施メンバー

研究代表者 稲葉陽二、研究分担者 菅野剛、研究協力者 緒方淳子
調査実施と回答の入力は社団法人新情報センターに委託

2) 調査結果の集計値の概要

本調査によると、認知的な社会関係資本の指標である「一般的信頼」では「ほとんどの人は信頼できる」（9段階評価の上位3段階合計）が27.9%であるが、もう少し対象を絞った「旅先での信頼」（9段階評価の上位3段階合計）はそれより低く21.3%となっている。

このほか認知的な信頼でも、対象をより具体的にした特定化信頼では、家族への信頼が89.1%と際立って高いが、友人・知人への信頼（「頼りになる」）も69.7%と極めて高い。同様に親戚への信頼も66.7%と高い。職場の同僚への信頼は友人・知人への信頼の約半分の36.5%とさほど高くはない。

また、隣近所とのつきあいについては「生活面で協力」と「日常的に立ち話」の合計の比率が60.4%、「つきあっている人数が概ね20人以上」がやはり59.5%に達しており、近所づきあいの程度も高く人数も多いが、近所の住民について「ほとんど信頼できる」と答えた比率は40.5%とつきあいの程度や人数の割には高くない。

また、構造的な社会関係資本であるネットワークの代理変数としての社会参加・社会交流について、地縁活動への参加率46.1%、スポーツ・趣味・娯楽活動への参加率46.7%、ボランティア・NPO・市民活動への参加率25.3%となっているほか、上でふれたとおり近所づきあいについては「生活面で協力」と「日常的に立ち話」の合計の比率が60.4%、「つきあっている人数が概ね20人以上」がやはり59.5

部科校名：法学部

氏名：稲葉陽二

研究結果（つづき）

%に達している。また、友人・知人とのつきあいも「日常的にある（毎日～週に数回程度）」と「ある程度頻繁にある（週に1回～月に数回程度）」の合計が49.2%と約半数の人が週に1回以上友人・知人とのつきあいを持っている。

また、職場以外での職場の同僚とのつきあいも、「日常的にある（毎日～週に数回程度）」と「ある程度頻繁にある（週に1回～月に数回程度）」が22.1%であり、約5人に1人が週1回以上職場外で職場の同僚とのつきあいがある。同様に親戚・親類と週1回以上のつきあいがある者は38%であった。

このほか本調査では社会関係資本の関連項目として利他性（寄付・募金活動）、不正行為への許容度、また社会関係資本が影響を及ぼすと考えられる生活満足度、17項目にわたる日常生活での問題や心配事、主観的健康（4段階評価）と生活での積極性（抑うつ度 Geriatric Depression Scale15項目短縮版）についても尋ねている。

たとえば、寄付・募金については回答者の76.0%が何等かの寄付を行っており、「寄付・募金はしていない」と回答したものは19.1%にすぎない。このほか、不正行為の許容度については「脱税」と「公共交通機関の料金をごまかす」ことや「収賄」については、それぞれ回答者の94.6%、93.7%、92.4%が認められない（10段階評価の認められない上位3段階合計）と大変厳しい態度であるのに対し、「資格がないのに国の年金や医療給付などを要求する」については認められない（10段階評価の認められない上位3段階合計）は85.9%と他の3項目と比べて若干寛容である。

生活満足については「非常に満足」と「満足している」の合計は52.6%と過半数が満足している。心配事の中では、生活上の孤立を「かなり心配」「少し心配」と答えた者は24.4%、つまり4人に1人の比率となっている。

主観的健康は回答者の将来の健康状態の予測力が高いことが知られているが、本調査では「とても健康」8.7%、「まあ健康」67.1%と合計75.8%が健康と答えている。生活での積極性（抑うつ度）については15項目のうち6個以上の否定的回答をした者の比率は33.1%で、ちょうど3人に1人の割合になっており、否定的回答数が10を超えた者の比率も10.3%と10人に1人に達している。

3) 個票データで得られた知見

2010年調査の個票ベースで今回のデータを分析すると、都道府県単位の集計値による分析とは異なり、一般的信頼（「あなたは、一般的に人は信頼できると思いますか。それとも信頼出来ないと思いますか。」）は調査対象項目の多くの項目と統計的に有意に相関が見られる。この相関は、性別、年齢、学齢、世帯年収などをコントロールしても見られる。

ただし、相関係数の水準は「旅先・見知らぬ土地の人への信頼」の0.65以外は、0.15から0.3の範囲にある穏やかなものである。また、「寄付・募金活動合計」と「不正行為への許容度合計」の相関係数はそれぞれ0.111と0.072に過ぎない。

因果関係は不明だが、一般的信頼が高い人は近所とのつきあいも篤く、つきあっている人の数も多い。また、知人・友人、親戚、職場の同僚とのつき合いの頻度も高い。一般的信頼の高い人は、地縁活動、ボランティア・NPO活動を問わず地域社会活動への参加頻度が高い。これらの社会交流・つきあいと社会参加を構造的な社会関係資本としてのネットワークの代理変数とすれば、認知的社会関係資本（一般的信頼）とは個票ベースで相関している。構造的な社会関係資本が高い人は認知的社会関係資本も高い。

一般的信頼の高い人は自身の生活の満足度が高く、「家族（高齢者）の世話や介護」を除けば心配事が少ない。このほか、本調査では社会関係資本に関連する事象として主観的健康（4段階評価）と生活での積極性（抑うつ度 Geriatric Depression Scale15項目短縮版）を尋ねているが、一般的信頼の高い人は主観的健康が良好で、抑うつ度も低い。

課題番号	総 10-007
------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成23年4月4日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 寺西 重郎



所属・資格 商学部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種 目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	経済発展と中間組織；アジアにおける中間組織形成の理論的実証的研究	
3 研究目的	中間組織の形成過程を明らかにし、多元主義 (pluralism) への自然的傾向を仮定する議論の可能性ないし限界を明らかにすることにある。そうすることにより、政策論として、それぞれの経済社会に、いかにして公正で効率的な中間組織のシステム形成を促進するかを提案することができる。当面ここ2年間の研究では、中間組織の形成について日本を含むアジアの経済発展の経験の主たる対象にして、理論的実証的な基礎的作業を行うことにより、中間組織の形成理論開発の為の手がかりをつかむことを目的とする。	
4 研究概要	本研究の最終目的は、中間組織の形成過程に関する新しい理論仮説を提示することであり、当面2年間の研究は、アジアの個別国に関する実証分析、アジア諸国に関する国際比較と中間組織形成に関する理論モデル構築の三つの側面からなる。個別国の実証研究では中国、韓国、タイ、フィリッピン、日本を取り上げ、クロスカントリー研究では貿易政策、地方分権及び国際的個別国データベースを用いる計量分析から構成される。理論研究では、国家の理論、官僚組織、シカゴ学派の利益集団モデルを検討する。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 寺西重郎 商学部・教授 (研究全体の統括、個別国の実証研究 (日本)) ・研究分担者 (役割分担) 松原聖 商学部・准教授 (個別国の実証研究 (韓国)) 飯野文 商学部・専任講師 (クロス・カントリー研究 (貿易政策)) 井上葉子 商学部・専任講師 (個別国の実証研究 (中国)) 浅田義久 経済学部・教授 (クロス・カントリー研究 (地方分権)) 曾根康雄 経済学部・准教授 (個別国の実証研究 (中国)) 安藤至大 総合科学研究科・准教授 (中間組織の理論研究) 浅見靖仁 一橋大学大学院社会学研究科・教授 (個別国の実証研究 (タイ・フィリッピン)) 外谷英樹 名古屋市立大学大学院経済学研究科・准教授 (中間組織の展開に関するクロス・カントリー計量分析) 村瀬英彰 名古屋市立大学大学院経済学研究科・教授 (中間組織の理論研究) 	

※ホームページ等での公開の(可)否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：商学部

氏名：寺西重郎

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本年3月までの研究期間中に次のような研究会を開催した（報告者 報告タイトル）。

- 村瀬英彰・外谷英樹 Threat of Foreign Invasion and Economic Growth
- 安藤至大 Formation, Integration, and Fragmentation of Labor Unions in Japanese Firms
- 飯野文 GATT・WTO体制と経済危機下の保護主義的な不況対策との関係
- 寺西重郎 市場秩序のタイプと中間組織；日本とアメリカの経験
- 浅見靖仁 東南アジア研究からみた中間組織論：軟性国家論、パトロシ=クライアント 関係論、二重社会論、開発主義国家論、ポスト開発主義国家論、ソーシャル・キャピタル論との対比
- 三重野文晴（神戸大学）・和山のぞみ（一橋大学）タイ、マレーシアの企業分布と資金調達：『工業化過程における企業のネットワークと資金チャンネル』の研究にむけて
- 松原聖 グローバル化と国内労働市場：労働組合の役割
- 井上葉子「中国の中間組織：居民委員会を中心に」

こうした研究会を中心とした研究の結果、今後の研究進め方に関して次のような知見に達した。

国家ないし政府と民間ないし市場の間に存在する中間組織の役割に関しては、政治学ではイギリス絶対王政下の中間組織を分析したJ.ロック、19世紀アメリカの結社などの中間組織を研究したA.トクヴィルなどをはじめとして、民主主義の機能との関連で、多くの研究があるが、経済学では、公式・非公式のグループの形成とその機能という形で、ゲーム論の発展との関連において、ごく最近研究が開始されたにすぎない。しかし、中間組織は市場機能を補完する上で、公共財供給等における政府の役割や人々の倫理性などと並んで重要な役割を持つと考えることも可能である。この研究は、日本を含むアジアとアフリカを対象に中間組織の形成過程と機能の経済的メカニズムを理論的・実証的に分析することを目的とする。中間組織とは、さしあたって国家と民間セクターの間にあり、直接的には利潤や消費効用の極大化を目的とはしないグループとして定義される。利潤を極大化する個人や個人のグループは企業であり、効用を極大にする個人や個人のグループは家計である。（持株会社や財閥は企業であり、系列など関係に基づくグループは中間組織以外のグループに分類される。）中間組織には、政治団体、労働組合、経営者団体、消費者団体、各種職能団体、業界団体、さまざまなNGOなどの常設の組織と、民族団体や地域団体など必要に応じて一時的に個人が集合してグループ行動をとる coalition とがある。なおこの定義については研究グループのメンバー間でも異論があり今後さらに詰める必要がある。

この研究の最終的目的は、公式・非公式の中間組織が歴史的に形成される過程を分析することにより、中間組織が市場の機能を補完し、経済効率と経済社会の安定性に影響することを通じる機能を明らかにし、制度分析と長期的経済発展の理解に資することである。この点についての代表的な研究としては、西洋中世後期の商人の coalition やギルドの形成過程と契約のエンフォースメント機能の関係を分析したA. Greif (2006) のパイオニア的貢献がある。またこれにかかわって、M. Kandori (1992), M. Okuno-Fujiwara and A. Postlewaite (1990), A. Dixit (2004)、岡崎哲二の株仲間、中村真幸の製糸業に関する研究など多数の業績があるが、われわれの研究は今後次の2点でこれら一連の研究の拡張をせねばならない。第一に、経済取引における非対称情報・契約の不完備性などだけでなく、市場の失敗をより広く考え、そこにおける中間組織の形成・機能を検討することである。市場の失敗に関しては、多くの研究で、さまざまな外部効果などの効率に関連した失敗にのみ注目してきたが、我々はそうした問題に加えて、市場のもっとも不得意な問題である分配の問題を取り上げる。もちろん（ハイエクなどの強調するように）公正・公平な所得分配を定義しそれに政策的に対応することは容易でないし、我々はその問題に踏み込む能力も準備もない。しかし中間組織の多くは、M. オルソンの研究等で指摘されているように、いわゆる利益集団として、歴史的に人々の所得分配に関する不満・それに基づく対立などに関連して生成・変化してきた。そして、それぞれの中間組織が所得分配に関する対立にどのようにかかわって来たかは、経済社会の安定性を通じて経済発展に大きな影響を持って来たはずである。言い換えると、人々が何らかの形で、中間組織を通じて市場と政府（税制）のもとで定まる所得分配に関して働きかけるメカニズムが機能することが（必ずしも公正公平な分配を実現するというのではなく）、経済社会の安定、したがって最終的には経済成長に大きくかかわっている可能性がある。こうした理由からこの研究では、中間組織の不完備契約に関する効率効果と所得分配に関する経済

部科校名：商学部

氏名：寺西重郎

研究結果（つづき）

社会安定効果をとともに取り扱い、それぞれの国で支配的な中間組織のセットが契約などの効率上の理由から形成されるのか、それとも利益集団として所得分配上の理由から形成されるのかを、考察したい。ちなみに、D.ノースはそのノーベル・レクチャーや2005年の著書などで、長期的な経済発展のためには、経済制度の資源の配分効率への効果でなく、ショックへの適応効率への効果ないし経済社会の安定性が重要であると述べているが、我々の関心はこの線に沿ったものである。また、D.ノースは所有権の配分が、A.グライフはインフォーマルな契約エンフォースメントが、西欧の勃興にかかわっている（可能性がある）と主張するが、中間組織の所得分配調整機能はアジアの成長を理解する一つの鍵となる可能性がある。

第二に、中間組織を民族団体や地域団体などという coalition を含むものとして広く定義し、グライフの言うところの文化的文脈を踏まえて中間組織の展開過程を検討することが必要である。Greif（2004）は、グループ生成の文化的文脈の重要性を強調したが、彼の分析では、文化的論脈は必ずしも十分にはなされていない。例えば、民族・地域などの問題は社会の“区分”の問題としてのみ取り上げられており、グループとしての位置づけは与えられていないし、それぞれの経済社会が集団主義か個人主義かを最初から仮定しており、そもそもなぜ集団主義がある経済で強いかなどの問題は考察の外におかれている。我々の研究では、必ずしも十分なものではないが、我々にとって身近なアジアを中心に、アフリカを比較対象としつつ、経済発展の初期段階における社会の質ないし世代間に受け継がれてきた規範や価値としての文化的特性が、初期における中間組織形成がとる形態（人種的・宗教的・言語的・地域的 coalition）に与える影響を考察・分析することで、文脈的背景に多少でも迫るための手掛かりをつかむことを考えている。たとえば日本では、明治期には政府と民間部門の間のインターフェイスは中間組織としての地域共同体が担っていたが、経済発展が進行した高度成長期には中間組織としての業界団体と官庁の原局のシステムによる産業間対立が支配的となった（研究代表者研究業績2005）。またアフリカでは言語・宗教・地域などによってアイデンティファイされる人種ごとの coalition を中心とする対立・連携のメカニズムが（植民地化以後は少なくとも）支配的であり、それが今後どのように変容するのか、先進国的な階級対立はありうるのか、などが重要な研究課題となっている。中間組織に関する多くの研究で、自由な市場経済活動が進展し、経済が発展すれば、多様な中間組織が自然に形成され、多元主義に向かっている動きが生じるとするア・プリオリな近代化論的な前提がなされることがある（後述の D. トルーマン、K. ガルブレイス、R. ダールなど）。しかし取引費用などを考えると、多元主義への傾向は自明なことではなく、それぞれの経済はそれぞれの文化的文脈の背景のもと、その時々々の発展状況において、特定の中間組織による市場と国家の機能の補完がなされていると見ることがバランスのとれた考え方であると思われる。おそらく、発展の初期における民族・宗教や地域による coalition は、その経済の基本的な文化的特質などを強く反映したものであり、近代化・工業化などの過程を経て労働組合・業界団体などの新たな中間組織が形成されていくものと思われる。

今後のこの問題の考え方としては、中間組織が歴史的に利益集団として、生成・発展してきたという基本的事実を重視し、そのうえで中間組織がどのように効率や分配上の機能を発揮してきたかを考えることが必要である。歴史上の制度は、人々の文化的・社会的・政治的対立の結果、利害関係の錯綜する中で生成し、その後意図しない形で経済的な役割を果たすにいたるということが数多くみられる。中間組織はその典型である可能性がある。例えば、トクヴィルの注目したアメリカの結社は宗教上の対立を前提に国家からの「共同の自由」を確保するために生成したし、日本の明治期の地域共同体を軸とする中間組織は、自然村の生活条件の維持と新政府の税収の確保という二つの目的の錯綜の内に生成した。戦後日本の銀行中心の金融システムも、安全な金融システムを作るという目的から生成し、のちに信用割当・産業政策のツールとして用いられた。市場の失敗として、効率問題だけでなく、所得分配をも斟酌し、民族・地域 coalition という伝統的な中間組織から出発するという我々のリサーチ戦略は、こうした点を考慮して、制度変化を新しい視点からとらえることを意図している。例えば、分配上の理由から形成された中間組織が、形成後に重要な効率上の機能を果たすということは、十分生じうることであり、最初から効率だけを念頭に置いた制度論ではこうした場合思わぬ間違った結論が生じる可能性がある。

この研究においては、また、近年における世界的な個人主義の高まり、人々の中の紐帯の希薄化という問題にかかわる問題を意識することが求められる。Z. Bauman(2000) の言うポスト・モダンにおける液状化現

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：商学部

氏名：寺西重郎

研究結果（つづき）

象である。この点についてはすでにZ.バウマンをはじめ、社会学・政治学などで多くの研究がなされているが、方法論的個人主義の立場をとる傾向を強めてきた経済学もこの問題とは無縁ではないであろう。もちろん経済学のツールでこの問題に接近することは容易でないが、我々は、中間組織の形成という点に焦点を当てて、広義の市場の失敗に関連付けて、個人がいかなる場合にいかなる動機に基づき他者との絆を求めグループを形成するか、いかなる場合に特定の関係やグループがドミナントになるかという問題を、考えることによりこの問題に接近したい。アメリカについては、19世紀におけるトクヴィルの指摘以来、結社や地方団体の研究が進んでおり、多元主義にかんしてK. Galbraith (1952)、R. Dahl (1980) や D. Truman (1951) などの研究が叢生した。それらを踏まえて最近の個人主義化に関してR. Bellah (1985) のグループの実証研究、それを踏まえた W. Hudson (1995)、M. Sandel (1996) などが出ている。このうち、K. ガルブレイスの分析は、経済の大企業化・寡占化の進展に伴う市場の失敗に対する対抗力として中間組織を位置付けたものであり、W. ハドソンの研究は、ビジネスが特権的地位を持ち、アメリカ社会の特質である多元性を破壊した点に個人化進展の原因を求めており、経済学と密接なかかわりを持つ。しかし、日本やアジア・アフリカに関して、経済学がかかわる研究は、東京大学社会科学研究所の「希望学」プロジェクトの参加者による研究などを除いてわずかしかない。我々の研究を今後とも進めることの意義はこの点にもある。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23年 4月 15日

日本大学 総長 殿

氏 名 中川 活二



所属・資格 電子情報工学科・教授

退職,転出の場合は, () 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	次世代超高密度磁気光複合記録システムと材料に関する研究 Ultra high density hybrid recording system and materials	
3 研究目的	情報量の急速な増加に対応可能な超大容量情報記録システムの構築が緊急課題であり、その基盤をなす磁気および磁気・光複合超高密度記録に関する総合的研究を行う。現状の磁気記録方式を打破する磁気および磁気・光複合記録方式実現のための、(1)記録媒体、(2)光ヘッド、(3)磁化制御についての基盤技術を、実験と詳細なシミュレーションの両面から明らかにし、超高密度記録技術基盤の実現を目的とする。	
4 研究概要	記録媒体に関して、自己配列型基板の作製および高い磁気異方性を有する媒体の結晶粒成長過程を明らかにし、自己配列基板上への結晶粒成長による高密度化を検討した。光ヘッドに関して、レーザー光を回折限界以上に収束させる表面プラズモン技術を活用した磁気・光複合記録方式を実証した。磁化制御に関して、記録速度の限界を打ち破るため、極短時間パルス加熱による高速歳差スイッチングを実証した。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 中川活二 ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 伊藤 彰義; ハイブリッド記録用ナノ構造と材料, シミュレーション 塚本 新; 光による磁化反転の高速直接制御 芦澤 好人; 磁気・光ハイブリッド記録プラズモンアンテナの試作とシミュレーション 遠藤 拓; 超高密度磁気記録のシミュレーション 移川 欣男; 超高密度磁気記録用材料 新妻 清純; 超高密度磁気記録用材料 	

※ホームページ等での公開の (可) 否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名： 理 工 学 部

氏名： 中 川 活 二

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

情報社会の発展に伴う情報量の急速な増加が大きな問題であり、これに対応する超大容量情報記録システムの構築が緊急課題であるため、その基盤となる磁気および磁気・光複合超高密度記録に関する総合的研究を行った。記録密度の向上に加えて、記録速度の限界を打ち破るため、フェムト秒レーザによる超高速磁化制御も実施した。具体的材料へ応用し、実際の磁気、磁気・光複合記録における超高速磁化制御法へと発展させるため超長時間分解能磁化反転過程の計測により動特性の詳細の検討を行った。先のプラズモンアンテナと組み合わせることにより「全光磁気記録: All Optical Magnetic Recording」という革新的新手法の基盤とする。磁気および磁気・光複合記録技術基盤の実現を目標として、(1)記録媒体、(2)光ヘッド、(3)磁化制御について実験と詳細なシミュレーションの両面から研究を行った。

以下に、(1)記録媒体に関する、ナノ構造下地の作製手法および FePt 微粒子の結晶粒形成過程解析、(2)光ヘッドに関する、ナノサイズプラズモンアンテナを用いた熱アシスト磁気記録検証 (3)磁化制御に関する角運動量補償点近傍における極短時間パルス光照射のみによる高速歳差スイッチング実験の詳細を報告する。

(1) 記録媒体

(a) ビットパターン媒体(BPM: Bit Patterned Media) 孤立微粒子用テンプレート下地の作製

FePt 微結晶粒の更なる高密度化を目指し、トリブロックコポリマーの自己組織化現象を利用し作製したナノ空孔が周期的に配列した Nano Dent Array (NDA) の改良に重点をおいた。FePt 微結晶粒子数密度の増大には、NDA の①ナノ空孔径微小化、②薄膜化、③規則配列化の3つの課題がある。①に対し、ナノ空孔径を決定づけるトリブロックコポリマーの重合数を減少することで、ナノ空孔径を 8 nm から 5 nm まで約 47 %微小化させた。②さらに、ミセル溶液をエタノール希釈することで、薄膜化に成功し、その膜厚はほぼ希釈量に反比例することが明らかとなった。③膜厚 17 nm の NDA において、規則配列性を維持していることを確認した。

(b) 高い磁気異方性を持つ FePt 微小薄膜の熱処理時の結晶成長過程

超高密度の記録媒体材料として注目している 7×10^7 erg/cc の大きな結晶磁気異方性を有する $L1_0$ -FePt において、規則化、孤立微結晶粒化、および c 軸配向した FePt 結晶を得るために有望な作製手法である急速昇温熱処理(Rapid Thermal Annealing : RTA)において、その設計指針を立てるため RTA プロセス条件と、FeCuPt 微結晶粒形成過程の相関を詳細に解析した。

(2) 光ヘッド

アンテナの形状や媒体の構造に対応した近接場光記録を評価するため、記録媒体上にプラズモンアンテナを直接積層した実験法を検討した。本実験手法では、記録媒体の磁区から発生する漏れ磁界を検出する磁気力顕微鏡 (MFM) を用いて、作製したプラズモンアンテナの上方から観察を行うことで、記録したプラズモンアンテナ形状とその磁区構造の評価を同時に行うことが可能である。さらに、本手法を用いると、数 nm のプラズモンアンテナの浮上制御を不要とするために、媒体の損傷やプラズモンアンテナの剥離も防止される。記録媒体上に厚さ 3 nm の誘電体層 (Si_3N_4) 層を積層し、その上にプラズモンアンテナを作製した(図 1)。

また、アンテナと媒体との間が空気ではなく誘電体層であることの近接場光への影響を調べるため、電磁界解析および熱伝導解析を行った。電磁界解析には Finite-Difference Time-Domain (FDTD)

研究結果 (つづき)

法及び熱伝導解析には ADI 法を用いた。電磁界解析の結果から、 Si_3N_4 層の挿入により共鳴条件がシフトし、空気層の場合に 200 nm が最適であったプラズモンアンテナの長手方向長さが、本アンテナ積層構造においては 300 nm が最適であった。さらに熱伝導解析の結果から、 Si_3N_4 上に積層した場合においても空気層の場合とほぼ同様の熱分布が得られた。

実際に、磁区がすでに記録されている磁気ディスク上にアンテナを積層して検証実験を行い、記録された媒体の磁化の向きに対応するストライプ状の黒白の記録磁区と、楕円形状のプラズモンアンテナを観測した。プラズモンアンテナ構造部分にも、ストライプ状の黒白のコントラストが確認でき、プラズモンアンテナ下の記録マークを観察できることを示した (図 2)。

本構造では、同一試料上に大量のアンテナを形成することで、一度の記録プロセスで複数の近接場記録の検討を行うことが可能である。そこで、数 100 nm 級の構造を同時に大量に作製することが可能な電子線リソグラフィを用いたリフトオフ法を用いたリフトオフ法を用いてプラズモンアンテナの作製を検討し、アンテナ長手方向長さ 320 nm、アンテナ先端曲率半径 28 nm のアンテナの作製に成功した (図 3)。

本アンテナ構造実証実験用として、現行の CoPtCr 基垂直記録媒体の改善により熱アシスト磁気記録用媒体を作製し、その上にプラズモンアンテナを作製した。熱アシスト磁気記録用媒体には、室温において磁気ヒステリシスの角型比 (M_r/M_s) が 1 がかつ反転核生成磁界 H_k が大きいこと、及び 200°C 程度の高温において飽和磁界 H_s が小さいことが求められるため、種々の組成の CoPtCr 合金単相薄膜の磁気特性を参考にし、膜厚比を変えた異なる組成の層を多層に積層することより、上記の条件を満たす疑似組成の CoPtCr 記録層の作製を検討した。作製した種々の CoPtCr 薄膜の飽和磁界の温度依存性を磁気光学 Kerr 効果測定により算出し、記録実験上の最大印加磁界が 2.5 kOe と照らし合わせることで、記録実験に用いる薄膜組成 $\text{Co}_{55}\text{Pt}_{30}\text{Cr}_{15}$ を決定した。

熱アシスト磁気記録検討に先立ち、記録条件評価として、本 $\text{Co}_{55}\text{Pt}_{30}\text{Cr}_{15}$ 薄膜を用いて熱磁気記録実験を検討した。700 Oe の外部印加磁界中において、スポット径が約 1 μm で、照射パルス時間 10 μs のレーザー光による加熱を行い、レーザーパワー 10 mW 以上において直径 2~4 μm の磁化反転領域を観察し、熱磁気記録におけるレーザーパワーのしきい値を算出した (図 4)。



図 1 アンテナ積層構造の薄膜構成

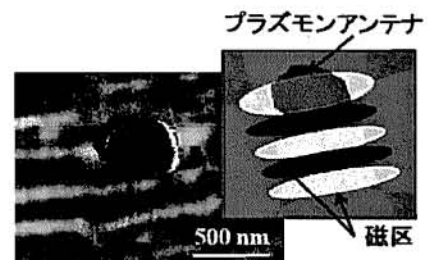


図 2 磁気ディスク上に作製したアンテナ直下の磁区観察像

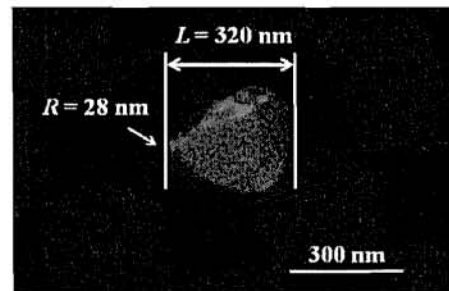
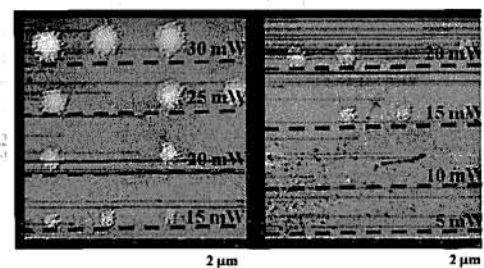


図 3 CoPtCr 薄膜上に作製したプラズモンアンテナ SEM 像

図 4 $\text{Co}_{55}\text{Pt}_{30}\text{Cr}_{15}$ 薄膜への熱磁気記録後の磁区観察像

研究結果 (つづき)

熱磁気記録による条件を参考にして、 $\text{Co}_{55}\text{Pt}_{30}\text{Cr}_{15}$ 薄膜媒体上に複数のプラズモンアンテナを作製し、熱アシスト磁気記録の検討を行った。印加磁界は同様に 700 Oe とし、パルス幅 10 μs の条件で、記録パワー 7.5 mW、9.4 mW のレーザを媒体上に隙間無くスキャンして媒体全面に記録を行った。この記録方法では、アンテナの無い部分にも光が照射されるが、記録閾値以下のため記録が行われない。記録パワー 9.4 mW の記録実験後の MFM 観察において、アンテナ周辺部に記録磁区に相当する白いコントラストが確認された。これは、アンテナで発生した表面プラズモンによる光エネルギー増強効果により、本構造を用いた熱アシスト磁気記録が観察できたと考えられる。記録パワー 7.5 mW では記録に対応する磁区が観察できなかったが、プラズモン共鳴の発生によっても照射パワーが小さく、磁化反転に至らなかったと考えられる (図 5)。

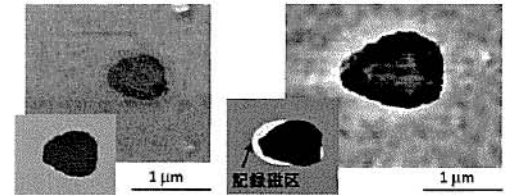


図 5 アンテナ積層構造における近接場記録 記録パワー 7.5 mW (左), 記録パワー 9.4 mW (右)

(3) 磁化制御

まず磁気記録、すなわち、磁化方向の反転過程の詳細につき検討するため、 $\text{Gd}_x(\text{Fe}_{87.5}\text{Co}_{12.5})_{100-x}$ フェリ磁性合金における磁化動特性を Landau-Lifshitz-Gilbert (LLG) 方程式のシミュレーションにより計算した。各元素の g 係数は Gd: 2.00、Fe: 0.89、Co: 2.22 を用い、ここで正味の磁化値の組成依存性は分子場近似法により求めた。角運動量補償組成 C_A は Gd 組成 $x = 23$ at. % であり、その近傍において γ_{eff} 及び α_{eff} が著しく増大した。また、磁化補償組成 C_M は $x = 24.5$ at. % である。この値は実測値と 1 at. % 以内の誤差で一致した。また、 C_A 近傍の磁化反転過程のシミュレーションを行った。条件として、外部磁界 H_{ext} は、膜面法線から 70° の方向に 4200 Oe 印加し、 $t = 0$ s において印加方向を反転した。垂直磁気異方性定数 K_U は 10^4 J/m³ とした。結果は、組成が C_A に近づくにつれ、歳差運動に起因する磁化 M の z 軸成分 M_z の減衰振動の時定数を大幅に短縮できることを示唆した。

続いて、中心波長 800 nm、パルス幅 90 fs (半値全幅)、繰り返し周波数 1 kHz のレーザを光源として用いたポンプ・プローブ法にて、外部磁界 H_{ext} を基板法線より 77° 傾け 4200 Oe 印加し、磁化歳差運動の測定を行った。測定試料はマグネトロンスパッタ法により作製した Si_3N_4 (60nm)/ $\text{Gd}_x(\text{Fe}_{87.5}\text{Co}_{12.5})_{100-x}$ (20nm)/ Si_3N_4 (5nm)/AlTi (10 nm)/glass sub. を用いた。測定した磁化歳差運動から求めた α_{eff} および歳差運動周波数 f の各種 Gd 組成 x 依存性の結果は、シミュレーション結果と同様の増大傾向を示し、 $x = 23.6$ at. % 付近に C_A が存在することを示した。

上記の検討結果を用い、実際に光誘起磁化反転実験を行った。 $H_{\text{ext}} = 4200$ Oe を基板法線から 70° 傾け印加し、プローブ光の中心波長は 420 nm の条件下で $x = 24.5$ at. % における歳差スイッチング過程の励起・測定を行った結果、試料の磁化補償温度 T_M を超える極短時間加熱により、正味の磁化が逆向きとなることで実効的に超短時間で印加磁場方向が反転し、歳差スイッチングが励起された。ポンプ光のエネルギー密度を 3.3 mJ/cm² としたときの測定結果より、磁化値が +M から -M 方向へと急峻に変化した後、振動を伴いながら遷移していることが明らかとなった。励起直後に生じる最初の歳差運動の周波数は 30 GHz 相当であり、 T_A 近傍の条件であった。

以上より、DC 磁場印加の下、超短パルスレーザ照射のみにより T_M を超え T_A 近傍まで急速に加熱することで、高速歳差スイッチングの励起が可能であることを実証した。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成23年4月8日

日本大学 総長 殿

氏 名 新宮清志



所属・資格 理工学部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <u>総合研究</u>	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	シェル・空間構造の振動減衰定数ならびに減衰特性の究明	
3 研究目的	<p>シェル・空間構造は絶対数が少なく、また重層構造物に比べてその構造や応答の把握が困難であることから、減衰定数に関してデータの蓄積・分析が未だ十分でない。収容人数が多く、災害時等に避難所として利用されるシェル・空間構造の動的挙動や精度の高い減衰評価を可能とすることは社会的急務といえる。そこで、本構造物の減衰定数を明らかにし、減衰特性を究明することが目的である。</p> <p style="text-align: right;">[研究計画書に基づく]</p>	
4 研究概要	<p>本研究では、数棟のシェル・空間構造の減衰定数を明らかにし、減衰データベース作成をめざし、既存のシェル・空間構造を対象に、常時微動観測・人力加振実験・衝撃加振実験・錘（砂袋）落下実験を実施する。また、併せて文献調査を行い、立道郁生作成のデータベース（データベース1と呼称する）に対して、新たに実施される実験結果と、本対象構造物を含む実験結果を新規に追加した減衰データベース2の作成を行う。これらの結果から、シェル・空間構造の減衰特性の究明を行う。</p> <p style="text-align: right;">[研究計画書に基づく]</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 <ul style="list-style-type: none"> 新宮清志（研究総括、減衰特性の究明） ・研究分担者（役割分担） <ul style="list-style-type: none"> 川島 孝幸（人力加振実験による減衰評価、減衰データベースの構築） 三井和男（常時微動観測による減衰評価、固有振動解析） 近藤典夫（衝撃加振実験、錘落下実験による減衰評価） 小川 清（既往の減衰データ収集と分析、常時微動観測による減衰評価） 	

※ホームページ等での公開の (可) 否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：理工学部

氏名：新宮清志

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

千葉県総合スポーツセンター内にある武道館を一つの対象構造物（写真1）とする。本構造物は、鉄筋コンクリート製のラーメン構造の躯体に、44m四方の4枚組み合わせHPシェル構造の屋根部が乗っている構造（図1）となっている。

本構造物の固有振動解析結果の一部を図2、表1に示す。

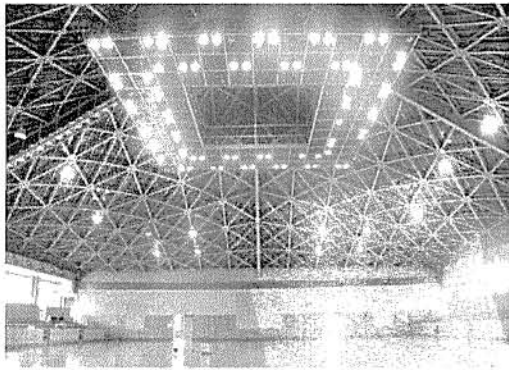


写真1 シェル内部

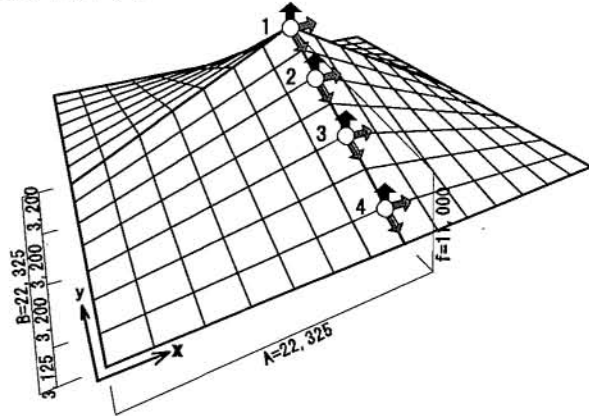


図1 構造寸法と計測点

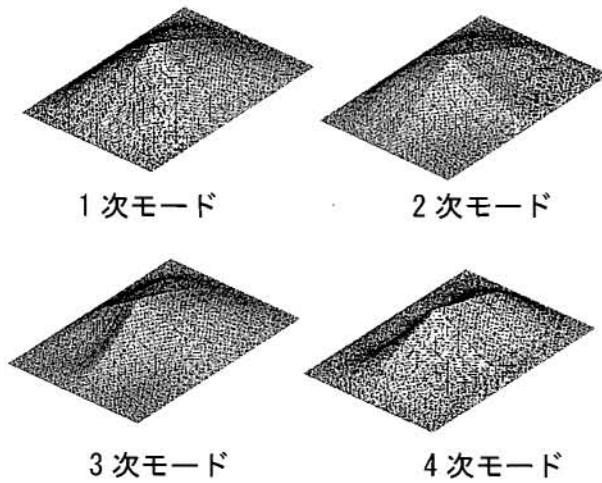


図2 固有振動モード

表1 固有振動数[Hz]

次数	固定支持
1	4.89
2	4.91
3	4.91
4	5.00
5	5.03
6	5.91
7	5.91
8	7.22
9	7.23
10	7.81

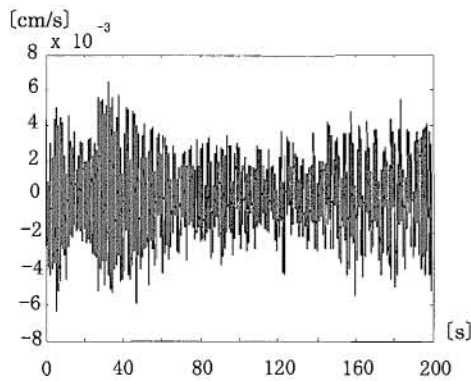


図3 常時速度微動波形の一例
(測定点 2, ch2)

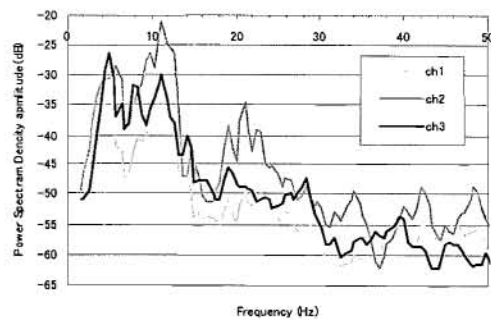


図4 パワースペクトルの一例
(測定点 2)

部科校名：理工学部

氏名：新宮清志

研究結果（つづき）

常時速度微動観測による波形を図3に、そのパワースペクトルを図4に示す。解析の途中の詳細は、省略するが下記のことが得られた。

- 1) 常時微動観測と衝撃加振実験から算出された千葉県武道館（HP シェル）の減衰定数は、それぞれ1.4%、3.1%である。
- 2) 両者の間にはやや大きな差異があるので、今後引き続き、詳細な検討が必要と考えられる。

以上

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成23年4月20日

日本大学 総長 殿

氏 名 増 田 光 一



所属・資格 理工学部 ・ 教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	地球環境問題対策のための超大型浮体技術の研究 —NUフロート実現に向けて—	
3 研究目的	本研究は、海面上昇や土地の沈下によって水没の危機にある南太平洋の島嶼国の人々を救うために、平面的に 1000m を超える規模の超大型浮体を利用して人工島を建造・成立させるための技術を検討することと人々の意識を知ることとを目的とした研究である。	
4 研究概要	多機能大型浮体式構造物建造のために必要な要素技術として、波浪中挙動解析技術の開発、各種海洋再生可能エネルギー利用技術の開発、軽量・高強度コンクリート開発、島嶼国の現状把握と支援策の策定が本研究で実施される研究内容である。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 理工学部 教授 増田光一 ・研究分担者 (役割分担) <p>出村 克宜 工学部・教授：高強度コンクリート開発，メンテナンス技術開発</p> <p>畔柳 昭雄 理工学部・教授：キリバス共和国の実態調査，浮体のコンセプト設計</p> <p>広海 十朗 生物資源科学部・教授：キリバス共和国の水産養殖の実態把握</p> <p>小林 昭男 理工学部・教授：キリバス共和国海岸浸食実態調査</p> <p>梅村 靖弘 理工学部・教授：コンクリート修復技術開発</p> <p>居駒 知樹 理工学部・専任講師：浮体の耐波性能評価技術開発，波力，潮流力利用技術開発</p> <p>齋藤 俊克 工学部・助手：高耐海水性コンクリート開発</p>	

※ホームページ等での公開の (可)・否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科枝名：理工学部

氏名：増田光一

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

(1) キリバス共和国現地調査結果

平成22年8月3日～8月11日の9日間でキリバス共和国の首都があるタラワ島を訪問し、現地各種役所への直接ヒアリングと現地踏査を実施した。調査日程および訪問先を表1に示す。

主な結果は以下の通りである。

- 1) タラワ島は珊瑚で形成された島であり、生活水は雨水の浸透による地下水と各自が貯めた雨水である。淡水の地下水を確保するために淡水レンズが極めて重要であり、これは降雨量に大きく依存するだけでなく、海岸の浸食による海水の地下水への浸入量にも影響される。このことから、海岸保全は極めて重要であるが、その対策は適切に実施されていない。
- 2) 電力はディーゼル発電に頼っているが、今後の電力需要の伸びを考えれば、自然エネルギー利用が重要なカギとなる。
- 3) 水産施設としてエコファームが運用されているが、ODAによる日本人技術者の支援が断たれた後の運用は縮小傾向が強い。
- 4) 適切かつ総合的な技術支援を前提としながらも、教育援助を積極的に行い、技術者を多く育成することが重要であると思われる。

表1 タラワ島視察日程および内容

月日	時間	用務
8/3(火)	13:55	成田 A.P. 発 Seoul Incheon A.P. へ 大韓航空 KE704
	19:25	Seoul A.P. 発 Fiji Nadi A.P. へ 大韓航空 KE137
8/4(水)	08:25	Fiji Nadi A.P. 着 トランジットのため宿泊
8/5(木)	05:00	Fiji Nadi A.P. 発 Kiribati へ Air Pacific FJ231
	08:00	Kiribati Tarawa A.P. 着
	10:00	現地日系人会訪問
	14:00	漁業・利用資源開発省訪問
	15:00	大統領府天災・気象変動対応室訪問
8/6(金)	10:00	公共事業省
	11:30	電力上下水道公社訪問
	13:30	気象サービス訪問
	15:00	国立文化センター訪問
8/7(土)	終日	海岸視察 調査地点 ①空港南の海岸, ②空港端部の海岸, ③ブオクとアバトア間のインレット, ④トウニガル中央病院前面の護岸, ⑤ベキニベウ小学校前面の海岸, ⑥アバラオの砂嘴, ⑦ナニカイ・バイキリ・コースウェイ, ⑧ニッポンコースウェイ, ⑨タポリオ・アンポー・コウズウェイ, ⑩オシントイホテル前
8/8(日)	09:00	前日までの調査内容について討議
	13:00	ビケマン島視察および船上からの海岸視察
8/9(月)	09:00	ベシオ港視察
	13:00	オノ・ケンタロ氏と調査内容の確認と今後の協力について討議
8/10(火)	09:00	漁業海洋資源開発省エコファーム視察
	16:10	Kiribati Tarawa 発 Fiji へ Air Pacific FJ230
	19:10	Fiji 着 宿泊
8/11(水)	09:55	Fiji Nadi A.P. 発 Seoul A.P. へ 大韓航空 KE138
	18:45	Seoul A.P. 発 成田へ 大韓航空 KE705 20:55 成田 A.P. 着

研究結果（つづき）

(2) 浮体の耐波性能評価技術開発

本研究では平面的に任意形状であり、かつ人工的な入江や内水面を有する浮体の解析技術を整備すると共に、それらの波浪中応答特性に与える影響を考察した。その理由は、一般に内水面（ムーンプール）の存在は好ましくない応答の増大を招く場合があるからである。

図1のような任意形状浮体の解析に圧力分布法を適用して波浪中弾性応答特性を調べた。図2～図5に示すように、実機で想定される波周期の範囲では特異な応答が発生することがなかった。よって、適切な平面計画が実施されれば、人工の入江等が配置されたとしても十分に浮体としての機能を果たせるものといえる。

(3) 波パワー・潮流パワーの発電への利用技術

波力については振動水柱型、潮流の利用に対しては垂直軸型可変ピッチ水車の開発を進めた。

図6のような入射波を誘導するためのプロジェクトング・ウォールを設置した振動水柱型波吸収装置を適用し、水槽実験結果から、従来の装置よりも広範囲な周波数域で1次変換性能を向上させることができた。

可変ピッチ水車を開発し、実際に実験用模型を開発した。それを用いた水槽実験を写真1のように実施した。ピッチ固定水車では回転不可能であった低流速域でもトルクを稼ぐことができた。

まとめ

平成22年度の研究成果は個々の要素技術開発とNUフロートコンセプト提案のための現地視察等を実施した。次年度の研究継続によりこれらを統合化した浮体システムの提案まで行う予定である。

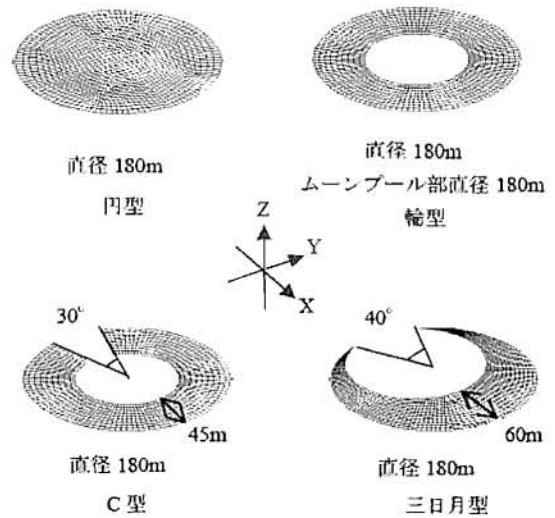


図1 計算対象浮体の平面形状



図2 円型弾性応答図



図3 輪型弾性応答図



図4 C型弾性応答図



図5 三日月型弾性応答図

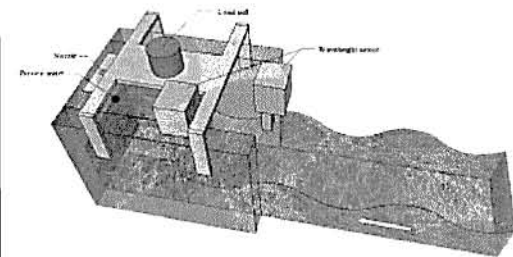


図6 プロジェクトング・ウォール付波吸収装置

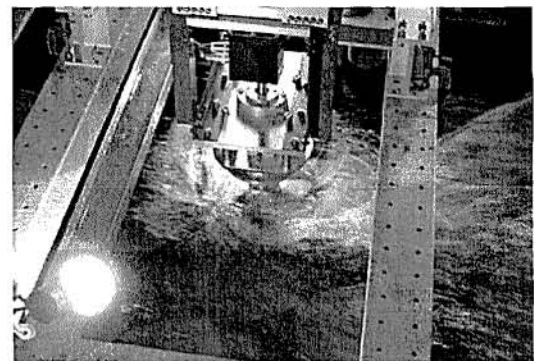


写真1 可変ピッチ水車の水槽実験

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23年 4月 15日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 野呂 知加子



所属・資格 生産工学部・准教授

退職,転出の場合は, () 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="checkbox"/> 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	高次生命機能を指標とした新規有用化合物スクリーニング系の開発	
3 研究目的	本研究は、新規有用化合物の発見と薬剤開発をめざし、細胞分化・細胞接着・形態形成・再生・発生・神経作用など、高次生命機能を指標とした低分子化合物スクリーニング系の開発を具体的な目的とする。	
4 研究概要	<p>本研究は研究期間の2年間で、下記の3種類の化合物スクリーニング系を開発・実用化する。</p> <p>1) ヒト幹細胞およびがん細胞を用いた分化誘導・細胞接着抑制・転移性浸潤効果スクリーニング</p> <p>2) マウスES細胞およびiPS細胞等の万能性細胞を用いた分化誘導・増殖抑制効果スクリーニング</p> <p>3) ヤマトヒメミミズ再生・生殖系を用いた個体再生・形態形成・有性生殖誘導効果スクリーニング系</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 野呂 知加子 生産工学部・准教授 (全体総括、細胞と個体を用いた高次生命機能スクリーニング系の開発) ・研究分担者 (役割分担) 神野 英毅 生産工学部・教授 (新規有用化合物の探索と精製、遺伝子発現解析) 柏田 歩 生産工学部・准教授 (ペプチド合成と精製 タンパク発現解析) 小森谷 友絵 生産工学部・准教授 (多能性幹細胞を用いたスクリーニング系開発) 松本 太郎 医学部・教授 (ヒト間葉系幹細胞を用いたスクリーニング系開発) 加野 浩一郎 生物資源科学部・准教授 (脱分化脂肪細胞を用いた分化スクリーニング系開発) ・研究協力者 (学外) 杉山 弘 京都大学大学院理学研究科・教授 (PI ポリアミドの合成と精製) 渡辺 信元 理化学研究所・前任研究員 (理研ケミカルライブラリーの提供) 	

※ホームページ等での公開の 可・否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：生産工学部	氏名：野呂 知加子
------------	-----------

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

平成 22 年度の本研究のスクリーニング系毎の研究内容と研究成果は、以下のとおりである。

1) ヒト幹細胞およびがん細胞を用いた分化誘導・細胞接着抑制・転移性浸潤効果スクリーニング系

A. ヒトがん細胞を用いた細胞接着・細胞移動 (転移性浸潤) 指標スクリーニング系 (野呂)

細胞接着分子カドヘリンプロモーターに対して設計した PI ポリアミドは、ヒトがん細胞に添加するとカドヘリン遺伝子の発現を抑制し、上皮-間充織転換 (転移) を誘導する効果があることがわかっている。この現象の逆反応を誘発する薬剤のスクリーニング系を検討し、がん転移防止薬の開発に繋げるとともに、がん転移の分子メカニズム解明をめざす。

平成 22 年度は、結果の数値化および定量化に重点をおき、モデル系の開発をほぼ完成した。

カドヘリン発現を抑制する PI ポリアミドを、細胞に与えた際の濃度依存的細胞形態変化を指標として、がん転移誘発 (上皮-間充織転換) を定量化した。生産工学部生命工学リサーチセンターにある Cellomics Array Scan (Forma) は、96well plate 上に播種した細胞を、細胞の生死・増殖・形態を検出する抗体等の蛍光試薬で染色することにより、各 well 中の個々の細胞についての蛍光強度を計測し、統計処理する装置である。本研究にこのシステムを活用するために、細胞培養法や検出法などの技術の最適化について検討を行い、細胞死誘発および上皮-間充織転換における細胞形態変化について、定量化するシステムを開発した (図 1, 2)。これを従来法であるテトラゾリウム MTT 細胞死判定法、細胞遊走試験などと比較した結果 (図 1)、妥当で詳細な新定量システムであることが明らかになった。また、上皮-間充織転換を遺伝子発現から評価するために、関連遺伝子群 (E-cadherin, slug, snail, twist 等) について、RT-PCR 法にて解析した。本助成金で購入したリアルタイム PCR 装置および分光光度計は、細胞の遺伝子発現解析の定量化に非常に有効であった。

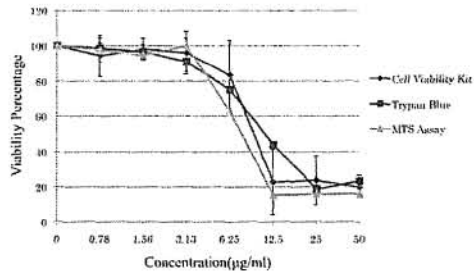


図 1 種々の細胞死検定定量法の比較

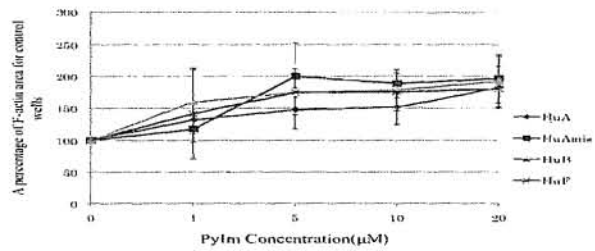


図 2 PI ポリアミドによる細胞形態変化の定量化試験 (細胞骨格)

B. ヒト間葉系幹細胞および脱分化脂肪細胞を用いた細胞分化指標スクリーニング系 (松本・加野)

ヒト間葉系幹細胞および脱分化脂肪細胞は体性幹細胞として近年注目されている。特に後者 DFAT は日大発のアイディアであり、今後の展開が期待されている。現状はこれらの細胞を移植医療へ応用する臨床応用研究が行われているが、この系を用いて細胞分化を指標としたスクリーニング系を作ることによって、特定方向のみへの分化誘導、完全分化による残存幹細胞の除去効果のある分子の発見が期待される。これまでの研究から、軟骨・血管・平滑筋・骨・神経等多様な組織へ分化誘導できることがわかっているが、特に血管と軟骨・骨を重点的に細胞分化系・3 次元組織形成系を開発し、様々な培養条件等の検討を行い、スクリーニング系構築の足がかりとした (図 3, 4)。

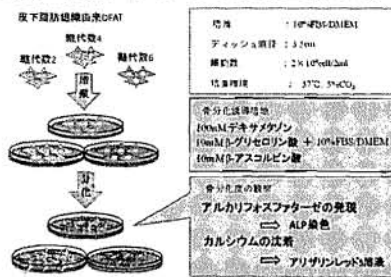


図 3 DFAT 細胞継代数による分化度の比較
デキサメザゾン添加による分化誘導

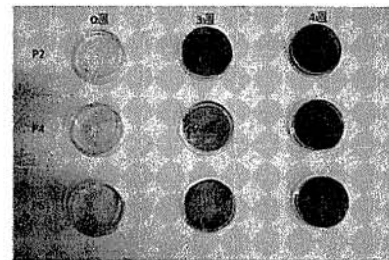


図 4 DFAT 細胞継代数による分化度の比較実験結果 (アルカリ
フォスファターゼ染色)

部科校名：生産工学部

氏名：野呂 知加子

研究結果 (つづき)

2) マウス ES 細胞および iPS 細胞等の万能性細胞を用いた分化誘導・増殖抑制効果スクリーニング系
(野呂・小森谷・松本)

多能性幹細胞は再生医療のホープとして期待され、特に昨年来話題の iPS 細胞は自己皮膚細胞に3種類の遺伝子を導入するだけで万能化することから注目されている。しかしこれらの細胞の問題点は、移植したときに幹細胞が残存しており、それががん化することで生命をおびやかす点である。また現状では、特定の方角のみへの分化誘導が完成されておらず、効率よく安全な移植医療のためには、これらの問題解決が必須である。マウス万能性細胞を用い、完全で特異的な細胞分化を誘導する(未分化幹細胞を残さない)薬剤のスクリーニング系を作り、ヒト移植医療への応用に発展させるために、まず文献情報より選択した分化誘導に有効な試薬(レチノイン酸等)、様々なエピジェネティック試薬(低分子、シトシンメチル化阻害剤、ヒストンアセチル化阻害剤等)等について、マウス ES 細胞における分化誘導試験を行った。

3) ヤマトヒメミズ再生・生殖系を用いた個体再生・形態形成・有性生殖誘導効果スクリーニング系(野呂)

ヤマトヒメミズ(*Enchytraeus japonensis*)は東北農業試験場で見つかった純国産の生物で、碎片分離と再生による無性生殖を行う環形動物である。体長は1cmほどで透明な体をもつ。実験室のシャーレ中の寒天上で、通常は摂氏18-25度で、オートミールを餌として飼育する。自身で体を引きちぎり数片の断片となり(碎片分離)、3日ほどで頭(脳)と肛門が前後に再生し、2週間で元の大きさまで成長して数倍の個体数に増殖することを繰り返す。このミミズの無性生殖系は皆同じゲノムを持ったクローンである。条件によっては有性生殖も誘導できる。本研究では、この個体再生系を用いた化合物スクリーニング系を構築し、培養細胞試験では得られない、生体機能効果がある化合物探索系として利用することを目的としている。

平成22年度は、環境ホルモンや神経化学物質に着目した試験系開発を行った(図5)。反応指標としては、個体の形態や動作に加え、分子生物学的解析を行うマーカーとして再生始動のマーカーとなる新規遺伝子 *grimp* に着目した(図6, 7)。抗 *grimp* 抗体を作成し、反応マーカーとするためにタグ付きベクターに組換え、組換えタンパク質作成を行った。

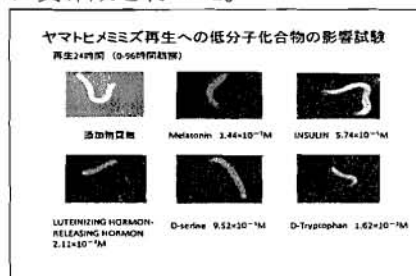


図5 ヤマトヒメミズ低分子化合物スクリーニング系の開発



図6 再生初期マーカー-grimp の遺伝子構造

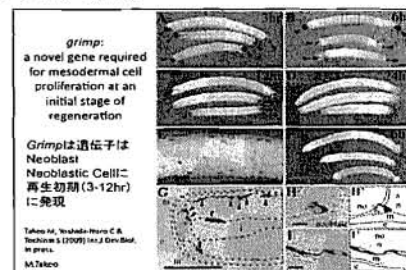


図7 再生初期マーカー-grimp 遺伝子の発現

本研究は、学部内および学部間の横断的なプロジェクトとして、協力して研究を進めて来た。また、医学部松本および生物資源加野とは、日本大学幹細胞研究会のメンバーとして、メールや講演会で情報交換を行い、日本大学学部連携研究推進シンポジウム「日本大学幹細胞研究フォーラム」と開催し、共にこの研究課題の推進に努めた。また大学院生もこの共同研究に参加し、様々な研究刺激を受けて教育効果が上がった。神野、柏田および協力者の杉山、渡辺からは、化合物選定等に関するアドバイスを受けた。今後も連携して、この研究を発展させていく予定である。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成23年3月31日

日本大学 総長 殿

氏 名 網 島 均



所属・資格 生産工学部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <u>総合研究</u>	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	近赤外分光法(NIRS)を応用したブレイン・コンピュータ・インターフェースの開発	
3 研究目的	ブレインコンピュータインターフェイス(BCI)は、脳からの信号を非侵襲的に取得、解析して、脳とコンピュータの間にリアルタイムの通信路を実現するシステムである。BCIの研究は、神経科学、工学およびリハビリテーションを含む学際的な試みである。本研究では、近年開発が大きく進んでいる近赤外分光装置(NIRS)を利用した新しいBCIを開発する。	
4 研究概要	NIRSデータから脳活動に関連した成分を抽出する有効な方法として、離散ウェーブレット変換を用いた信号処理方法が提案されている(網島ほか2005, 2009)。本研究では、この方法をBCIに適用するために、リアルタイムで処理できるシステムに拡張し、ポータブル型のNIRS装置を対象とした信号処理システムも開発する。BCI用の意図識別システムを開発する。また、前頭連合野および運動野の脳活動に焦点を当て、予測的循環調節と大脳皮質領域の活動特性を明らかにし、運動(動作)を行う意図の検出可能性を検討する。開発したリアルタイム信号処理システムおよび人工神経回路モデルによる意図識別システムを、医学部で開発した筋刺激装置を用いたリハビリテーションシステムへ適用し、有効性を検証する。ポータブル型NIRS装置を用いて自動車運転中の注意力低下をリアルタイムに検出することを検討する。	
5 研究組織(共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 網島 均 (研究統括) ・研究分担者(役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 中村 英夫 (意図の認識技術の開発・ハードウェア化) 酒谷 薫 (NIRSを用いた脳機能計測, リハビリテーション分野への応用) 山本 隆充 (NIRSを用いた脳機能計測, 高齢者脳機能解析) 高橋 聖 (意図の認識技術の開発・ハードウェア化) 栗谷川 幸代 (自動車運転支援システムへの応用) 岩館 雅子 (NIRSを用いた脳機能計測, 運動関連領域の持つ機能の解明) 	

※ホームページ等での公開の (可) / (否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：生産工学部

氏名：網島 均

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

平成22年度の実施内容とその成果は以下のとおりである。

(1) NIRS データのリアルタイム信号処理システムの開発

生産工学部所有のマルチチャンネル NIRS 装置およびポータブル NIRS 装置から出力された信号をリアルタイムで処理できる信号処理システムを製作した。離散ウェーブレット変換による多重解像度解析を用いて、脳活動に関連する周波数成分をリアルタイムに抽出する。この信号処理システムを GUI 化することで、簡単に操作することが可能になった。また、NIRS 信号は皮膚血流の影響を大きく受けるため、皮膚血流計測装置を用いて、皮膚血流が NIRS 信号に与える影響を評価する実験を行った。暗算などの認知課題時は、皮膚血流の影響をほとんど受けないが、運動課題時の場合は皮膚血流の影響が大きいことを確認した。

(2) 人工神経回路モデルによる意図識別システムの開発（人工神経回路モデルのハードウェア化）

研究分担者の中村、高橋らは時空間パターン認識のための人工神経回路モデルを提案してきた。これまではソフトウェアによる実装であったので、パターンの学習や認識に多くの時間を要し、実用上問題があった。リアルタイムで認識を行うためにはモデルのハードウェア化が不可欠である。人工神経回路モデルを FPGA（Field Programmable Gate Array）でハードウェア化するための基本回路設計を行った。本モデルの主要な要素である S 細胞回路と C 細胞回路を、積和器、平方根計算器、除算器で構成した。さらに、NIRS 信号を脳イメージング動画像に変換するためのアルゴリズムの検討と、この変換を行うためのソフトウェア開発を行った。これを用いて、2つのカテゴリからなる言語課題に対して、NIRS 信号により識別できる可能性を示した。これらの、成果は以下の学会において発表した。

・高橋 聖：NIRS 信号とニューラルネットによる脳活動の識別，第1回 NU-Brain シンポジウム -光脳機能イメージングの研究開発および臨床応用に関するシンポジウム- 2010.9

・Sei Takahashi, Hideo Nakamura, Hitoshi Tsunashima：Multichannel Temporal Data Classification of Motor Imagination Using fNIRS, International Conference on Control, Automation and Systems (ICCAS 2010), SE04-2, 2010.10

・小松崎諒，山崎拓也，高橋聖，中村英夫：BCI を目的とした NIRS による脳計測データ分布に対する一検討，電気学会全国大会講演論文集，3-021，2011.3

(3) 運動の予測に伴う心循環反応と大脳皮質脳血流信号との対応についての検討

本年度は掌握運動時の前頭前野の酸素化亢進の特徴を明らかにすると共に、同時計測した心拍数との関連から運動準備期のセントラルコマンドへの関わりを検討した。昨年度と同様に、準備期にカウントダウンを行った後に随意最大筋力の80%で掌握運動を静的に実施するプロトコルを用いた。また、運動肢の側性の影響を検討するため、掌握運動は、右手のみ/左手のみ/両手同時の3条件とした。また、準備期のカウントダウンを検者が被験者に対し呈示する場合としない場合の2条件とし、予測的準備が可能である場合と可能でない場合の違いも検討した。その結果、予測ができる場合よりも予測ができない場合の差のみが左前頭前野にみられた。しかし、心拍数については試行間で差がみられなかった。この結果から、予測的準備には左前頭前野の関与が示唆されたが、心拍数に反映される準備期のセントラルコマンドの働きはこれとは関連しないと考えられる。これらの成果を以下の学会で発表した。

・岩館雅子，柳沢一機，網島均：NIRSを用いた大脳皮質運動野活動の検討~運動準備期から運動期の脳血流と循環応答の対応~，日本健康行動科学会誌，9巻2号，93-99，2011

・Masako Iwadate：The relationship between the laterality of handgrip and the prefrontal cortex activities during preparation before and after maximum voluntary handgrip exercise: An NIRS study. Society for Neuroscience 40th annual meeting, 2010.11

部科校名：生産工学部

氏名：綱島 均

研究結果（つづき）

(4) リアルタイム信号処理システムおよび識別アルゴリズムのリハビリテーションシステムへの実装
マルチチャンネル NIRS 装置を使用して運動の意図を検出するリアルタイム信号処理システムおよび識別アルゴリズムの検討を行った。NIRS によって計測される oxy-Hb とその微分値に注目した識別アルゴリズムを提案し、リアルタイムに運動の意図を検出できる可能性を示した。これらの成果を以下の学会で発表した。

・ Kazuki Yanagisawa, Kyohei Asaka, Hideyuki Sawai, Hitoshi Tsunashima, Takafumi Nagaoka, Takeo Tsujii, Kaoru Sakatani : Brain-Computer Interface using Near-Infrared Spectroscopy for Rehabilitation, International Conference on Control, Automation and Systems (ICCAS2010), SP04-3, 2010.8

・ 柳沢一機 : NIRS を用いた BCI とリハビリテーションへの応用, 第 1 回 NU-Brain シンポジウム -脳機能イメージングの研究開発および臨床応用に関するシンポジウム-, 2010.9

・ 柳沢一機, 浅賀恭平, 綱島均, 永岡右章, 辻井岳雄, 酒谷薫 : 近赤外分光法を用いた Brain Computer Interface に関する研究 -新しい脳活動判定方法の提案-, 第 25 回生体生理工学シンポジウム講演集 3A2-2, 2010.9

(5) ポータブル NIRS 装置を用いた運転注意力のモニタリング

ポータブル NIRS 装置に開発した信号処理システムを組み込むことにより、自動車運転中の注意力をリアルタイムにモニタリングすることが可能になると考えられる。そこで、運転中の脳活動を連続して長時間記録できるポータブル NIRS 装置を用いて、ドライビングシミュレータ内で運転中の注意力をモニタリングできるか検証を行った。まず、マルチチャンネル NIRS 装置を用いて、前方障害物衝突警報によるドライバの注意力の変化を脳活動から評価した。先行車の急減速実験を行い、ドライバの脳活動を計測した結果、警報の有無により脳活動に違いがあることを確認した。さらに、ポータブル NIRS 装置を用いて、マルチチャンネル NIRS 装置と同様にドライビングシミュレータ運転時の脳活動を計測することができるか検証実験を行った。平成 23 年度は実車での実験を実施する予定である。

平成 22 年度に実施した総合研究の成果は、下記の第 1 回 NU-BRAIN シンポジウムにおいて発表した。以下に会議の内容と出席者の評価を示す。

第 1 回 NU-BRAIN シンポジウム

平成 22 年 9 月 11 日から平成 22 年 9 月 11 日まで

会場名：島津製作所東京支社セミナールーム 開催地：東京

113 人（内訳 学外者 80 名、学内者 33 名）

実行委員：

綱島 均（総括、講演者）、酒谷 薫（健康科学への応用セッション担当、基調講演）、中村 英夫、高橋 聖（信号処理セッション担当、講演者）、岩館 雅子（講演者）

平成 22 年 9 月 11 日（土）

開会の挨拶 日本大学 教授 医学部長 片山 容一

1. 日本大学における NIRS を用いた連携研究の取り組み 日本大学生産工学部 教授 綱島均

2. 基調講演「NIRS の臨床応用の最前線」 日本大学医学部 教授 酒谷薫

NIRS における信号処理と BCI への応用

(1) 「NIRS 信号のゆらぎと解析」（招待講演）東京都精神医学総合研究所 星 詳子

(2) 「NIRS 信号の統計解析：空間的標準化と POTATO」（招待講演）自治医大 檀一平太

(3) 「NIRS を用いた BCI とリハビリテーションへの応用」 日本大学生産工学部 学振研究員 柳沢一機

(4) 「NIRS 信号とニューラルネットによる脳活動の識別」 日本大学理工学部 准教授 高橋聖

部科校名：生産工学部

氏名：綱島 均

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

健康科学への応用

- (1)「運動による高次脳機能の変化」(招待講演)筑波大学人間総合科学 征矢英昭
- (2)「運動による疲労と脳活動」(招待講演)長崎総合科学大学 澁谷顕一
- (3)「NIRSを用いた運動準備期の脳活動と循環応答」日本大学生産工学部 助教 岩館雅子
- (4)「臨床薬理へのNIRSの応用」日本大学医学部 辻井岳雄
- (5)「サプリメントの高次脳機能に対する効果」(招待講演)資生堂リサーチセンター 谷田正弘

1) シンポジウムについての聴衆の感想(アンケート結果):

- ・参加人数が多く、意見も多く出され、非常に活発なシンポジウムだった。
- ・会場の選定、設定もよかった。・進行がスムーズで素晴らしい。
- ・レベルが高かった。・様々な考え方があり面白い。
- ・今後のためになると思った。
- ・今後の研究の方向性や解析に関しての方法など参考できる部分を取り入れた様々な視点からの研究を拝聴することができ勉強になった。
- ・データの解釈についての意見がいろいろあっていると思った。
- ・今後の課題に取り組むにあたり、必要であったアイデアが浮かんだ。
- ・臨床から基礎まで幅広い内容で良かった。
- ・EEG解析がメインなのでNIRSの先端研究がわかってよかった。
- ・第1回目として相応しいセッション構成であった。次回は分野別での応用例のシンポジウムの企画を期待する
- ・自動車の運動支援(運動支援による心理的負荷の低減効果)
- ・心理的ストレス・いやし感の評価。
- ・BCI研究会について、社会への貢献・医療への貢献だけでなくきちんと教育まで視野に入られていることは素晴らしいと思った。

2) 今後の取り組みに対する意見(アンケート結果):

- ・触覚、嗅覚とNIRSの研究について(タッチやアロマなど)
- ・動き(動作・行動)が大きくなった時の対応についても教えて頂きたい。
- ・信号処理等についての進捗状況についても取り入れ頂きたい。
- ・今回のように基礎と応用的な両方をあわせてとりあげることが良い。
- ・他の研究者との連携を是非進めていただきたいと思う。
- ・データ解析方法、統計方法、3次元プロットのlectureとworkshop(データ分析)
- ・快・不快・不安の識別判別・末梢神経障害・痛み
- ・NIRS以外の脳マッピングの演題・さらに具体的な解析方法を聞きたい。
- ・各研究室や研究者の取り組みや工夫点が気になる。
- ・NIRS信号のパターン認識の手法をもっと詳しく知りたい。

課題番号	総10-018
------	---------

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23年 4月 15日

日本大学 総長 殿

氏 名 清水 耕作 

所属・資格 生産工学部 電気電子工学科 教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <u>総合研究</u>	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	酸化物半導体膜の pn 接合形成と太陽電池への応用	
3 研究目的	<p>太陽電池として有効に利用できていない紫外光や太陽熱を有効に発電に利用することを目標として研究を行う。</p> <p>(i)薄膜、バルクを問わず現在主流の太陽電池において現在 400nm 以下(~3eV 以上)の光は殆ど利用できていない。ワイドギャップ半導体(>3.0eV)である酸化物半導体を用いて、これまで用いられることのなかった可視-紫外領域(350-450nm)の光を吸収し太陽電池の可能性を示すこと、および(ii)より短波長の光に対しては、蛍光体を用いた波長変換膜を作製して可視光に変換することで光電変換効率を向上させる。以上 2 点の可能性を実証することを本研究の目的とした。</p>	
4 研究概要	<p>n 型、および p 型酸化物半導体を作製し、接合を形成することを目標とした。n 型半導体には、a-InGaZnO₄ を p 型膜には CuAlO₂ 薄膜を用いた。特に CuAlO₂ は超臨界水を用いて、合成した。この合成微結晶体をスパッタターゲットとして用いることにより、スパッタ法にて薄膜を堆積した。また、改良の余地はあるものの接合作製にも成功した。さらに、光電変換膜は、SrTiO₃:Pr, Al および CaTiO₃:Pr を用いて薄膜化を検討した。作製した薄膜は、紫外光 250 から 330nm の紫外線を吸収して 617nm の赤色光を発光することが確認された。波長変換膜は、同じ製膜条件で作製しても蛍光するサンプルと蛍光しないサンプルができ、なぜそのようなことが起こるかが本研究の焦点となった。蛍光分光、EPMA による微量元素の分析を通して非晶質薄膜の短距離秩序の維持およびプラセオジム周辺の欠陥構造が最も蛍光(効率)に寄与していることがわかった。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 <ul style="list-style-type: none"> 清水耕作 (薄膜作製と物性評価) ・ 研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 新妻清純 (薄膜作製技術と機器分析) 日秋俊彦 (溶液層での p 型層堆積技術) 佐藤敏幸 (p 型材料作製技術) 北野幸樹 (光透過性と美的評価) 	

※ホームページ等での公開の (可)・否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：生産工学部

氏名：清水耕作

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

【はじめに】

薄膜、バルクを問わず太陽電池において現在 400nm 以下(～3eV 以上)の光は殆ど利用できていない。本研究ではワイドギャップ半導体(>3.0eV)である酸化物半導体を用いて、これまで用いられることのなかった可視～紫外領域の光を吸収し太陽電池を作製することを目的とする。開発に当たっての要素技術をこの目標として検討を進めた。

- ① p型、およびn型の半導体を作製すること
- ② p型半導体とn型半導体の接合を作製すること
- ③ 電荷収集層としての透明電極、金属電極の最適設計
- ④ 短波長側吸収のための蛍光材添加方法を確立すること

①n型半導体は、非晶 InGaZnO₄(以降 IGZO) を用いた。この薄膜は、当研究室ではこれまでの検討によって既に作製可能である。p型薄膜は CuAlO₂ (以降 CAO) を用いた。この材料は日秋研究室にて既に合成可能であり、しかも量産技術が確立しつつある。②pn接合によるダイオードの作製を主として様々な作製方法を通して検討する。③透明電極層や金属層を。④紫外光を発電に利用するために、蛍光材料を用いることで可視光に変換する技術について検討を行う。特に、蛍光材料を入射光側最表面に位置させ、しかも通常利用している可視光への影響を極小にするための最適条件を検討する。

【結果および考察】

(1)p型およびn型薄膜の作製

(i)薄膜物性と作製とオーミック特性

n型薄膜およびp型薄膜と金属界面では、オーミック接触が必要とされる。当研究では、仕事関数差の値を検討した結果からアルミニウム、クロム、銅、銀、チタンを候補として挙げ、検討を行った。実用的にはITO(In2O₃:5%Sn)薄膜を介して接続するとオーミックが取れることは既にわかっているが、本研究では、むしろプロセス数低減のため直接金属薄膜を作製する方法を検討した。検討の結果クロムが最も良いことがわかりオーミック層の形成に用いた。

オーミック特性を得ることができたことから、直接薄膜の物性を評価することが可能になった。以下ホール測定、4探針測定を行った結果を示す。

表1 特性 IGZO, CAO の物性

特性	InGaZnO ₄	CuAlO ₂
導電率[S/cm]	3.23 × 10 ⁻⁴	3.93 × 10 ⁻⁴
キャリア密度[cm ⁻³]	1.55 × 10 ¹⁴	2.79 × 10 ¹⁵
ホール移動度[cm ² /Vs]	1.34	0.88

これらの特性は、初期的な膜から考えると高い性能の膜を持った膜である。CAOの移動度で、0.88 cm²/Vs という値は、通常0.1程度の値が一般的であるから国際的にもかなり高い値である。この原因は、通常のCAO膜の作製が、超臨界水を用いた合成法によるものではないかと考えている。

(ii)接合特性

ガラス基板上にクロム電極、IGZO, CTO, クロムを順次積層させて接合特性を評価した(図1)。良好な接合特性を作製することができた。表2に示すような、ガス圧の制御を行うだけで製膜条件の最適化を行うことでより簡便に作製できることを明らかにした。

表2 薄膜作製条件

condition	CuAlO ₂	InGaZnO ₄
Ar+O ₂ (5.0%) Gas pressure [Pa]	4	3
RF power [W]	100	100
Growth Time [min]	60	60
Base Pressure [Pa]	8 × 10 ⁻⁴	8 × 10 ⁻⁴

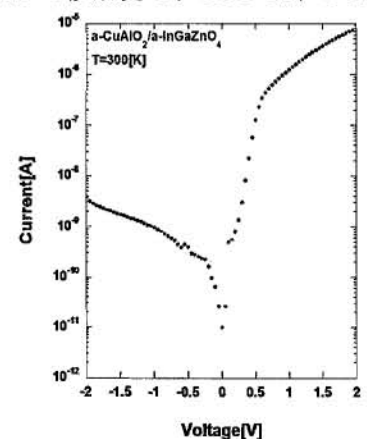


図1 接合特性評価

部科校名：生産工学部

氏名：清水耕作

研究結果 (つづき)

(iii) 光電変換特性

形成されたダイオード素子を用いて光電変換特性を評価した(図 2)。このダイオードは、光学バンドギャップが 3.3 から 3.6eV あることから、可視光は全て透過している。したがって、太陽電池の効率の値は非常に小さいが、キセノンランプ光源の紫外光に反応して太陽電池特性が出ていることを確認した。

しかし、薄膜中には多くの欠陥やまた CAO 薄膜が十分な光透過性を持たないことから CuO にまつわる不純物の存在が推測される。主として合成段階か合成後の自然参加によるものと考えられる。今後純度を上げるべく合成パラメータを検討する、もしくは精製を行うなどの対策を考える必要がある。

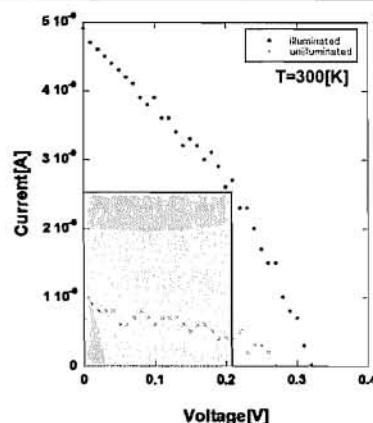


図 2 光電変換特性

(2) 波長変換膜の作製と評価

(i) SrTiO₃:Pr, Al 薄膜の作製

SrTiO₃:Pr, Al (以降 STOPA) は、古くから赤色蛍光材料として知られている。しかし通常は結晶微粉末の状態で使用すること、また励起源は電子線または X 線である。今回は、特に紫外光を用いること、および非晶質薄膜を用いることで蛍光薄膜の新たな展開を目指した。STOPA は、微結晶体で使用する場合は図 3 のような吸収蛍光特性を示すが、非晶質薄膜にした場合には図 4 のようになる。蛍光はいずれも 617nm の赤色光であるが、そのときに吸収している紫外光の範囲が微結晶体の場合は 300-380nm 範囲で非常に広いのに対して、薄膜の場合は、330-370nm と狭くなっていることがわかった。この原因は、吸収した光が蛍光に使えていないことつまり励起電子の膜内での失活が顕著であることを意味しており、非晶質材料にまつわる欠陥や結合角、結合長の乱れに依存していると考えられる。特に図 4 では、作製したサンプルをより結晶の少ない薄膜にするべく熱処理温度依存性を示したものである。STOPA は、約 1100℃で結晶化することがわかっているが、傾向特性はむしろその逆であり、熱処理温度を上昇させても蛍光強度は、低下することがわかった。これに伴い、製膜条件を検討しながら、それぞれの条件化と蛍光特性を検討した結果、同じサンプルでも蛍光の強度が異なるサンプルが作製されることがわかってきた。図 5 は、蛍光を発するサンプルの例である。

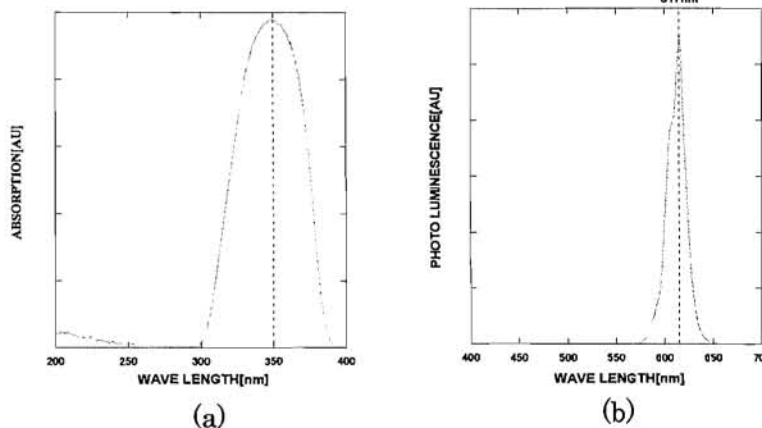


図 3 STOPA 結晶微粉末の(a)吸収,(b)蛍光特性

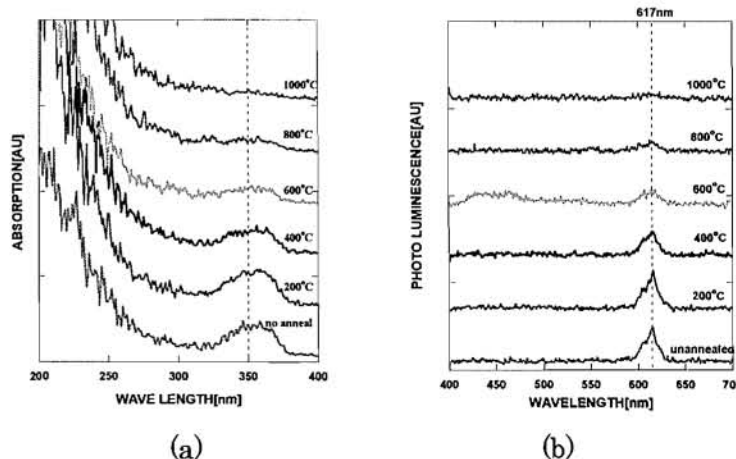


図 4 STOPA 薄膜の(a)光吸収、(b)蛍光特性

部科校名：生産工学部

氏名：清水耕作

研究結果（つづき）

(ii)再現性と技術課題

再現性の問題は、そのサンプル自体の信頼性を失うことになる。この点を対照実験を通して、また CaTiO₃:Pr との比較を通して、検討した。原因を次のように考えた。

- ① 薄膜が非晶質であるために欠陥が励起電子を捕獲している。
- ② 薄膜に発光中心であるプラセオジウム濃度が初期の濃度を保っていない。
- ③ STO 自体の組成が変化している。

これらを詳細に検討した。

より高い温度で製膜を行い、堆積初期から結晶化しているような薄膜

を作製した。これは、結晶体であるから欠陥はかなり低減していると考えた。しかしこれには全く依存性がなく再現性良く蛍光を発するようは試料の作製には至らなかった。次に、発光中心の濃度依存性について検討した。図6に示す L_α 線の検討結果より、両者の濃度に大きく差があるということは実証できなかった。最後に STO の組成の組成がずれていることから本来のペロブスカイト構造が歪んだり、結晶欠陥が発生したりすることで、励起電子が発光中心に輸送されていないことを考えた。実証は、現在の評価装置では非常に困難であり、今後理工学部のパラメトリック X 線を使うことでプラセオジウム周りの結合状態を評価し、明らかにしたいと考えている。本年度の課題が採択されて、上記 X 線を利用することができることとなった。



図5 薄膜 STO:Pr の発光

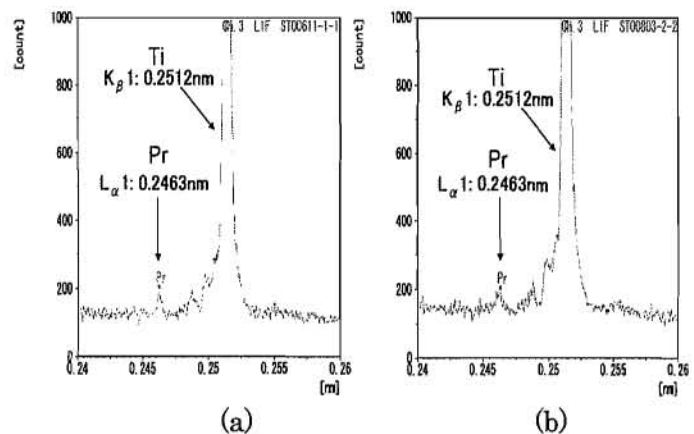


図6 EPMA による(a)発光サンプルと(b)非発光サンプル間のプラセオジウム濃度についての比較

【まとめ】

(1) 酸化物太陽電池

- ・ 当初計画した、接合製作に目処を立てることができた。
- ・ CAO の純度や酸化による低品質化が顕著になってきた。今後の対策を要する。
- ・ 酸素の相互拡散は、太陽電池の劣化につながるということが理解された。今後対策を要する。

(2) 波長変換膜

- ・ 波長変換薄膜を作製することに成功した。
- ・ 再現性に問題があることがわかり、ペロブスカイト構造の歪みが原因しているであろうことが推測される。今後 EXAFS を用いて解析を進めることとする。
- ・ 透明度に問題がある。今後新しく導入した製膜装置を用いて、広域的な条件の検討を行う。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成23年5月12日

日本大学 総長 殿

氏名 若林 裕之



所属・資格 工学部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	レーザ計測に基づく大規模実環境に忠実な3次元モデルの全自動構築技術	
3 研究目的	近年、3次元レーザ計測機の急速な性能向上に伴い、建築、土木、農林など、その利用範囲が大規模実環境計測へと拡大している。しかしながらこの大規模環境計測データ処理に関しては、過去の研究例も少なく、市販ソフトウェアもほとんど整備されていないのが現状であり、レーザ計測の実業務への利用にはデータ処理上の課題が多く残っている。そこで我々は、実環境をより小さな誤差で忠実に再現し、なおかつユーザが実業務で有効利用可能な形式へと変換した、高品質構造化モデルを構築する技術の開発を目的とする。	
4 研究概要	本研究では、実環境レーザ計測データを独自入手し、これをもとに実務で要求される技術の開発を行った。具体的には、下記4テーマについて研究を実施した。1)コンクリート構造物の定量的劣化診断、2)森林バイオマス推定、3)計測データからの平面抽出、4)位置合わせ精度評価。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 若林裕之 工学部/教授 (研究とりまとめ, コンクリート構造物の劣化診断, 森林バイオマス推定) ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 李 和樹 理工学部/教授 (計測データからの平面抽出) 白井健二 工学部/教授 (位置合わせ精度評価) 原 靖彦 工学部/教授 (データ取得, 計測データからの平面抽出) 小林義和 工学部/准教授 (データ取得, 位置合わせ精度評価) 溝口知広 工学部/助教 (データ取得, コンクリート構造物の劣化診断, 森林バイオマス推定) 	

※ホームページ等での公開の 可 否 いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：工学部

氏名：若林 裕之

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1. レーザ計測に基づくコンクリート構造物の劣化診断

近年、融雪剤の大量散布に起因し、スケーリングによるコンクリート構造物表層部の劣化が顕在化している。本研究では、3次元レーザ計測より取得したデータより、このスケーリング劣化を定量的に評価する手法を考案した。データ取得に関しては、レーザ計測を利用することで、既存の方法と比べて格段に広い数百メートル規模の広範囲データを、数百メートル程度の遠距離から取得可能である。古い橋梁2つを対象に、実際にレーザ計測を行った。開発した手法は、既存のリージョンローイング法を拡張したものであり、レーザ計測データから構造物健全時の形状を推定し、推定した形状と計測データとを比較することで、表面凹凸を定量的に評価できる。検証より、表面凹凸の評価精度は十分であることを確認した。これらの成果を、国際会議1件、国内学会2件に投稿した。

2. レーザ計測に基づく森林バイオマス推定

森林破壊や植林活動による森林CO₂吸収量を診断する技術の開発が求められている。吸収量評価のためには、森林バイオマスを高精度に推定することが重要である。このバイオマスは、森林中の各樹木の胸高直径及び樹高より算出でき、高精度なバイオマス推定のためには、胸高直径と樹高を高精度に推定することが重要となる。本研究では、森林レーザ計測データから樹木の胸高直径及び樹高の推定を行った。このためまず、北海道苫小牧市にてレーザ計測を行い、取得したデータから、市販ソフトウェアにてユーザが対話的に胸高直径の推定を行った。また同地にて、手作業で樹木ごとの胸高直径及び樹高を測定した。その結果、胸高直径は、レーザ計測データより推定した方が、現地で手作業にて測定した結果より1-2cm程度大きく推定されることを確認した。

3. レーザ計測データからの平面抽出と計測精度評価

建築物等の人工構造物設計には、平面が多用される。この平面をレーザ計測データ中から抽出できれば、建築物3Dモデル構築など、様々な用途に有効利用できる。そこで本研究では、既存のリージョンローイング法を応用し、レーザ計測データから平面を抽出する方法を開発した。データ取得のために、本学キャンパス全体を計測し、その中の図書館周辺データを使用した。また開発した手法を利用し、レーザ計測精度評価、建築物壁面歪みの推定も行った。開発した手法では、妥当な精度で平面抽出が可能であることを確認した。また、レーザの入射角特性により計測精度が異なること、壁面歪みを可視化できることも確認した。

部科校名：工学部

氏名：若林 裕之

研究結果 (つづき)

4. レーザ計測データの位置合わせ精度評価

レーザ計測では、通常複数方向から取得した複数データを1つに統合する位置合わせ処理を行い、全体データを取得する。この位置合わせは、あらゆるアプリケーションにおける重要な前処理であり、その精度はその後のデータ解析結果を大きく左右するにもかかわらず、精度検証は十分に行われておらず、論文等でもほとんど公表されていない。本研究では、この位置合わせ精度評価を行った。位置合わせは、実環境中に配置したマーカー同士をデータ中で重ね合わせるように行う方法と、マーカーなしで全自動で行う方法とに大きく分類される。今年度は前者における位置合わせ精度評価のみを行った。このため、大型パイプを購入し、これを実環境中に配置しレーザ計測を行い、位置合わせ精度評価の基準とした。検証より、最大で5mm以上の誤差が含まれることが分かった。

[主な研究業績]

1. Tomohiro Mizoguchi, Yasuhiro Koda, Yoshikazu Kobayashi, Ichiro Iwaki, Yasuhiko Hara, Kenji Shirai, Hwa-Soo Lee, and Hiroyuki Wakabayashi, "Quantitative Damage Assessment of Concrete Structures based on 3D Laser Scanning," 2011 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium, *accepted*.
2. 溝口知広, 子田康弘, 若林裕之, 岩城一郎, 「3次元レーザ計測に基づくコンクリート構造物のスケーリング評価」, 日本リモートセンシング学会第50回(平成23年度春季)学術講演会開催, 2011.
3. 溝口知広, 子田康弘, 若林裕之, 岩城一郎, 「3次元レーザスキャナを用いた実RC部材のスケーリング計測手法の考案」, 第65回セメント技術大会, 2011.
4. 子田康弘, 溝口知広, 岩城一郎, 若林裕之, 「凍害を受けた実RC部材のスケーリング評価手法の構築に関する検討」, 平成22年度土木学会東北支部技術研究発表会, 2011.
5. 河田成宏, 原靖彦, 小林義和, 白井健二, 足立秀之, 滝沢義信, 菅野純一: 画像歪み補正を援用した3角測量方式微小球体高さ検出, 日本大学工学部紀要, Vol.51, No.2, pp57-62 (2010).
6. 原靖彦, 河田成宏, 白井健二, 小林義和, 足立秀之, 滝沢義信, 菅野純一: 2次元画像検出器を用いた3角測量方式微小ボール高さ検出法の研究, 第24回エレクトロニクス実装学会講演大会講演論文集, pp50-51(2010)
7. 原靖彦, 安達倫司, 梅田武宏, 関口勇: 拡張現実感および複合現実感における現実物体と仮想モデルとの相互作用試行, 動的画像処理実利用可ワークショップ2011講演予稿集, pp115-116(2011).
8. Yoshikazu Kobayashi, Kenji Shirai, Yasuhiko Hara, Tomohiro Mizoguchi and Kiyotaka Kawasaki, "Generation and Assessment of Random Surface Texture in a Wide Area," International Journal of Automotive Technology, Vol.5, No.2, pp. 185-189, 2011.

注：課題番号を記入してください。

平成 22 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23 年 4 月 28 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 越 永 従 道



所属・資格 医学部・准教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	(和文表記) MYCN 遺伝子を標的とした神経芽細胞腫の新規治療法の開発 (英文表記) Development of novel neuroblastoma therapeutic agents targeting the MYCN gene	
3 研究目的	神経芽細胞腫は、近年治療法の改善により予後が改善しているが、未だ多くの予後不良例（進行神経芽細胞腫）が存在し、その治療法は確立していない。我々はピロール基(Py)イミダゾール基(Im)を組み合わせた化合物が DNA の 2 重螺旋構造を配列もしくは修飾特異的に認識することを見出し、その化合物の設計、自動合成を学内に確立している。これに基づき、神経芽細胞腫特異的に増幅する MYCN 遺伝子領域の発現調節領域を高感度に同定し、発現を抑制する化合物の合成に成功した。MYCN 遺伝子は、癌遺伝子として知られ特に予後の不良な小児固形腫瘍、神経芽細胞腫で高頻度に増幅が認められる遺伝子であり、治療標的として注目されてきた遺伝子である。さらに MYC 遺伝子ファミリーには、MYCC、MYCL および MYCN が多くある成人の悪性腫瘍、血液腫瘍に関わる鍵となる遺伝子であり、その下流の遺伝子の調節ができれば様々ながんの治療法が確立できる可能性がある。我々は MYC 遺伝子により発現制御される MYC ターゲット遺伝子の発現調節を行う化合物の合成にも成功している。本研究では、これらの化合物を臨床に応用するための基礎研究を行い、日本大学発の独自の治療薬の開発を目指すものである。	
4 研究概要	MYCN の発現調節領域を標的としたポリアミド化合物および MYC の結合領域である E-box 配列 (cacgtg) を標的としたポリアミド化合物を設計し合成した。 新規に設計し合成したポリアミド化合物による in vitro での機能解析として、神経芽腫細胞株における増殖抑制、分化誘導の有無をを検討した。また、同時に得られた細胞から RNA を抽出し、それぞれのポリアミドの標的遺伝子となる MYCN 遺伝子、MYCN 下流遺伝子の発現抑制を確認した。 In vitro での機能解析で増殖抑制を最も強く認め、標的遺伝子の発現抑制を認めたポリアミド化合物について、実験動物での薬物動態を確認した。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> 研究代表者 越 永 従 道 研究分担者（役割分担） 麦 島 秀 雄 （小児腫瘍薬物治療法開発） 松 本 宜 明 （薬物動態の解析） 斎 藤 勉 （治療薬動態イメージング解析） 杉 藤 公 信 （小児腫瘍薬物治療法開発） 青 山 隆 彦 （薬物動態の解析） 	

部科校名：医学部

氏名：越永 従道

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

平成 21 年度は、MYCN の転写調節因子である SP1、E2F の MYCN のプロモータ部位にあるそれぞれの結合領域を標的としたポリアミドを合成し、それらを MYCN の増幅が確認されているヒト神経芽腫細胞株 CHP134 に投与した。その結果 SP1 結合領域を標的とした PI ポリアミド（ポリアミド S-1）では細胞増殖抑制効果及び MYCN 遺伝子発現抑制効果を認めたが、E2F 結合領域を標的としたポリアミド化合物（ポリアミド E-1）では有意な腫瘍増殖抑制効果、分化、細胞死などの抗腫瘍効果を認めなかった。しかし現在までにポリアミド化合物の Dp 末端と β リンカー部分の設計の工夫により CG が多い配列への設計が可能となり、認識配列に対する設計の自由度が高くなった。またブロック合成の開発により認識配列が 12 塩基まで延長できるようになった。さらにそのいずれにおいても、標的配列を持つ二本鎖 DNA に対する特異的結合能が低下しないことがピアコア法による分子間相互作用解析により、確認できている。そこで、平成 22 年度では、E2F を標的としたポリアミド化合物および SP1 を標的としたポリアミド化合物の再設計を行いその抗腫瘍効果を検討した。また、新規に合成した SP1、E2F を標的としたポリアミド（ポリアミド S-2、ポリアミド E-2）を同時に投与することで細胞増殖抑制、MYCN の発現抑制に相加、相乗効果が得られるか検討した。

a. SP1 および E2F を標的とした新規 PI ポリアミドの抗腫瘍効果の検討

MYCN 転写調節因子のうち E2F および SP1 の、MYCN 遺伝子プロモーター領域での結合領域を標的としたポリアミド化合物を新規に 2 つ（ポリアミド E-2 およびポリアミド S-2）設計し合成した。この 2 つのポリアミドを MYCN 増幅神経芽細胞腫細胞株である CHP134 に 1、5、10 μ M となるように投与し 72 時間培養したのち、直接顕微鏡下にて形態学的変化の有無を確認し、細胞計数により細胞増殖の変化を確認した。ポリアミド E-2 を 5 μ M 投与した群では 20%、ポリアミド S-2 を 5 μ M 投与群した群では 30% の細胞増殖抑制を認めた。濃度依存性は認めなかった。同時に得られた細胞から RNA を抽出し、MYCN の発現を real time RT-PCR 法にて検討したところポリアミド E-2 を 5 μ M 投与群した群で 40% MYCN の発現抑制を認めた。顕微鏡下における形態学的な変化はアポトーシスを思わせる凝縮した細胞や分断化された細胞を一部認めるものの、神経突起の伸長等分化の誘導を思わせるような形態学的変化は確認されなかった。並行して CHP134 細胞に対しポリアミド S-2 とポリアミド E-2 を各 2.5 μ M ずつ計 5 μ M となるように投与し、72 時間培養したところ 40% の増殖抑制効果を認めた。同時に得られた細胞から RNA を抽出し、MYCN の発現を real time RT-PCR 法にて検討したところ 60% の MYCN の発現抑制を認めた。MYCN 増幅神経芽細胞腫細胞株である IMR32、NB9 および、MYCN 非増幅神経芽細胞腫細胞株である SK-N-SH、NB69 においては、CHP134 に対するもの以上の細胞増殖抑制効果は認めなかった。

b. 腫瘍細胞株における当該 PI ポリアミドの核内移行性の確認

1. の実験において抗腫瘍効果を認めた PI ポリアミドの、CHP134 における核内移行性を確認した。ポリアミド E-2 およびポリアミド S-2 をそれぞれ FITC による蛍光標識し、それらを a. の実験同様ポリアミド E-2 及びポリアミド S-2 を単剤で 5 μ M、ポリアミド S-2 とポリアミド E-2 を各 2.5 μ M ずつ計 5 μ M となるように処理した後 24h、72h 及び 168h 後に蛍光顕微鏡による観察をした。その結果、各時間帯において全てのポリアミド処理をした細胞群で Hoechst33342 による核染色に一致して、蛍光標識された核を持つ細胞を確認した。

c. 腫瘍形成モデルの作製、MYCN 遺伝子の発現の確認

すでに CHP134 のヌードマウスへの移植モデルは報告されており、これに準じて腫瘍形成モデルマウスを作製した。1 匹あたり 1×10^7 個に CHP134 細胞を調節した 100 μ l の PBS 細胞混濁液 を 6 週齢の雄ヌードマウスの後頸部に移植し、8 から 12 週間の飼育により腫瘍形成を肉眼的に確認した。

d. 実験動物における PI ポリアミド化合物の薬物動態の確認

上記のごとく作製した腫瘍形成モデルマウスにおける PI ポリアミド化合物の薬物動態を確認するべく、ポリアミド E-2、ポリアミド S-2 及び MYCN プロモータ部位に結合配列を持たないポリアミドをコントロール PI ポリアミド（mismatch ポリアミド）としてそれぞれ FITC でラベルし、腫瘍形成モデルマウス に尾静脈から全身投与を試みた。

部科校名：医学部

氏名：越永 従道

研究結果（つづき）

しかし FITC ラベリングにより各 PI ポリアミド化合物の水溶性の低下を招き、経静脈的全身投与が困難であった。そこで腫瘍形成モデルマウスの腫瘍への皮下注射による直接投与を行い、投与後 24 時間および 7 日後に解剖し、肝、脾、肺、腎、胃、小腸、皮膚および脳組織を蛍光顕微鏡で確認した。その結果、24 時間および 7 日後の摘出腫瘍組織において腫瘍細胞の核内に FITC で標識された PI ポリアミド化合物の存在を認めたが、そのほかの組織では確認できなかった。

e. 腫瘍形成モデルマウスへの PI ポリアミド化合物の投与

d. で作製した腫瘍形成モデルマウスの腫瘍の大きさが 200mm^3 になった時点で移植マウスを以下の 3 群に用いた。

- ① match ポリアミド投与群（ポリアミド E-2 およびポリアミド S-2 等量混合物投与群）
- ② mismatch ポリアミド投与群（コントロール PI ポリアミド投与群）
- ③ PBS 投与群

各群において局所に PI ポリアミド ($6\text{mg}/\text{kg}$) を投与し、投与後 2 週間まで腫瘍径の確認と腫瘍形態の確認を行い解剖したところ、match ポリアミド投与群において mismatch ポリアミド投与群と比較し、抗腫瘍効果を認める傾向にあった。さらに腫瘍組織を摘出し MYCN 遺伝子の発現を real time RT-PCR によって確認したところ、match ポリアミド投与群において mismatch ポリアミド投与群と比較し MYCN の発現が抑制されている傾向にあった。今後さらに個体数を増やし検討するとともに摘出した腫瘍組織から HE 染色切片を作製、顕鏡下での腫瘍形態の確認と、MYCN 蛋白の抗体を用いて免疫組織染色を施行し、MYCN 蛋白の発現状態の確認も行う。

f. Annexine V、7AAD を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシスの確認実験

これまでの *in vitro* の実験で match ポリアミドを CHP134 に投与すると細胞増殖抑制効果を認め、MYCN 遺伝子の発現抑制を認めた。そこでその増殖抑制効果がアポトーシス誘導効果によるものかどうか Annexine V、7AAD を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシス誘導の有無の確認を行った。アポトーシスの初期段階では、細胞膜の完全性は保たれているが、膜のリン脂質の非対称性が失われる。それに伴い、細胞膜の内側に局在する陰性荷電リン脂質のフォスファチジルセリン (PS) が細胞表面に露出するため、 Ca^{2+} 依存性のリン脂質結合タンパクである Annexine V が PS に選択的に結合する。一方細胞膜の構造自体は保たれているため DNA のシトシン-グアニン塩基対の間に結合する 7-アミノ-アクチノマイシン D (7-AAD) は結合できない。これらを蛍光標識しフローサイトメトリーを行うことによりアポトーシスの解析を行った。その結果、match ポリアミド投与群において mismatch ポリアミド投与群と比較しアポトーシスが誘導される傾向にあった。

g. アポトーシス抑制遺伝子 MDM2 の発現の確認

MYCN による転写の調節を受ける遺伝子のうち、MDM2 遺伝子は P53 との相互作用によりアポトーシス抑制していることが報告されている。match ポリアミドを CHP134 に投与することで MYCN 遺伝子の発現が抑制されれば、その下流である MDM2 遺伝子の発現が抑制され、結果 P53 の抑制が解除され、アポトーシス誘導効果を得られる可能性がある。そこで昨年度と同様のポリアミド処理をした細胞から抽出した RNA において、real time RT-PCR 法を用いて MDM2 遺伝子の発現を確認した。その結果、match ポリアミド投与群において mismatch ポリアミド投与群と比較し MDM2 遺伝子の有意な発現低下を認めた。これらにより、match ポリアミドによる一連のアポトーシス誘導効果は、MYCN 発現低下に起因するその MDM2 の発現低下を介して引き起こされている可能性が示唆された。

なおこれまでの研究成果については平成 22 年度、第 110 回日本外科学会、第 69 回日本癌学会、42th International Society of Pediatric Oncology において発表しており、今後平成 23 年度、第 111 回日本外科学会において報告予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成 22 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23 年 4 月 28 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 江 角 眞 理 子



所属・資格 医学部・准教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注: 該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	マイクロダイセクション・プロテオミクス融合による新規病態分子の解明と診断への応用	
3 研究目的	本研究では、より正確な新規病態分子を解明するために、病理組織標本を対象に顕微鏡下で標的細胞を採取するレーザーマイクロダイセクションと疾患プロテオミクスとの融合をはかり、新規病態分子や微小環境と病態との関わりを解明する。ここでは、肝細胞癌再発および発癌機構、また口腔癌制御を例に、疾患メカニズムのより厳密な解明および新しい診断マーカー、治療ターゲットを明らかにする。また非腫瘍性病変—ウイルス感染症、椎間板変性—にも応用を試み、感染制御や変性の分子機構解明や治療戦略への応用を模索する。	
4 研究概要	ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いたマイクロダイセクション・プロテオミクスを実施することにより見いだした分子および微小環境について、病変、病態との関わりを解明する。1) 肝細胞癌の再発・発癌に関わるマーカーおよびその意義を解明するために、再発難易に関わる微小環境解析を行った。2) ウイルス感染制御の微小環境因子の1つと思われる細胞膜セリンプロテアーゼの機能を検討した。3) 口腔癌微小環境—血管新生とリンパ管新生—の制御を解明するため、ヒストンアセチル化酵素による制御を検討した。4) 椎間板の変性メカニズムを場所および細胞特異的にとらえるため、局所でのタンパク質発現変動から解析した。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 江角 眞理子 ・研究分担者 (役割分担) 高山 忠利 (肝細胞癌症例の収集と予後調査) 小宮山 一雄 (白板症と扁平苔癬の組織マイクロダイセクションと解析) 杉谷 雅彦 (マイクロダイセクション) 黒田 和道 (微量サンプル対応 nanoLC-MS/MS の樹立) 	

部科校名： 医学部

氏名：江角 真理子

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

1. 肝細胞癌再発(発癌)マーカーについて

C型肝炎ウイルス(HCV)感染者は40人に1人である。日本人の肝細胞癌の8割はHCVが原因である。このウイルスは持続感染しやすく、慢性肝炎、肝硬変を経て、20~30年かけて肝細胞癌に進展する重篤な感染症である。たとえ癌を外科切除できてもその再発は2年で50%に及ぶ。未だに有効な治療法や予防法が模索されている感染症である。我々は、本来ヒトがもつウイルス制御や発癌再発制御因子をとらえ、診断、治療及び予防に役立てることを目指した。すなわち一癌の再発が早い肝臓と遅い肝臓-これらの違いを遺伝子発現レベルで明らかにすることで、これら生体内制御因子を探索した。中でも非癌部からの再発は、既に慢性肝炎肝硬変となった肝組織からの多中心性発癌ともとらえられることから、初期の初発単発癌症例に絞って非癌部の解析を行った。

1) プロテオーム解析による再発難易を決める非癌部の素質について

術後24ヶ月以内再発の15例と術後48ヶ月以内無再発12例を選び、非癌部組織から2D-DIGEを行った結果、複数の再発マーカーを見つけた。その中で早期再発群に発現亢進を示したサイトケラチン19は、肝硬変で最も高く、癌部や正常肝ではほとんど発現が見られなかった。サイトケラチン19については免疫染色像から、胆管上皮に特異的発現を示し、胆管増生そのものを定量していることが予想された。胆管増生(ductular reaction)と繊維化との関連が強く示唆される一方で、以下の観察経緯から2つの作業仮説が考えられた。

サイトケラチン19陽性細胞は、間質の他、肝実質にも点在し、必ずしも胆管上皮細胞とは言えない細胞が観察された。また間質に隣接する肝実質細胞は、これらサイトケラチン19陽性細胞と相互作用するかのように入り組み混在することが多かった。以上のことより、①胆管増生と思われる細胞の中に、サイトケラチン19陽性の特異な肝実質細胞(肝前駆細胞や癌幹細胞に類似)が存在し、前癌細胞としてがん準備状態にあり早期発癌にかかわる。②胆管増生が起こる間質の微小環境が、肝実質細胞に影響を与え癌化へ導く重要な因子となる。そこで以下の実験を進めた。

2) サイトケラチン19陽性細胞に、肝前駆細胞や癌幹細胞がいるか?

これらサイトケラチン19陽性細胞の中に、幼若な肝前駆細胞や癌幹細胞が存在しないか?そのような細胞は、癌前駆細胞として再発や発癌に関わる可能性がないかを検討した。肝前駆細胞マーカーとしてCD34(血液由来幹細胞マーカー)、hepatocyte marker、 α -フェトプロテイン(ラット oval cell marker、がん胎児性抗原)を染色し、癌幹細胞マーカーとしてCD44、CD133を染色し、それぞれサイトケラチン19との二重染色を検討した。その結果、 α -フェトプロテイン以外は皆染まるべき陽性細胞が検出されたが、サイトケラチン19と共に陽性を示す細胞は見られなかった。

3) サイトケラチン19陽性微小環境に、特徴的タンパク質発現がみられるか?

レーザーマイクロディセクションにて間質および実質に分けて切り取り、再発早期群(サイトケラチン19陽性)と遅延群とで、比較プロテオミクスを行った。その結果、tumorigenesis-associated factor や apoptosis-inducing factor が早期再発群の間質に特徴的な発現タンパク質として見いだされた。間質微小環境が癌の再発は発生に関与する可能性が示唆された。

部科校名： 医学部

氏名： 江角 眞理子

研究結果（つづき）

2. ウイルス制御に関する微小環境は？

C型肝炎ウイルス感染症は、高率に慢性肝炎肝硬変を経て肝細胞癌に進展する重篤な感染症である。抗ウイルス剤の開発が待たれる中、宿主本来がもつウイルス制御機構を後押しすれば、それだけでもウイルス増殖を抑え、病態の進展を抑えることができるはずである。慢性肝炎の病態自体はまさにウイルス制御の現れであり、肝組織間質にはリンパ球浸潤や線維化に関わる細胞などがマイクロレベルで観察される。上記1と同様、これら間質プロテオームをウイルス量の違いで比較することにより、ウイルス制御因子の本体を明らかにすることができる。ウイルス量の多い症例と少ない症例の肝組織を用い、まずは比較オミクスを検討した。その結果、ウイルス量の多い肝組織にインターフェロン誘導性遺伝子など、ウイルスを制御すると考えられる遺伝子が複数見つかった。その中で細胞膜セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、ウイルス感染に正の制御因子か負の制御因子か不明であった。今回 *in vitro* 培養細胞感染実験系でセリンプロテアーゼ阻害剤およびトリプシン阻害剤が、ウイルス感染初期を抑えることを見いだした。おそらくヒト肝臓では TMPRSS2 が高発現を示すことにより、ウイルスエントリーを促進し感染に有利に働き、その結果ウイルス量が多く観察されたと考えられた。実際インフルエンザウイルスや SARS ウイルスでは、最近細胞膜セリンプロテアーゼがウイルスエンベロープタンパク質を切断することにより、感染を進行していることがわかってきた。さらにウイルス感染制御に関わる微小環境因子を肝組織マイクロプロテオミクスからも模索中である。

3. 口腔癌の微小環境は？

口腔癌境界病変（上皮異形成・上皮内癌）の適切な診断は、早期治療を可能にし、患者の QOL を得るために肝要である。口腔癌境界病変の診断は生検標本の顕微鏡的診断により行われているが、時として HE 染色では、反応性・再生性上皮異型との鑑別が困難なことがある。そのため、境界病変に特有な診断マーカーの開発が期待されている。今回マイクロダイセクション・プロテオミクス融合からサイトケラチン 17 をはじめとする 35 個のタンパク質が特異的に同定された。

さらにこれら口腔癌では、血管新生やリンパ管新生など微小環境が予後を左右する重要な因子となっている。そこで癌抑制作用が報告されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が、これら微小環境の制御に働くか否かを検討した。その結果、リンパ管新生誘導因子である VEGF-C、VEGF-D や、血管新生誘導因子である PDGF-B、angiopoietin-2 の発現抑制が認められた。一方、血管新生誘導因子 VEGF-A と、cyclooxygenase-2 については、有意な産生上昇が認められ、異なるパスウェイを介して VEGF ファミリーの発現制御のあることも明らかとなった。

4. 椎間板マイクロプロテオームの試み

喫煙は腰痛の危険因子の1つである。腰痛発生機序の1つに椎間板変性があげられる。本研究では椎間板変性機序あるいは再生機序を知る目的で、(1)受動喫煙ラット椎間板と(2)ヒト腰椎椎間板変性症について、椎間板タンパク質の発現を網羅的に解析し、比較プロテオミクスを試みてきた。今回はさらに椎間板組織を髄核、線維輪、軟骨終板にわけ、マイクロダイセクション/プロテオミクス融合により、組織学的変化とタンパク質変化を局所レベルで結びつける試みをした。

1) ラット椎間板マイクロプロテオミクス

4週および8週受動喫煙ラットと、それぞれの非喫煙コントロールラットを準備し、組織学的変化と

部科校名： 医学部

氏名： 江角 眞理子

研究結果（つづき）

アポトーシスの関与を検討した。受動喫煙の影響は軟骨終板で最も強くアポトーシス促進が観察された。また細胞外基質の減少も観察され、これらの影響は髄核へ伝わり、アグリカンおよび II 型コラーゲンの減少をもたらすと同時に髄核細胞の構造変化と組織構築の破壊を引き起こしていた。ここで観察された特徴的な局所変化—軟骨終板細胞と髄核細胞—に注目し、これらで起こる特徴的な変化をタンパク質レベルで解析することを試みた。すなわちこれらの細胞をマイクロダイセクションで切り抜き、プロテオーム解析を行った。その結果、髄核には vimentin, サイトケラチン 8, 19 が特徴的に見つかり、軟骨終板には骨軟骨代謝に関連するタンパク質が髄核よりは優位に発現していた。網羅的 mRNA 発現比較解析では見つけられなかったタンパク質レベルの違いが、明らかになる可能性が示された。

2) ヒト腰椎椎間板マイクロプロテオミクス

ヒト椎間板は、ラットに比べ細胞数が少ない。マイクロダイセクションにて細胞外基質の特徴を、髄核および線維輪について検討した。肉眼的には健常に見えた 36 歳男性の剖検症例について検討したところ、髄核にはラット同様 vimentin が特徴的に発現していたほか、アルファ 2 マクログロブリンが特徴的であった。これはアグリカナーゼ阻害剤として働くことが知られており、プロテオグリカンの維持のため変性に対処している可能性が示された。一方線維輪については、線維化新生を抑制するタンパク質や椎間板変性に関与するとされるタンパク質が特徴的に発現していた。36 歳健常椎間板といえども、すでに変性が進行しつつあることが示唆された。

以上のように、マイクロダイセクション・プロテオミクス融合により、椎間板細胞および細胞外基質に起こる変性メカニズムを、局所で明らかにできることが示された。

【論文発表】

1. Ishibashi M, Wakita T, and Esumi M. 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral replication *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 392(3): 397-402, 2010
2. Shinojima Y, Terui T, Hara H, Kimura MT, Igarashi J, Wang X, Kawashima H, Kobayashi Y, Muroi S, Hayakawa S, Esumi M, Fujiwara K, Ghosh S, Yamamoto T, Held W, and Nagase H. Identification and analysis of an early diagnostic marker for malignant melanoma: ZAR1 intra-genic differential methylation. *Journal of Dermatological Science* 59(2): 98-106, 2010
3. Kudo I, Esumi M, Kida A, and Ikeda M. p53 mutation, but not *in vitro* predictor genes of therapeutic efficacy of cisplatin, is clinically relevant in comparing partial and complete responder cases of maxillary squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 24(4): 851-856, 2010
4. Takagi K, Takayama T, Nagase H, Moriguchi M, Wang X, Hirayamagi K, Suzuki T, Hasegawa H, Ochiai T, Yamaguchi N, Kochi M, Kimura M, and Esumi M. High TSC22D3 and low GBP1 expression in the liver is a risk factor for early recurrence of hepatocellular carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2(3): 425-431, 2011.

部科校名： 医学部

氏名： 江角 真理子

研究結果 (つづき)

5. Matsumoto N, Sawada A, Tanaka T, Okudera M, Yamamura T, Ohki H, Abiko Y, and Komiyama K. Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, regulates lymphangiogenic factors in oral cancer cell line. submitted to Acta Histologica et Cytochemica
6. 中島伸哉、江角真理子：遺伝子多型と疾患感受性遺伝子解析. 脊椎脊髄ジャーナル 23(1): 75-76, 2010
7. 小川剛史、江角真理子：RNA 解析—ノーザンブロット、RT-real time PCR/トランスクリプトーム解析. 脊椎脊髄ジャーナル 23(2): 143-145, 2010
8. 山口裕美、江角真理子：ウェスタンブロットと免疫組織染色. 脊椎脊髄ジャーナル 23(3): 213-216, 2010
9. 間世田優文、江角真理子：プロテオームとプロテオミクス. 脊椎脊髄ジャーナル 23(5): 553-555, 2010
10. 谷口 真、江角真理子：トランスジェニックマウスとノックアウトマウス. 脊椎脊髄ジャーナル 23(6): 635-637, 2010

【学会発表】

1. 山崎浩司、山口裕美、宗像康明、黒田和道、徳橋泰明、江角真理子：受動喫煙ラットを用いた椎間板変性初期モデルにおけるプロテオミクス. 第 39 回日本脊椎脊髄病学会、高知、2010.4
2. 中橋 昌弘、山崎 浩司、間世田 優文、高橋 理恵、石橋 真理子、徳橋 泰明、江角 真理子：受動喫煙ラットにおける椎間板のアポトーシス経路の解明. 第 39 回日本脊椎脊髄病学会、高知、2010.4
3. M Esumi, H Yamaguchi, K Kuroda, Y Munekata, M Sugitani, H Nagase, K Hasegawa, N. Kokudo, H Nakayama, T Takayama. A Role of Non-parenchymal Cells Indicated by Recurrence Proteomics of Hepatocellular Carcinoma from Non-tumorous Liver Tissues. HUPO2010 World Congress Sydney, 2010. 9
4. 山口裕美、黒田和道、宗像康明、杉谷雅彦、長谷川潔、國土典宏、間宮孝夫、高山忠利、江角真理子：肝細胞癌非癌部のプロテオーム解析から見いだされた再発難易マーカー、サイトケラチン 19 陽性細胞の意義. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010. 9
5. 中橋 昌弘、山崎 浩司、間世田 優文、高橋 理恵、石橋 真理子、徳橋 泰明、江角 真理子：受動喫煙ラット椎間板におけるアポトーシスの遺伝子学的および免疫組織学的評価. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2009. 10
6. 江角真理子、石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、菊田幸子、榊原由子、脇田隆宇：C 型肝炎ウイルス感染に対する自然防御について. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 徳島、2010. 11
7. Esumi M, Yamaguchi H, Kuroda K, Munekata Y, Obana Y, Takahashi R, Fuchinoue F, Sugitani M, Nagase H, Takemura T, Minowa T, Hanagata N, Nakayama H, Takayama T. Liver microenvironment containing cytokeratin 19-positive cells associated with the early recurrence of hepatocellular carcinoma. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference – The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics. Chiba, 2011. 3

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成 22 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23 年 5 月 10 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 麦島 秀雄



所属・資格 医学部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注: 該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	臍帯血、臍帯組織幹細胞を用いた新規細胞治療の開発	
3 研究目的	臍帯血や胎盤組織中には多くの未分化細胞が存在することが知られている。一方その局在や特異的細胞表面抗原マーカーなど不明な点が多い。本研究計画では、臍帯血、臍帯組織中に存在する未分化多能性細胞のスクリーニングを行い、同定した多能性細胞を細胞ソースとする新しい再生医療の開発や、難治性免疫疾患に対する細胞治療の開発を目指す。	
4 研究概要	臍帯血、臍帯組織より神経堤由来細胞や免疫制御細胞、造血微小環境を構築できる造血ニッチ細胞などの同定、単離および増幅法の検討を行う。また臍帯血移植における生着促進を目的とした臍帯由来造血ニッチ細胞移植の効果について検討を行う。神経堤由来細胞を用いた難治性神経疾患モデル動物に対する細胞移植効果を評価する。さらに臍帯より誘導した免疫制御細胞の作用機序の解析および慢性炎症性腸疾患モデルやGVHDモデルに対する移植効果の検討などを行う。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 麦島 秀雄 ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 鈴木 孝 (免疫抑制性の分子機構解析) 野呂 知加子 (臍帯幹細胞のスクリーニング) 松本 太郎 (神経堤由来細胞の同定) 小林 寿美子 (臍帯血幹細胞のスクリーニング) 谷ヶ崎 博 (疾患モデル動物を用いた移植実験) 石毛 美夏 (臍帯血幹細胞のスクリーニング) 	

※ホームページ等での公開の () 否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：医学部

氏名：麦島 秀雄

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1. 臍帯血・臍帯由来細胞を用いた神経再生治療法の開発

神経堤由来細胞特異的にGFPを発現するマウス(P0-Cre/Floxed-EGFPダブルトランスジェニックマウス)と野生型マウスを交配し、この表現型を有する出生直前の胎仔(E15.5)を得た。そしてこのマウス胎仔血を採取し、溶血試薬で赤血球を除去後、フローサイトメーターを用いてGFP陽性細胞の同定および細胞表面抗原解析を行った。その結果、マウス胎仔血中に0.05%の割合でGFP陽性細胞が存在することが明らかになった。GFP陽性細胞の大部分は神経堤マーカーであるp75NTRを発現していた。またこのマウス胎仔より胎盤付属組織を採取し、臍帯の凍結切片標本を作製した。そしてGFP陽性細胞の局在や、神経堤マーカーの発現状況を免疫組織化学的に検討した。その結果、臍帯動脈内皮近傍にGFP陽性、p75NTR陽性細胞の存在が少数ながら認められた。これらの実験結果より、臍帯血中や臍帯組織内に神経堤由来細胞が存在することが明らかになった。またヒト臍帯血を単核球分画に分離し、p75NTR陽性細胞を磁気ビーズを用いて単離した。単離したp75NTR陽性細胞からニューロスフェアを形成させ、効率的に細胞を増幅させる至適培養条件を検討した。また神経細胞やグリア細胞への選択的および効率的な分化誘導法を検討した。その結果、20 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml LIF, B27 supplementを含有したDMEM/F12 (1:1)培地で培養することにより、効率よくニューロスフェアが形成され、継代培養が可能であることが明らかになった。また神経細胞への至適分化誘導条件を検討した結果、1 mM β -mercaptoethanol 含有 α -MEMにて24時間培養後、10%FBSと35 ng/ml レチノイン酸を含有した α -MEMにて3日間培養し、その後10%FBS, 5 μ M forskoline, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml BDNFを含有した α -MEMにて7日間培養することにより、80%以上の効率で神経細胞を誘導できることが明らかになった。さらにグリア細胞への至適分化誘導条件を検討した結果、1 mM β -mercaptoethanol 含有 α -MEMにて24時間、10%FBSと35 ng/ml レチノイン酸を含有した α -MEMにて3日間培養後、10%FBS, 5 μ M forskoline, 5 ng/ml PDGF-BB, 10 ng/ml FGF-2, 200 ng/ml Neuregulin1-b1/Heregulin 1-b1 EGF domainを含有した α -MEMにて7日間培養することにより、約90%の効率でグリア細胞を誘導できることが明らかになった。これらの研究成果は、平成22年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「日本大学幹細胞研究フォーラム」(平成23年1月)にて発表を行った。今後、臍帯血由来p75NTR陽性細胞を増幅後、ヌードラット脊髄損傷モデルの傷害部位に移植し、生理食塩水を傷害部位に注射したコントロール群と運動機能の改善の程度を経時的に比較検討する予定である。

2. 臍帯幹細胞のスクリーニングと細胞治療への応用

妊婦よりインフォームドコンセントを得て提供された臍帯組織を胎盤側、胎児側、中央部の3部位に分けて組織標本を作製し、各検体に対して種々の幹細胞マーカーに対する抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、マーカー陽性細胞の局在や発現プロファイルを共焦点レーザー顕微鏡で検討した。また、ヒト臍帯を臍帯動脈(UA)、臍帯静脈(UV)、Wharton's jelly(WJ)に機械的に分離後、酵素処理により細胞を単離した。これにより得られた各分画の細胞に対して免疫染色による細胞表面抗原発現プロファイル、間葉系幹細胞(MSC)の選択的培養法として使用されているCFU-F法や神経幹細胞の選択的培養法として使用されているニューロスフェア法によるコロニー形成能を検討した。その結果、ヒト臍帯組織標本の免疫組織染色ではCD90、CD105、CD146、PDGFR β などMSCマーカーの多くはWJのみならず、UA、UVの内皮周囲にも高発現していた。WJ内では、PDGFR β 陽性細胞がWJ全体にびまん性に分布している一方、CD105、CD90、CD146陽性細胞はWJの血管筋層近傍に高分布または限局する所見が認められた。またUA、UVの内皮周囲には神経堤マーカーであるp75NTR陽性細胞の存在が認められた。p75NTR陽性細胞はペリサイトマーカーPDGFR β 陽性で血管内皮細胞マーカーvWF陰性であり、ペリサイトの形質を有していることが明らかとなった。また、ES細胞様の多能性幹細胞として注目されているMUSE細胞に一致する細胞表面マーカー(SSEA-3陽性かつCD105陽性)を示す細胞の存在を臍帯動脈内皮に認めた。一方、胎盤側、胎児側、中央部といった部位における幹細胞マーカーの明らかな発現差異は認められなかった。

部科校名：医学部

氏名：麦島 秀雄

研究結果（つづき）

CFU-F コロニー形成能は UA、WJ 分画で認められ、特に WJ 分画で高い形成率を示した。ニューロスフェア形成能は WJ、UA、UV いずれの分画でも確認できた。神経分化誘導を行った結果、いずれの分画からもニューロフィラメント 200、 β III チューブリン陽性を示す神経細胞、O4、GFAP 陽性を示すグリア細胞への分化が認められた。これらの結果より ①UA、UV の筋層、②UA、UV の内皮周囲、③WJ、④UA や UV 周囲の WJ のそれぞれの領域には、それぞれ幹細胞マーカー発現プロファイルを異にする数種類の細胞群が存在することが明らかになった。これらの細胞群それぞれの特性や機能を明確にし、選択的採取・増幅法などを検討することで、細胞治療の種々のニーズに適した細胞を臍帯組織より調整できる可能性がある。これらの研究成果は、平成 22 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「日本大学幹細胞研究フォーラム」（平成 23 年 1 月）、第 33 回日本造血細胞移植学会総会ワークショップ（平成 23 年 3 月）、第 10 回日本再生医療学会総会（平成 23 年 3 月）にて発表を行った。今後、ソーティング機能付きフローサイトメーターや、マグネットビーズ法を用いて、臍帯組織より同定した各種多能性細胞（MSC、MUSE 細胞、p75 陽性神経堤由来細胞、造血ニッチ細胞など）を単離し、形質解析や、機能解析、分子機構の解明などを行う予定である。

3. 臍帯血移植における生着促進を目的とした細胞治療法の確立

放射線照射などの移植前処置により、がん細胞と共に骨髄造血微小環境も障害されることが、臍帯血移植において高率に生着不全が起こる原因の一つと考えられている。この仮説を検証し、分子機序を明らかにする目的で、ヒト臍帯血造血幹細胞を増殖維持できるストローマ細胞株（HESS-5）に放射線照射を行い、造血幹細胞維持に関連する分子の発現変化を検討した。HESS-5 に、種々の線量（1, 5, 10, 20Gy）の放射線照射を行い、48 時間後に幹細胞維持関連分子の mRNA 発現や培養上清中の蛋白濃度を測定し、放射線未照射 HESS-5 と比較検討した。また放射線照射した HESS-5 とヒト臍帯血 CD34⁺細胞とを共培養し、増殖させた臍帯血細胞の CD34⁺細胞数や比率をフローサイトメーターにて解析した。その結果、10Gy 以上の放射線照射により HESS-5 からの SDF-1 や Jagged1 の mRNA 発現が未照射細胞に比べ有意に低下し、同時に培養上清中の SDF-1 タンパク濃度も有意に低下することが明らかになった。一方 HESS-5 の臍帯血造血幹細胞の増幅・維持能は、20Gy まで線量を増加させても変化しなかった。つぎに種々の線量（1, 5, 10, 20Gy）の放射線を照射した HESS-5 培養上清を採取し、臍帯血単核球に対する細胞遊走能をマイクロケモタキシスチェンバーを用いて検討した。その結果 10Gy 以上の放射線照射を行った HESS-5 の培養上清は臍帯血単核球の遊走能を約 30%と有意に低下させた。つぎに種々の線量（1, 5, 10, 20Gy）の放射線を全身照射したマウスより骨髄ストローマ分画を単離し、細胞数や発現サイトカイン濃度を未照射マウスと比較検討した。その結果、10Gy 以上の放射線照射によってマウス骨髄ストローマ分画の生細胞数は未照射マウスに比べ約 1/10 に減少していた。また骨髄組織の免疫組織学的検討により 10Gy 以上の放射線照射を行ったマウスの骨髄では、非照射マウスに比較して SDF-1 の発現が著明に減少していることが明らかになった。以上の結果より、骨髄破壊の前処置に相当する線量の放射線照射によって、骨髄ストローマ細胞の減少や SDF-1 の発現・分泌が低下し、移植した細胞の骨髄へのホーミングが障害されることが明らかになった。これらの研究成果は、平成 22 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「日本大学幹細胞研究フォーラム」（平成 23 年 1 月）、第 33 回日本造血細胞移植学会総会（平成 23 年 3 月）にて発表を行った。上記の知見により、骨髄と異なり臍帯血中にはストローマ細胞の含有が少ないため、臍帯血移植に伴いストローマ細胞を補充するといった細胞治療法の有効性が示唆された。今後、放射線照射による骨髄破壊的処置を行った免疫不全（NOD-SCID）マウスにヒト臍帯血造血幹細胞（Lin⁻, CD34⁺, CD38⁻）を移植し、ヒト血液細胞の生着能を評価できるモデル動物を確立するとともに、SDF-1 を高発現することが明らかになっているマウス脱分化脂肪細胞（DFAT）を尾静脈より投与し、経時的に骨髄および末梢血中のヒト血液細胞をフローサイトメーターにて解析し、DFAT が臍帯血生着を促進する作用があるか検討を行う予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23 年 4 月 6 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 岡山吉道



所属・資格 医学部・准教授

退職, 転出の場合は, () 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <u>総合研究</u>	注: 該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	ヒトマスト細胞活性化阻害によるアレルギー疾患の新規治療薬の開発	
3 研究目的	目的1) FcεRIβ鎖がIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化を制御していることを明らかにする。目的2) FcεRIβ鎖のITAM motifのチロシン残基をリン酸化させたペプチドがヒトマスト細胞の活性化を抑制できるかを調べる。目的3) FcεRIβ鎖のITAM motifのチロシン残基をリン酸化させたペプチドがアレルギー患者の粘膜組織におけるヒトマスト細胞の活性化を抑制することを ex vivo で示す。目的4) マウス FcεRIβ鎖のITAM motifのチロシン残基をリン酸化させたペプチドがマウスのアレルギー反応を in vivo で抑制することを示す。目的5) Lynをもつマスト細胞、好塩基球以外の細胞におけるβ鎖のITAM motifのチロシン残基をリン酸化させたペプチドの影響を検討する。	
4 研究概要	FcεRIの架橋後の脱顆粒および脂質メディエーターの産生能, サイトカイン産生能におけるβ鎖の役割を検討する目的にてレンチウイルスベクターを用いたshRNA技術にてヒト末梢血由来培養マスト細胞FcεRIβ鎖の発現抑制をおこなった。FcεRIβ鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではFcεRIの架橋による脱顆粒、PGD ₂ 産生、サイトカイン産生は統計学的有意に抑制された。また、β鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではLynの細胞膜への移行が阻止されていることがわかった。Lynの細胞膜への移行を阻止するため、FcεRIβ鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドをマスト細胞へ導入するとIgE依存性の活性化が抑制された。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 岡山吉道 ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 浅野正岳 (病理学的診断) 秋久俊博 (創薬化学) 照井正 (ヒト皮膚マスト細胞実験指導) 権寧博 (ヒト上皮細胞実験) 	

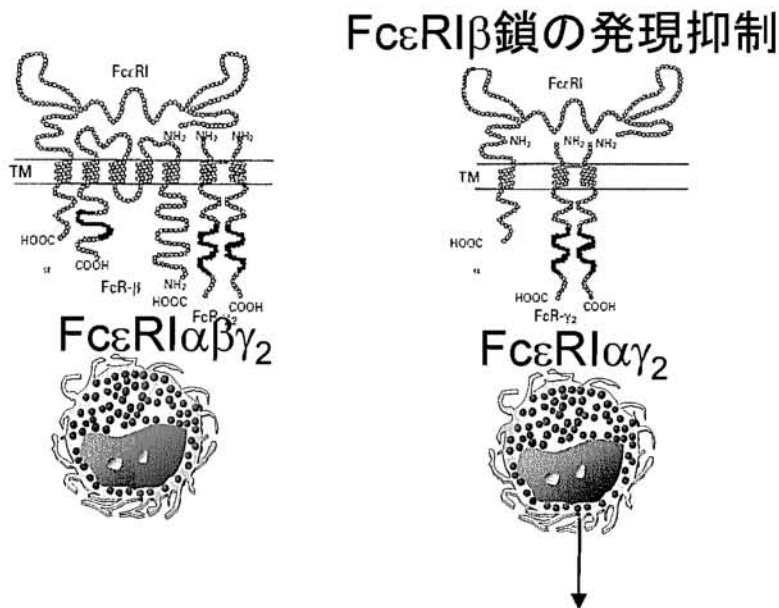
※ホームページ等での公開の(可)否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：医学部

氏名：岡山吉道

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

1. **FcεRIβ鎖は FcεRI のシグナル増幅因子である。** FcεRI の架橋後の脱顆粒および脂質メディエーターの産生能、サイトカイン産生能における FcεRIβ鎖の役割を検討する目的にてレンチウイルスベクターを用いた shRNA 技術にてヒト末梢血由来培養マスト細胞 FcεRIβ鎖の発現抑制をおこなった。FcεRIβ鎖の発現が抑制されたマスト細胞では FcεRI の架橋による脱顆粒、PGD₂産生、サイトカイン産生は統計学的有意に抑制された(未発表)。FcεRI の架橋後にβ鎖は Lyn などの Src kinase によって ITAM のチロシン残基がリン酸化され、同時にチロシンリン酸化されたβ鎖 ITAM に Lyn が会合し、Lyn が細胞膜へ移行するが、FcεRIβ鎖の発現が抑制されたマスト細胞では Lyn の細胞膜への移行が阻止されていることがわかった(下図)。



IgE依存性の脱顆粒, PGD₂産生、
サイトカイン産生が抑制された

FcεRI aggregation	control shRNA			FcεRIβ shRNA		
	image	FcεRIβ	Lyn	image	FcεRIβ	Lyn
-						
(1 min)						
+						

FcεRIβ の発現抑制によりFcεRIαの架橋によるヒトマスト細胞のLynの細胞内局在の変化は抑制された

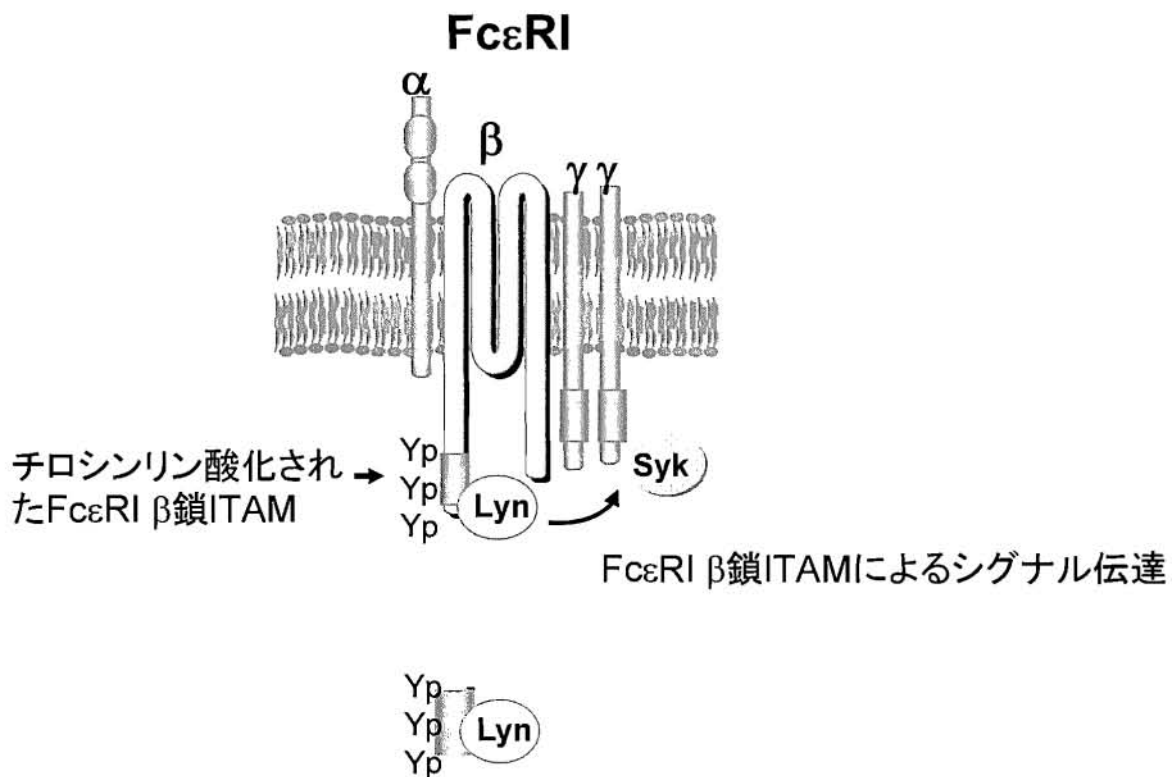
部科校名：医学部

氏名：岡山吉道

研究結果 (つづき)

したがって FcεRIβ鎖が IgE 依存性のヒトマスト細胞の活性化を制御していることがこれらのデータから示唆され、Lyn の細胞膜への移行を阻止することが IgE 依存性のヒトマスト細胞の活性化を抑制できるのではないかと考えドミナントネガティブな効果を期待し FcεRIβ鎖の ITAM チロシン残基をリン酸化させたペプチドに細胞膜透過性ペプチドを結合させたペプチドを作製しその効果を検討した (下図)。

2. FcεRIβ鎖の ITAM のチロシン残基をリン酸化させたペプチドがヒトマスト細胞の活性化を抑制した。FcεRIβ鎖の ITAM のチロシン残基をリン酸化させたペプチドは Lyn に会合した。ヒトマスト細胞をヒトリコンビナント IgE (1 μg/ml) で 24 時間感作したのち、洗浄し、このペプチドあるいはコントロールのペプチド 5 μM と細胞を 10 分 37°C でインキュベートし、抗 IgE 抗体あるいは calcium ionophore で 30 分 37°C でインキュベートしたのちの細胞上清中に遊離されたヒスタミンを測定したところ FcεRIβ鎖 ITAM のチロシン残基を 3 つリン酸化したペプチドおよび外側 2 つのチロシン残基をリン酸化したペプチドが IgE 依存性の脱顆粒を統計学的有意に抑制した。



細胞内に投与されたチロシンリン酸化されたFcεRI β鎖ITAMペプチドはLynと会合し、Lynのβ鎖への会合を抑制



ヒトマスト細胞の活性化の抑制

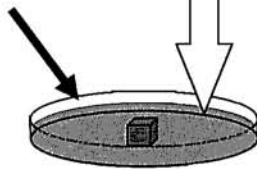
部科校名：医学部

氏名：岡山吉道

研究結果（つづき）

3. FcεRIβ鎖の ITAM のチロシン残基をリン酸化させたペプチドがアレルギー患者の粘膜組織におけるヒトマスト細胞の活性化を *ex vivo* で抑制した。

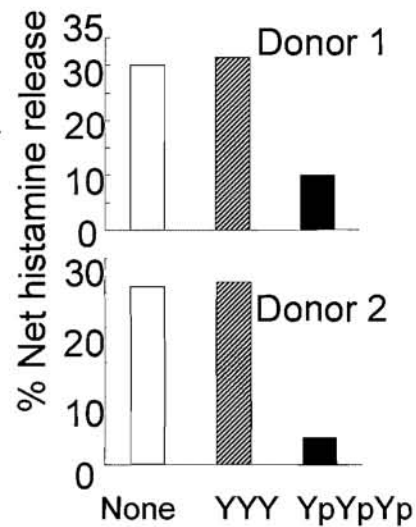
手術で得られたアレルギー疾患患者（アトピー性角結膜炎および春季角結膜炎）および健常人の結膜切片を細切し、無血清培地でこのペプチド(YpYpYp)とコントロールペプチド(YYY)を加え、抗 IgE 抗体を加えインキュベートし、組織上清と組織中のヒスタミンを測定したところ、FcεRIβ鎖の ITAM のチロシン残基をリン酸化させたペプチドが IgE 依存性の脱顆粒を有意に抑制した（下図、未発表）。



春季カタルの巨大乳頭手術組織切片

ペプチド Y-Y-Y
または
ペプチド pY-pY-pY

+ anti-IgE



論文発表の有無	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無	<p>Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, Saito H, Ra C, Okayama Y: Activation of human mast cells through the platelet activating factor receptor. J Allergy Clin Immunol 125(5):1137-1145, 2010.</p> <p>岡山吉道, 松田彰, 布村聡, 佐々木朋美, 羅智靖: マスト細胞と高親和性 IgE 受容体 beta 鎖 臨床免疫・アレルギー科 53(5):481-485, 2010.</p> <p>岡山吉道, 梶原直樹, 佐々木朋美, 羅智靖: 血小板活性化因子 (platelet activating factor; PAF)によるマスト細胞活性化 アレルギー・免疫 17(6):124-129, 2010.</p> <p>岡山吉道, 権寧博, 浅野正岳, 秋久俊博, 照井正, 羅智靖: PAF レセプターによるマスト細胞の活性化 臨床免疫・アレルギー科 54(2):149-154, 2010.</p> <p>岡山吉道, 松田彰, 佐々木朋美, 羅智靖: アトピー関連遺伝子 ST2, IL-33 のアレルギー疾患における発現とその機序 臨床免疫・アレルギー科 54(5):553-557, 2010.</p>
特許出願の有無	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無	<p>「新規ヒトマスト細胞活性化阻害ペプチド、特願 2009-206324 号 出願日 2009-9.7、国際特許出願（出願番号：PCT/JP2010-065689 出願日：2010-9.7）」</p>

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年3月31日

日本大学 総長 殿

氏 名 小林 真之



所属・資格 歯学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	顎顔面口腔領域に生じる感覚の高次脳における制御機構	
3 研究目的	<p>大脳皮質一次味覚野は島皮質に存在し、味覚嫌悪学習など高次味覚情報処理に重要な役割を果たしている。味覚嫌悪学習とは、動物やヒトが新規の味物質を摂取した後で、嘔吐や下痢などの体調不良・内臓不快感を経験すると、時間が経ち体調が元に戻った状態であっても、その味物質の再摂取を忌避するようになる現象のことで、その獲得には GABA 受容体、アドレナリン受容体およびアセチルコリン受容体が重要な役割を果たしていることが報告されている。GABA_A 受容体を介した抑制性シナプス伝達は、経験依存的な大脳皮質可塑性の調節に関与していることが知られている。近年、体性感覚野において、GABA 作動性シナプス伝達が経験依存的な大脳皮質可塑性の臨界期の開始と停止を調節している可能性が報告されており、島皮質における味覚嫌悪学習の獲得においても GABA が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、中枢神経系には、神経機能に対して調節的に働く受容体が存在し、なかでもアドレナリン受容体やアセチルコリン受容体は、各種の神経機能を調節する主要な受容体として注目されてきた。</p> <p>そこで本研究では、抑制性シナプス後電流に対するノルアドレナリンおよびアセチルコリンの作用を明らかにし、その神経作用メカニズムの解明を目的として研究を行った。</p>	
4 研究概要	脳スライス標本を用いたパッチ・クランプ法による研究を行った。その結果、大脳皮質味覚野においてノルアドレナリンおよびアセチルコリンに代表される neuromodulator は、抑制性シナプス伝達を多様な様式で修飾することが明らかとなった。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 小林 真之(研究の立案・遂行と統括) ・研究分担者（役割分担） <ul style="list-style-type: none"> 越川 憲明(動物実験の立案と助言) 藤田 智史(動物実験の遂行) 坪井 美行(動物実験の遂行) 大井 良之(ヒトにおける実験の課題立案) 小川 節郎(ヒトにおける実験の課題立案) 伊藤 芳久(動物実験の立案と助言) 石毛 久美子(動物実験の遂行) 	

※ホームページ等での公開の (可) / (否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：歯学部

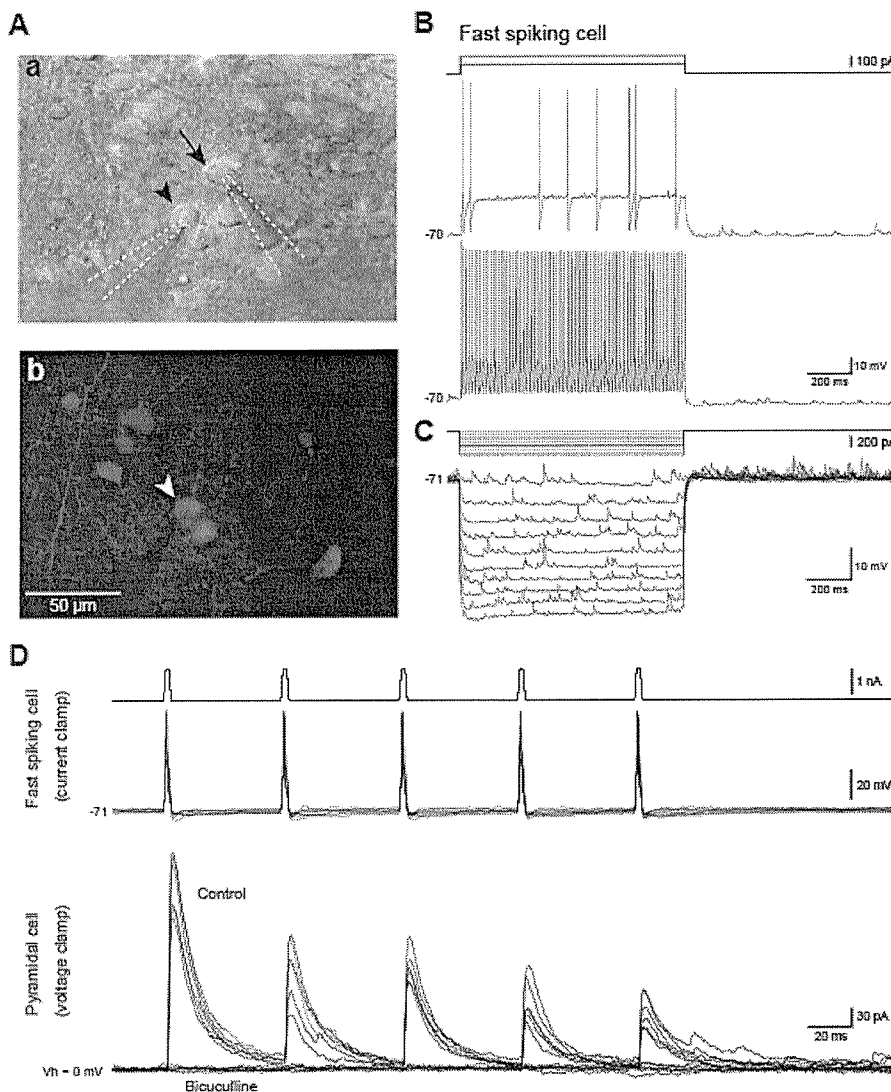
氏名：小林 真之

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

本年度は、多チャンネルホールセル・パッチクランプ記録法を確立し、カテコラミン類の抑制性シナプス後電流(uIPSC)に対する作用について、シナプス前細胞とシナプス後細胞の種類を分類して精細な解析を行った。以下、研究成果の概要と公表された業績(英文のみ)を記載する。

① β アドレナリン受容体活性化による抑制性シナプス後電流の修飾様式

ラット島皮質を含む脳スライス標本を用いて、複数の細胞から同時にホールセル記録を行い、 β アドレナリン受容体の抑制性シナプス伝達に対する修飾作用およびアセチルコリン受容体の抑制性シナプス伝達に対する修飾作用について、シナプス前細胞と後細胞の組み合わせに着目して電気生理学的に検討した。図1は、抑制性ニューロンと興奮性ニューロンからの同時記録の例を示している。



ノルアドレナリン作動性ニューロンは青斑核から大脳皮質に投射しており、これによって放出されたノルアドレナリンは大脳皮質において、 β アドレナリン受容体を介して興奮性あるいは抑制性の神経伝達を調整し、神経の活動性や可塑性を含む生理学的機能の調節に重要な役割を果たしている。 β アドレナリン受容体の興奮性シナプス伝達に対する作用については、これまでの報告により、シナプス前終末からのグルタミン酸の放出を増加させて興奮性シナプス伝達を増強することが分かっている。しかし抑制性シナプス伝達に対する作用については、未だ解明されていない。一方、大脳皮質では、10-20%の神経細胞がGABA作動性介在ニューロンと考えられている。これらのGABA作動性介在ニューロンは、電気生理学的発火特性の違いにより、いくつかのサブタイプに分類できる。GABA作動性介在ニューロンのサブタイプの違いにより、それらの神経機能に対する調節性

図1. 抑制性ニューロンと錐体細胞からの同時ホールセル記録を行った例。(A) ノマルスキー微分干渉像 (a) と同一視野の蛍光像 (b)。 (B) 抑制性ニューロンの特徴的な発火パターンを示す。(C) 抑制性ニューロンに活動電位を発生させることによって錐体細胞で観察された抑制性シナプス後電流。GABA (A) 受容体アンタゴニストの bicuculline によって消滅することが分かる。

研究結果（つづき）

伝達物質受容体の調節効果も異なると考えられており、実際に、fast spiking (FS) 細胞と low-threshold spike (LTS) 細胞では、アセチルコリン受容体の調節効果が異なることが報告されている。したがって、 β アドレナリン受容体は、標的となる GABA 作動性介在ニューロンのサブタイプにより異なる調節効果を持つ可能性が考えられる。

そこで、ラット島皮質第 V 層において GABA 作動性介在ニューロンと錐体細胞から同時にホールセル記録を行い、シナプス前細胞にあたる GABA 作動性介在ニューロンを電気生理学的発火特性の違いから FS, LTS, late spiking (LS) 細胞の 3 種類に分類し、それぞれがシナプスを形成している錐体細胞から記録される uIPSC に対する β アドレナリン受容体の修飾作用について検討した。

その結果、 β アドレナリン受容体アゴニストの isoproterenol (100 μ M) 灌流投与により、FS—錐体細胞間のペアにおいては paired-pulse ratio (PPR) の増加を伴って uIPSC の振幅が減少するものと、PPR の減少を伴って uIPSC の振幅が増大するものの両方が観察された。そこでラットの年齢別に uIPSC の振幅の変化をみたところ、生後 18–29 日齢において正の相関を認めた。一方、LTS—錐体細胞間のペアにおいては、isoproterenol は PPR の増加を伴って uIPSC の振幅を減少させた。また LS—錐体細胞間のペアにおいても、isoproterenol は PPR の増加を伴って uIPSC の振幅を減少させた。以上の結果から、 β アドレナリン受容体はラット島皮質において、シナプス前細胞のサブタイプとラットの年齢依存的に、抑制性シナプス前終末からの GABA の放出を多面的に調節している可能性が示唆された。

②ムスカリン受容体活性化による抑制性シナプス後電流の修飾様式

コリン作動性ニューロンは前脳基底部分から大脳皮質に投射しており、これによって放出されたアセチルコリンは大脳皮質において、ムスカリン性またはニコチン性アセチルコリン受容体を介して、注意や睡眠と覚醒の切り替え、可塑性、学習と記憶などを含む高次脳機能調節に重要な役割を果たしている。アセチルコリンの興奮性シナプス伝達に対する作用については、シナプス前終末に存在するムスカリン性アセチルコリン受容体を介して誘発興奮性シナプス後電位を抑制することが報告されている一方、ニコチン性アセチルコリン受容体が寄与しているとの報告もある。また抑制性シナプス伝達に対しても、シナプス前終末に存在するムスカリン性アセチルコリン受容体を介して錐体細胞から記録される誘発抑制性シナプス後電位や誘発抑制性シナプス後電流を抑制することが報告されている。さらにアセチルコリンは、静止膜電位を脱分極あるいは過分極させて神経活動を調節する。例えば、錐体細胞と LTS 細胞に対しては、アセチルコリンは膜電位を脱分極させて自発的な発火を増強する一方、FS 細胞と late spiking (LS) 細胞の膜電位に対しては作用しないか、むしろ過分極させることが報告されている。このように、アセチルコリン受容体による神経機能調節効果は多面的であり、標的となる細胞の種類によって異なる可能性が考えられる。

そこで、島皮質第 V 層の 2 つまたは 3 つの GABA 作動性介在ニューロンや錐体細胞から同時にホールセル記録を行い、抑制性シナプス前細胞のサブタイプを FS 細胞と non-FS 細胞に分類し、シナプス後細胞との組み合わせに着目して、uIPSC に対するアセチルコリン受容体の修飾作用を検討した。

その結果、アセチルコリン受容体アゴニストである carbachol (10 μ M) は FS—錐体細胞間のペアにおいて、PPR の増加を伴って uIPSC の振幅を減少させ、この効果はムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストである atropine (100 μ M) 前投与により阻害された。FS—GABA 作動性介在ニューロン間のペアにおいては、carbachol 灌流投与により PPR の増加を伴って uIPSC の振幅が減少するペアと、PPR の減少を伴って uIPSC の振幅が増大するペアの両方が観察された。その際、シナプス前細胞が同一の FS 細胞であっても、シナプス後細胞の GABA 作動性介在ニューロンのサブタイプが FS 細胞か non-FS 細胞かの違いによって、carbachol による uIPSC の修飾作用が異なっていた。一方、non-FS—錐体細胞間のペアにおいては、FS—錐体細胞間のペアと同様に carbachol は PPR

部科校名：歯学部

氏名：小林 真之

研究結果（つづき）

の増加を伴って uIPSC の振幅を減少させた。Non-FS—GABA 作動性介在ニューロン間のペアにおいても、FS—GABA 作動性介在ニューロン間のペアと同様にシナプス後細胞の GABA 作動性介在ニューロンサブタイプ依存的に、carbachol 灌流投与により PPR の増加を伴って uIPSC の振幅が減少するペアと、PPR の減少を伴って uIPSC の振幅が増大するペアが観察された。以上の結果から、アセチルコリン受容体はラット島皮質において、シナプス後細胞のサブタイプ依存的に、抑制性シナプス前終末からの GABA の放出を多面的に調節している可能性が示された。

以上の結果は、 β アドレナリン受容体やアセチルコリン受容体などの調節性伝達物質受容体が、抑制性シナプス前終末に作用して GABA の放出を調節している可能性を示しており、この調節作用は、シナプス前細胞やシナプス後細胞のサブタイプ、ラットの年齢によって異なり、多面的であることが明らかとなった。さらに、抑制性シナプス前細胞はシナプスを形成しているシナプス後細胞のサブタイプを認識している可能性が示された。これらの所見は、島皮質において、 β アドレナリン受容体とアセチルコリン受容体が、神経可塑性の発現に極めて重要な役割を果たしていると言われている $GABA_A$ 受容体を介した抑制性シナプス伝達を巧妙に調節することにより、味覚嫌悪学習の獲得に寄与している可能性がある」と推察された。

部科校名：歯学部

氏名：小林 真之

研究結果（つづき）

公表された業績：

- 1) Kobayashi M, Fujita S, Takei H, Song L, Chen S, Suzuki I, Yoshida A, Iwata K, Koshikawa N (2010) Functional mapping of gustatory neurons in the insular cortex revealed by pERK-immunohistochemistry and in vivo optical imaging. *Synapse*, 64: 323-334.
- 2) Fujita S, Adachi K, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Spatiotemporal dynamics of excitation in rat insular cortex: intrinsic cortico-cortical circuit regulates caudal-rostral excitatory propagation from the insular to frontal cortex. *Neuroscience*, 165:278-292.
- 3) Chen S, Fujita S, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Pilocarpine-induced status epilepticus causes acute interneuron loss and hyper-excitatory propagation in rat insular cortex. *Neuroscience*, 166: 341-353.
- 4) Fujita S, Kiguchi M, Kobayashi M, Kinsella A, Koshikawa N, Waddington JL (2010) Assessment of jaw movements by magnetic sensor in relation to topographies of orofacial behaviour in freely moving rats: Studies with the dopamine D(1)-like receptor agonists SKF 83822 vs SKF 83959. *Eur J Pharmacol*, 632: 39-44.
- 5) Fujita S, Kiguchi M, Kobayashi M, Koshikawa N, Waddington JL (2010) Involvement of NMDA receptors in the ventrolateral striatum of rats in apomorphine-induced jaw movements. *Brain Res*, 1322C: 30-37.
- 6) Tomiyama K, Song L, Kobayashi M, Kinsella A, Kanematsu T, Hirata M, Koshikawa N, Waddington JL (2010) Orofacial movements in phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP)-1/2 double knockout mice: effect of the GABAergic agent diazepam and the D1 dopamine receptor agonist SKF 83959. *Synapse*, 64, 714-720.
- 7) Koyanagi Y, Yamamoto K, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Presynaptic interneuron subtype- and age-dependent modulation of GABAergic synaptic transmission by β -adrenoceptors in rat insular cortex. *J Neurophysiol*, 103: 2876-2888.
- 8) Yamamoto K, Koyanagi Y, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Postsynaptic cell type-dependent cholinergic regulation of GABAergic synaptic transmission in rat insular cortex. *J Neurophysiol*, 104, 1933-1945.
- 9) Takei H, Fujita S, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Insulin facilitates repetitive spike firing in rat insular cortex via phosphoinositide 3-kinase but not mitogen activated protein kinase cascade. *Neuroscience*, 170, 1199-1208.
- 10) Kobayashi M (2011) Macroscopic connection of rat insular cortex: anatomical bases underlying its physiological functions. *International Review of Neurobiology*, in press.

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成 22 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23 年 3 月 31 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 今 村 佳 樹



所属・資格 教 授

(受領時の資格)

下記のとおり報告いたします。

1 種 目	一般研究(個人) / 一般研究(共同) / <u>総合研究</u>	注: 該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	バーニングマウス症候群の病態解明に関する研究	
3 研究の目的	バーニングマウス症候群（以下BMS）の発症には、末梢神経障害（神経因性疼痛）の側面と精神活動の影響の側面とが関与している可能性があり、BMSの病態研究ではこれらを統合した研究計画を立てる必要がある。本研究では、神経因性疼痛としての発症機序を検討するために、中枢におけるマップキナーゼの活性化を指標として末梢の感覚受容を変化させた場合の疼痛発現様式の検討を行い、これと並行して、BMS患者における疼痛に対する生体反応を免疫・内分泌系の動態と脳活動を指標に明らかにする。	
4 研究の概要	研究は、3つの実験からなり、第1の実験は、ラットを用いた鼓索神経損傷後の痛覚の変化に関する実験で、鼓索神経から孤束核への入力が三叉神経から中枢への入力を変調しうるかを調べるものである。第2の実験は、BMS患者と健康対照を用いて免疫・内分泌系の疼痛への関与を調べるもので、BMS患者に特有な免疫反応が背景として存在しているかを検討する。第3の実験は、BMS患者における侵害刺激に対する脳活動の特異性を調べるもので、各種刺激に対する脳の反応をfMRIを用いて観察する。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 今村佳樹（研究成果の統括） ・ 研究分担者（役割分担） 岩田幸一（脳賦活部位の解析） 浅野正岳（血液検査における免疫学的検討） 岡田明子（研究モデルの作製、行動学的検討） 小池一喜（心理検査の解析、評価） 篠崎貴弘（fMRI撮像、刺激の付与） 	

※ホームページ等での公開の（☑・否） いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：歯学部

氏名：今村佳樹

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

1) ラットにおける鼓索神経傷害時の三叉神経からの入力調整について

ペントバルビタール麻酔（50 mg/kg）下に7週齢のラットを用いて、左側の耳介を切除して鼓膜を明示し、鼓索神経を切断した群（鼓索神経傷害群）と、耳介の除去と鼓膜の切開のみを行い鼓索神経は温存した群（Sham群）を作製した。手術から7日後に再度ペントバルビタール麻酔下に手術側の舌の前方2/3に von Frey filament を用いて侵害刺激を加え、その際のMAPキナーゼ（Extracellular signal-regulated kinase: ERK）のリン酸化を指標に疼痛の発現様式を観察した。その結果、鼓索神経傷害群では、手術側ならびに反対側の三叉神経脊髄路核尾側亜核において、ERKのリン酸化の亢進が著明に認められ、加えて孤束核においても、両側性に著明な亢進が認められた。この三叉神経脊髄路核尾側亜核ならびに孤束核におけるERKのリン酸化は、Sham群と鼓索神経傷害群において、舌に非侵害刺激を加えた場合には、ほとんど見られず、両群間には有意差が見られなかった。一方、このERKリン酸化は、Sham群においても認められたが、その程度は、鼓索神経傷害群で有意に強かった。また、この三叉神経脊髄路核尾側亜核ならびに孤束核におけるERKリン酸化は、手術後7日にカプサイシンを手術側舌の同部位に注入したモデルにおいても、同様に鼓索神経傷害群で有意に強かった。これらの結果から、第1にこのERKのリン酸化は、侵害刺激が加わったことによる脳幹部での反応であり、さらに鼓索神経の傷害がその侵害受容反応を増強したと考えられた。第2に鼓索神経からの味覚情報入力途絶えると、三叉神経からの侵害刺激入力が増大することがうかがえた。

次に、味覚刺激が三叉神経の侵害情報をコントロールする可能性について、上記の実験モデルを用いて検討を加えた。上述の鼓索神経切断手術またはSham手術7日後にペントバルビタール麻酔下に20%ショ糖液を含ませた綿棒をラットの舌の上に置いて1分放置したのちに、上述の侵害刺激を加えてERKのリン酸化を観察した。その結果、鼓索神経傷害群とSham群の双方において、20%ショ糖前投与によってERKリン酸化発現の程度には有意な変化は見られなかった。このことから、20%ショ糖は、三叉神経における侵害刺激入力に明らかな変調を及ぼさないことが考えられた。従来の報告からは、甘味刺激が疼痛強度を減弱させることが認められているので、本研究で与えた刺激が適当でなかった可能性も考えられる。今後、味覚の種類、濃度を変化させて検討を加える必要がある。

2) BMS患者における免疫・内分泌系反応の特性について

第2の実験として、BMSの持つ病態の特異性を患者において検討した。BMSは、従来、心理ストレスと密接な関係があるとされ、この側面からの病態解明がなされてきたが、近年、末梢神経と中枢神経系を含めた神経因性の機序が提唱されている。このことから、心理ストレス/情動系の影響以外での病態を検討することとした。BMSに特有の病態を検討するためには、研究対象の持つ心理背景の影響を排除する必要があった。このため、まず心理検査を用いて、不安(MAS)とうつ状態(SDS)の状態を検査し、これらの心理状態と性別(女性)、年齢において有意差のないように、BMS患者47名(BMS群:平均49.5歳)と対照患者22名(対照群:平均52.9歳)を設定し、この2群を研究対象とした。BMS群と対照群においては、MASの得点はそれぞれ、 20.3 ± 1.33 と 18.3 ± 1.94 、SDSの得点はそれぞれ 42.1 ± 1.48 と 41.9 ± 2.27 と、2群間でほぼ同等であり、これら2群の抱える不安とうつ状態に差異はないと考えられた。したがって、以下の観察項目における2群間の差異は、心理ストレスに影響されない機序によるBMSの病態の特徴を表すと考えられた。

BMS群と対照群において、免疫機能を観察するために、血漿T細胞数、B細胞数、CD4リンパ球数、CD8リンパ球数、CD4/CD8比、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)活性値を測定し、内分泌機能を観察するために、コルチコトロピン放出ホルモン(CRH)濃度、ACTH濃度、コルチゾール濃度、アドレナリン濃度、ノルアドレナリン濃度を測定した。その結果、NK細胞活性値は、BMS群で $30.9 \pm 2.43\%$ 、対照群で $38.7 \pm 3.20\%$ 、血症アドレナリン濃度はBMS群で 27.1 ± 2.23 pg/ml、対照群で 36.3 ± 3.93 pg/mlと、それぞれBMS群が対照群に比較して著しい低値($p=0.033$ と $p=0.031$)を示し、一方でCD4/CD8比はBMS群で 2.17 ± 0.15 、対照群で 1.64 ± 0.12 と、BMS群において対照群と比較して著しい高値($p=0.045$)を示した。

部科校名：歯学部

氏名：今村佳樹

研究の結果（つづき）

また、血漿ACTH濃度は、BMS群において対照群より低値を示す傾向にあった ($p=0.084$)。これらの差異を統計学的手法を用いてさらに検討したところ、ロジスティック回帰分析においては、CD4/CD8比の値が、オッズ比 19.13 と極めて高い値を示しており、これら2群を識別するうえで最も重要な変数であることが示された。さらに、線形回帰分析の結果からは、不安の強度(MAS値)と血漿ACTH濃度が強い相関関係 ($p=0.041$) を有していることが判明した。

これらの結果から、慢性の不安状態はCRHの受容体の感受性を減弱させ、HPA（視床下部－下垂体－副腎）軸に影響してACTHの分泌を抑え、血漿アドレナリン濃度を低くしたものと考えられた。すなわち、本研究におけるBMS患者におけるACTHの低値は慢性的な不安状態を反映している可能性が示唆された。一方、SA（交感神経－副腎）軸や自然免疫、獲得免疫への影響は、心理状態とは直接関係したのではなく、BMSにおける特異的な病態が影響を与えているものと考えられた。特に、CD4/CD8比はBMSの病態を知る上で重要な指標であると考えられた。

3) BMS患者における侵害刺激に対する脳活動の特性について

実験3ではBMS患者群と対照群（健常者）に侵害熱刺激を与え、その際の脳活動の差異を観察した。対象は18名の女性BMS患者と性別年齢を一致させた18名の心身共に健康なボランティアとした。被験者には右側手掌と右側下口唇に熱刺激を与えた。熱刺激には、コンピューター制御された10mm角のペルチエ素子を用いて、ベースラインとして30度、そして加温時として40度と49度の温熱を加えた。また、自覚する痛みの強さは、visual analogue scale (VAS) を用いて定量的に評価した。これらの熱刺激は、32秒サイクルのブロックモデルを用いて加え、各相においてfunctional-MRI（以下f-MRI）により脳活動を記録した。この研究デザインで観察した脳活動をハードディスク上に記録し、後刻、MATLAB（Mathworks Inc., Natick, MA, USA）およびSPM5（Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK）、AFNIソフトを用いて、標準脳上でマッピングを行い、脳活動状態を演算で求め、統計処理を行った。有意差の検定は、補正なしで5%の危険率をもって有意差ありとみなした。

その結果、BMS群では、口唇の侵害熱刺激時のVAS値は、対照群に比べ明らかに高値を示し、疼痛の強度は強かった。脳の賦活部位については、BMS群では下口唇に侵害熱刺激を与えた場合、刺激側の前帯状回、中心前回、前頭前皮質に亢進が見られた。一方、対照群では、前頭回以外では顕著な脳の賦活は認められなかった。右側手掌における熱刺激では、BMS群は、中心前回、上前頭回、前帯状皮質において脳賦活の亢進が見られた。対照群では、中心前回、前頭皮質と下側頭回に脳賦活が見られた。手掌刺激時には、口唇の刺激時ほど各部位での脳活動の亢進が見られなかったことは、口唇刺激がBMS患者における病態解明に有用となると考えられた。

BMS患者において、口唇刺激時も手掌刺激時も、帯状回前部の賦活が健常者よりも増強されており、疼痛がより情動的な側面から影響を受けている可能性がある。手掌に刺激を加えた時に比べ、下唇に熱刺激を加えた際にBMS患者でより強い脳活動が認められたことは、口腔組織の刺激によって、中枢が過敏に反応していることを示しており、侵害刺激時の疼痛感覚の増強、すなわち痛覚過敏を呈していたことが考えられる。

以上の3つの実験結果をまとめると、動物モデルを用いた研究からは、BMSの発症には、鼓索神経と三叉神経の脳幹部における痛みの修飾が関係している可能性がうかがわれた。侵害受容入力に鼓索神経を介して孤束核に至れば、孤束核から三叉神経脊髄路核尾側亜核に抑制性の調節を行う機構を賦活して、痛みを制御しているのかもしれない。鼓索神経の損傷は、この機構を働かなくすることで、脱抑制を起こして疼痛の増大をもたらす可能性がある。また、BMS患者の血液検査からは、BMSは、免疫・内分泌機能を含めた機序によっても影響を受けており、従来言われている心理的要因だけによって痛みが生じているものでもないことを示唆している。一方、痛みのイメージングを用いた研究結果からは、BMS患者では侵害刺激に対する高位中枢の反応で、前帯状回の活動が亢進しており、痛みの認識に情動が深く関与している可能性が示唆された。このように、BMSの疼痛においては、末梢から中枢までさまざまなレベルで特徴的な疼痛認識の機序が存在するようである。これまでに得られた結果からは、外部刺激（味刺激）が疼痛認識を変調する事実は得られなかったが、今年の研究では、上述の仮説の妥当性を検討するため、研究をさらに進める予定である。


課題番号	総 10-035
------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成23年3月31日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 小方 頼昌 印

所属・資格 松戸歯学部 ・ 教授

退職,転出の場合は, () 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	歯周組織再生における転写因子と骨シアロタンパク質の役割	
3 研究目的	歯周病は、プラーク細菌が原因で引き起こされる炎症性疾患であり、炎症が歯肉に局限する歯肉炎と、歯を支える歯根膜や歯槽骨に炎症が波及した歯周炎に分けられる。歯周炎では炎症が歯周組織深部にまで及び、付着の喪失と歯槽骨吸収が生じる。歯周病は多因子性疾患であり、細菌因子、宿主因子および環境因子の3者が複雑に影響し合い発症、進行すると考えられる。そこで、骨芽細胞および歯周組織再生のマーカーとして石灰化結合組織特異的に発現し、アパタイト結晶形成能を有する骨シアロタンパク質 (BSP) を用い、BSP の発現と転写因子の関係に注目して歯周組織再生を制御する転写因子と BSP の発現調節機構との関係を明らかにすることを目的とする。	
4 研究概要	BSP の発現を促進する因子の検索を行い、歯周組織再生への臨床応用の足がかりとするために、骨芽細胞様細胞を歯周組織再生を誘導するエムドゲイン (エナメルマトリックスメディリバティブ; EMD)、リコンビナントアメロジェニン (rAmelogenin) または精製ブタアメロジェニン (25k、20k、13k および 6kDa) で刺激し、BSP の遺伝子発現と転写因子の発現変化を検討する。さらに、EMD、rAmelogenin および精製アメロジェニンの未分化間葉細胞に対する効果を検索する。転写因子と歯周組織再生に関してターゲットを当てた研究はほとんど無いことから、独創的な研究であると考えられる。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 小方 頼昌 (研究総括・分子生物学的解析) ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 落合 邦康 (細胞内情報伝達系の解析) 大島 光宏 (タンパク質発現調節の解析) 加野浩一郎 (細胞分化機構の解析) 大場 茂夫 (再生医学への応用解析) 木場 秀夫 (病理組織学的解析) 増永 浩 (細胞生物学的解析) 中尾 寿美 (転写調節機構の解析) 高井 英樹 (転写因子の結合能の解析) 	

※ホームページ等での公開の 可) 否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：松戸歯学部

氏名： 小方 頼昌

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

1. 細胞培養

骨芽細胞様細胞として ROS17/2.8 細胞を用いた。10%ウシ胎児血清 (FCS) を含む α -MEM 培地を使用して培養を行い、60 mm 培養ディッシュ中で細胞がコンフルエントになるまで培養した後、無血清の α -MEM 培地で 12 時間培養した。ROS17/2.8 細胞は、各種濃度のエムドゲイン (エナメルマトリックス デイリバティブ ; EMD)、rAmelogenin (rP172, full-length native porcine P173) または精製ブタアメロジェニン (25k、20k、13k および 6kDa) にて 12 時間刺激後に細胞を回収した。EMD、rAmelogenin または精製アメロジェニンにて刺激後の BSP mRNA 発現の経時的変化を検索するために、細胞を上記因子にて刺激後、3、6、12 および 24 時間後に細胞を回収し、ノーザンハイブリダイゼーション法で検索した。

2. ノーザンハイブリダイゼーション法

回収した ROS17/2.8 細胞よりグアニジンチオシアネート法にて RNA を抽出し、20 μ g の全 RNA を 1.2% アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写した。BSP、Osteopontin および Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の cDNA を、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP で標識し、ハイブリダイゼーション後、フジ BAS 2000 イメージングアナライザーで解析を行った。

3. プラスミドの作製

ルシフェラーゼプラスミドを、制限酵素 HindIII および Sal I で切断し、種々の長さに調節したラット BSP 遺伝子プロモーター配列を挿入した。作製したコンストラクトは、pLUC1 (-18~+60 塩基対)、pLUC2 (-43~+60 塩基対)、pLUC3 (-116~+60 塩基対)、pLUC4 (-425~+60 塩基対)、pLUC5 (-801~+60 塩基対)、pLUC6 (-938~+60 塩基対) で、pLUCB は、プロモーター配列を含まないルシフェラーゼプラスミドである。次に、pLUC 3 および pLUC 4 に含まれるプロモーター配列の長さを調節し、pGL3Basic に挿入して、-43BSPLUC (-43~+60 塩基対)、-60BSPLUC (-60~+60 塩基対)、-84BSPLUC (-84~+60 塩基対)、-108BSPLUC (-108~+60 塩基対)、-116BSPLUC (-116~+60 塩基対)、-280BSPLUC (-280~+60 塩基対) を作製した。さらに、Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit を用いて、BSP プロモーターの -116~+60 塩基対上流までのプロモーター配列に 2 塩基ずつ変異を挿入したミュレーションルシフェラーゼプラスミドを作製した。全てのミュレーションプラスミドは、作製後にその塩基配列の確認を行った。

4. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイにて、遺伝子プロモーターの転写活性の検索を行った。ルシフェラーゼプラスミドを細胞に導入する 1 日前に、ROS17/2.8 細胞を 35 mm ディッシュに播種し、細胞が 40~70% コンフルエントの状態、ルシフェラーゼプラスミド (1 μ g) とコントロールとして β -Gal プラスミド (2 μ g) を、リポフェクタミンを用いて細胞に導入した。プラスミドを導入した ROS17/2.8 細胞は、10% FCS を含む α -MEM 培地で 2 日間培養後、無血清培地で 12 時間培養し、EMD、rAmelogenin または精製アメロジェニンで 12 時間刺激後細胞を回収した。細胞は、細胞溶解液 (125 μ l) にて溶解後、遠心し、上清を活性の測定に用いた。20 μ l の上清と 100 μ l のルシフェラーゼ基質を混合し、ルミネッセンスリーダー AccuFLEL Lumi 400 (アロカ 社) にてルシフェラーゼ活性の測定を行った。プラスミドの導入効率を補正する目的で、60 μ l の上清と 66 μ l の β -Gal 基質を混合し、37°C で 12 時間インキュベート後、420 nm で吸光度を測定し、活性値の補正に用いた。

5. ゲルシフトアッセイ

ルシフェラーゼアッセイの結果から、BSP プロモーター中の転写因子結合配列と推定される配列部分を合成し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP にて標識を行った。ROS17/2.8 細胞を EMD、rAmelogenin または精製アメロジェニンにて経時的に刺激後、核内タンパク質を抽出した。核内タンパク質には、緩衝液 (10 μ M Tris-HCl、

部科校名：松戸歯学部

氏名： 小方 頼昌

研究結果（つづき）

50 μ M KCl, 1 μ M DTT, 0.04% NonidetP-40, 5% glycerol, 0.5 μ M EDTA, pH 8.0) と 1 μ g/ μ l polydI-dC を加え、アイソトープ標識したオリゴヌクレオチドを添加し、20 分間室温でインキュベート後、5% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。ゲルを乾燥後、イメージングプレートに 12 時間コンタクトし。イメージングアナライザー (BAS 2500) にて解析を行った。

6. 結果

BSP の発現を石灰化および歯周組織再生の指標として、EMD およびエナメルマトリックスタンパク質の約 90%を占めるアメロジェニンの BSP の遺伝子発現に対する効果を検索した。骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞を、EMD (50 μ g/ml)、rAmelogenin (1 μ g/ml) および精製アメロジェニン (25k、20k、13k および 6kDa ; 100 ng/ml) で刺激すると、EMD は BSPmRNA 量を刺激 12 時間後に、rAmelogenin は、刺激 3 時間に BSPmRNA 量を増加させ、12 時間後に最大に発現を誘導した。精製アメロジェニンは、BSPmRNA 量を刺激 3 時間後から増加させ、25k および 20kDa は 12 時間後に、13k および 6kDa アメロジェニンは 6 時間後に最大に誘導した。

ルシフェラーゼアッセイの結果、EMD は転写開始点から-424 塩基対上流までの BSP プロモーター配列を含む pLUC4 (-424~+60)、rAmelogenin は、-116 塩基対上流までのプロモーター配列を含む pLU. C3 (-116~+60)、pLUC4 (-424~+60) および pLUC5 (-801~+60) ルシフェラーゼコンストラクトの転写活性を上昇させた。精製アメロジェニン (25k、20k、13k および 6kDa) は、pLUC3 (-116~+60) の転写活性を上昇させたが、6kDa アメロジェニンだけが pLUC4 (-424~+60) の転写活性を上昇させた。

ゲルシフトアッセイの結果、EMD は Homeodomain protein-binding site (HOX; -194~186) および TGF- β 応答配列 (TAE; -499~485) への核内タンパク質の結合を 3 および 12 時間後に増加させ、rAmelogenin は、FGF2 応答配列 (FRE; -92~85) と TAE への核内タンパク質の結合を 12 時間後に増加させた。25kDa アメロジェニンは、FRE、HOX および TAE への核内タンパク質の結合を刺激 3 時間後に増加させたが、6 時間後にはコントロールレベルに戻った。20kDa アメロジェニンは、FRE、HOX および TAE への核内タンパク質の結合を刺激 6 時間後に増加させ、12 時間後にはコントロールレベルに戻った。13k および 6kDa アメロジェニンは、FRE、HOX および TAE への核内タンパク質の結合を刺激 3 時間後に増加させ、6 時間後に最大となり、12 時間後にはコントロールレベルに戻った。

7. 考察

以上のことから、EMD およびアメロジェニンは、BSP の転写を促進することが明らかになった。EMD 中には、エナメルマトリックスタンパク質以外に TGF- β および骨誘導因子(BMP)等の成長因子が含有されることから、それらの因子が共同で作用して上皮細胞の増殖を抑制し、間葉系細胞の分化を誘導して、歯周組織再生を誘導すると考えられた。アメロジェニン遺伝子欠損マウスはエナメル質異形成症を示し、歯根吸収および BSP の発現の減少が認められる。このことは、BSP の遺伝子発現にアメロジェニンが深く関与することを示している。アメロジェニンは、細胞外マトリックスタンパク質であるが、BSP の発現に対してシグナル分子として働き、転写を促進したと考えられた。今後、EMD 中のその他の成分の BSP の転写に対する効果を検討することにより、EMD の真の効果を解明したい。BSP の発現を促進する成長因子、PGE2、ホルモンやリポ多糖 (LPS) による BSP の転写調節機構を明らかにし、歯周組織再生への臨床応用の足がかかりとしたい。骨髄由来未分化間葉系幹細胞 (MSC) に転写因子を発現または骨芽細胞で発現する転写因子をノックダウンし、骨芽細胞への分化や骨再生にどの様な転写因子群が重要であるか、さらに、骨髄由来細胞中の未分化間葉系幹細胞による歯周組織再生を目指す。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成23年3月31日

日本大学 総長 殿

氏 名 安孫子 宜光



所属・資格 松戸歯学部・教授

退職、転出の場合は、()書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	機能ゲノム科学の応用による歯周病の予防治療戦略	
3 研究目的	<p>主要な歯周病原菌である <i>fimA II P. gingivalis</i> ゲノムプロジェクトを完成し、日本大学の総情センターを基盤に比較ゲノム科学情報を含むゲノムデータベースを世界に向けて発信して世界の歯周病研究者に役立てる。そして、このゲノム情報を基盤に、効果的な新規治療標的分子を探索し、特定に成功した標的分子に対して、臨床で実用可能な安全性の高いヒト型中和抗体の作製と歯周病、歯科界では初といえるゲノム創薬の開発を試みる。また、本研究の研究成果を網羅的有機的に利用できるようなデータベースを構築し、歯科界の共通財産として公開することで歯周病撲滅のための研究推進に役立てる。</p>	
4 研究概要	<p><i>fimA II</i> 型 <i>P. gingivalis</i> TDC60 株の全ゲノム計画を完成し、<i>fimA I</i> 型(ATCC3327)と IV 型株 (W83) との比較ゲノム科学的データベースを構築する。分子標的治療を目指して、宿主組織定着因子、結合組織破壊因子、バイオフィルム形成因子、オートファジー応答因子、などの治療標的分子をゲノム/プロテオームデータベースを応用して治療標的分子を特定する。そして、免疫療法とゲノム創薬の開発を目指して、標的分子となる病原因子の組換えタンパクを精製し、組換えタンパクを用いて、ヒト型抗体ファージ ディスプレイ可変部位抗体を作成する。また、結晶化し、立体構造の決定に成功している多機能の標的分子 40-kDa 外膜タンパクに対して <i>in silico</i> スクリーニングを行ないリード化合物の探索を行なう。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<p>・研究代表者 安孫子 宜光 松戸歯学部・教授 (研究の総括および Gene Chip/情報伝達系データベース解析)</p> <p>・研究分担者 (役割分担)</p> <p>飯島 洋 薬学部・教授 (IT 創薬、ゲノム創薬)</p> <p>田中 寅彦 医学部・准教授 (ヒト型抗体の作出)</p> <p>柴田 恭子 松戸歯学部・講師 (ゲノムプロジェクト、標的分子の特定、遺伝子組換え実験)</p> <p>平塚 浩一 松戸歯学部・講師 (抗体の中和機能の検定)</p> <p>岡野 総一郎 松戸歯学部・助教 (プロテオーム解析、標的分子の特定)</p> <p>高宮 知子 薬学部・助教 (IT 創薬、ゲノム創薬)</p>	

※ホームページ等での公開の (可)・否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：松戸歯学部

氏名：安孫子 宜光

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

進行性歯周炎患者のほとんどに *P. gingivalis* が感染しており、その70%がFimA II型 *P. gingivalis* であること、さらに、健常者においても *P. gingivalis* の存在が認められるが（1/3の健常者に存在）、その80%はI型 *P. gingivalis* であることが報告されている。しかし、日本国内外を問わず、ATCCからの細菌株の入手が可能なI型 *P. gingivalis* に対しての研究が主流であり、このことが *P. gingivalis* 研究が多くなされながらも、今まで歯周病撲滅に至らなかった原因の一つではないかと考えられる。そこで、当研究では、最も有力な病原菌としてFimA II型 *P. gingivalis* (TDC60) のゲノムプロジェクトを開始し、ついに完結した。これらのことからII型とI型を比較してII型で発現している病原因子は治療標的分子として重要と考え、プロテオミクス研究を応用してTDC60 (II型) に特異的に発現する分子の探索と解析を行った。

始めに *P. gingivalis* W83 (IV型) とTDC60 (II型) の二次元電気泳動を行い、発現タンパク質分子スポットを比較し、TDC60 (II型) 特異発現タンパク質スポットをMALDI-TOF-MSにて同定した。同時に、菌体および培養液中への分泌試料をマウスに免疫し、TDC60 認識抗体産生ハイブリドーマのライブラリーを作製した。TDC60 (II型) で特異的に発現する70 kDa タンパク質分子をはじめ、TDC60 (II型) で特異的に発現している分子について解析を行い、*P. gingivalis* TDC60 (II型) の特異な治療標的分子として有用と考えられる分子を探索する一方で、全株に共通な病原因子について、特に *P. gingivalis* のヘミン結合タンパク質や赤血球凝集因子の解析を行っており、これらの分子の構造解析から得られる情報を基に、新規治療法の開発を試みる。以下に、具体的な研究成果と発表した科学雑誌を示す。

A. 治療標的分子の探索に関する業績

- Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Abiko Y : Hemin-binding protein 35 (HBP35) plays an important role in bacteria-mammalian cells interactions in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis*. 48:116-23, 2010. (IP=2.289) すでに遺伝子クローニングに成功している40kDaの細胞外タンパク質(40k-OMP)は、共凝集、赤血球凝集因子、そしてヘミン結合タンパク質であることが判明し、塩基配列から決定したアミノ酸配列から理論的分子量は35-kDa hemin binding protein (HBP35)と呼んでいる。今回、この遺伝子欠損株を作成し、共凝集、赤血球凝集活性を失う事、また、HBP35抗体が赤血球凝集因子活性を抑制することを明らかにした。これらの結果から40k-OMP歯周治療標的分子として有用であり、また作成抗体は抗体療法に有用であると考えられる。
- Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranyake LP. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics*. 10:1444-54, 2010. (IP=4.589) 近年、口中 *Candida* が歯周病の原因になる報告がなされている。特に恒高齢者の歯周病に免疫応答を低下させ重要な役割を果たしている。本研究では *Candida* のバイオフィルム形成機序となる因子について、プロテオーム解析を行い、治療標的分子として有用因子を同定した。
- Shoji M, Shibata Y, Shiroza T, Yukitake H, Peng B, Chen YY, Sato K, Naito M, Abiko Y, Reynolds EC, Nakayama K: Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization. *BMC Microbiol.* (E. Pub) 10:152, 2010. (IP=2.877) 40kDaの細胞外タンパク質の局在、チオドレキシン活性、そしてヘミンの役割を明らかにした。
- Ohshima M, Yamaguchi Y, Matsumoto N, Micke P, Takenouchi Y, Nishida T, Kato M, Komiyama K, Abiko Y, Ito K, Otsuka K, Kappert K. *TGF- β signaling in gingival fibroblast-epithelial interaction.* *J Dent Res.*89:1315-1321, 2010. (IP=3.142) 歯周病の発症には歯肉上皮細胞と歯肉繊維芽細胞に細胞相互作用が重要な役割を果たすが、両細胞の3次元培養系においてTGF-betaシグナリングが関与することを明らかにした。

B. 免疫療法に関する業績

- Hijiya T, Shibata Y, Hayakawa M, Abiko Y. A monoclonal antibody against fimA type II *Porphyromonas gingivalis* inhibits IL-8 production in human gingival fibroblasts. *Hybridoma (Larchmt)*. 29:201-204, 2010. (IP=0.321) FimA II型の *P. gingivalis* TDC60no内毒素であるLPSによるヒト歯肉繊維芽細胞のIL-8産生を阻害できる中和抗体MAb-TDC4-33Hの作成に成功した。この新たに作出した抗体は、*P. gingivalis* 感染の歯周病に対する受動免疫療法の開発に有用であると考えられる。

部科校名：松戸歯学部

氏名：安孫子 宜光

研究結果（つづき）

Du Y, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yuzawa S, Abiko Y, Yamamoto M : Nasal immunization with a fusion protein consisting of the hemagglutinin A antigenic region and the maltose-binding protein elicits CD11c(+) CD8(+) dendritic cells for induced long-term protective immunity. *Infect Immun.* 79(2):895-904, 2011. (IP=3.987)

マルトース結合タンパクと *P. gingivalis* ヘマグルチニン融合タンパク抗原の経鼻免疫は CD11c(+) CD8(+) 樹状細胞を活性化して長期の抗体産生を維持し、歯周病の粘膜免疫の開発、実用化を促進する。

C. その他、歯周治療に関する業績

1. Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang CY, Abiko Y, 1. Ishikawa I, Izumi Y: Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Lasers Med Sci.* 25:559-569, 2010. (IP=1.675) Er:Yag レーザーは骨芽細胞を増殖させて骨形成の促進に働く。本研究 MAPK/ERK シグナル伝達系を介していることを明らかにした。

2. Feng SW, Lo YJ, Chang WJ, Lin CT, Lee SY, Abiko Y, Huang HM: Static magnetic field exposure promotes differentiation of osteoblastic cells grown on the surface of a poly-L-lactide substrate. *Med Biol Eng Comput.* 48:793-798. 2010. (IP=1.379)

骨補填剤の Poly-L-lactide 上における骨芽細胞の分化に磁気が促進させることを見いだした。

3. Hirata S, Kitamura C, Fukushima H, Nakamichi I, Abiko Y, Terashita M, Jimi E: Low-level laser irradiation enhances BMP-induced osteoblast differentiation by stimulating the BMP/Smad signaling pathway. *J Cell Biochem.* 111(6):1445-52, 2010. (IP=2.935) 低出力レーザー照射が骨芽細胞の骨形成を促進機序として BMP/Smad signaling pathway が関与する事を証明した。

4. Li Y, Shibata Y, Zhang L, Kuboyama N, Abiko Y : Periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS induces mitochondria-dependent-apoptosis in human placental trophoblasts. *Placenta.* 32:11-19, 2010. (IP=2.775) 歯周病が低体重出産のリスク因子であることが知られ手いる。本研究では、歯周病原菌の内毒素が胎盤の絨毛細胞のミトコンドリア依存性アポトーシスを惹起することで胎児の成長を抑制することを明らかにした。

D. 本研究補助に関連した業績

1. Lin YT, Chen YH, Yang YH, Jao HC, Abiko Y, Yokoyama K, Hsu C : Heme oxygenase-1 suppresses the infiltration of neutrophils in rat liver during sepsis through inactivation of p38 MAPK. *Shock.* 34(6):615-21, 2010. (IP=3.298) 炎症を促進させる中心的な役割を果たす好中球の組織侵入の機構の抑止に Heme oxygenase-1 が重要であることを明らかにした。

2. Kawai S, Abiko Y, Amano A: Kawai S, Abiko Y, Amano A: Odd-skipped related 2 regulates genes related to proliferation and development. *Biochem Biophys Res Commun.* 398:184-190, 2010. (2.648) 細胞増殖および分化に関与する機構として Odd-skipped related 2 (Osr2) が種々の遺伝子発現を制御することを明らかにした。

3, Murakami T, Fukunaga T, Takeshita N, Hiratsuka K, Abiko Y, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. : Expression of Ten-m/Odz3 in the fibrous layer of mandibular condylar cartilage during postnatal growth in mice. *J Anat.* 217:236-244, 2010. (IP=1.134) 成長期における下顎骨の軟骨化骨プロセスでの線維層での Ten-m/Odz3 遺伝子発現は顎骨の成長に重要な働きをもつことを明らかにした。

4. Obikane H, Abiko Y, Ueno H, Kusumi Y, Esumi M, Mitsumata M: Effect of endothelial cell proliferation on atherogenesis: a role of p21(Sdi/Cip/Waf1) in monocyte adhesion to endothelial cells. *Atherosclerosis.* 212(1):116-122, 2010. (IP=4.522) 動脈硬化における血管内皮細胞の増殖における p21(Sdi/Cip/Waf1)の発現は血管内皮細胞の単球の接着に関与する事を明らかにした。

注：課題番号を記入してください。

平成 22 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 22 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 加野 浩一郎



所属・資格 生物資源科学部・准教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <u>総合研究</u>	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	脱分化による体細胞の可塑性と多能性獲得機構に関する研究	
3 研究目的	本研究では、終末分化した細胞が脱分化することによって再プログラム化し、多分化能を獲得するメカニズムを解明する目的で、種々の体細胞が脱分化および多能性獲得する過程について生化学的、発生物学および分子生物学的手法を用いて知見を集積し、理解を深めることによって、体細胞の多能性獲得機構を解明する。	
4 研究概要	本研究では、終末分化した細胞を脱分化誘導することによって再プログラム化を促し、多分化能を獲得するメカニズムを解明することを目的としている。卵母細胞やウィルスベクターによる山中ファクターなどを用いない独自の培養系を利用することによって、成熟脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞が脱分化および多能性獲得する過程をエピジェネティクスの側面から解析することによってデータを集積し、バイオインフォマティクス（生物情報学）の手法を用いて脱分化および多能性獲得機構に関わる重要な因子の同定を行なう。さらに、それら解析結果を基にして、脱分化および多能性獲得のパスウェイの描出を試みる。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 加野 浩一郎(成熟脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得機構の網羅的解析) ・研究分担者（役割分担） 森友 忠昭（多能性細胞の遺伝子プロファイリング解析） 関 泰一郎（皮膚および肝臓における再生機構の解明） 松本 太郎（成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞 DFAT の遺伝子プロファイリング解析） 小方 頼昌（歯髄組織における多能性細胞の遺伝子発現パターンと多能性維持の機構解明） 中尾 寿美（歯髄組織由来の多能性細胞のニッチ機構の解明） 	

※ホームページ等での公開の (可) (否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：生物資源科学部

氏名： 加野 浩一郎

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1) ブタ卵胞顆粒層細胞の脱分化過程における遺伝子発現の経時的変化および機能解析

我々は、生体内で既に特異的な機能をもつ成熟脂肪細胞（AC）および卵胞顆粒層細胞（GC）を脱分化させることによって、骨芽細胞、軟骨細胞、神経系細胞など種々の細胞へと分化する多能性細胞を作り出すことに成功している。しかし、これらの細胞がどのような機構で脱分化および多能性獲得するかについては明らかではない。昨年度において、我々はブタ AC および GC の脱分化および多能性獲得機構の一端を明らかにする目的でマイクロアレイ解析を行なった。その結果、AC および GC の脱分化前後において共通して発現が顕著に増減する遺伝子群を抽出することによって、脱分化及び多能性獲得に関与すると推察される各遺伝子群に関連する生物学的機能の特徴を示すことに成功した。しかし、分化した体細胞がどのタイミングで脱分化するかについては明らかでない。本研究では、GC の脱分化および多能性獲得のタイミングとそれに関与する遺伝子群を抽出する目的で、GC の脱分化および多能性獲得過程で得られた経時的なマイクロアレイデータをもとにして、それらの過程に特徴的な遺伝子発現パターンを調べた。その結果、体外培養した GC は、培養 24 時間後までに GCs 特異的遺伝子群の発現が急速に低下した。一方、有意に発現上昇した遺伝子は培養 24 時間後に最も多かったが、その後は殆ど変化しなかった。また、有意に発現上昇した遺伝子は、“ストレス応答”、“形態変化”および“組織形成”に関わるものであった。以上の結果から、GC の脱分化および多能性獲得は培養 24 時間以内と極めて短時間に起こると推察された。

2) 公共マイクロアレイデータを活用した種々の多能性細胞との比較解析

我々は昨年度において、脱分化前後の成熟脂肪細胞（AC）および卵胞顆粒層細胞（GC）を用いて脱分化ならびに多能性獲得に関与すると考えられる機能を抽出した。しかし、DFAT および DFOG の脱分化ならびに多能性獲得に関与すると考えられる機能を比較解析するための報告は哺乳類のみならず、動物界においても見当たらない。一方、植物細胞の脱分化ならびに多能性獲得については、古くから多くの研究が行われており、細胞壁を消化することによって得られるプロトプラストがその形成過程で脱分化および多能性を獲得する点などにおいて、AC および GC の脱分化および多能性獲得と共通点があると考えられる。そこで本年度では、公共のデータベースに公開されているシロイヌナズナのマイクロアレイデータを利用することによって、植物細胞（葉肉細胞およびプロトプラスト）の脱分化前後において発現変動する遺伝子との比較解析を行なった。その結果、AC および GC において脱分化後に特異的機能にかかわる遺伝子群が発現減少するが、同様に植物細胞においても脱分化することによって光合成などに特異的機能にかかわる遺伝子群の発現が減少することが示された。一方、いずれの細胞においてもストレス応答および創傷治癒に関連する遺伝子群の発現が共通して増加することが示された。以上の結果から、哺乳類の分化細胞における脱分化は植物細胞の脱分化と類似した機構によって制御されることが示唆された。

次いで、公共のデータベースに公開されている動物の体細胞とそれに由来する多能性細胞（iPS 細胞）のマイクロアレイデータを取得し、生物情報学的手法を用いて AC および GC に由来する多能性細胞と比較解析を行なった。その結果、ブタ胎子線維芽細胞（PFF）由来の iPS 細胞と AC および GC 由来の多能性細胞から得られたデータを主成分解析した結果、PFF、AC および GC 由来の多能性細胞の遺伝子発現状況は類似したが、ips、AC および GC とは大きく異なった。さらに、多能性獲得にかかわる遺伝子群を抽出する目的で、同じく公共のデータベースに公開されている胎子線維芽細胞から樹立された iPS 細胞のマイクロアレイデータとの比較解析を行なった。その結果、上記 2) の解析によって抽出された AC および GC の脱分化および多能性獲得にかかわる遺伝子群と推定された 223 個から、さらに 46 個の候補遺伝子を見出した。それらは、ストレス応答および細胞の分化制御にかかわる遺伝子が多く含まれていた。

以上の結果から、Ads および GCs に由来する多能性細胞は、1) プロトプラストと同様にストレス応答に関わる遺伝子群が高発現すること、2) PFF の遺伝子発現状況と類似するが、多能性をもつ iPS 細胞とは異なった特徴をもつことが示された。

部科校名：生物資源科学部

氏名：加野 浩一郎

研究結果 (つづき)

3) 脂肪細胞に由来する多能性前駆細胞 DFAT の細胞系譜上における位置付け

我々は、生体内において特異的な機能をもつ成熟脂肪細胞を体外培養し、脱分化させることによって、多能性前駆細胞 DFAT を樹立した。成熟脂肪細胞に由来する DFAT は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞および筋細胞など中胚葉に由来する種々の細胞に分化するだけでなく、神経系細胞や乳腺上皮細胞など胚葉を越えて外胚葉系の細胞にも分化することを明らかにしてきた。しかし、成熟脂肪細胞が脱分化することによって、細胞系譜のどの位置まで可塑するかについては明らかでない。本年度では、DFAT の細胞系譜上における位置付けを明らかにする目的で、公共の遺伝子発現情報データベース (GEO) が提供するヒト胚性幹細胞 (ESC)、胚性中胚葉系前駆細胞 (EMPC)、間葉系幹細胞 (MSC) および脂肪細胞 (AC) のマイクロアレイデータと、我々が取得したブタ AC および DFAT のマイクロアレイデータを用いて、種々の細胞表面抗原 (CD 抗原) および核内転写因子 (TF) の遺伝子発現パターンの比較解析を行なった。DFAT と ESC、EMPC および MSC それぞれの CD 抗原遺伝子の発現パターンの類似性を調べた。その結果、成熟脂肪細胞の遺伝子発現と比較した際に、DFAT の脱分化過程において発現減少した CD 抗原遺伝子群は 8 個、発現増加した CD 抗原遺伝子群は 12 個であった。次いで、DFAT において発現が減少あるいは増加した CD 抗原遺伝子群と、ESC、EMPC および MSC それぞれにおいて発現が増加あるいは減少した CD 抗原遺伝子群の類似性を調べた。その結果、DFAT と ESC、EMPC および MSC それぞれにおいて発現パターンが一致した CD 抗原遺伝子の割合は、それぞれ 70%、75% および 50% であり、DFAT は EMPC との類似性が高いことが示された。

DFAT と種々の幹細胞における核内転写因子の遺伝子群の発現パターンの類似性を調べた。まず成熟脂肪細胞と DFAT の遺伝子発現を比較すると、脱分化過程において発現が減少した核内転写因子遺伝子群は 34 個あり、また発現増加した核内転写因子遺伝子群は 53 個であった。次に、DFAT において発現減少あるいは増加した核内転写因子群と ESC、EMPC および MSC それぞれで発現が増加あるいは減少した核内転写因子群の類似性について調べた。その結果、DFAT と ESC、EMPC および MSC それぞれにおいて発現パターンが一致した核内転写因子遺伝子の割合は、63%、74% および 75% であり、DFAT は中胚葉系に運命決定された EMPC および MSC と高い類似性を示した。

以上の結果から、DFAT の CD 抗原は ESC および EMPC に近く、核内転写因子は中胚葉系に運命決定された EMPC および MSC に近い発現パターンであることが示めされた。したがってこれらのことから考えると、成熟脂肪細胞由来の DFAT は細胞系譜上において EMPC に近い状態の細胞であると推定される。

4) マウス皮膚組織の創傷治癒過程における遺伝子発現プロファイリングの変化

有尾両生類のイモリでは、四肢や尾を失っても完全に再生する能力をもつことが知られている。再生時の組織では内在する未分化な体性幹細胞からだけでなく、終末分化した細胞が脱分化することによって組織・器官が再生されることが示されている。本研究では、哺乳類の皮膚組織の創傷治癒過程において「脱分化・再生」が起こるかを明らかにする目的で、GEO が提供するマウス皮膚および舌組織の創傷治癒過程で取得されたマイクロアレイデータを解析した。その結果、創傷 6 時間後にはすでに創傷前と異なる遺伝子発現パターン (GEP) となり、創傷 24 時間後では最も異なる GEP を示した。その後、時間の経過に伴って創傷前と類似した GEP となり、皮膚および舌組織ではそれぞれ創傷 10 および 5 日後に創傷前と同様となった。以上の結果から、皮膚組織の創傷治癒過程では脱分化および再生が起こることが示めされた。また、この結果は生体内の組織再生における遺伝子発現の変化を網羅的に解析することが可能であることを示しており、生体における組織細胞のメカニズム解明に大きく貢献すると考えられる。現在、創傷治癒過程において組織の再生に関与する重要な遺伝子を抽出し、それら遺伝子に関連する生物学的機能について解析を行なっている。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23年 4月 20日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 小 林 信 一



所属・資格 動物資源科学科 教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="checkbox"/> 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	野生鳥獣—特にシカ—を活用した地域活性化戦略に関する研究	
3 研究目的	本研究は、本学部主催平成19年度農村サミットを契機に連携の申し出があった奈良県十津川村を主な調査対象地とし、シカなどの野生鳥獣を山村活性化の手段と考え、一時養鹿によるシカ肉のローカルフードとしての活用の可能性（生体捕獲、キノコ類の廃菌床の飼料的利用、衛生管理およびマーケティング）や、シカなどの野生鳥獣をモチーフにしたエコツーリズムの提案などによって、野生鳥獣問題の解決を地域と大学との連携の中で、内発型地域活性化として進めることを目的とした。	
4 研究概要	平成20年度より、表記のテーマに関し、十津川村における住民調査（平成20・21年度）、十津川村旅館・民宿および全国のレストラン等を対象にしたシカ肉需要調査（21年度）、少数のサンプルによるシカの脂肪組成の分析と疫学調査、および牛によるキノコ類の廃菌床、廃ホダギなどの消化試験を行ってきた。この成果を踏まえ、以下の課題について調査・検討を進めた。 1. 住民調査等に基づいたシカを活用した地域活性化戦略の策定 2. シカの肉資源としての活用方法—生体捕獲、食肉処理、マーケティングの具体的検討 3. シカを活用したグリーンツーリズム・エコツーリズムの具体的策定 4. シカ肉の特性（DHA, EPA 含量）に関する調査 5. シカ由来人獣共通感染症の疫学調査 6. シカの飼料としての地域の未利用資源の活用の検討	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	・研究代表者 小 林 信 一 ・研究分担者（役割分担） 野上 貞 雄（シカ由来人獣共通寄生虫の疫学調査） 糸長 浩 司（シカを活用した地域活性化戦略の策定） 梶川 博（シカの飼料としての地域の未利用資源の活用の検討） 小泉 聖 一（シカを活用した地域活性化戦略の策定） 壁谷 英 則（シカ由来人獣共通感染症の疫学調査） 鳥居 恭 好（シカ肉の特性（DHA, EPA 含量）に関する調査） 高橋 巖（住民および大学・NPO など外部支援組織の役割の検討） 藤沢 直 樹（シカを活用した地域活性化戦略の策定）	

※ホームページ等での公開の 否 いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：生物資源科学部

氏名：小林 信一

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

研究計画に基づき調査研究を実施した。これまで結果が得られた研究の概要は以下の通りである。

1. 住民調査等に基づいたシカを活用した地域活性化戦略の策定

奈良県十津川村において、平成22年8月に鳥獣被害とその対策、及びそれを踏まえた地域活性化のアクションプランを構築するため、村役場各関係部署及び、谷瀬、中谷、竹筒、五百瀬などの集落調査、集落活動拠点（直売所等調査）を対象にヒアリング調査を実施した。その結果、①県は、駆除を今年で目標1,000頭に設定しており、シカ糞量調査に補助ポイントを決めて予算化している。当初2年前700頭で、見直し後は2,300頭（直近資料1,870頭）である。②単価は、シカ1頭5千円、サル2万円、イノシシ2千円などである。③しかし以前は殆ど居なかったシカの被害は減少しておらず、電柵等の設置が引き続き課題となっている。捕獲したシカ肉を売ろうという時はあったが、加工が困難なことや、肉の美味しい夏期は輸送がさらに困難であることから、実現していない。このことから、捕獲エリアの設定や一時養鹿などの対策について、役場担当者と実現の可能性を検討した。集落調査では、いずれも鳥獣害被害の状況が深刻であることが明らかとなったが、基本的な解決策は「山に人がいる」状況つくることであり、この対策としては、自然愛好家などを組織した「西熊野街道」のトレールメンテナンスを行い、これを「天空の道」とするなどが考えられる。

また、集落を基礎として内発的鳥獣対策の可能性を追求するため、ワイルドライフマネジメントを視野に入れた集落土地利用計画のための基礎的研究として、同村谷瀬集落を対象とした聴き取り調査を実施した。これは住民参加による合意形成型での集落土地利用計画策定に際しての基礎調査として、土地利用実態と野生鳥獣被害との空間的関係性の解明を試みるためである。その結果、全22世帯中15世帯への聞き取りと現地踏査により作成した土地利用図の分析から、母屋に離れた農地に休耕化の傾向があり、集落全体では宅地間に休耕地が連担・モザイク状に生じることが、野生鳥獣の侵入を容易にする一要因であることが判明した。ワイルドライフマネジメント（WLM）を視野に入れた土地利用計画策定のうへでは、集落営農等による農地利用の集約化、集団的な野生鳥獣被害対策の提案が効果的だと考察する。そのためには地権者の持つ農地の所有、利用意識を変革した土地利用体系の必要性が指摘され、限界化の進む集落の維持のために従来の価値観に捉われない新たなガバナンスの検討の要素があると考察した。

2. シカの肉資源としての活用方法—生体捕獲、食肉処理、マーケティングの具体的検討

（生体捕獲）本研究班が主催し、全日本鹿協会、富士宮市、富士宮市鳥獣被害防止対策協議会の共催、日本大学生物資源科学部の後援により、平成23年1月25、26日にわたって、「シカの生体捕獲のためのワークショップ—オーストラリアの経験から」を、日本大学富士自然教育センター（静岡県富士宮市）において開催した。地元や他市町村猟友会、行政、大学関係者など90名が参加し、招聘したオーストラリア連邦シドニー大学獣医学部トニー・イングリッシュ博士の講義と実地指導、討議の他、研究班からの研究報告も行った。

（マーケティング）不特定多数の消費者を対象とし、近年、急速に拡大するインターネット市場に着目し、シカ肉販売の現状についての調査を行った。今回の調査では、インターネットショッピングモールの大手である楽天市場の食肉市場におけるシカ肉販売状況を調査し、平成19年に行った同様の調査と比較分析を行った。その結果、インターネット販売によるシカ肉の販売は、わずかではあるが拡大傾向にある。シカ肉のうち、国産シカ肉が増加しており、本州産ではモモ肉が中心であり、加工品の多くは北海道（エゾシカ）が主流となっている。用途別にみた場合、調理法で「焼き」のジンギスカン、焼肉、ステーキの件数が増加傾向にあるが、「煮る」用途は停滞している。今後のシカ肉のインターネット市場における販売は、件数増加と価格上昇を経て、安定的な価格へと向かうことが予測される。しかしその反面、シカ肉が定着するためには、安全性の確保を図るとともに、用途件数の増加、消費者ニーズに合致する加工品の提供が必要不可欠である（本稿は「日本鹿研究」誌第2号（通巻52号）2011年3月に掲載された）。

3. シカを活用したグリーンツーリズム・エコツーリズムの具体的策定

シカやイノシシをモチーフとしたエコツーリズムの試行として、平成22年8月に奈良県内の小学生約50名を対象に2回にわたり実施されたこども交流キャンプ（主催：十津川村神納川地区協議会）において、鳥獣害の実態やシカ、イノシシの生態に関するプログラムを作成し、実施した。実施前後に参加児童を対象に

部科校名：生物資源科学部

氏名：小林 信一

研究結果（つづき）

したアンケート調査を実施した結果、鳥獣害の認識が高まる等の効果が見られた。

4. シカ肉の特性（DHA, EPA 含量）に関する調査

平成 20～22 年にかけて十津川村で捕獲されたニホンシカ、および北海道釧路市で飼養されたエゾシカを試料とし、ヒレ・ロース・バラに該当する部分の脂肪および肝臓脂肪の分析を行った。各試料より脂溶性成分をヘキサンにより溶媒抽出し、TLC（薄層クロマトグラフィ）による脂質一般分析、およびメチルエステル化後の GC（ガス・クロマトグラフィ）による脂肪酸組成分析を行った。特に多価不飽和脂肪酸に注目し、シカ肉の分析結果とブタ・ウシ肉の数値（科学技術庁『5訂増補・食品成分表』記載の数値）を比較検討した。その結果、シカのヒレ・ロース・バラ肉に含まる脂肪酸はブタ・ウシと比較してパルミトレイン酸（16:1n7）・アラキドン酸（20:4n6）が有為に多く、ブタ・ウシでは検出限界以下であるドコサペンタエン酸（DPA, 20:5n3）を検出した。多価不飽和脂肪酸について同様の傾向は肝臓でも認められ、DPA、さらにドコサヘキサエン酸（DHA, 22:6n3）の存在を認めた。肝臓脂質中の飽和脂肪酸および一価不飽和脂肪酸の組成はシカとブタ・ウシで大きな差は認められなかった。また、 ω -3系（n3系）脂肪酸の代表である α -リノレン酸（18:3n3）の含量は各組織でシカ肉が高い値を示した。多価不飽和脂肪酸、特に ω -3系脂肪酸には循環器系など種々の疾患に対して予防効果があることが提唱され、摂取が推奨されている。以上の結果より、シカ肉は多価不飽和脂肪酸、特に ω -3系脂肪酸を多く含み、栄養性に優れた食肉資源であることが確かめられた。

5. シカ由来人獣共通感染症の疫学調査

（トキソプラズマ）シカやイノシシが中間宿主としてヒトへの感染源となり得る動物であることから、群馬県で捕獲されたシカやイノシシにおける抗トキソプラズマ（Tp）抗体保有状況を把握するためシカの血清 107 検体、イノシシ 175 検体を用い、市販ラテックス凝集試験キットによって検査した。その結果、抗 Tp 抗体陽性率はシカで 1.9%、イノシシでは 6.3%あった。従って、食肉としてはヒトへの Tp の感染源になり得ると考えられ、Tp 症や E 型肝炎を含む種々の人獣共通感染症を防ぐためにもそれらの肉を摂取する際には十分に加熱することが推奨される。（本研究は、Parasitology International [ISSN:1383-5769] に投稿中である。）

（サルモネラ、エルシニア、志賀毒素産生性大腸菌）平成 22 年 3 月から 23 年 1 月、北海道、宮城、愛知、奈良県のニホンシカから採取した血液 41 検体、糞便 43 検体、また奈良のシカ 13 頭、5 頭からそれぞれ採取されたダニ 66 匹、シラミバエ 16 匹を用いた。血液と外部寄生虫から DNA を抽出し、PCR 法によりリケッチア、ツツガムシ病、Q 熱、野兔病の各遺伝子を検出した。糞便を用いて定法によりサルモネラ、エルシニア、志賀毒素産生性大腸菌（STEC）の分離培養を行った。その結果、奈良県のシカ 14 頭中 4 頭（28.6%）の血液、44 匹のダニ（66.7%）、4 匹のシラミバエ（25%）からリケッチア遺伝子が検出されたが、他の地域のシカ、及び他の病原体は検出されなかった。糞便からサルモネラは検出されなかったが、エルシニアが 8 頭（18%）から分離され、このうち 1 頭から *Y. pseudotuberculosis* が分離されたが、他は全て非病原性と考えられた。STEC は 21 頭（48%）から 61 株の分離株が得られた。このうち *eaeA* や *EHEC-hlyA* といった病原遺伝子が 17 頭のシカから分離された 36 株に認められた。今後、検出された各種病原体の人への病原性について検討する必要がある。

6. シカの飼料としての地域の未利用資源の活用の検討

シカ飼育用飼料として、市販の代表的な反芻家畜用飼料であるアルファルファヘイキューブを用いて、その採食性および消化性の検討を行った。雌ニホンシカ 4 頭（平均体重 45kg）にアルファルファヘイキューブを給与したところ、直ちに良好な採食が観察され、ほとんど馴致の必要はみられなかった。給与量を徐々に増加させたところ、代謝体重の 18%まで摂取量が増加し、これはシカの維持要求量が同体重の山羊と同等であると仮定した場合の 1.87 倍に相当する値であった。またこの時の体重変化は 5kg の増加であった。次に、飼料中の不消化成分であるアルカンを指示物質としてアルファルファヘイキューブの消化性を推定し、日本在来種山羊を用いて求めた値と比較した。その結果、乾物消化率において山羊で 55%であるのに対して、シカで 53%と両者に大きな差は見られなかった。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23 年 3 月 31日

日本大学 総長 殿

氏 名 宮入 伸一



所属・資格 薬学部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	生体内ビスインドールのインディルビンを基本構造とした新規生物活性物質の創製と応用	
3 研究目的	本研究は、多様な生物活性が期待できるビスインドール系化合物であるインディルビンを基本骨格に様々な誘導体を合成し、その生物活性の評価を基に新規薬物 seed を創製することを目的としている。	
4 研究概要	<p>本研究は、インディルビン誘導体を合成して以下のような生物活性を検討すると共に、生体内インディルビンに濃度に影響を与える化合物の探索を行うことを目的としている。</p> <p>1) AhR 高親和性アゴニストおよびアンタゴニスト開発を行う。</p> <p>2) 神経芽腫に特異的な抗腫瘍性化合物の薬物 seed を見出す。</p> <p>3) 多剤耐性発現の抑制活性を有する誘導体を見出す。</p> <p>4) グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3β (glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β) に対する阻害効果を検討するとともに、本酵素のノックアウト細胞で報告された神経細胞への影響の薬物での再現を試みる。</p> <p>5) 生体内インディルビン濃度を上昇させる化合物を見出す。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<p>・研究代表者 宮入 伸一</p> <p>・研究分担者 (役割分担)</p> <p>小林 俊亮 (無細胞系での遺伝子発現系への作用評価)</p> <p>大橋 祥世 (細胞を用いた遺伝子発現系への作用評価)</p> <p>小菅 康弘 (神経細胞への作用評価)</p> <p>齋藤 弘明 (インディルビン類縁体の合成)</p> <p>田畑 恵市 (腫瘍細胞への特異作用の評価)</p>	

※ホームページ等での公開の (可)・否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：薬学部

氏名：宮入 伸一

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

近年、オーファン受容体である多環式芳香族化合物受容体(aryl hydrocarbon receptor; AhR)の内因性リガンド候補化合物として、indirubin に注目が寄せられている。AhR は様々な細胞での発現が認められており、薬物代謝酵素(CYP_{1A1}, CYP_{1A2}, CYP_{1B1}, glutathione-S-transferase, UDP-glucuronyl transferase など)の合成誘導ならびにサイトカイン(IL-1 β , IL-2, TNF- α , TGF- β 2 など)の合成誘導などへの関与が指摘されている。しかし内因性リガンドが未知であるため、AhR 本来の生理的役割が十分に解明されているとは言い難く、内因性リガンドの特定が待たれている。indirubin は、インドール誘導体の二量体であり、ヒト尿やウシ胎児血清などの体液中での存在が確認されている他に、綿繊維の染色に用いられる藍の発酵液中の赤紫色系色素成分としてもよく知られている化合物である。また、芳香環部分の臭素置換体も貝類などの軟体動物動物の内臓の発酵液中に見出されており、古くから Tyrian Purple として珍重されてきた物質でもある。ヒトを含めた哺乳動物における indirubin の生成においては、腸内細菌により食餌中のトリプトファンから変換されるインドールが原料であると考えられている。インドールは腸で吸収されると肝臓で代謝的にイサチンとインドキシル(互変異性体は、indolin-3-one)に変換され、それらが非酵素的に脱水縮合することにより indirubin になるとされている (図 1)。indirubin の AhR 親和性は極めて高く、強力な AhR 結合能を特徴とする環境汚染物質であるダイオキシン(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TCDD)と同等と報告されている。そのため、ダイオキシンの生体影響を評価する上でも考慮すべき生体側因子である。また、AhR 高親和性の indirubin 誘導体は、ダイオキシンの生体影響の軽減効果も期待できる有望な薬物 seed となり得るものである。

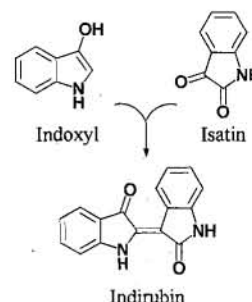


図 1. Indirubin の生成

一方、indirubin 誘導体の中には細胞周期を調節するサイクリン依存性キナーゼ(cyclin dependent kinases; CDKs)や Wnt シグナル伝達系を介して細胞周期、細胞分化、神経細胞の極性形成などに関与しているグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 β (glycogen synthase kinase-3 β ; GSK-3 β)に直接作用して、これらの酵素の活性阻害作用を示すことが報告されているものがある。これは、indirubin 分子がこれらキナーゼの補因子である ATP の結合を競合的に阻害するためである。さらに、これら両酵素はアルツハイマー病の特徴的病態であるタウタンパク質の異常なリン酸化への関与、糖尿病やパーキンソン病、癌などの疾病の発症への関与も疑われているものである。さらに、GSK-3 β 遺伝子をノックアウトすると、神経細胞の分化が促進されるとの報告もある。このように、とりわけ ATP が結合する酵素やタンパク質に強く影響を及ぼすことが考えられる indirubin 誘導体には様々な生物活性が期待できる。置換基の工夫により神経系への作用や選択性の高い抗腫瘍活性を示す化合物が見出される可能性が高く、さらに抗腫瘍剤に対する多剤耐性の改善やダイオキシンの毒性軽減効果も期待できる化合物が見出される可能性も秘められている。なお、indirubin はその生成過程から明らかなように、2分子のインドールの脱水縮合体であり、その置換基導入可能部位としては2つの芳香環上の8つの水素原子のうちの7箇所と2つの窒素原子の部分および非アミド性カルボニル基が考えられる。

以上のような観点から、本プロジェクトでは、多様な生物活性が期待できるビスインドール系化合物である indirubin を基本骨格に様々な誘導体を合成し、その生物活性の評価を基に新規薬物 seed を創製することを目的としている。標的としては、薬学部内で有用な知見が集積されつつある以下の生物活性を選定した。

- A: AhR に対する indirubin 誘導体の親和性と構造の関係を精査し、AhR 高親和性アゴニストおよびアンタゴニスト開発の可能性の検討
- B: 正常細胞や他のがん細胞との比較により、神経芽腫に特異的な抗腫瘍性化合物の薬物 seed の探索
- C: 腫瘍細胞の多剤耐性に関与する遺伝子発現系に対する作用を検討し、多剤耐性に関与するタンパク質の発現抑制活性を有する誘導体の探索
- D: GSK-3 β に対する阻害効果を検討するとともに、本酵素遺伝子のノックアウト細胞で報告された神経細胞への影響の薬物での再現

部科校名：薬学部

氏名：宮入 伸一

研究結果 (つづき)

E: 天然型の indirubin は水への溶解性が低いため投与による生理作用の検討は困難であることから、様々な食品由来成分を検討して生体内 indirubin 濃度を上昇させる化合物を特定し、本来の indirubin の生理作用を検討するための基礎的知見の取得

初年度に得られた知見を以下に要約する。

本年度は、5、6、7、5'位にメトキシ基、ブロム基、水酸基を有する indirubin 誘導体、および、それらの 3'位カルボニル基のオキシム誘導体などを調製し、生物活性を検討した。

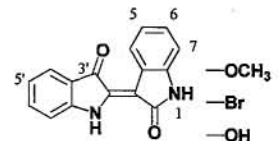


図 2. Indirubin の置換基の位置

AhR 活性化能は、AhR と Arnt (AhR nuclear translocator) を安定的に共発現させた酵母に、AhR のシスエレメントである XRE (xenobiotic response element) の下に β -galactosidase 遺伝子 (*LacZ*) を組み込んだ plasmid を導入し、それを用いた reporter gene assay により検討した。まず、強力な AhR 活性化物質として知られている β -naphthoflavone と indirubin の活性化能を比較したところ、前者では 30 nM ~ 10 μ M の濃度範囲で用量依存的な AhR 活性の上昇が認められ、後者では 3 nM ~ 100 nM の範囲であったことから、 β -naphthoflavone に比べて indirubin は約 1/10 の濃度から活性を示すこと、また最大活性値はほぼ同等であるものの、その濃度は約 1/100 であることが示され、このアッセイ系は indirubin の高い AhR 活性化能を十分に表現し得るものであることを確認した。引き続き、本アッセイ系を用いて前述の誘導体の AhR 活性化能を検討したところ、5、6、7 位水酸化体はいずれも母化合物である indirubin に比べて AhR 活性化能は低下し、誘導濃度範囲は 10 ~ 100 倍程度高濃度側にシフトしたが、最大活性値は indirubin とほぼ同等であったことから、水酸化により indirubin の AhR への結合親和性は低下したが、複合体の構造的変化はあまり大きくないものと考えられた。また、メトキシ誘導体では、水酸化体に比べ用量作用曲線が低濃度側にシフトしたことから、AhR に対する結合親和性はメトキシ誘導体の方が高いものと推測されたが、indirubin と同等の最大活性値を示したものは 5 位誘導体のみであった。6 位誘導体は活性化初濃度は indirubin のそれとほぼ同等であったものの最大活性値約 7 割に低下しており、7 位や 5' 位誘導体においては初濃度は約 10 倍高濃度側にシフトし最大活性値も 5 割程度に低下していた。これらの結果から、6、7、5' 位誘導体は AhR に対する結合親和性も低下し、かつ複合体の構造変化も大きいものと考えられる。一方、これらの 3' 位オキシム誘導体や 6 位ブロム体では、AhR に対する結合は著しく低下することが明らかになった。

GSK-3 β に対する影響は、ヒト由来の肝臓がん細胞である HepG2 細胞を用いて検討した。被験化合物存在下に 24 時間培養を続けた HepG2 細胞を回収し、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) に付し、western blotting により β -catenin、Y216 リン酸化 GSK-3 β および総 GSK-3 β ならびに β -actin 量を求め、各成分の β -actin に対する相対量を比較検討した。 β -Catenin は GSK-3 β の基質であり、リン酸化されると proteasome により分解されるため、その細胞内の量は、GSK-3 β の活性と逆相関関係にある。また、Y216 リン酸化 GSK-3 β は活性型酵素である。Indirubin およびその水酸化体については、コントロールに比べて総 GSK-3 β 量および活性型 GSK-3 β 量ならびに β -catenin 量に変化が認められなかったことから、これらの化合物には GSK-3 β 阻害活性はないと結論した。一方、メトキシ誘導体では、5 位、6 位誘導体において β -catenin 量の増大が認められたことから、これら化合物には阻害活性があることが明らかになった。さらに、3' 位カルボニル基のオキシム誘導体について検討したところ、indirubin の 3 位オキシム誘導体にとりわけ強い阻害活性が確認され、5 位メトキシ体およびブロム体のオキシム誘導体も若干の阻害活性を示した。

腫瘍細胞の悪性化に伴い増大する薬剤耐性の低減化合物の探索は、NF-Y タンパク質への影響評価により行った。NF-Y タンパク質は、抗がん剤の細胞外排出に関与する膜タンパク質をコードする MDR1 タンパク

部科校名：薬学部

氏名：宮入 伸一

研究結果 (つづき)

質の転写調節因子である。ここでは、NF-Y タンパク質に特異的に結合する放射性標識 oligomer を用いた gel shift assay によりスクリーニングを行った。Indirubin 3 位オキシム誘導体と 7 位メトキシ体の 3 位オキシム誘導体は、NF-Y タンパク質への oligomer 結合能を高めること、一方 5 位メトキシ誘導体と 5'位プロム誘導体は逆に結合能を低下させることが判明した。そこで、マウス由来の神経芽腫細胞である NG108-15 細胞および筋芽細胞である C2C12 細胞ならびにヒト乳がん由来の MCF-7 細胞を用いて、NF-Y タンパク質の *in vivo* における転写活性を評価する reporter gene assay 系を構築した。なお、マーカーには GFP (green fluorescent protein) を用い、細胞内蛍光強度の増減から転写活性を評価した。前述の 4 種の indirubin 誘導体は、いずれも NG-108-15 細胞では効果を示さなかったが、MCF-7 細胞では 5'位プロム体を除く 3 種の誘導体が転写を抑制し、C2C12 細胞では 7 位メトキシ体の 3'位オキシム誘導体が転写を抑制した。この結果、前述の gel shift assay が first screening として適していること、また 7 位メトキシ体の 3'位オキシム誘導体が薬剤耐性低減化合物の seed 候補化合物となり得るとの結論を得た。

神経芽腫に特異的な抗腫瘍性化合物の薬物 seed の探索は、ヒト由来の神経芽腫 3 種 (IMR-32、SK-N-SH、NB-39) を用い、正常細胞 2 種 (NHDF、HUVEC) を対照として、細胞毒性の差異の検討により行った。すなわち、神経芽腫により毒性を示し、かつ正常細胞の生存率には影響の少ない化合物を screening した。その結果、5'位にメトキシ基を有する誘導体は神経芽腫 3 種すべての細胞生存率を 50% 以下に下げる濃度においても、両正常細胞の細胞生存率は 90% 以上を示した。また、indirubin の 3'位オキシム誘導体も神経芽腫に選択性が認められたが、正常細胞にも毒性を示し、とりわけ HUVEC 細胞には強く現れた。

現在、初年度に得られた成果を基に indirubin の新規誘導体を合成中であり、今後さらに高い選択性を有する有用な誘導体の開発が期待される。

なお、本研究で得られた成果の一部は、現在 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters に投稿中である。

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23 年 5 月 13 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 近藤 健史



所属・資格 通信教育部・教授

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	多言語による e-learning 日本語学習メディアに関する総合的研究	
3 研究目的	本研究は、留学生受入拡大に寄与するため、海外や国内外に発信できる e-learning による日本語学習メディア教材を、メディア授業を担当している通信教育部教員と留学生を対象とする日本語教育を担当している総合科学研究所の教員が中心となり、国内外の専門家と共同して開発・検証することを目的とする。	
4 研究概要	現在運用されている通信教育部のメディア授業の中から、留学生などが日本の大学で学ぶために教養的知識として求められる日本社会や日本文化に関連する科目の教材を取り上、英語・中国語・韓国語の3か国語で多言語化を図り、多言語対応教材プロトタイプを作成する。また開発した教材について、日本で学ぶ留学生や海外で日本語を学ぶ学生を対象に実際に運用・検証を行う。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 近藤 健史 (総括・多言語日本語学習メディア化の計画) ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 高網 博文 (中国語圏担当) 真野 一雄 (英語圏担当) 猪野 恵也 (英語圏担当) 陸 亦群 (中国語圏担当) 松岡 直美 (学習デザインの設計・評価) 保坂 敏子 (日本語学習デザイン担当) 水木 ピーター (英語圏担当) ・研究協力者 <ul style="list-style-type: none"> 崔 光準 (韓国語圏担当) 宋 協毅 (中国語圏担当) 宮添 輝美 (学習デザインの設計・評価) 	

※ホームページ等での公開の(可)否) いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：通信教育部

氏名：近藤 健史

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

第1回の打ち合わせで、研究計画と分担の確認、第2回の打ち合わせで開発メディア教材の確定と担当者の決定、第3回の打ち合わせでコンテンツ・デザインの計画などを行った。システム開発業者との打ち合わせを経て、第4回以降の打ち合わせでは、具体的にメディア教材の多言語版の草稿作成とシステム開発の検討などを行った。

その結果は以下のとおりである。まず、多言語教材のプロトタイプを作成する科目として、海外の学生が興味を持っている日本の社会や文化、さらには東洋の歴史ということで、「万葉集」と「東洋史概説」の2科目に決定した。次いで、その2教材の「解説文」を英語、中国語、韓国語の3か国語に翻訳し、日本語と対応させて学習できるようにした。「理解度チェック問題」については、韓国での実験的検証のため、とりあえず韓国語のみ翻訳した。

また、日本語コンテンツへの辞書機能（用語解説）や「ディスカッションボード」におけるオンライン辞書の利用機能などの新設も行った。

そして開発教材などの研究内容について検証するため、海外において以下のような学会報告や実験的検証を行った。

① 中国・大連大学（2010年10月23日～24日）における学会報告

『第四回 中・日・韓 日本語文化研究国際フォーラム』

24日 パネルディスカッション「e-learning 日本語学習メディアについて」

保坂 敏子「多言語 e-learning 日本語学習メディア
—日本語教育と専門科目の融合を目指して—」高網 博文「多言語による日本語・歴史学の学習
—e-learning を利用した東洋史概説の場合—」近藤 健史「多言語による日本語・日本文学の学習
—e-learning を利用した万葉集の場合—」

保坂の発表は、「日本語教育と専門科目の融合を目指して」と題し、これからの日本語教育について「日本語を学習する留学生の増加と多様化」と「e-learning を利用した日本語教育」を踏まえた実践的・国際的共同研究の必要性を説いたものである。

具体的には、日本・中国・韓国の日本語教育・日本研究の専門家とメディア授業の専門家が連携して、日本国内外の多言語日本語学習者が共有できる e-learning 日本語学習メディア教材を開発・検証することが求められているというものである。

その根拠として、e-learning 日本語学習メディアの流れは、「教材中心から学習システム、学習環境へと移行していること」を指摘した。現状については、多様な教材や学習システムがあり、教科書準拠型（総合日本語型）、個別目的別型（技能、対象者等）、学習支援ツール型、その他（教師・授業支援のためのサイト）に分類されることを指摘した。また、現状の学習内容の分析から、レベル的には「中・上級用の教材が少ないこと」、内容的には、「特定の技能・初級総合日本語が多く、専門的内容や専門科目のものは少ないこと」、対応言語としては「多言語対応はあるが、基礎的段階のもののみであること」、利用実態は「学習効果が不明であるため実証的研究が必要であること」などを示した。

これらのことから e-learning を利用した多言語学習者のための「求められる学習デザイン」として、「コア・コンテンツ（多言語・多文化対応）」と「自立学習」と「協同学習の場」の融合した「メディア授業」に「対面授業」をプラスしたブレンド型を提案する。また「求められる学習コンテンツ」としては、多言語・多文化の学習者が内容重視で学べるものとして「文化」が適切とし、日本語で日本を学ぶ中級・上級を対象とすべきであることを説く。

結論的には、「中級以上」の学習者を対象とした「専門的な内容」で「多言語対応」の「多言語の人が協働学習できること」や「学習者が自律的学習できること」を目標とした「メディア教材」を開発すべきとする。そしてその方法としては、日本語教育と専門科目の融合した「メディア授業の多言語化」があると提言する。

高網の発表は、「e-learning を利用した東洋史概説の場合」と題するものである。保坂の提言した「求められる学習コンテンツ」を具体化したもので、「講義形式」の「文化」の例である。

前半は、日本大学通信教育部における「メディア授業の概要」「メディア授業の流れ（導入→講義→質疑応答・ディスカッション）→理解度測定→試験」の報告である。後半は「メディア教材の画面構成の説明」と「多言語による東洋史概説」の e-learning を用いた実践的報告であった。

近藤の発表は、「e-learning を利用した万葉集の場合」と題した「演習形式」の「日本文学」の例である。前半は、中国における日本語教育の現状と特色について指摘した上で、e-learning を利用した日本語教育の必要性を説き、通信教育部における「メディア授業の特徴」や「メディア教材の特徴」「メディア授業における国文学演習の特徴」などを報告した。後半は「多言語による万葉集」の内容説明と e-learning を用いた実践的報告であった。

部科校名：通信教育部

氏名：近藤 健史

研究結果（つづき）

② 韓国・新羅大学校（2011年2月7日～9日）における実験的検証

「多言語による日本語・歴史学の学習 —e-learning を利用した東洋史概説の場合—」

(近藤 健史・高綱 博文・保坂 敏子)

次年度本格的にメディア教材の施行、検証を行う前提として、2011年2月8日に新羅大学校（韓国釜山市）において、日本語を学ぶ学部生と大学院生の11名を対象に、韓国語版メディア教材（解説文等を韓国語訳した一章の部分）のe-learningを利用した実験的検証を行った。

実験に協力した11名（韓国籍、男5名、女6名）のプロフィールは、以下のとおりである。

- (1) 学年 1年（4名）、2年（2名）、3年（2名）、4年（1名）、院生（3名）
- (2) 専攻 日本語（2名）、日語日文（9名）
- (3) 年齢 20代（10名）、40代（1名）
- (4) 日本語学習歴 1年（1名）、2年（1名）、3年（3名）、4年（3名）、6年（1名）、7年（1名）、10年（1名）
- (5) 日本語能力試験 旧1級（3名）、旧2級（1名）、旧3級（1名）、N2（1名）、なし（5名）
- (6) 日本語能力 初級（3名）、中級（7名）、上級（1名）
- (7) コンピュータリテラシー プログラミング能力を有する者（3名）、Word・Excelなどを日常的に使用（4名）、ネットサーフィン（6名）、全くの初心者（0名）

実験はパソコンルームに全員集合し、最初に解説等をした上で、約1時間自立学習の形式で行った。中国の歴史に関する章について、まず日本語で学び、不明な部分は韓国語訳の解説文で補足して学ぶという方法である。理解度測定は日本語の理解度チェック問題、次いで韓国語訳問題の順で行ない、比較できるようにした。

③ 韓国・新羅大学校（2011年2月8日）における実験的検証後のアンケート調査

学習終了後、今回の授業やコンテンツなどについて満足度や理解度の調査を行った。試行的なものであることから、Web上ではなくペーパーによる調査であった。

<主なアンケート調査項目>

- | | |
|-------------------|--------------------------|
| (1) 「授業内容」の満足度 | (7) 「韓国語翻訳資料」は役立ったか |
| (2) 「教材」の満足度 | (8) 「日本語」学習に役立ったか |
| (3) 「参考資料」の満足度 | (9) 「中国」についての理解度 |
| (4) 「理解度チェック」の満足度 | (10) 「教材内容」の理解度 |
| (5) 「メディア授業」の満足度 | (11) e-learning 学習に対する意見 |
| (6) 学習方法 | |

<特徴的な調査結果>

- (1) 協力者のほとんどは e-learning 学習の経験がない。
- (2) 画面、音声、翻訳資料、参考資料のすべてを利用。
- (3) いつでも（時間）、どこでも（場所）学習可能なので便利。
- (4) 日本語を学習するのに役に立つ。
- (5) 図式などを見ながら説明を聞くことができている。

理解度チェック問題（日本語版と韓国語版）や終了後のアンケート調査によると、参加した11名のほとんどの学生が内容を理解していると判断できた。この試行的アンケート調査項目などにさらに改良を加え、今後の研究に役立てる予定である。

④ 『中・日・韓 日本語文化研究国際フォーラム 論文集』（大連大学 2011年5月刊行予定）に掲載予定

大連大学における学会報告後、主催者より依頼があったので、発表内容を踏まえ、3人の共著として次の内容の論文を投稿した。

「多言語による e-learning 日本語学習メディアに関する総合研究について」

(近藤 健史・高綱 博文・保坂 敏子)

<目次>

1. 研究の目的 2. 研究のプロセス 3. 研究の意義 4. これまでの研究活動
5. 本共同研究と日本大学通信教育部のメディア授業の関連について

以上の結果を基に、次年度は本格的な運用と検証を行う計画であり、留学生や留学生予備軍を対象に実用性や有効性の検証・評価を行い、研究成果を報告書としてまとめる予定である。

以上

注：課題番号を記入してください。

平成22年度 学術研究助成金実績報告書

平成 23年 4月 26日

日本大学 総長 殿

氏 名 福田 昇



所属・資格 大学院総合科学研究科・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="checkbox"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	薬剤および食品による自己再生細胞を活性化する抗老化の総合研究	
3 研究目的	<p>幹細胞は自己複製能と多分化能を持つ重要な細胞で、胎生期の器官形成を起こしているが、成人の組織にも骨髄、皮膚、小腸粘膜等に存在することが分かっている。最近、脳、心臓、腎臓などの最終分化臓器にも組織幹細胞の存在が発見された。さらに前駆細胞は幹細胞から分化した細胞である。これら幹細胞や前駆細胞は臓器傷害に応じて活性化され、自己修復細胞として組織再生を起こすことが分かってきた。これら組織幹細胞や前駆細胞の寿命は酸化ストレスで短くなる事が知られている。我々はこれまで抗酸化薬剤が組織幹細胞や前駆細胞の機能を高め、寿命を延長することを動物実験および臨床試験で検討し報告してきた。</p> <p>以上の背景と我々の知見を基に、総合科学研究科、医学部、薬学部で共同研究を行い、抗老化としての薬剤、食習慣を確立し、これを啓蒙することにより、抗老化再生医療として社会還元することを目的とする。</p>	
4 研究概要	<p>1) 総合科学研究科、医学部の共同で高血圧ラットを用いて、組織アンジオテンシン (Ang II) 系による血管内皮前駆細胞(EPC)および血管芽細胞の調節機構と Ang II 受容体拮抗薬の作用を明らかにする。</p> <p>2) 薬学部で高血圧ラットを用いて、種々抗酸化生薬による EPC、心筋幹細胞、腎幹細胞機能の活性化作用を比較検討する。</p> <p>3) 医学部と武庫川女子大学との共同で抗酸化食品および食生活習慣が修復細胞である EPC の機能への影響を評価する。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 福田 昇 ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 北中 進 (生薬による幹細胞、前駆細胞の研究) 飯島 洋 (生薬により幹細胞、前駆細胞の研究) 松本太郎 (EPC, 血管芽細胞の調節機構の研究) 上野高浩 (食品の臨床試験) ・研究協力者 家森幸男 (食品の臨床試験) 	

部科校名：大学院総合科学研究科

氏名： 福田 昇

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

研究 I. 血管芽細胞その微小環境(ニッチ)の存在を明らかにし、酸化ストレスによる血管傷害での変化を検討する事により血管病および老化での血管芽細胞とニッチの機能障害の検討

1. WKY ラット大動脈において、血管外膜に CD31⁻/CD34⁺細胞の局在が認められた。
2. 次に大動脈からの血管新生の評価として、WKY ラット大動脈を用いた Ring Assay により Sprout 細胞の派生が確認された。Sprout 細胞は培養 7 日目においてネットワーク形成を呈していた。
3. Sprout 細胞は免疫染色により aSMA⁺/vWF⁺細胞であり、内皮細胞であることが認められた。
4. 経時的に採取した Aortic Ring Assay の大動脈は Sprout 派生が最も盛んな 4 日目において、血管外膜部に CD34⁺/Ki-67⁺細胞が認められ、大動脈において EPC の存在が示唆された。
5. 血管外膜局在細胞と血管構成細胞との相互作用による血管新生の検討として、全層血管を用いた 3 次元培養では Sprout 細胞の派生は既に認められているが、血管外膜を取り除いた動脈および血管外膜のみでは Sprout 細胞の派生は認められなかった。血管外膜に存在する EPC は血管平滑筋細胞との相互作用によって血管新生に寄与し、血管平滑筋がニッチとして動脈内 EPC を調節している可能性が示唆された。
6. 高血圧自然発症ラット (SHR) は組織 Ang II 産生亢進による酸化ストレス動物モデルであり、我々は SHR 及びコントロールとして正常血圧 WKY ラットの胸部大動脈のリング標本をコラーゲンゲルで 3 次元培養を行い、SHR 由来大動脈リングからの Sprout 細胞は低下していた。

研究 II. 高血圧ラットを用いて、種々抗酸化生薬による EPC の活性化作用を比較検討

1. 抗酸化生薬の選択のための検討

- 1) 抗酸化ストレス活性の強い漢方薬を選択するためには短期間で評価を行えることが重要である。我々が今までに EPC 保護作用がある抗酸化ストレス漢方として見いだした柴胡加竜骨牡蛎湯ならびに、福田らにより抗酸化ストレス作用が報告されているセリプロロールの活性を検出できるかを検討した。ネガティブコントロールはアテノロールを使用した。10 日間の経口投与を行った。
- 2) 経口投与、2 週間後に末梢血単核球酸化ストレスを TBARS スコアで評価したところ、柴胡加竜骨牡蛎湯にもセリプロロールにおいて、TBARS の低下を認めた。
- 3) EPC コロニーアッセイにおいても、アテノロールよりも多数のコロニーを観察した。ただし、一群の個体数が少なく有為差はつけられなかった。
- 4) 単核球画分を 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate 処理し、細胞に取り込まれたこの色素が細胞内の酸化反応により、2',7'-Dichlorofluorescein へ変換されたときに発する蛍光を利用して、flow cytometry で、単核球画分の細胞における酸化状態を測定したところ、TBARS と相関した。
- 5) 今後、SHR に、生薬としてフラボノイドを含むマリアザミ、黄ごん、甘草、紅花、猫眼草、ルイボスティー、カテキン、スチルベン、生脈散等を順次検討する予定である。

2. 天然薬物からの活性成分の分離・構造決定

- 1) 生薬・漢方薬を有機溶媒を用い抽出後減圧下濃縮し、エキスを作成。エキスを更にエーテル、酢酸エチル、ブタノールの溶媒にて順次分配抽出
- 2) 活性の認められた画分は、シリカゲル、ODS ゲル、Diaion HP20 ゲル、Sephadex LH-20 などの担体で繰り返し精製し、最終的には分取用 HPLC カラムで化合物を単離
- 3) 単離化合物の構造決定は、融点、旋光度の測定、UV, IR, NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY NOESY, HMQC, HMBC などを測定)、MS (Low MS 及び High MS,) CD などのスペクトルを測定し、解析して化学構造式を決定を現在行っている。

部科校名：大学院総合科学研究科

氏名： 福田 昇

研究結果 (つづき)

研究 III: 抗酸化食品および食生活習慣が修復細胞である EPC の機能への影響を評価

ベースライン研究として、ボランティア被験者登録のもと、栄養調査を行うとともに、尿中の食成分のバイオマーカーを活用して、普段の食生活が EPC の機能にいかに関与しているかを評価した。対象は 20-30 歳の健康な成人とし、

- ① 食事調査アンケート
- ② 体重・身長・腹囲・血圧・脈拍測定
- ③ 血管内皮機能測定装置による脈波測定評価
- ④ 24 時間蓄尿し、抗酸化活性やフェトエストロゲン作用で内皮機能を賦活化する可能性がある物質、ならびに 8OHdG など参加ストレスマーカーを測定
- ⑤ 肘静脈から末梢血を採血し、EPC コロニーアッセイ・酸化ストレスアッセイを行うと同時に、酸化ストレス度・抗酸化力の測定、生化学マーカーとして高感度 CRP・HDL コレステロール・LDL コレステロールを測定、さらに空腹時血糖・インスリン値からインスリン抵抗性を計算

これらのデータをまとめ体内酸化ストレス、EPC コロニー形成能と体内抗酸化物質との関係を明らかにし、EPC 機能を伸ばす食品を見出していく。ベースライン研究の結果、現代的都市生活を営む若者で不足していることが明らかな成分について、栄養介入研究を実施した。

ベースライン研究のデータから摂取不足が明らかな物質、あるいは補充が心血管病の予防に有効であると判断される物質について栄養介入研究を実施した。先行研究の結果からは都市在住の若年層では魚介類の摂取不足からタウリン減少が認められる。タウリンは最新の基礎研究で局所の酸化ストレス、次亜鉛素酸の中和作用が証明され、加齢促進が明らかな脳卒中易発症モデル SHR-SP の EPC を若返らせる作用があり、ヒトでも酸化ストレス状況にある喫煙者の内皮機能改善が証明されている。

- 1) ベースラインデータの得られたボランティアを EPC のデータなどで 2 群にランダム化して、試験食群 (タウリン 3000 mg/day)、対照群 (プラセボ) に分け、封筒法により第三者に群分けをしてもらい、さらに二重盲検で 2 週間の介入研究を実施した
- 2) 初回の健診の前 2 週から試験食摂取終了までの計 4 週間、タウリン含有量の多い魚介類および栄養補助食品・栄養ドリンク等の摂取を制限し、最終健診ではベースライン研究と同じ調査、分析を実施した

平成 23 年 3 月までに、ボランティア被験者 40 名 (対照群 14 名、試験食群 26 名) の調査を行った。その結果、被験者全員のベースラインにおける EPC コロニー形成能と尿中 8OHdG、血中 TBARS との間に負の相関傾向が認められた。また、試験食介入群においては、2 週間のタウリン摂取後、EPC コロニー形成能が有意に増加し、酸化ストレスマーカーである末梢血中 TBARS と d-ROMs、尿中 8-OHdG が減少した。

このことから健常者において、EPC コロニー形成能は酸化ストレス状態で減弱し、抗酸化食品であるタウリン摂取で高められることがわかった。すなわち、抗酸化食品と呼ばれている食品をできるだけ多く摂取するような食生活習慣を心がけることにより、血管内皮修復機能が高まり、心血管イベントが抑制され、さらには抗老化に寄与できることが示唆された。

平成 23 年度は、被験者の数をさらに増やし、データの信頼度を高めると同時に、高血圧ラットを用いて抗酸化食品の影響を評価していく予定である。