

# 福井大学 助成研究成果集 2013

—明日への挑戦—

創造力、実践力。

国立大学法人



福井大学

UNIVERSITY OF FUKUI



# 目 次

No.	部 局	講座・専攻・領域	職	研究代表者	研究 課 題	目次
<b>■平成24年度福井大学研究育成経費</b>						
<b>【大型の競争的資金獲得を目指す研究の支援】</b>						
1	工学研究科	生物応用化学	准教授	沖 昌也	異分野融合による多方面からのエピジェネティクスの解明	6～ 7
2	工学研究科	ファイバーアメリ ティ工学	教授	末 信一郎	分子配向性バイオデバイス構築によるバイオ電池開発	8～ 9
3	高エネルギー医学 研究センター		教授	岡沢 秀彦	がん分子イメージングを応用した新しいがん治療法の開発	10～ 11
4	遠赤外線領域開発 研究センター		教授	斉藤 輝雄	核融合プラズマ計測への適用のための遠赤外ジャイロトロン の飛躍的高出力化	12～ 13
5	子どものこころの 発達研究センター、医学部		教授	佐藤 真	学習機構の発達・成熟に関する新たな分子基盤の解明と展開	14～ 15
<b>【競争的資金獲得を目指す研究の支援】</b>						
1	教育地域科学部	理数教育	准教授	栗原 一嘉	金属V溝テーパー構造による中遠赤外スーパーフォーカシン グの研究	16～ 17
2	医学部	組織細胞形態学・神 経科学	助教	謝 敏珏	神経伝達の新たな制御の解明：シナプス後肥厚部の分子複合 体を制御する新たな分子の役割	18～ 19
3	医学部	分子生理学	助教	岩本 真幸	非対称脂質二重膜を用いた膜タンパク質機能に対する脂質効 果の解析	20～ 21
4	医学部	ゲノム科学・微生物学	准教授	千原 一泰	マスト細胞による自然免疫応答におけるSykの新たな役割	22～ 23
5	医学部	分子生体情報学	准教授	水谷 哲也	ステロイド産生を司る新規遺伝子の同定とその転写制御機構 の解明(2)	24～ 25
6	医学部	分子生体情報学	学内講師	矢澤 隆志	アンドロゲン～AR系の排卵における機能解析	26～ 27
7	医学部	内科学(2)	講師	濱野 忠則	Rho-キナーゼ(ROCK)阻害薬のアルツハイマー病に対する治 療効果の研究	28～ 29
8	医学部	検査部	准教授	木村 秀樹	進行性腎障害におけるペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体 (PPAR)の免疫調節作用の解析	30～ 31
9	医学部	小児科学	教授	大嶋 勇成	食物アレルギーの耐性獲得機構の解明と新規治療法の開発	32～ 33
10	工学研究科	機械工学	助教	酒井 康行	プラズマアシスト燃焼のラジカル反応制御機構の解明	34～ 35
11	工学研究科	情報・メディア工学	准教授	橘 拓至	緊急災害情報の高信頼伝送を可能にするすれ違い通信技術の 研究開発	36～ 37
12	工学研究科	建築建設工学	准教授	小林 泰三	エネルギーを生む基礎工・地盤改良技術の開発に向けた フィジビリティ研究	38～ 39
13	工学研究科	材料開発工学	准教授	内村 智博	難揮発性成分の質量分析に向けた基礎研究	40～ 41
14	工学研究科	材料開発工学	准教授	川崎 常臣	不斉自己触媒型アミノ酸合成法の開発	42～ 43
15	工学研究科	生物応用化学	准教授	杉原 伸治	環境調和型メタルフリーリビング重合によるスマートポリ マーの合成	44～ 45
16	工学研究科	知能システム工学	教授	池田 弘	ニューロン・グリア細胞活動の同時イメージングによる痛覚 過敏メカニズムの解明	46～ 47
17	工学研究科	原子力・エネルギー 安全工学	准教授	小川 泉	ダークマターアキシオンの探索研究	48～ 49
18	工学研究科	原子力・エネルギー 安全工学	准教授	桑水流 理	腐食環境で疲労劣荷を受けるステンレス鋼の腐食速度と負荷 速度の関係	50～ 51
19	遠赤外線領域開発 研究センター		教授	谷 正彦	チェレンコフ位相整合と超集束効果を用いたテラヘルツ波の 高効率検出の研究	52～ 53
20	遠赤外線領域開発 研究センター		准教授	立松 芳典	周波数連続可変ジャイロトロン用ガウスビーム変換器の開発	54～ 55
21	遠赤外線領域開発 研究センター		准教授	藤井 裕	量子計算への応用を目指した希薄ドープ半導体中の孤立スピ ン系の研究	56～ 57
22	子どものこころの 発達研究センター	Age2企画	教授	友田 明美	顔刺激による愛着障害の検討	58～ 59
<b>【若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援】</b>						
1	教育地域科学部	社会系教育	准教授	長谷川 裕子	日本中世・近世における土地所有および年貢請負体制に関す る研究	60～ 61
2	教育地域科学部	地域政策	准教授	三浦 麻	バイオマス環境修復材の実用化のための適性評価	62～ 63
3	教育地域科学部	人間文化	講師	田中 美吏	心的動揺に対する運動制御の中核及び末梢神経機構	64～ 65
4	教育地域科学部	附属地域共生プロ ジェクトセンター	助教	田中 志敬	外部支援者が住民自治の力量形成に果たす役割と効果に関す る調査研究	66～ 67
5	教育学研究科		准教授	木村 優	授業の不確実性に立ち向かう教師の特性と学校組織の探究 —情動を媒介とした教職専門性開発の道筋とそれを支え促す 学校モデルの生成—	68～ 69
6	医学部	組織細胞形態学・神 経科学	特命助教	尾身 実	大脳皮質と皮質下の神経核を結ぶ軸索走行制御機構の解明	70～ 71
7	医学部	分子生理学	特命助教	炭竈 享司	K <sup>+</sup> チャンネルにおけるイオン選択性の理論的解析	72～ 73
8	医学部	分子生体情報学	特命助教	河邊 真也	薬剤処理による間葉系幹細胞からのステロイドホルモン産生 細胞の創出	74～ 75
9	医学部	分子生体情報学	特命助教	今道 力敬	ステロイドホルモン産生細胞におけるFDXR遺伝子のエピ ジェネティクス制御	76～ 77

No.	部 局	講座・専攻・領域	職	研究代表者	研究 課 題	目次
10	医学部	薬理学	助教	宇和田 淳介	細胞内ムスカリン受容体の動態制御メカニズムの解明および ストレスの影響	78 ~ 79
11	医学部	眼科学	助教	瀧原 祐史	網膜におけるミトコンドリア軸索輸送 in vivo イメージング	80 ~ 81
12	医学部	母子看護学・助産学	助教	嶋 雅代	母乳育児継続に向けた支援についての考察—出産後1ヵ月の 母親における母乳育児に対する感情とその関連要因—	82 ~ 83
13	工学研究科	ファイバーアメリ ティ工学	准教授	藤田 聡	ナノファイバー基材と極限微生物の相互作用の解析と新規固 相培養法への展開	84 ~ 85
14	工学研究科	ファイバーアメリ ティ工学	講師	植松 英之	水/澱粉/高分子の相転移を利用した環境調和型ハイブリッ ド材料の創出	86 ~ 87
15	工学研究科	ファイバーアメリ ティ工学	准教授	廣垣 和正	高耐久性金属複合化導電繊維の創出—超臨界二酸化炭素を用 いた金属複合化デポジションシステムの構築とその応用—	88 ~ 89
16	工学研究科	原子力・エネルギー 安全工学	講師	鈴木 啓悟	腐食損傷を受けた構造物に対する非破壊的残存板厚算定を目的 とした基礎的研究	90 ~ 91
17	子どものこころの 発達研究センター	こころの形成発達研 究部門	特命講師	岡 雄一郎	長連合ニューロンの個性獲得と軸索投射の分子機構の解析	92 ~ 93
18	テニュアトラック 推進本部		助教	小澤 大作	細胞外シャペロンによる蛋白質品質管理機構の解明	94 ~ 95
19	テニュアトラック 推進本部		助教	本田 信治	糸状菌における二次代謝産物遺伝子群の不活性化機構の解明	96 ~ 97

【東日本大震災からの復興に関連する調査・研究の支援】

1	医学部	地域医療推進講座	講師	山村 修	東日本大震災被災者を対象とした受診行動促進支援法の創出 研究	98 ~ 99
2	工学研究科	建築建設工学	教授	福原 輝幸	東北塩害農地における除塩事業の事前・事後評価	100 ~ 101
3	工学研究科	原子力・エネルギー 安全工学	教授	玉川 洋一	福島県高線量地域の屋内被曝量低減に関する研究	102 ~ 103

■福井大学生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業

【学内共同研究等】

1	医学部 工学研究科	人体解剖学・神経科学 知能システム工学	助教 教授	伊藤 哲史 池田 弘	in vitroおよびin vivoイメージングを用いて聴覚神経回路に おける聴覚情報の統合の仕組みを探る	106 ~ 107
2	工学研究科	生物応用化学	准教授	里村 武範	色素依存性D-アミノ酸脱水素酵素の機能と構造解析及び応 用開発	108 ~ 109
3	附属国際原子力工学 研究所		教授	安田 仲宏	大規模な細胞解析を想定した高速コロニーカウンター開発・ 製品化	110 ~ 111
4	工学研究科	ファイバーアメリ ティ工学	准教授	藤田 聡	細胞外マトリクスのナノファイバー構造に着目した3次元組 織ビルドアップ	112 ~ 113
5	医学部	分子遺伝学	准教授	黒岡 尚徳	ヒ素誘導性細胞死における、ヒ素結合タンパク質Id3の役割	114 ~ 115
6	医学部	ゲノム科学・微生物学	学内講師	竹内 健司	C型肝炎ウイルス非構造蛋白質のチロシンリン酸化とそのウ イルス宿主間相互作用における重要性	116 ~ 117
7	医学部	分子生体情報学	学内講師	矢澤 隆志	生殖腺体細胞における遺伝子発現の性差とその機能の解明	118 ~ 119
8	子どものこころの 発達研究センター	こころの形成発達研 究部門	特命助教	猪口 徳一	皮質脊髄路軸索側枝形成における微小管制御機構の解析	120 ~ 121
9	附属国際原子力工学 研究所		特命助教	松尾 陽一郎	蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた生体分子の放射線によ る損傷量評価手法に関する研究	122 ~ 123

■福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成24年度公募採択型研究費

【重点プロジェクト研究】

1	医学部	内科学(1)	准教授	吉田 明	抗アポトーシス分子を標的とした癌治療法の開発	126 ~ 127
---	-----	--------	-----	------	------------------------	-----------

【学内共同研究等】

1	医学部	小児科学	講師	川谷 正男	小児同胞例を用いた発達障害における脳内神経ネットワーク	128 ~ 129
2	医学部	精神医学	講師	高橋 哲也	障害の解明：非線形解析による脳生理学的検討	
2	医学部	小児科学	教授	大嶋 勇成	小児気管支喘息患者の局所的炎症マーカーの開発	130 ~ 131
3	医学部	産科婦人科学	講師	黒川 哲司	HPV感染の概念を取り入れた新しいコルポスコピー（子宮腔 部拡大鏡診）の開発	132 ~ 133
4	医学部	基礎看護学	准教授	上原 佳子	健康な成人女性に対するアロマセラピーを併用したハンド	134 ~ 135
4	医学部	ゲノム科学・微生物学	教授	定 清直	マッサージの心理的・生理的効果	
4	医学部	行動基礎科学	教授	安倍 博		
5	医学部	腫瘍病理学	教授	伊藤 浩史	癌の病理診断及び治療マーカーとなるマイクロRNAの検索	136 ~ 137
6	医学部	分子生体情報学	准教授	水谷 哲也	癌の病理診断及び治療マーカーとなるマイクロRNAの検索 (3)	138 ~ 139
7	医学部附属病院	リハビリテーション部	理学療法士	松尾 英明	マウス神経障害性疼痛モデルに対する経皮的末梢神経電気刺 激(TENS)の効果	140 ~ 141
8	医学部附属病院	皮膚科	医員	知野 剛直	胎仔期循環血液内の間葉系幹細胞を利用した遺伝性・自己免 疫性皮膚疾患の新規治療法の確立	142 ~ 143
9	医学部	内科学(2)	講師	濱野 忠則	2型糖尿病患者におけるタウ蛋白オリゴマーを介するアルツ ハイマー病発症機序の解明	144 ~ 145

No.	部 局	講座・専攻・領域	職	研究代表者	研 究 課 題	目次
-----	-----	----------	---	-------	---------	----

■福井大学産学官連携本部平成24年度実用化研究助成(FUNTECフォーラム 福井大学研究シーズ紹介ポスター発表)

【知財創出研究】

1	工学研究科	情報・メディア工学	准教授	森 幹男	骨導音を用いた歯音・口唇開閉音モールス装置の試作	148
2	工学研究科		特命助教	坂元 博昭	超高感度バイオデバイスを旨指した導電性ナノファイバー電極の開発	149

【知財育成研究】

1	工学研究科	生物応用化学	准教授	寺田 聡	細胞培養の添加因子	150
2	工学研究科	材料開発工学	教授	橋本 保	環化ポリマーを用いた高透過性・高選択性ガス分離膜の開発	151
3	医学部	生体防御研究室	講師	伊保 澄子	特許物質オリゴDNAを用いた免疫賦活を伴うがんの分子標的・細胞療法	152
4	医学部	統合生理学	助教	成田 和巳	マルチ同位体標識化合物を用いた高感度カテコールアミン自動分析法の確立	153

※所属・職については平成24年度末時点の表記としています



---

**平成24年度  
福井大学研究育成経費**

---

## 福井大学研究育成経費「大型の競争的資金獲得を目指す研究の支援」 異分野融合による多方面からのエピジェネティクスの解明

研究代表者： 沖 昌也（工学研究科・准教授）

共同研究者： 吉田 俊之（工学研究科・教授）、水谷 哲也（医学部・准教授）

<b>概要</b>	ヒトゲノムプロジェクトが終了し、ヒトという複雑な生物を作り出すには予想以上に遺伝子数が少なく、DNA 配列に依存しない新たな転写制御機構の存在が示唆された。我々はそのうちの1つであるエピジェネティクスという現象に注目し、研究を行った。エピジェネティクスはほぼ全ての真核生物に共通して見られ、種を越えて保存された制御機構の1つである。我々は、現在までに遺伝子破壊が容易に行え、遺伝学的解析や生化学的解析技術が進んでいることにより分子レベルでのメカニズム解明には最適な出芽酵母をモデル生物として用い研究を行ってきた。本研究では、出芽酵母を用いてより詳細に分子レベルでのメカニズム解明を行い、得られた知見を、ヒト及びマウス細胞等の他の生物種を用いて解析し、種を越えたエピジェネティクス制御機構の解明を目指した。また、情報の分野を専門とする研究者とも協力し、現在の技術では不可能な全遺伝子レベルでの解析を可能とする、新たな視点からのエピジェネティクス研究を行うための、独自の解析システムの開発を試みた。
<b>関連キーワード</b>	エピジェネティクス、単一細胞、出芽酵母、間葉系幹細胞、ヒストン修飾酵素

### 研究の背景および目的

2003年、ヒトの全DNA配列が解読され、大半の研究員の予想よりもはるかに少ないたった約23,000個しか遺伝子が存在しないことが明らかとなった。複雑かつ精巧な人間の制御を行うためには同じDNA配列から多様な遺伝子発現制御を生み出すエピジェネティックな制御機構が不可欠である。ヒトなどの分化・発生や疾患のほか、多能性幹細胞“iPS細胞形成”においてもエピジェネティックな制御が重要な役割を担うことは知られているが、分子レベルでのメカニズムは未知の部分が多い。本プロジェクトでは、酵母を用いる研究グループ（沖）と、ヒト及びマウス細胞を用いた研究を行っている研究グループ（水谷）、画像解析を専門に研究している研究グループ（吉田）が共同し、独自の解析手法を用い、種を越えたエピジェネティクスメカニズム解明を目指すことを目的とした。

エピジェネティックな発現制御は個々の細胞によって異なるため、沖グループは出芽酵母をモデル生物として用い、世代を越えた発現状態の変化

を追跡する「単一細胞追跡システム」を確立した。しかし、1つ1つの細胞の親子関係を判断しながら追跡する必要があり、その作業を現在、手作業で行っているため膨大な時間を費やして解析している。そこで、吉田グループと共同で独自の解析ソフト開発を目指した。ソフトを用い、自動で解析することが可能になれば、膨大な量のデータを短時間で処理出来、得られる情報も膨大となり、研究の飛躍的な発展が期待される。

また、水谷グループは、間葉系幹細胞を用い、ホルモン産生細胞に分化するシステムを確立しており、沖グループの酵母で得られた知見を、ヒト及びマウス細胞を用い解析し、種を越えた、共通のエピジェネティクス制御メカニズムの解明を目指した。

上記のように、異なる研究分野の研究者が協力し合って、独自の視点から「エピジェネティクス」のメカニズム解明を目指すことが本プロジェクトの最大の特徴である。

### 研究の内容および成果

(1) 独自に開発した「単一細胞追跡システム」を用いた解析（沖）

染色体上でエピジェネティックに発現状態が変化する領域を多数同定した。同定した領域に蛍光タンパク質をコードする遺伝子を挿入し、単一細胞追跡システムにより、世代を越えた発現状態の変化及び、同一細胞内での異なる領域間での相関関係を解析した（図1）。その結果、異なる制御領域ではそれぞれ独自の規則性が見られ、また、相関関係のある領域と、独立して機能している領域

が存在していることが明らかとなった（現在論文投稿中）。

(2) 酵母全遺伝子から分離したエピジェネティックな現象に関与する遺伝子の解析（沖）

既に我々は、全遺伝子約6000個からエピジェネティックな発現制御因子を55個分離していた。本年度はそのうちヒストン修飾酵素複合体の構成因子であるSgf73、Sgf29、Ada1、Ada2を中心に解析した。最初にSgf73のドメイン解析を行うことにより、エピジェネティックな発現制御に必要な最

小領域を決定し、Sgf73 の C 末端に存在する 30 アミノ酸が重要であることを明らかにした。また、同定した最小領域に結合するタンパク質を質量分析法により解析し、ヒストンアセチル化酵素複合体である SAGA 及び SLIK の構成因子が多数同定された。更に、ヒストンアセチル化活性を失った変異株を用いた解析により、ヒストンのアセチル化活性がエピジェネティックな発現制御調節に重要であることを明らかにした（現在論文投稿中）。

同様に、Sgf29、Ada1、Ada2 のエピジェネティックな発現制御に重要な最小領域を、ドメイン解析により決定した。興味深いことに、Sgf29 には 2ヶ所、Ada1 には 1ヶ所、Ada2 には 2ヶ所の複数の領域がエピジェネティックな発現制御に関与することが明らかとなった。

#### (3) 酵母で機能が明らかになった遺伝子 *ADAI*、*GCV5* のヒトホモログを、siRNA により処理した幹細胞における分化の影響解析（水谷・沖）

解析には、酵母の実験系により同定した、エピジェネティックな発現制御因子、Gen5 と Ada1 を用いた。本年度は、それぞれのヒト及びマウスのホモログに注目し、主に siRNA で処理するための条件決めを行い、生育に必須であるか否かを確認した。その結果、我々が解析に用いる細胞では、上記タンパク質を失っても生育に影響が無いことが明らかとなった。

#### (4) 分化前後でエピジェネティックにコントロールされる遺伝子近辺のクロマチン構造変化の解析（水谷）

酵母において観察されたエピジェネティックな制御領域に特異的に存在するヒストンの修飾状態についてクロマチン免疫沈降法を用い解析した。その結果、酵母とヒト細胞において同様の修飾を受けており、種を越えて共通の制御機構が存在することが明らかとなった。

#### (5) 「単一細胞追跡システム」によって得られた結果を自動で解析できるソフトの開発（吉田）

昨年度から継続して開発を進めてきたが、昨年度よりも、追跡の過程でのエラーが大幅に減少し、またエラーが起きた際の対処方法も改善された。上記問題点が改善され、より精度の高い、実用的なソフトに近付いてきた。

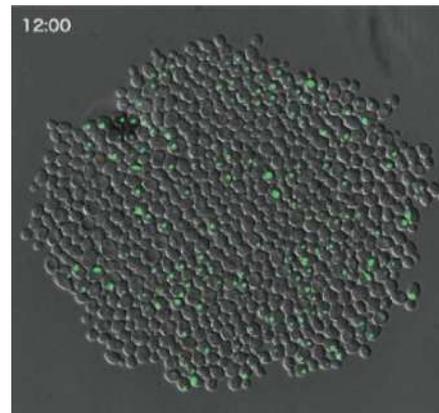


図 1：単一細胞から分裂を開始させて、分裂を繰り返した際の発現状態の変化の様子

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

- (1) Kawabe, S. et al., *Endocrinology* (in press)
- (2) Imamichi, Y. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press)
- (3) Yazawa, T. et al., *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press)
- (4) Ju, Y. et al., *Endocrinology* 153, 5522-34 (2012)

#### 「投稿中論文」

- (1) Mano, Y. et al., *PLOS Biology*, under revision.
- (2) Kamata, K. et al., Submitted.

#### 「国際学会発表」

- (1) Oki, M. et al., Cold Spring Harbor Meeting (New York, USA) 2012, Sep.
- (2) Mano, Y. et al., Cold Spring Harbor Meeting (New York, USA) 2012, Sep.
- (3) Mizutani, T. et al., The Endocrine society's 94th Annual Meeting 2012. 6
- (4) Mizutani, T., et al., 15th International Congress on Hormonal Steroid and Hormones & Cancer 2012. 11

- (5) Mizuno, M. et al., Proc. Of International Workshop on Advanced Image Technology 2013, 1

#### 「特記事項」

- (1) 今年度の研究成果が評価され、来年度の国際会議 2 件に招待された。いずれも「Single Cell Genomics」に関するセッション。
- (2) 9月に「酵母エピジェネティクス」の国際会議を JST と日本分子生物学会の支援を得て福井で主催する。

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- (1) 申請種目：JST さきがけ「エピジェネティクスの制御と生命機能」（代表、沖）  
助成年度：平成 21 年度～平成 24 年度  
研究課題：出芽酵母を用いたエピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解明
- (2) 申請種目：基盤研究 (C)（代表、水谷）  
助成年度：平成 24 年度～平成 26 年度  
研究課題：新たなステロイド合成酵素の同定と高次クロマチン構造変換を介した転写調節機構の解明

## 福井大学研究育成経費「大型の競争的資金獲得を目指す研究の支援」 分子配向性バイオデバイス構築によるバイオ電池開発

研究代表者：末 信一郎（工学研究科・教授）

共同研究者：米沢 晋（産学官連携本部・本部長）中根 幸治、藤田 聡、里村 武範（工学研究科・准教授）、坂元 博昭（工学研究科・特命助教）、

概 要	酵素を触媒とするバイオ電池は、安全性が高い、軽量化・小型化が容易であるといった利点から次世代エネルギーとして期待されているものの、電子移動効率や酵素の安定性などの種々の問題から、実用化への道のりは遠いものとされてきた。本プロジェクトは、バイオ、材料、電池、電気化学の各分野の研究者が結集連携することにより、従来困難とされていたバイオ電池に適したバイオデバイス構築を目的として、まず耐熱性 PQQ-依存型グルコース脱水素酵素(PQQ-GDH)の高配向固定化法の検討及びその電流特性の検討を行った。酵素分子のN末端へHis-tagを導入し、電極上に電析した銅原子を介して酵素分子を一定方向に配向させた電極を開発した。電極上において酵素分子の配向を高めることにより、約4倍の電流密度の向上に成功した。
関連キーワード	電気化学、バイオエレクトロニクス、分子配向、酵素工学、ナノファイバー

### 研究の背景および目的

持続可能な社会の構築を目指し、従来の化石燃料に代わる次世代エネルギーの多角化を目指して新エネルギー開発を行っていく必要がある。こうした背景のもと、自然界に広く存在するバイオマスから直接電力を得る装置として、バイオ燃料電池が注目されている。バイオ燃料電池は、触媒に酵素を用いてバイオマスを酸化し、その酸化反応で生じるエネルギーを電気エネルギーに変換する発電装置である。バイオ燃料電池は、「使用したいその場」に対応した微小電源として人工臓器やロボット型内視鏡などの体内用ロボットへの応用や携帯型電子機器の電源など多様な用途への展開も期待されている。これまでに報告されてきた多くの酵素燃料電池は、数日間しか電池として作動出来ず、また、エネルギー変換効率や酵素の安定性が低いといった課題があった。

本研究では、エネルギー変換素子として、高い安定性を有した超好熱菌由来酵素に注目した。超好熱菌は温泉や海底火山の熱水域など90℃以上の高温環境に育成している微生物である。そのため、

超好熱菌が生産する酵素は高温で高い安定性を有する。

酵素をバイオ燃料電池に用いるためには、より効率の良い酵素-電極間の界面電子移動が求められる。そのためには、酵素を電極上へ配向性を持たせて固定化することが有効であるが、これまで、バイオ燃料電池用電極への酵素の固定化は、水溶性カルボジイミド(EDC)による化学結合や、ナフィオンを用いた電極表面のコーティングにより行われており、酵素分子の電極上での向きを制御するには至っていなかった。

本研究では、安定性に優れ、かつ、高効率な電極反応を実現するバイオアノード電極の構築を目的とした。アノード電極素子として、超好熱性古細菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来 Pyrroloquinoline quinine (PQQ) 依存型グルコース脱水素酵素 (PQQ-GDH) にヒスチジンタグ (His-tag) を導入することで電極上への配向性を有した固定化を行い、その電気化学特性の評価を行った。

### 研究の内容および成果

本研究で用いたPQQ-GDHの活性部位は未だ明らかにされていないが、補酵素であるPQQが存在する付近に活性部位が存在すると推測される。そこでGDH分子のN末端にHis-tag(ヘキサヒスチジン配列)を遺伝子工学的的手法により導入したHis-PQQ-GDHを設計し、発現・精製を行った。pET-15bを用いて、耐熱性酵素である *P. aerophilum* 由来 PQQ-GDHのN末側にHis-tagを修飾するためのプラスミド(pET15b-PaeAsd)の構築を行った。次に

pET15b-PaeAsdを *E. coli* BL21 codonplus IRLPに導入し、His-tagが付加されたPQQ-GDH (His-PQQ-GDH)のタンパク質大量発現を行った。精製酵素を解析した結果、His-PQQ-GDHはHis-tagを修飾していないPQQ-GDHと同様の比活性を示し、His-tagの酵素活性への影響が見られないことを確認した。

得られたHis-PQQ-GDHを用いて、酵素燃料電池のためのアノード電極の構築を試みた。

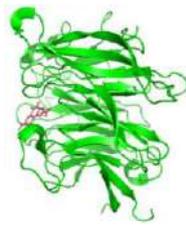


Fig.1 超好熱性古細菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来 Pyrroloquinoline quinine (PQQ)依存型グルコース脱水素酵素(PQQ-GDH) 3次元構造

酵素と電極間に配向性を持たせて固定化するために電極表面に銅を電析させ、銅-His-tagのアフィニティを利用した酵素固定化を行った(Fig. 2a)。また、コントロールとして、カーボン電極を酸化処理してカルボキシル基を導入し、EDCを用いてアミド結合により、ランダムに PQQ-GDH を固定化した電極を作製した(Fig. 2b)

作製した電極を用いてCVを測定した(Fig. 3)。His-PQQ-GDH固定化電極(A)に基質であるグルコースを添加すると、PQQに基づく酸化波が大きく現れた(B)。一方、His-tagを持たないPQQ-GDHを固定化した電極(C)ではグルコースを添加してもPQQの酸化波は見られなかった。ここでは、電極と酵素間で電子の授受を媒介するメディエータとなるPQQは添加していないが、酵素分子に結合す



Fig. 2a 配向性の高い酵素固定化



Fig. 2b ランダムな酵素固定化

るPQQが介在して酵素反応に伴い発生した電子を電極へ受け渡しているものと考えられる。

化学結合によるランダムな向きに固定化された酵素電極では、最大電流密度 $27 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であったが、配向固定化電極ではその約4倍の電流密度を得ることができた。メディエータフリーでここまで電流密度をあげた電極は未だ報告されていない。

本研究では電極上に電析した銅を介して His-PQQ-GDH を固定化することに成功した。また、本電極では遊離の PQQ をメディエータとして添加することなく酵素-電極間の電子授受が確認された。なお、電子移動効率の増大については今後さらなる検討と機構解明が求められる。さらに、電極への分子修飾技術の開発やナノファイバー材料などを検討することによってさらに電流密度をあげることが期待される。

本研究では、バイオ電池を構成するためのカソード電極についても開発を行った。カソード用エネルギー変換素子としても、アノード同様に超好熱性アーキア由来の *Pyrobaculum aerophilum* Muticopper oxidase を触媒として用いて酸素を還元するバイオカソード電極の開発を進めている。

併行して、電流密度を大幅に向上させるためナノファイバー電極の開発も行うなどバイオ電池の他の構成要素についても併せて検討を進めている。

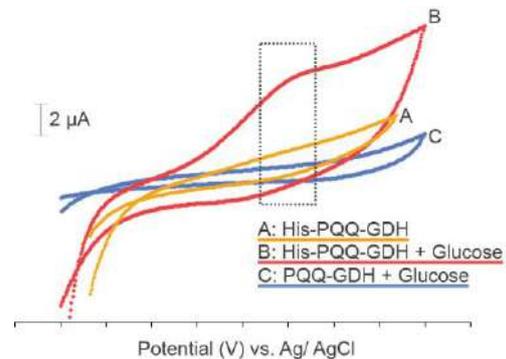


Fig. 3 酵素固定化電極のサイクリックボルタモグラム

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

[発表論文]

1. T. Satomura, Y. Hara, S. Suye, H. Sakuraba, T. Ohshima. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a galactose 1-phosphate uridylyltransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. F68,330-332 (2012).

[国際学会]

1. S. Suye, S. Kurata, H. Yoshimura, Takenori Satomura, S. Fujita, K. Kuroda, M. Ueda, Mutation of lipase on the yeast cell surface by

error-prone PCR for application of eco-friendly fiber processing, isCEBT 2012, Taiwan, (invited)  
2. H. Sakamoto, R. Hatsuda, L. Li, K. Miyamura, S. Sugiyama, Blood plasma separation PMMA device using capillary phenomenon. isCEBT 2012, Taiwan, (invited)

[国内学会]

生物工学会 1 件、繊維学会 3 件、バイオマテリアル学会北陸支部 1 件、農芸化学会 1 件 電気化学会 1 件：計 7 件

「特記事項」

特許申請準備中 2 件

- ・高感度バイオセンサ
- ・導電性ナノファイバー

## 福井大学研究育成経費「大型の競争的資金獲得を目指す研究の支援」 がん分子イメージングを応用した新しいがん治療法の開発

研究代表者：岡沢 秀彦（高エネルギー医学研究センター・教授）

共同研究者：清野 泰（高エネルギー医学研究センター・教授）、森 哲也（同助教）、木村浩彦、菊田健一郎、藤枝重治、吉田好雄（以上、医学部・教授）大山伸幸（同・講師）藤林泰久、佐賀恒夫（放射線医学総合研究所）、山本和高（福井県立陽子線がん治療センター）

概 要
1980年代初頭に“がん”が我が国最大の死因となって以降、高齢化社会の到来とともにその死亡率は増加し続けており、がん診療の強化は国民的課題となっている。強度変調照射(IMRT)や陽子線・重粒子線治療装置など最新の放射線機器が臨床に導入される一方で、進行がんに対する新たな治療戦略が求められている。こうした背景のもと、治療計画の個別化、高精度化を実現する分子イメージング技術を用いた生体機能画像を治療法選択・決定などに取り入れる集学的取り組みが求められている。本研究は腫瘍分子イメージングの基礎検討とその臨床応用を繋ぐ橋渡し研究であるが、最終的には実際のがん治療に役立つ機能画像法の開発を目指している。その具体的なテーマとして本年度は、1) 低酸素イメージングのがん治療計画への応用、2) 受容体イメージングのホルモン依存性腫瘍への応用、3) 異なる代謝機序のPET薬剤による戦略的がん診療の3項目に関して検討した。
関連キーワード
分子イメージング、ポジトロンCT (PET)、難治がん、放射線治療、ホルモン化学療法

### 研究の背景および目的

強度変調放射線治療(IMRT)や、分子標的薬等の新たな抗がん剤の開発など、がん治療の選択肢はこれまでになく広がりを見せ、個別医療化が進んでいる。本学ではこれまで、21世紀COEやリーディングプロジェクト等の大型助成金による研究課題や多くの研究プロジェクトにおいて、 $^{18}\text{F}$ -fluoroestradiol(FES)やCu-ATSM等各種PET薬剤を用い、基礎から臨床に至る幅広い腫瘍イメージングに関する研究成果を上げてきた。これらの薬剤を応用した申請者らの研究は、臨床診断としての有用性が認められ、国際学会での受賞等、世界的にも高く評価されてきた。PETによる機能画像を用いたがん悪性度評価および適切な治療計画を実施することで、大きさや広がりによる画一的な治療を避け、個々の患者ごとになんかの状態に合わせたテーラーメー

ド型の効果的治療を行うことが可能であり、臨床的意義は極めて高い。本研究課題では、腫瘍分子機能画像の基礎検討から得られた成果を実際のがん治療に応用する画像法開発を目標とし、本年度は以下の3つ検討を行った。1) 低酸素イメージング薬剤であるCu-ATSM集積を強度変調型のがん治療計画に導入するためのPOC(proof of concept)確立のための臨床例集積、2) 子宮がん・卵巣がん・乳がんを対象にFESを利用した受容体イメージングによる治療法選択と長期予後に関する検討を行うとともに、 $^{18}\text{F}$ -FDHT(アンドロゲン受容体リガンド)等新たな受容体イメージング製剤の臨床導入、3)  $^{18}\text{F}$ -fluorothymidine (FLT)や $^{11}\text{C}$ -酢酸による治療効果の早期判定等、異なる代謝機序のPET薬剤による戦略的がん診療の展開、の3項目である。

### 研究の内容および成果

#### (1) 低酸素イメージングのがん治療計画への応用

低酸素イメージングは、がん治療抵抗部位の描出法として臨床応用が期待されている。我々は低酸素プローブとして独自に開発した $^{62}\text{Cu}$ -ATSMを用い、肺がん・頭頸部がんを主な対象疾患として、 $^{62}\text{Cu}$ -ATSM集積と治療抵抗性との相関を検討した。本年度は肺がん患者の登録が少なく、主に頭頸部がんでの解析となったが、従来の報告通り扁平上皮がんではFDG集積との乖離を認め、腺がんでは同様の分布を示した。がん集積部ピーク値と正常部筋内集積との比をT/M比とし、集積の程度で患者を2群に分けた際の生存曲線は図1の通りである。 $^{62}\text{Cu}$ -ATSM集積が低い患者ほど、再

発・転移・死亡を来すまでの期間が長く、予後が良好な傾向にあることが示唆された。今後更に症例を増やすとともに、観察期間を延長し、両群間の差異を明らかにする予定である。

#### (2) 受容体イメージングのホルモン依存性腫瘍への応用

これまで $^{18}\text{F}$ -FES-PETによる子宮腫瘍の良悪性鑑別診断における有用性を報告してきたが、筋腫・肉腫の鑑別にもFES-PETによるエストロゲン受容体(ER)密度の評価が重要であるかを検討した。FESおよびFDG-PET検査終了後、子宮摘出術が施行され、病理組織学的診断により最終診断とした。

組織標本では免疫組織学的解析も加え、PET 薬剤集積と免疫組織染色(IHC)スコアの相関を検討した。FES 集積は ER $\alpha$ 、プロゲステロン受容体(PR)と有意な相関を示して筋腫群で有意に集積および受容体発現が高いことが示された。一方 FDG 集積は、ブドウ糖トランスポーター(GLUT1) や腫瘍増殖能マーカーの Ki67 と相関し、肉腫群で有意に高値であった。各腫瘍で FDG/FES 比を算出すると、筋腫群と比べ肉腫群で有意な高値を認めた。FES 集積は ER $\alpha$ 発現を反映し、肉腫の特徴である ER $\alpha$ 発現の低下を描出することで、良悪性の鑑別に有用であることが示された。

**(3) 異なる代謝機序の PET 薬剤による戦略的がん診療**

核酸代謝を反映する [ $^{18}\text{F}$ ]-FLT PET による細胞増殖能イメージングを肺がん、卵巣がん等の化学療法の治療効果判定に応用し、臨床的有用性が示されてきている。

肺がんでは、3-4 期進行がんを対象に、治療前と化学療法 1 クール終了後にそれぞれ FDG-および FLT-PET を行い、いずれの集積が予後を反映しているか検討した。対象は切除不能非小細胞肺がん 10 例程度で、症例数は少ないものの、各トレーサーの集積量により患者を 2 群に分けると、治療開始前 FLT 集積が低値の群で高値群と比較し、有意に予後不良である結果が得られた。今後、治療前後での集積量の変化等を指標として、更に詳細な予後予測因子を検討する予定である。

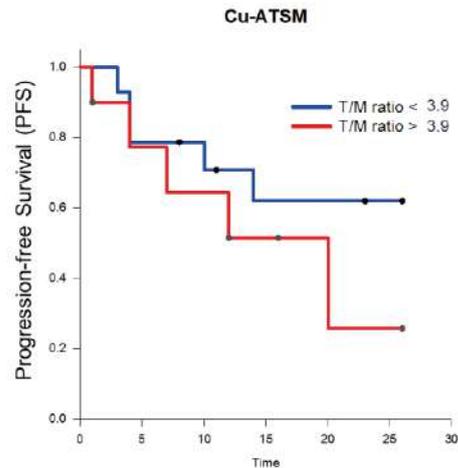


図 1. T/M 比低値(< 3.9)の患者群(青線)は高値群(> 3.9: 赤線)より予後良好の傾向であった。T/M 比: tumor-to-muscle 比、横軸は観察期間(月)

卵巣がんは、経過観察できた症例で、5 例程度と少ないが、少数例でも FLT 集積が治療効果を良く反映した結果が得られており、ホルモン化学療法前後での集積変化が認められた症例では、その後腫瘍の縮小傾向が認められ、逆に集積変化の認められなかった症例では増大傾向にあったため治療法を変更し、良好な反応性が得られた。今後の更なる症例蓄積による結果が期待される。

**本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況**

「主な発表論文等」

Kositwattanak A, et al. Different distribution of  $^{62}\text{Cu}$  ATSM and  $^{18}\text{F}$ -FDG in head-and-neck cancers. *Clin Nucl Med*. 2012; 37: 252-257.

Kiyono Y, Mori T, Okazawa H. Positron emission tomography radiopharmaceuticals for sex steroid hormone receptor imaging. *Curr Med Chem*. 2012; 19: 3266-70.

Tsujikawa T, et al. Oestrogen-related tumour phenotype: PET characterisation with  $^{18}\text{F}$ -FDG and  $^{18}\text{F}$ -FES. *Br J Radiol*. 2012; 85: 1020-1024.

Kobayashi M, et al. Transport mechanism of  $^{11}\text{C}$ -labeled L- and D-methionine in human-derived tumor cells. *Nucl Med Biol*. 2012; 39:1213-1218

Zhao Z, et al. FES- and FDG-PET for differential diagnosis and quantitative evaluation of mesenchymal uterine tumors: Correlation with immunohistochemical analysis. *J Nucl Med*. 2013; (e-pub ahead of print: March 7).

Tsuchida T, et al. Imaging the early response to chemotherapy in advanced lung cancer with diffusion-weighted magnetic resonance imaging compared to fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography and computed tomography. *J Magn Reson Imaging*. 2013 (in press).

Tsuyoshi H, et al. [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluorothymidine positron

emission tomography is a potential predictive imaging biomarker of the response to gemcitabine-based chemotherapeutic treatment for recurrent ovarian cancer: preliminary results in three patients. *Clin Nucl Med* 2013 (in press).

吉田好雄, 岡沢秀彦 PET 画像診断による子宮筋腫・肉腫の鑑別診断法 日本医事新報 2013; 4590: 65-70.

津吉秀昭 他 PET による悪性腫瘍の治療戦略 5. 卵巣癌 PET ジャーナル(in press)

「特記事項」

特になし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

文部科学省科学研究費基盤研究(A)(一般)H24-27 代表・岡沢秀彦「腫瘍分子イメージングによる効果的がん治療法開発のための総合研究」(採択: H24 年度 12,740 千円)

独立行政法人科学技術振興機構(JST) 分子イメージング研究戦略推進プログラム「難治性がん治療に向けた機能画像法の開発」(採択: H24 年度 6,800 千円)

## 福井大学研究育成経費「大型の競争的資金獲得を目指す研究の支援」 核融合プラズマ計測への適用のための遠赤外ジャイロトロン の飛躍的高出力化

研究代表者： 斉藤 輝雄（遠赤外領域開発研究センター・教授）  
共同研究者： 小川 勇（遠赤外領域開発研究センター・教授）、立松 芳典（遠赤外領域開発研究センター・准教授）、池田 亮介（遠赤外領域開発研究センター・特命助教）、山口 裕資（遠赤外領域開発研究センター・機関研究員）

<b>概要</b>	超高密度核融合プラズマのイオン温度の新計測法開発に必要な 100 kW 級高出力遠赤外ジャイロトロンの実現が強く求められている。研究代表者のグループはこれまでに、超伝導マグネット で制約されない 2 次高調波発振を用いて、周波数約 0.4 THz のサブテラヘルツ帯で、ジャイロトロン の 2 次高調波発振として世界最高出力 80 kW 以上の単独発振を達成している。本研究では、さらなる高出力を安定して発振させるため、基本波を用いた実験を開始した。新たなモードの探索、このモードに適合し、かつ、高ピッチ因子・低速度分散を実現する新規電子銃の設計、さらには応用目的に適合させるための内蔵モードコンバータの設計を進め、これらの設計を取り入れたジャイロトロンを新規製作した。24年度は、12 T 超伝導マグネットを用いて実験を開始した。その結果、300 GHz 帯で 200 kW を超える発振を達成した。また、この結果を学問的基盤として、科研費基盤研究 (A) に申請した。
<b>関連キーワード</b>	高出力遠赤外光源、ジャイロトロン、核融合プラズマ計測、モードコンバータ

### 研究の背景および目的

#### 1. 研究の背景

周波数がサブテラヘルツ帯にある遠赤外ジャイロトロン の応用として強い期待のある核融合プラズマ計測への適用を実現するため、その飛躍的な高出力化が求められている（例えば、プラズマ・核融合学会誌 **84**, pp.853-916 (2008)に掲載の特集記事、Y. Tatematsu et al., IAEA Fusion Energy Conference (2010)発表論文）。ジャイロトロン の周波数  $f$  は、 $n$  を整数、 $f_{ce}$  を電子サイクロトロン周波数として、ほぼ  $f \approx n f_{ce}$  で決まる。 $f_{ce}$  は磁場強度  $B$  に比例し、相対論効果を考えなければ  $f_{ce} [\text{GHz}] \approx 28 \cdot B [\text{T}]$  である。 $B = 10 \text{ T}$  で  $280 \text{ GHz} = 0.28 \text{ THz}$  となる。これまでサブテラヘルツ帯では、超伝導マグネットの磁場強度の制約から、 $n=2$  の 2 次高調波が用いられてきた。研究代表者らはこれまでに、科研費・基盤研究 (B) 等による研究により、周波数 0.4 THz 帯において、ジャイロトロン の 2 次高調波発振として世界最高出力 50 kW 以上を達成し (Phys. Rev. Lett. 誌に発表)、さらに、国際共同研究による電子銃の改良等から、出力記録を更新し 83 kW を得た。しかし、高出力化には  $n=1$  の基本波発振が望ましいことが理論的に指摘されている。最近の技術進歩により、遠赤外ジャイロトロンにも適用可能な内径 100 mm 程度の強磁場超伝導マグネットの使用が可能になってきた。

#### 2. 研究目的

本研究では、新たに基本波を用いることにより、遠赤外領域で 200 kW 級の高出力ジャイロトロン発振を実証する。さらに、安定な長パルス発振に挑戦する。

この結果、サブテラヘルツ帯で世界最高出力の遠赤外ジャイロトロンが実現し、ジャイロトロン物理、ひいてはプラズマ科学として大きい意義を持つ。加えて、遠赤外ジャイロトロンをプラズマ計測に応用するための実験計画を立案する上で、実証された結果に基づく提案が可能になる。

図 1 はこれまでに得たサブテラヘルツ帯 2 次高調波ジャイロトロン の出力記録と、本研究の目標を示す。

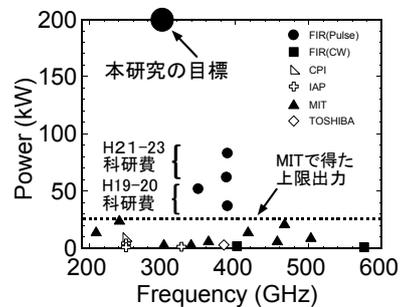


図 1

### 研究の内容および成果

本研究では、最近遠赤外領域開発研究センターに設置された内径 100 mm の 12 T 超伝導マグネッ

トを用いて基本波 0.3 THz ジャイロトロンの実験を開始した。図 2 に、12 T 超伝導マグネットに装



図 2

着されたジャイロトロンの写真を示す。モードコンバータを内蔵して水平方向にガウスビームを出力することも、このジャイロトロンの大きな特徴である。

実験では、まずファブリ・ペロー干渉計による周波数測定に基づき発振モードを同定した。発振モードとは、ジャイロトン共振器内の電磁場構造を指す。測定された発振周波数は 294.17 GHz であり、設計通り、TE<sub>14,2</sub> モードの発振を確認した。赤外線カメラを用いて出力ビーム形状を計測し、

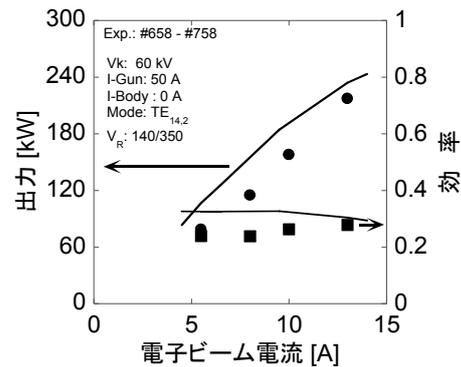


図 3

設計計算に対応した形状での放射を確認した。

次に、最高出力試験を実施した。図 3 は、各電子ビーム電流  $I_b$  に対して、運転条件の最適化の結果得られた最高出力を示す。 $I_b = 14$  A において約 220 kW を得、200 kW 級の高出力ジャイロトン発振を実証した。長パルス試験では、20  $\mu$ s 以上のパルス幅で安定して高出力発振させることに成功した。しかし、効率が目標値より低い。電子ビームの特性をさらによくするように設計変更した電子銃に換装後、高効率発振を目指す予定である。

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

##### 学術論文 (4 編発表)

1. T. Saito, Y. Tatematsu et al., “Generation of High Power Sub-THz Radiation from a Gyrotron with Second Harmonic Oscillation,” Phys. Plasmas **19**, 063106 (2012).
2. T. Saito, Y. Tatematsu et al., “Observation of Dynamic Interactions between Fundamental and Second-Harmonic Modes in a High-Power Sub-Terahertz Gyrotron Operating in Regimes of Soft and Hard Self-Excitation,” Phys. Rev. Lett. **109**, 155001 (2012).
3. O. Dumbrajs, T. Saito et al., “Calculations of Starting Currents and Frequencies in Frequency-Tunable Gyrotrons,” Jpn. J. Appl. Physics **51**, 126601 (2012).
4. Y. Yamaguchi, T. Saito et al., “Formation of a laminar electron flow for 300 GHz high-power pulsed gyrotron,” Phys. Plasmas **19**, 113113 (2012).

##### 国際会議論文 (14 件)

1. T. Saito et al., “Mode Competition and Cooperation in High Power Sub-THz Gyrotrons,” 37th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves, Wollongong, Australia, September 24-28, 2012, Tue-A-3-4.
2. Y. Yamaguchi, T. Saito, et al., “Development of a High-Power 295 GHz Fundamental-Harmonic Gyrotron,” 37th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves, Wollongong, Australia, September 24-28, 2012, Tue-A-3-5.
3. Y. Tatematsu, T. Saito et al., “Development of Gyrotrons FU CW GIII with a Gaussian beam output,” 37th International Conference on Infrared, Millimeter

and Terahertz Waves, Wollongong, Australia, September 24-28, 2012, Tue-Pos-33.

他 11 件 発表者は斉藤以外

#### 国内会議招待講演

斉藤輝雄「サブテラヘルツ帯 2 次高調波ジャイロトロンの高出力発振と非線形モード間相互作用」日本物理学会第 68 回年次大会、東広島市、2013 年 3 月 26 日-29 日、28pEC-1.

#### 国内会議発表 17 件

##### 「特記事項」

平成 25 年 3 月 14 日-15 日にセンターで開催した国際シンポジウムにおいて本研究は注目された。

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 学術研究助成基金助成金・挑戦的萌芽研究・H23-24・有限電荷効果を抑制したテラヘルツ帯ジャイロトン用小型大電流電子銃の開発・代表・採択・直接経費総計 3,000 千円
2. 科学研究費補助金・基盤研究 (A)・H25-28・高出力サブテラヘルツジャイロトロンの実現—新規高効率発振機構の適用—・代表・申請・直接経費総計 50,000 千円
3. 学術研究助成基金助成金・挑戦的萌芽研究・H25-26・赤外線熱画像計測によるテラヘルツ帯ジャイロトロン出力評価法の開発・代表・申請・直接経費総計 5,000 千円

福井大学研究育成経費「大型の競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**学習機構の発達・成熟に関する新たな分子基盤の解明と展開**

研究代表者： 佐藤 真（医学部・教授、子どものこころの発達研究センター長）

共同研究者： 黒田一樹（医学部・助教）

<b>概 要</b>	中枢神経での神経ネットワークの形成や成熟の仕組みの解明は、科学的な興味に留まらず、発達障害や精神疾患など脳機能異常を伴う諸疾患の根本的な原因究明につながる可能性を有する。中でもシナプスは脳の学習機構の生物学的基盤である。我々は、大脳皮質を例とし、そこでの神経細胞の8割近くを占める興奮性神経細胞が脳室周囲で生まれ法線方向に移動し、大脳皮質を構築する事象を研究する過程で、関連する分子として FILIP、さらに FILIP 分子類似の FILIP-L（仮称）を同定している。今回、これら分子が神経細胞移動とほぼ時期を同じくして始まるシナプスの成熟やシナプスでの神経情報伝達制御に関わることを見出した。これら分子は、特に後シナプスの実体である棘突起（スパイン）の形態とスパイン内でのグルタミン酸受容体局在制御に関わっていた。そして、これら分子は、アクチン結合蛋白の一つである非筋肉型ミオシンを介して働くことが明らかとなった。
<b>関連キーワード</b>	シナプス、棘、細胞骨格、グルタミン酸受容体、非筋肉型ミオシン

### 研究の背景および目的

「学習」の神経基盤は、軸索の新生・消褪による神経回路の組替え、もしくはシナプスでの神経伝達効率の変化である。特に臨界期以降においては、後者がその主たる基盤であり、後シナプス側にある棘突起（スパイン）の形態変化とスパインでの伝達に関わる機能分子の発現量、スパイン内局在変化が「学習」の生物学的実体である。一方、学習障害や発達障害の症例の多くでスパインの形態変異が認められ、同時にそれら疾患の原因遺伝子の多くはスパインでの機能分子の挙動に関わるものである。

シナプスでの神経情報伝達機構は、神経科学の中心的課題の一つとして精力的に研究がすすめられてきた。1990年代には受容体の同定や機能解析が進み、2000年以降は発生学的な観点からの解明が進んできた。さらに最近になり発達障害や精神・神経疾患発症との関連が大いに注目されてい

る。当初、簡単な制御機構が想定されたスパインでの情報伝達であるが、働く分子は100を超えるとの報告もある。

これらの事実の下、本研究では、さまざまな細胞内シグナルの終着点であり、形態制御の実体である細胞骨格系、なかでもアクチンの制御を軸とし、神経情報伝達機構の解明をすすめる。とりわけアクチンとの interaction によってスパインの形態と機能を制御しているとして現在大変注目されているアクチン結合蛋白である非筋肉型ミオシン（Rex et al, Neuron, 2010）にフォーカスし、同分子に結合する FILIP、並びに FILIP 類似の構造を持ち FILIP の発現しない海馬にて発現することを我々が見つけた新たな分子（FILIP-L と仮称）を対象に、これら分子がスパインにて果たす役割を解明する。

### 研究の内容および成果

我々はすでに、FILIP 並びに FILIP-L が非筋肉型ミオシンに結合することを観察している（未発表）。今年度、以下の成果を得た。

(1) FILIP 並びに FILIP-L はスパインの形態制御に関わる。

(2) FILIP 並びに FILIP-L はスパインでの非筋肉型ミオシンの局在に関わる。

FILIP、FILIP-L について、前者はノックアウトマウス、後者はノックダウンによって、それぞれスパイン形態と非筋肉型ミオシンの局在に変化が生じることを観察した。

(3) FILIP 並びに FILIP-L はグルタミン酸受容体のスパインでの局在に関わる。

NMDA 受容体のサブユニットである NR2A, NR2B のスパインでの局在変化を海馬神経細胞を用い、FILIP では強制発現系（FILIP は海馬神経細胞に発現していない）、FILIP-L はノックダウン細胞にて検討したところ、FILIP では NR2A、FILIP-L では NR2B の局在に変化が観察された。

(4) FILIP はグルタミン酸への反応性に関わる。いわゆる Bath application によりグルタミン酸を投与し、神経細胞の反応をカルシウム濃度を指標に計測したところ、FILIP ノックアウトマウスでは、コントロールに比し、反応性が大きく変化していた。

(5) FILIP-L のノックアウトマウスの作製。

FILIP-L のノックアウトマウスを作製し、現在キメラまでできた。FILIP-L は自閉症と関連があるとの

報告もあり、同ノックアウトマウスをモデルマウスとして利用可能かも含め、今後検討する。

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」(投稿中も含む)

Iguchi, T., Yagi, H., Wang, C.-C., Sato, M. (2012) Tightly controlled conditional knockdown system with Tol2 transposon-mediated technique: Advanced tool for studies on the brain with *in utero* electroporation gene transfer. *PLoS ONE* 7(3): e33380.

Urano, T., Shiraki, M., Yagi, H., Ito, M., Sasaki, N., Sato, M., Ouchi, Y., Inoue, S. (2012) GPR98/Gpr98 gene is involved in the regulation of human and mouse bone mineral density. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: E565-E574.

Omata, N., Murata, T., Narita, K., Maruoka, N., Mitsuya, H., Mita, K., Nishimoto, T., Sato, M., Wada, Y. (2012) Effects of antidepressants and mood stabilizers on serum levels of adiponectin. *NeuroEndocrinol. Lett.* 33(1):1-2.

Komada, M., Asai, Y., Morii, M., Matsuki, M., Sato, M., Nagao, T. (2012) Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology* 295(1-3):31-38.

Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang, C.-C., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., Iguchi, T., Sato, M., WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cereb. Cortex* (epub ahead of print) DOI:10.1093/cercor/BHS123

Takitoh, T., Kumamoto, K., Wang, C.-C., Sato, M., Toba, S., Wynshaw-Boris, A., Hirotsune, S. (2012) Activation of Aurora-A is essential for neuronal migration via modulation of microtubule organization. *J. Neurosci.* 32(32):11050-11066.

Kosaka, H., Munesue, T., Ishitobi, M., Asano, M., Omori, M., Sato, M., Tomoda, A. and Wada, Y. (2012) Long-term oxytocin administration improves social behaviors in a girl with autistic disorder. (case report) *BMC Psychiatry* 12:110. doi: 10.1186/1471-244X-12-110.

Toba, S., Tamura, Y., Kumamoto, K., Yamada, M., Takao, K., Hattori, S., Miyakawa, T., Kataoka, Y., Azuma, M., Hayasaka, K., Amamoto, M., Tominaga, K., Wynshaw-Boris, A., Wanibuchi, H., Oka, Y., Sato, M., Kato, M., Hirotsune, S. (2013) Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective neuronal migration and neuronal circuit formation in lissencephaly. *Sci. Rep.* 2013; 3:1224. doi: 10.1038/srep01224.

Yagi, H., Nagano, T., Xie, M.-J., Ikeda, H., Kuroda, K., Komada, M., Iguchi, T., Tariqur, R.M., Morikubo, S., Murase, K., Okabe, M., Sato, M. Filamin A-interacting protein (FILIP) controls spine morphology and NMDA receptor accumulation through myosin 2b. (*in revision*)

Komada, M., Iguchi, T., Takeda, T., Ishibashi, M. and Sato, M. Smoothed controls cyclinD2 expression and regulates the generation of intermediate progenitors in the developing cortex. (*submitted*)

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」(申請中も含む)

1. 文部科学省・科学研究費・挑戦的萌芽研究 (H23~H24) 「人工誘導型神経細胞と脳内神経細胞の直接分化転換による難治疾患治療への新展開」代表・配分総額 2,610 千円。

2. 文部科学省脳科学研究戦略推進プログラム・(精神・神経疾患の克服を目指す脳科学研究(自閉症の病態研究と新たな診療技法(診断・予防・治療)の開発))・(H23~H27)・「自閉症スペクトラム障害(ASD)の発症基盤の解明と診断・治療への展開」分担機関代表者・H24 年度分担機関配分額 18,530 千円(間接経費込)。

3. 公益財団法人 武田科学振興財団・特定研究助成・「自閉症の病態研究と新たな診療技法(診断・予防・治療)の開発」分担機関代表者・分担機関配分額 10,000 千円。

4. 基盤研究(B)(一般)・(H25~H27)「非筋肉型ミオシンへの新たな結合分子群による脳機能制御の新展開」(代表)・申請中。

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」

## 金属V溝テーパ構造による中遠赤外スーパーフォーカシングの研究

研究代表者： 栗原 一嘉（教育地域科学部・准教授）

<b>概 要</b>	スーパーフォーカシングとは、回折限界を超えて、波動を集束させることである。 本研究では、金属V溝テーパ構造でのスーパーフォーカシングについて、中遠赤外領域で有効な理論を準変数分離法による近似解析解を求めることで構築した。この近似解析解は、完全導体の極限で、金属を完全導体として理論構築しているマイクロ波のホーンアンテナ理論と一致した。スーパーフォーカシングの特性に関して、中遠赤外領域と光領域では、金属誘電率の値を反映して、大きく異なるものであった。近年、遠赤外領域で、金属V溝テーパ構造でのスーパーフォーカシングを利用した実験を急速に進んでおり、多くの実験データが蓄積し始めている。今回得られた近似解析解に基づく理論により、実験データを定性的かつ定量的に解釈することが可能となる。
<b>関連キーワード</b>	超集束、プラズモン、テラヘルツ波、準変数分離、金属V溝、金属テーパ構造

### 研究の背景および目的

可視光や赤外線などの電磁波を、レンズで集光しても、波長の半分を超えて絞り込むことはできない。これは回折限界として知られており、電磁波の乗り越えられない技術的な壁として長い間考えられて来た。しかし、近年、金属テーパ構造を使うと、回折限界を超えて狭い空間へ電磁波を閉じ込めることができると理解され始めてきた。これは、表面プラズモンと呼ばれる金属表面を伝搬する電磁波の効果の為であり、表面プラズモンを使えば回折限界を超えて電磁波を集束させることができる。この現象はスーパーフォーカシング（超集束）と呼ばれ、この超集束を使えば、容易に超強電場を発生させ、超高空間分解能の測定が可能になり、これまでの分光技術を飛躍的に発展させることができる。

現在、テラヘルツ波とも呼ばれる遠赤外線領域

で、超集束を利用した実験が急速に進んでおり、多くの実験データが蓄積し始めている。その実験データを適切に解釈するためには、電磁気学の理論に基づいて、金属テーパ構造における表面プラズモンの超集束を正しく理解する必要がある。

本研究の目的は、私が提案した準変数分離法を用いて、金属V溝テーパ構造における超集束の近似解析解を中遠赤外で求めることが第一である。第二の目的は、近似解析解に基づく超集束の理論を用いて、最近蓄積し始めている超集束の実験データを定性的かつ定量的に解釈することである。特に、福井大学・遠赤外線開発研究センターでは、テラヘルツ波時間領域分光法（THz-TDS）を用いて、金属V溝テーパ構造の超集束実験を精力的に推進しており、超集束の理論が不可欠な段階となっている。

### 研究の内容および成果

金属V溝テーパ構造に関する超集束の理論は、可視光領域では、既に報告していた(K.Kurihara et al., *J. Phys. A: Math. Theor.* **42** (2009) 185401)が、金属が完全導体として扱われる遠赤外線領域では未報告であった。遠赤外線領域での超集束に関しては、図1に示すように電気力線表示が可能な程度までに、解析解の特性は調べられていたが、数値的に境界条件を解く必要があった。本研究の第一の成果は、現在実験的に重要な遠赤外線領域において、金属V溝テーパ構造に関する超集束の解

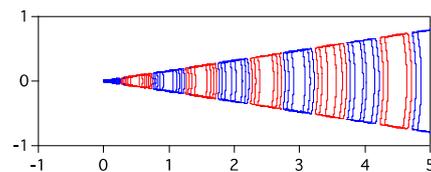


図1 金属V溝テーパ構造での超集束の電気力線表示（遠赤外線領域）

析解を求めたことである(表1)。可視光領域では、金属の誘電率を負値として扱うことができたが、遠赤外線領域では、金属誘電率を複素数値として扱わなければならない難点があった。しかし、遠赤外線領域では、金属誘電率の絶対値が大きく、この条件を用いると境界条件が解析的に解け、表1の解析解が得られることがわかった。なお、この解析解は、金属誘電率の絶対値が比較的大きい中赤外線領域でも有効である。

本研究の第二の成果は、テラヘルツ波の実験データが、解析解の観点から解釈が可能になったことである。福井大学・遠赤外線領域開発研究センターのテラヘルツ波実験から、金属V溝テーパ構造の先端から放射されるテラヘルツ波の位相が1THz付近で $\pi/4$ 程度遅れることが報告されている。この実験事実は、表1で示された金属V溝テーパ構造での伝搬特性が、空中伝搬するガウシアンビームの伝搬特性と大きく異なることから理解できる。

表1 動径関数と角度関数の解析解(遠赤外線領域)

$$\text{動径関数: } R^{(0)}(\rho) = \frac{W_{\kappa,0}(2i\rho k_p)}{\sqrt{\rho}},$$

$$\kappa = \frac{1}{2\alpha\sqrt{\epsilon_2}} \exp\left\{-\frac{i}{2}\arg\epsilon_2\right\},$$

角度関数(V溝内側):

$$Q^{(0)}(\phi, \rho) = \frac{\cosh\{\phi\eta_1(\rho)\}}{\cosh\{\alpha\eta_1(\rho)\}}, 0 \leq |\phi| \leq \alpha,$$

$$\eta_1(\rho) \sim |\epsilon_2|^{-1/4} \sqrt{k_0\rho/\alpha} \exp\left\{i\left(\frac{\pi}{4} - \frac{1}{4}\arg\epsilon_2\right)\right\}$$

角度関数(V溝外側):

$$Q_2^{(0)}(\phi, \rho) = \frac{\cosh\{(\pi-|\phi|)\eta_2(\rho)\}}{\cosh\{(\pi-\alpha)\eta_2(\rho)\}}, \alpha \leq |\phi| \leq \pi,$$

$$\eta_2(\rho) \sim k_0\rho\sqrt{|\epsilon_2|} \exp\left\{i\left(\frac{1}{2}\arg\epsilon_2 - \frac{\pi}{2}\right)\right\}$$

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

#### 学術論文

- ・ Z. S. Lie, A. Khumaeni, H. Niki, K. Kurihara, K. H. Kurniawan, R. Hedwig, K. Fukumoto, K. Kagawa, and Y. I. Lee, "A Comprehensive Study of H Emission in a TEA CO<sub>2</sub> Laser-Induced Helium Gas Plasma for Highly Sensitive Analysis of Hydrogen in Metal Samples", *J. Korean Phys. Soc.*, **61** (2012) 49-54.
- ・ A. Khumaeni, Z. S. Lie, Y. I. Lee, K. Kurihara, K. H. Kurniawan, K. Fukumoto, K. Kagawa, and H. Niki, "Emission Characteristics of Ca and Mg Atoms in Gas Plasma Induced by the Bombardment of Transversely Excited Atmospheric CO<sub>2</sub> Laser at 1 atm", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **51** (2012) 082403 (9 pages).
- ・ 桑島史欣, 谷口真一郎, 谷正彦, 栗原一嘉, 萩行正憲, 長島健, 岩澤宏, 「ファイバカプラとレーザカオスを用いた THz 波の安定化と広域化」, 電気学会論文誌 A 部門誌 (IEEJ Transactions on Fundamentals and Material), 2012 年 9 月号 (Vol.132, No.9, テラヘルツ波特集号), pp. 734-740.

#### 国際会議発表

- ・ K. Kurihara, K. Yamamoto, F. Kuwashima, M. Tani, "Theoretical consideration of nonadiabatic superfocusing of terahertz waves in a metallic V-groove tapered waveguide", Proc. of International Symposium on Frontiers in THz Technology (FTT2012), Nara, Japan, November 26-30 (2012) Pos.1.36. (他7件)

#### 国内学会発表

- ・ 栗原一嘉, 山本晃司, 桑島史欣, 谷正彦, 「金属V溝構造におけるテラヘルツ波の超集束: 先行研究との比較」, 2012 年 9 月, 第 73 回応用物理学学会学術講演会, 11p-B1-3.
- ・ 栗原一嘉, 山本晃司, 桑島史欣, 谷正彦, 「金属

V溝構造における超集束の理論的考察: 近似解析解」, 2013 年 3 月, 第 60 回応用物理学学会春季学術講演会, 29a-D1-5. (他12件)

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- ・ 福井県・大学連携リーグ連携研究推進事業・一般研究・H24・「テラヘルツ電磁波におけるプラズモン超集束のメカニズム解明と新規デバイス開発への応用」・代表・採択・750千円.
- ・ 日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究(B)・H25~H28・「テラヘルツ帯プラズモニクスの開拓と応用」・代表・申請中.
- ・ 日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究(B)・H25~H27・「チェレンコフ位相整合 EO サンプリングの高度化と THz 波イメージング計測への応用」・分担・申請中.
- ・ 日本学術振興会・科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究・H25~H27・「サブテラヘルツ領域の高感度・室温動作遠赤フーリエ分光器の開発」・分担・申請中.
- ・ 他、不採択の研究助成申請(分担)2件あり.

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**神経伝達の新たな制御の解明：**

**シナプス後肥厚部の分子複合体を制御する新たな分子の役割**

研究代表者：謝 敏珏（医学部・助教）

共同研究者：佐藤 真（医学部・教授）

<b>概 要</b>	スパイン成熟過程ではアクチン線維やシナプス後肥厚部(PSD)の分子複合体がスパイン機能およびシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。しかし、シナプス形成に係わる分子機構の解明はいまだ十分ではない。我々は、細胞骨格関連因子である LL5 $\beta$ がスパイン形成および成熟に関わることをノックアウトマウスにて観察した。さらに、LL5 $\beta$ のノックアウトマウスではシナプス後肥厚部の分子複合体である PSD-95 の移動が低下していることや長期抑圧(LTD)をおこすと AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPA-R)のエンドサイトーシスが阻害されたことを観察し、LL5 $\beta$ が LTD のシナプス可塑性に関連し、シナプス後肥厚部の分子を制御することが明らかとなった。
<b>関連キーワード</b>	LL5 $\beta$ 、シナプス、ノックアウトマウス、LTD、可塑性

**研究の背景および目的**

中枢神経系における主要な神経伝達物質はグルタミン酸であり、このグルタミン酸による伝達効率は神経活動に応じて変化することが知られている。この現象はシナプス可塑性と呼ばれ、記憶・学習の基礎過程と考えられている。最近興奮性シナプス伝達とその可塑性変化を担うグルタミン酸受容体である AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPA-R)のエンドサイトーシスやエクソサイトーシスといった細胞内輸送が長期増強(LTP)や長期抑圧(LTD)等のシナプス可塑性の分子実態であることが明らかにされてきている。しかし、AMPA-R の輸送を制御する分子機構、さらには AMPA-R とシナプス後部の膜直下に存在する多種類のタンパク質複合体であるシナプス後肥厚部(PSD)との相互関連は十分には解明されてない。

一方、スパインでフォスファチジルイノシトール3リン酸(PIP3)がAMPA-RおよびPSD-95の樹状突起シャフトからスパイン内部への局在変化に対し重要な役割を果たしていると報告された(Sasaki J et al., *Nat. Neurosci.* 13:36;2010)。このことより、まだ未知ではあるが、何らかの分子を介して、PIP3がAMPA-RとPSD-95の時空間的調節を行っていると考えられた。

我々は、PIP3 と特異的に結合する PH (pleckstrin homology) domain を持つ LL5 $\beta$  (PHLDB2;pleckstrin homology-like domain, family B, member 2) (Takabayashi, T and Xie M-J et al., *J. Biol. Chem.* 13:36;2010) の解析を進めていたが、その過程で、この LL5 $\beta$  が海馬の神経細胞に発現し、LL5 $\beta$  をノックダウンした神経細胞のスパインでは、未成熟なフィロポディアや thin 型スパインが増加することから LL5 $\beta$  がスパイン成熟に重要な役割を果たしていることが見い出してきた。さらに、LL5 $\beta$  が PSD に存在する足場蛋白質である PSD-95 やカルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素 II (CaMKII)、AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPA-R)およびアクチン結合蛋白 drebrin A に結合することを見い出している。CaMKII や PSD 95 は PSD に豊富に存在し、スパイン形成および AMPA-R の機能を調節し、シナプス可塑性に役割を果たす中心的な分子である。

本研究は LL5 $\beta$  がシナプス形成から成熟に至る分子過程で果たす役割を解き明かし、さらには学習・記憶などの脳高次機能での役割を解明することを目的とする。

**研究の内容および成果**

以下の成果を得た。

(1) LL5 $\beta$  ノックアウト (LL5 $\beta$  KO) マウスを作製した。我々は最初に、LL5 $\beta$  の exon2 を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟むターゲティングベクターを構築し、このような遺伝子座を持つ flox マウスを作製した。その後、この flox マウスを TNAP-Cre 発現マウスとかけ合わせる事で、LL5 $\beta$  の exon2 の欠損した LL5 $\beta$  KO マウスを作製した。LL5 $\beta$  KO マウスでは LL5 $\beta$  の発現が大脳皮質および海馬にて欠損していることを Western blot 法および RT-PCR により確認した。その他、腎臓、肺、肝臓などの臓器に対しても LL5 $\beta$  ノックアウトマウスでは LL5 $\beta$  の発現の欠損を確認した。

(2) LL5 $\beta$  KO マウスにて、LL5 $\beta$  がスパイン成熟に重要な役割を果たしていることを明らかにした。シナプス成熟過程では、未成熟なフィロポディアや thin 型スパインが形成され、その後、成熟に伴い形態が stubby 型や mushroom 型のスパインとなることが知られている。Golgi 染色法により、生後 2 週齢マウスの脳切片を用いて、CA1 錐体細胞のスパイン形態変化を検討した。LL5 $\beta$  KO マウスではフィロポディア型や thin 型の未成熟型スパインを多数認めた。この結果は *in vitro* 系にて報告されている LL5 $\beta$  をノックダウンした海馬神経細胞のスパインでは、フィロポディアもしくは thin 型の未成熟型スパインを増加した結果と一致したことから、LL5 $\beta$  は *in vivo* 系にてスパイン成熟に重要な役割を果たすと証明された。

(3) LL5 $\beta$  は PSD に存在する足場蛋白質である PSD-95 の移動を制御していることを見出した。PSD-95-mCherry 発現 vector を導入した神経細胞に

て、photobleaching 法により PSD-95-mCherry の移動速度を検討した。LL5 $\beta$  KO マウスでは PSD-95-mCherry の recovery が野生型マウスに比較し遅いことを観察した。さらに、光により活性化する photoactivatable GFP (PAGFP) 付き PSD-95 発現 vector を神経細胞に導入した。LL5 $\beta$  KO マウスでは活性化された PAGFP-PSD-95 の蛍光強度減少が遅いことを観察した。以上ことより LL5 $\beta$  は PSD-95 の移動を促進していることと示唆された。

(4) LL5 $\beta$  は AMPA-R2 の局在および化学的 LTD 誘導後の AMPA-R2 のエンドサイトーシスを制御することを見出した。培養海馬神経細胞に HA-AMPA-R2 を発現するベクターを導入し、樹状突起およびスパイン膜表面上における AMPA-R2 の発現量の変化を検討した。AMPA-R2 の発現量は HA を免染し、定量化した。野生型神経細胞に比較し、LL5 $\beta$  KO 神経細胞では表在 AMPA-R2/総 AMPA-R2 の発現は減少していることを観察した。さらに、NMDA 処理により LTD をおこすと、表在 AMPA-R2/総 AMPA-R2 の発現の減少が野生型マウスに比較しにくいことを観察した。このことより、AMPA-R のエンドサイトーシス阻害がされたと考えられた。

(5) LL5 $\beta$  は LTD を制御することを見出した。電気生理学的な LTD の解析により LL5 $\beta$  KO マウスでは LTD を起こしにくいことから LL5 $\beta$  がシナプス可塑性に重要な役割を果たしていることを見出した。

以上のことより LL5 $\beta$  はスパインの成熟および可塑性に関わり、なかでもシナプス後肥厚部の分子複合体を制御することで海馬学習の分子メカニズムの重要な一翼を担うと想定された

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「発表論文」

Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang C.-C., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cereb. Cortex* 2012 May 22. [Epub ahead of print]○

本助成による成果発表は投稿する予定。

### 「学会発表」

Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang C.-C., Komada, M., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Neuroscience* 2012, Nagoya.

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**非対称脂質二重膜を用いた膜タンパク質機能に対する脂質効果の解析**

研究代表者： 岩本 真幸（医学部・助教）

概 要
細胞膜での膜タンパク質の働きは周囲の脂質の影響を常に受けている。脂質による活性調節は膜での酵素反応や電気信号の発生に利用されることもあるが、具体的メカニズムは不明のままである。本研究では、普遍的膜タンパク質・イオンチャネルの活性に対する脂質効果とその背後にある分子機構の解明を目指した。表裏で脂質組成が異なる非対称膜など様々な脂質環境下での単一チャネル電流測定や蛍光分析を行い、脂質に依存したチャネル活性・構造の変化を解析した。また周囲の脂質を感知するセンサー部位を同定し、膜との静電相互作用によるセンサー部位の構造安定化がチャネルの活性化構造の安定化と関連することを突き止めた。今回明らかになったセンサー部位と類似の構造は多くの膜タンパク質にも見られることから、本メカニズムが普遍的な可能性もある。
関連キーワード
チャネル、一分子、脂質、膜、センサー

### 研究の背景および目的

細胞は脂質二重膜からなる細胞膜に包まれており、そこに存在する膜タンパク質が、細胞内外への物質輸送やシグナル伝達など極めて重要な機能を担っている。膜タンパク質の働きは、周囲の脂質の影響を常に受けている。時に、細胞膜上での酵素反応の調節や電気信号の発生に脂質が関与する場合もある。しかし、脂質がどのように膜タンパク質の活性を調節するのか、その分子機構はほとんど明らかにされていない。膜タンパク質の機能・活性を左右する脂質効果のメカニズムは、タンパク質の構造・機能連関を理解する上でも必須の情報と言える。

イオンチャネルタンパク質は全ての細胞膜に必ず存在する普遍的膜タンパク質であり、細胞膜を介するイオンの移動を制御している。その働きによって細胞内環境が維持され、また心臓や神経の

活動を制御する電気信号が生み出されている。イオンチャネルの活性も様々な脂質によって調節されることが知られている。その一例が、陰イオン性脂質の有無で活性が大きく変わる KcsA カリウムイオンチャネルである。

本研究では KcsA チャネル活性に対する陰イオン性脂質効果を、一分子レベルで詳細に解析する。具体的には、表裏で組成が異なる非対称膜など、様々な脂質環境下で単一チャネル電流測定を行い、脂質の作用部位の特定、およびチャネル活性化に及ぼす影響の速度論的な解析を行う。また蛍光分析により、チャネル活性化に伴う脂質依存的な構造変化を解析する。KcsA チャネルは構造情報が最も蓄積したチャネルであり、それらも併せれば脂質効果の背後にある分子機序を高い精度で明らかにできる可能性がある。

### 研究の内容および成果

#### 【方法】

**1. 試料調製** KcsA チャネルは、多くのイオンチャネルに共通したコア構造のみを持ち、高分解能の結晶構造が得られている。よって、構造-機能連関に関する様々な研究手法が KcsA チャネルに投げられてきた。本研究では、大腸菌膜に発現させた野生型および変異体 KcsA チャネルを、アフィニティークラムを用いて精製した。単一チャネル電流測定には、精製チャネル試料を透析法によって各種脂質のリポソームに組み込んで用いた。チャネルへの蛍光ラベル導入は、システイン変異体を用いて行った。蛍光ラベルとしてテトラメチルローダミンを用い、そのマレイミド体をラベル化部位のシステインと特異的に反応させた。

**2. 単一チャネル電流測定** 脂質平面膜法により単

一 KcsA チャネル電流を測定した。膜の両側が同一のリン脂質から成る対称膜の他、両側のリン脂質組成が異なる非対称膜も作成し、様々な膜環境で測定を行った。

**3. 蛍光測定** テトラメチルローダミンは疎水性環境でより強い蛍光を発する特性がある。よって、活性化前後での蛍光強度の比較によって環境変化が推定でき、ラベル位置を系統的に変えることで周辺の構造変化の推定が可能である。測定ではラベル化チャネルを各種脂質のリポソームに組み込み、532 nm の励起光により発せられる蛍光スペクトルを活性化前後で測定した。

#### 【結果・考察】

**1. 陰イオン性脂質センサー部位の同定** 昨年度ま

で非対称脂質二重膜での単一チャンネル電流測定を行い、KcsA チャンネル活性化に必要な陰イオン性脂質は、二重膜の細胞質側（内葉）から作用することを明らかにしている。そこで、正電荷を持つアミノ酸側鎖（Arg, Lys, His）を陰イオン性脂質との相互作用部位と予想し、その変異体の単一チャンネル電流から影響を解析した。その結果、これまで機能上の役割が不明であったアミノ末端の M0 ヘリックスに存在する 2 つの正電荷（Arg11, Lys14、**図 1 左**）に対する変異体では、陰イオン性脂質膜中でも活性が大きく低下することがわかった。よって、これらアミノ酸側鎖を KcsA チャンネルの陰イオン性脂質センサーと同定した。

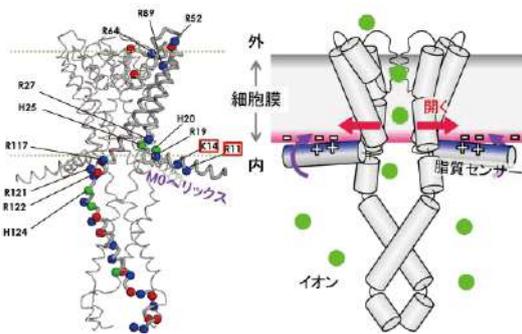


図 1. KcsA チャンネル内の荷電性アミノ酸（左）と脂質センサーが開状態を安定化する機構（右）

**2. M0 ヘリックスの構造変化** 脂質センサーを含む M0 ヘリックスのチャンネル活性化に伴う構造変化を、蛍光ラベル化チャンネルを用いて調べた。ラベルは Arg11 と Lys14 前後の 8 か所（10～17 番目のアミノ酸）に系統的に導入したが、活性化前後での蛍光強度変化がラベル位置によって周期的に増減した（**図 2 上**）。興味深いことに、増減の周期は  $\alpha$  ヘリックスの周期と同じ 3.6 であった。これは、 $\alpha$  ヘリックスである M0 が活性化に伴いヘリックス長軸に沿って回転することを示唆する結果である（**図 2 下**）。

**3. M0 ヘリックスと活性化状態の安定性の関連** 様々な膜環境下および変異体の単一チャンネル電流解析から、脂質効果をエネルギー面から検討した。その結果、M0 ヘリックスの安定性とチャンネル開・閉状態安定性との関連性が明らかになった。チャンネル活性化に伴い回転した M0 ヘリックスの配置が、陰イオン性脂質膜表面の負電荷と脂質センサーの正電荷との静電相互作用により安定化されれば、チャンネル活性化状態も安定に保持されるという関係が示唆された（**図 1 右**）。

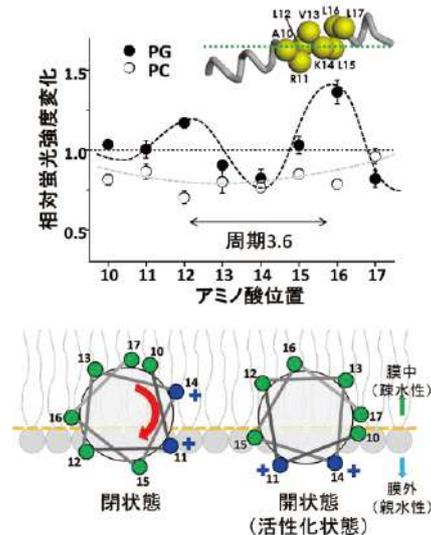


図 2. 活性化に伴う M0 ヘリックスの回転

**4. 普遍的メカニズムの可能性** M0 ヘリックスは膜表面に横たわって配置する両親媒性ヘリックスである。同様の構造は他のイオンチャンネル、および多くの膜タンパク質に見つかっている。したがって、KcsA チャンネルにおける脂質効果のメカニズムが普遍的である可能性も十分考えられ、今後対象を広げ同様の検討行っていく必要がある。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

1. Iwamoto and Oiki “Amphipathic antenna of an inward rectifier  $K^+$  channel responds to changes in the inner membrane leaflet” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** (2013) 749-754
2. Iwamoto and Oiki “The sensing sites for the membrane inner lipids regulate the activation gating of the KcsA potassium channel” *Biophys. J.* **104** (2013) 128a
3. Sumino, Sumikama, Iwamoto, Dewa, Oiki “The open gate structure of the membrane-embedded KcsA potassium channel viewed from the cytoplasmic side” *Sci. Rep.* **3** (2013) 1063

### 「特記事項」

日本生理学会・平成 24 年度入澤宏・彩記念若手研究奨励賞受賞

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

（申請中の研究費）

・科研費・基盤研究 (C)・平成 25～27 年度・「油中水滴接触膜を応用したイオンチャンネル機能に対する脂質効果の一分子解析」・代表

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**マスト細胞による自然免疫応答における Syk の新たな役割**

研究代表者： 千原 一泰（医学部・准教授）

共同研究者： 定 清直（医学部・教授）、竹内 健司（医学部・学内講師）

<b>概 要</b>	非受容体型チロシンキナーゼ Syk は IgE 受容体を介するシグナル伝達に必要不可欠である。一方、Syk を活性化する新たな自然免疫受容体がマスト細胞に発現することが、最近の研究から明らかとなってきた。しかし、マスト細胞による自然免疫応答や、Syk を介するシグナル伝達機構は不明である。本研究では、C 型レクチン Dectin-1 の特異的リガンド Curdlan が RBL-2H3 細胞において ERK のリン酸化レベルを上昇させる事を明らかにした。さらに、Dectin-1 安定発現細胞株の樹立に成功し、Dectin-1 が IgE 受容体刺激とは異なるメカニズムで蛋白質のチロシンリン酸化反応を引き起こす事を明らかにした。今後、Dectin-1 を介する Syk の活性化機構とそのシグナル伝達、細胞応答について解析を進めたい。
<b>関連キーワード</b>	Syk、Dectin-1、マスト細胞、チロシンリン酸化、シグナル伝達

### 研究の背景および目的

非受容体型チロシンキナーゼ Syk は気管支喘息や蕁麻疹などの I 型アレルギー疾患に加え、真菌感染、関節リウマチや全身性エリテマトーデスの病態に深く関与している。現在治験に進んでいる Syk 阻害薬はこれらの疾患治療研究における最新のトピックスとして注目を集めている。

マスト細胞は I 型アレルギー反応において中心的役割を担っており、その活性化に Syk は必要不可欠である。Syk は抗原刺激によりチロシンリン酸化された IgE 受容体 FcR $\gamma$  サブユニットの ITAM(免疫受容体チロシン活性化モチーフ) に会合して活性化する。その結果、マスト細胞は炎症の化学的メディエーターを即時に遊離し、サイトカインの産生を開始する。

一方、マスト細胞欠損マウスが腹腔内細菌感染に対して脆弱なことから、マスト細胞が I 型アレルギー反応のみならず、自然免疫応答にも関与することが示唆されてきた (Malaviya *et al.* *Nature*, 1996)。これまでの研究から Toll 様受容体の発現がマスト細胞で確認されているが、その生理的意義は明らかとなっていない。ところが最近、真菌

の細胞壁構成成分を認識する C 型レクチン Dectin-1 の発現がヒトのマスト細胞で確認された (Ribbing *et al.* *Allergy*, 2011)。また、新たに同定された自然免疫受容体 (CD200R3, LMIR5) がマスト細胞に発現しており、ITAM 含有アダプター蛋白質 dap-12 と会合して自然免疫応答を引き起こすことが示された (Kojima *et al.* *J. Immunol.*, 2007; Yamanishi *et al.* *Blood*, 2007)。これらの受容体はリガンドにより凝集すると受容体内部や会合分子の ITAM がチロシンリン酸化を受け、Syk を活性化すると考えられている。しかし、その細胞内シグナル伝達機構やマスト細胞による細胞応答について未解決な点が多く、受容体の生理機能の解明に向けた研究のさらなる発展が期待されている。

本研究の目的は、マスト細胞による自然免疫応答において Syk が果たす新たな役割について、分子レベルで解析することにある。研究を進める基盤を構築するために、マスト細胞様細胞株における自然免疫受容体の発現とリガンドに対する反応を解析した。

### 研究の内容および成果

#### 1) マスト細胞に発現する自然免疫受容体

最近、ヒト末梢血由来マスト細胞で Dectin-1 の発現が確認されたが、その機能は不明である。そこで、マスト細胞のモデルとして分子生物学的な解析に用いられるラット RBL-2H3 細胞を Dectin-1 の特異的リガンドである Curdlan で刺激した。その結果、60 分後に ERK のリン酸化レベル (図 1) と細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルの上昇が認められた。それゆえ、Dectin-1 はヒト以外のマスト細胞にも発現し、マスト細胞の機能制御に深くかかわっている可能性が示唆された。

一方、CD200R3 や LMIR5 はシグナル伝達に dap-12 を利用することが知られている。そこで、RBL-2H3 細胞やマウス骨髄由来マスト細胞における dap-12 の発現を解析したが、蛋白質レベルにおける発現を確認できなかった。Dectin-1 以外の C 型レクチン Mincle や Dectin-2 の発現については、今後解析を進める予定である。

#### 2) Dectin-1 を安定発現するマスト細胞株の作製

Dectin-1 によるマスト細胞の機能制御メカニズムを明らかにするために、Dectin-1 を安定発現する RBL-2H3 細胞を作製した。この細胞株を Curdlan

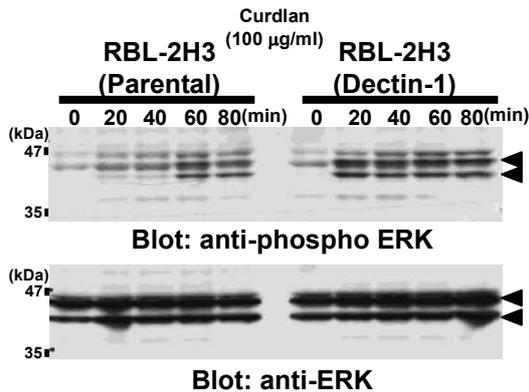


図1 : Dectin-1 特異的アゴニスト Curdlan による ERK のリン酸化

で刺激すると、親株に比べて ERK のリン酸化レベルが大きく亢進していた (図1)。さらに、IgE 受

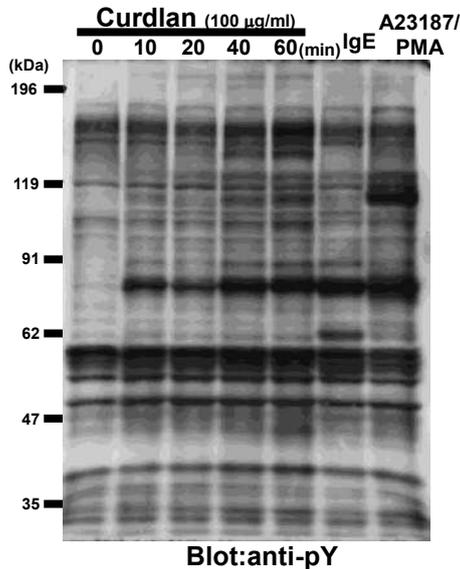


図2 : Dectin-1 を介するチロシンリン酸化反応

体刺激とは異なる細胞内蛋白質のチロシンリン酸化反応が認められた (図2)。この結果から、Dectin-1 が IgE 受容体とは異なるシグナル伝達経路を動かす可能性が示唆された。

### 3) Dectin-1 の活性化は IgE 受容体の活性化を引き起こさない。

Dectin-1 と IgE 受容体による Syk の活性化メカニズムを比較する目的で、それぞれの受容体と Syk の SH2 ドメインとの会合を pull-down アッセイにより解析した。Dectin-1 安定発現株を Curdlan で刺激すると、刺激後 40 分まで Dectin-1 と Syk の会合が認められたが、FcR $\gamma$  サブユニットと Syk の会合は全く認められなかった。同様に、IgE 受容体刺激を行った場合、FcR $\gamma$  サブユニットと Syk の会合が認められたが、Dectin-1 と Syk の会合は認められなかった (図3)。この結果から、Dectin-1 安定発現株を用いれば、Dectin-1 と IgE 受容体によ

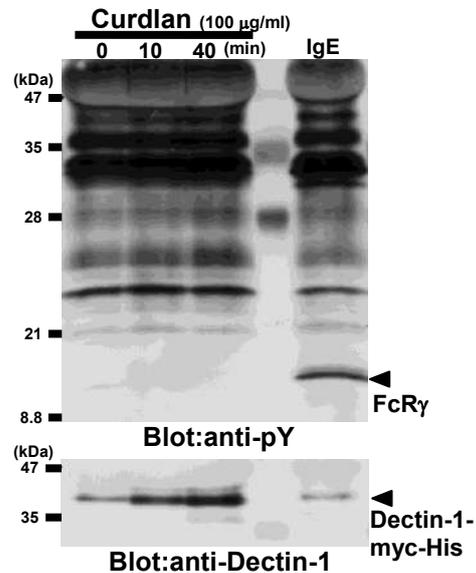


図3 : Syk の SH2 ドメインと Dectin-1 との会合

る Syk の活性化を独立した現象として解析できると考えられた。

今後、Dectin-1 による Syk の活性化メカニズムや、Syk を介するシグナル伝達機構、マスト細胞の細胞応答の仕組みを分子レベルで解析していく予定である。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

#### 論文：

Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Horiguchi, T., Sun, X., Deng, L., Shoji, I., Hotta, H. and Sada, K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS One*, 7(10):e46634, 2012.

#### 総説：

木村幸弘ほか、「Syk 阻害薬」、日本臨床、印刷中。

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

#### 申請中

日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究 (C)・平成 25 - 27 年度・Dectin-1 による Syk の活性化とマスト細胞の機能制御メカニズム

## 福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」 ステロイド産生を司る新規遺伝子の同定とその転写制御機構の解明 (2)

研究代表者： 水谷 哲也（医学部・准教授）

<b>概 要</b>	<p>転写因子 SF-1 はステロイド関連遺伝子の発現に重要であると共に性腺や副腎の発生・分化に必須の転写因子であり、その機能解析はステロイド産生細胞への分化制御メカニズムの解明に極めて重要である。本研究では、DNA マイクロアレイと ChIP-on-Chip 法を併用したゲノムワイドな解析より、新たな SF-1 標的遺伝子の同定を試みた。その結果、今まで SF-1 の標的遺伝子とは考えられていなかった 10 の遺伝子を同定した。これらの中で、ゲノム上でクラスターを形成しているグルタチオントランスフェラーゼ A (GSTA) ファミリーは、SF-1 依存的なクロマチン構造の変化により発現が制御されていることが明らかとなった。さらにこのファミリーの中で GSTA1 と A3 が新たなステロイド代謝酵素のメンバーであることが示された。</p>
<b>関連キーワード</b>	SF-1、 SF-1 標的遺伝子、GSTA ファミリー、クロマチン構造

### 研究の背景および目的

転写因子 SF-1 は性腺および副腎で共に発現し、多くの性腺や副腎特異的遺伝子の発現に重要であることが明らかになっている。また SF-1 のノックアウトマウスでは性腺・副腎が形成されないことから、SF-1 は性腺・副腎の発生・分化に必須であることも証明されている。そのためその標的遺伝子は副腎・性腺の形成やステロイド産生疾患の原因遺伝子として同定されているものが多い。一方、未だに原因遺伝子が特定されない副腎低形成、性分化異常およびステロイド産生疾患も多く残されている。これらの原因遺伝子として新たな SF-1 標的遺伝子の存在も考えられる。

私どもは間葉系幹細胞に SF-1 を導入することにより効率よくステロイドホルモン産生細胞へ分化誘導させ、生体内同様 cAMP 刺激によりステロイド

ホルモン産生を増強する細胞の創出に成功している。この成果は同じ原基から派生する性腺と副腎の分化メカニズムの解明や、ステロイド産生疾患に対する新たな再生医療法の開発につながると考えられる。本研究では、この分化誘導系を用いて DNA マイクロアレイと ChIP-on-Chip 法を併用したゲノムワイドな解析より、新たな SF-1 標的遺伝子の同定を試みた。その結果、今まで SF-1 の標的遺伝子とは考えられていなかった 10 の遺伝子を同定した。その中からグルタチオントランスフェラーゼ A3 (GSTA3) に着目した。GSTA3 は GSTA ファミリーに属し、ゲノム上でクラスターを形成している。そこで本研究では、GSTA ファミリーの SF-1 による転写制御メカニズムおよびステロイド産生に対する役割の解明を試みた。

### 研究の内容および成果

#### ① GSTA ファミリー (A1~A4) の転写調節機構の解明

遺伝子クラスターを形成している GSTA ファミリー (A1~A4) は、SF-1 によって発現誘導される (図 1)。そこで GSTA ファミリーの転写調節機構を明らかにするために、それぞれのプロモーター領域への SF-1 のリクルートと転写活性を検討した。間葉系幹細胞および副腎由来 H295R 細胞を用いて検討した結果、GSTA3 (および A4) には SF-1 のリクルートと転写活性の上昇が認められたが、A1 と A2 には認められなかった。このことから、SF-1 による GSTA1 と A2 の転写制御にはクロマチン構造の変化を介していると推察された。そこで Chromosome Conformation Capture assay を用いて検討したところ、SF-1 によって GSTA1 の

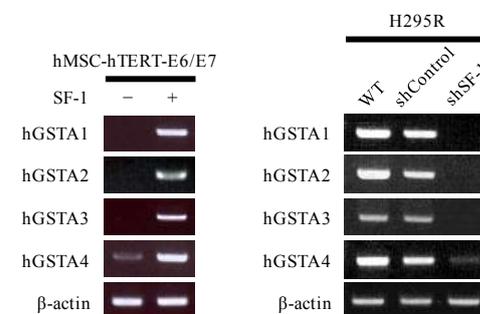


図 1 GSTA ファミリーの遺伝子発現  
間葉系幹細胞 (hMSC-hTERT-E6/E7) と副腎由来 H295R 細胞における GSTA ファミリーの発現を検討した。その結果、GSTA ファミリーの発現は SF-1 依存的であることが示された。

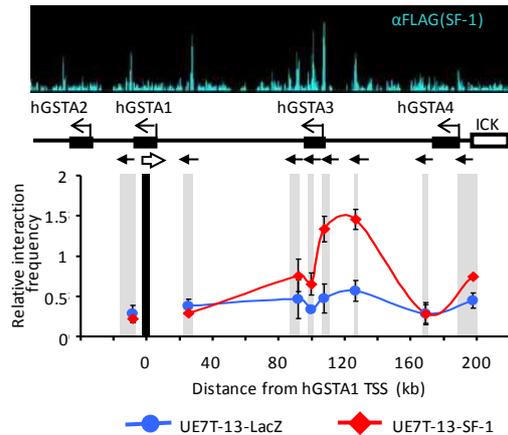


図 2 GSTA ファミリークラスター領域における SF-1 結合領域の同定とクロマチン構造変化

GSTA ファミリークラスター領域における SF-1 結合領域を ChIP-on-chip 法により同定した(図上段)。GSTA1 の転写がどの SF-1 結合領域によって制御されているかを明らかにするために、Chromosomal Conformation Capture 法を用いて検討した。その結果、SF-1 導入間葉系幹細胞(UE7T-13)では、GSTA3 プロモーター領域が GSTA1 プロモーター領域に近接し転写制御していることが示された(図下段)。

プロモーター領域が GSTA3 のプロモーター領域に近接することで転写制御されていることが示された(図 2)。以上の結果から SF-1 による GSTA ファミリーの転写は、SF-1 によって引き起こされるクロマチン構造の変化を介していることが示唆された。

## ② GSTA ファミリーのプロゲステロンおよびアンドロステンジオン産生に対する役割

GSTA ファミリーのステロイド産生における役割を明らかにするために、GSTA ファミリーのアデノウイルス発現系を構築した。そして卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞を用いて、それぞれの GSTA ファミリーまたは  $3\beta$ -HSD の過剰発現によるアンドロステンジオンおよびプロゲステロン産生における役割を検討した。その結果、GSTA ファミリーの中で GSTA1 と A3 には  $3\beta$ -HSD と同様、 $3$ -ケト- $\Delta^5$ -ステロイドから  $3$ -ケト- $\Delta^4$ -ステロイドへのイソメラーゼ活性を有していることが明らかとなった。以上の結果から、GSTA1 と A3 が新たなステロイド代謝酵素のメンバーであることが示された。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., **Mizutani, T.**, Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M., Miyamoto, K.: A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* (in press)

Imamichi, Y., **Mizutani, T.\***, Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press)

Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., **Mizutani, T.**, Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Shimada, M., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press)

Ju, Y., **Mizutani, T.\***, Imamichi, Y., Yazawa, T., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Kangawa, K., Miyamoto, K.: Nuclear receptor 5A (NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1) gene expression in steroidogenic cells.

*Endocrinology* 153, 5522-34 (2012)

**水谷哲也**, 今道力敬, 河邊真也, 矢澤隆志, 宮本薫: 卵巣における遺伝子発現とその調節メカニズム. 日本生殖内分泌学会雑誌. 17, 11-16, 2012.

### 「特記事項」

#### 国際学会発表

**Mizutani, T.**, Ju, Y., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human 5-aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1) gene in steroidogenic cells. The Endocrine society's 94th Annual Meeting 2012. 6

**Mizutani, T.**, Ju, Y., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Osaki, T., Minamino, N., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Steroidogenic factor 1 (SF-1) and C/EBP $\beta$  cooperatively regulate human *HSD3B2* gene expression. 15th International Congress on Hormonal Steroid and Hormones & Cancer 2012. 11

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

基盤研究 (C)・新たなステロイド合成酵素の同定と高次クロマチン構造変換を介した転写調節機構の解明・代表・採択

## 福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」 アンドロゲン～AR系の排卵における機能解析

研究代表者： 矢澤 隆志（医学部・学内講師）

<b>概 要</b>	<p>卵巣・莢膜細胞が産生するアンドロゲンは、初期の卵胞発達に重要な役割を果たすことが、よく知られている。私は、過去の研究で、卵巣におけるアンドロゲン産生は、排卵直前にピークを迎えることを証明している。この時、アンドロゲンの受け手であるARの発現は、排卵に必要不可欠な卵丘細胞に強く見られることから、アンドロゲン～AR系は、排卵過程において、機能している可能性が強く示唆された。そこで、本研究では転写因子であるARの標的遺伝子の探索とその転写メカニズムについて解析を行った。in vivoとin vitroの実験結果から、排卵前の卵巣（顆粒膜細胞）において、プロスタグランジンの律速酵素であるCox-2とEGF様成長因子であるAmphiregulinが、ARの標的遺伝子であることが分かった。これらの遺伝子は、排卵に非常重要であることから、アンドロゲン～AR系は、これらの遺伝子の発現を制御することにより排卵過程に関わることが示唆された。</p>
<b>関連キーワード</b>	<p>アンドロゲン、アンドロゲン受容体、顆粒膜細胞、Cox-2、Amphiregulin</p>

### 研究の背景および目的

卵巣において未発達な卵胞の周囲に莢膜細胞が出現すると同時に、卵胞は成長の速度を増す。そして、卵胞はゴナドトロピンに対する反応性を獲得し、やがて排卵に至る。莢膜細胞が産生するアンドロゲンは、卵胞の発育に必要不可欠であり、特にゴナドトロピンに依存しない初期の顆粒膜細胞の増殖やアポトーシスの抑制に必須であると考えられている。その一方で、アンドロゲンの過剰な産生は、多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）に代表されるような排卵障害を伴う不妊となることがよく知られている。

私は、幹細胞からステロイドホルモン産生細胞を分化誘導する研究を行ってきた(Yazawa *et al.*, 2006, 2008, 2009, 2010, 2011)。そして、幹細胞から分化したアンドロゲン産生細胞を調べる過程で、卵巣における新たなアンドロゲン代謝経路を発見した。さらに、この代謝経路を含む卵巣のアンドロゲン産生は、LHサーージ後の排卵直前にピーク

を迎えることが分かった。そして、アンドロゲン受容体（AR）は、卵巣において、卵胞の発達時期には、顆粒膜細胞に様に発現しているが、排卵前になると、卵子の周囲を取り囲み排卵に必要不可欠な顆粒膜細胞由来の卵丘細胞に強く発現していた。これらの事実は、アンドロゲン～AR系がゴナドトロピンに依存しない初期卵胞の発達のみならず、ゴナドトロピンに依存する排卵期においても重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

本研究は、卵巣・顆粒膜細胞（卵丘細胞）におけるアンドロゲン～AR系の標的遺伝子を同定し、その転写メカニズムを調べることにより、排卵におけるアンドロゲンの機能を明らかにすることを目的とする。本研究の遂行により、卵巣におけるアンドロゲンの新たな機能と共に、PCOSを含むアンドロゲン過剰による不妊の原因（遺伝子）が明らかになることも期待される。

### 研究の内容および成果

#### (1) アンドロゲンの標的遺伝子の探索

排卵時のアンドロゲン～AR系の標的遺伝子を探索する目的で、幼若マウスにFSH製剤により卵胞を発達させた後に、アンドロゲン投与を行ない顆粒膜細胞に発現する排卵関連遺伝子の発現をRT-PCRにより調べた。すると、プロスタグランジン合成の律速酵素であるCox-2とEGF様成長因子のAmphiregulinの発現がアンドロゲンによって誘

導されることが分かった（図1）。また、LH製剤による排卵誘導時におけるCox-2やAmphiregulin遺伝子の発現上昇は、ARのアンタゴニストであるFlutamideを投与により著しく抑制された。よって、排卵直前の卵巣・顆粒膜細胞では、この両遺伝子がアンドロゲン～AR系の標的であることが強く示唆された。

## (2) 顆粒膜細胞における Cox-2 と Amphiregulin 遺伝子のアンドロゲンによる発現誘導

(1) で同定された遺伝子が、顆粒膜細胞において、アンドロゲン～AR系によって、直接誘導されるかどうかを初代培養の顆粒膜細胞で確かめた。そこで、卵巣から単離した顆粒膜細胞に、アンドロゲンを添加して、Cox-2 や Amphiregulin 遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた。初代培養の顆粒膜細胞は、組織からの単離や培養によって AR の発現が著しく低下するため、アンドロゲン添加によっても AR の転写活性は検出できず、標的遺伝子の発現も全く変化しない。しかしながら、アデノウイルスにより AR の発現を回復させたところ、アンドロゲンにより、Cox-2 や Amphiregulin 遺伝子の発現が誘導された。この発現誘導は、flutamide により抑制されたことから、アンドロゲンにより活性化された AR が、直接これらの遺伝子の発現を誘導していることが強く示唆された。

## (3) AR による Cox-2 と Amphiregulin 遺伝子の発現調節機構の解明

アンドロゲン～AR系による Cox-2 や Amphiregulin 遺伝子の発現調節機構を調べるために、顆粒膜細胞腫由来の KGN 細胞を用いて、レポーターアッセイやゲルシフトアッセイを行なった。

レポーターアッセイの結果、両遺伝子は、その 5' 上流 3 Kb 以内に、アンドロゲンに応答する領域が存在することが分かった。アンドロゲンに応答する配列を、さらに詳しく調べたところ、Cox-2 は遺伝子の約 2kb 上流に 2ヶ所、

Amphiregulin では上流 1.5Kb に 1ヶ所のアンドロゲン応答配列 (ARE) が存在することが分かった。KGN細胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果、これらの ARE には、AR が結合した。

また、FSH 製剤と LH 製剤により排卵を誘導したマウスの卵巣・顆粒膜細胞で、AR 抗体を使って ChIP アッセイを行った。すると、Cox-2 や Amphiregulin 遺伝子の上流域に同定された ARE を含む領域が AR 抗体により濃縮された。よって、排卵直前の卵巣では、LH 刺激によって、莢膜細胞において産生されるアンドロゲンが、顆粒膜細胞(主に卵丘細胞)の AR に作用し、これが Cox-2 や Amphiregulin 遺伝子の上流域に結合して転写を促進していることが分かった。Cox-2 は、プロスタグランジンを産生すること、Amphiregulin は EGF 受容体シグナルを活性化することにより、排卵に必須であることから、アンドロゲン～AR系は、これらの因子を介して、排卵過程に重要な役割を果たすことが示唆された。

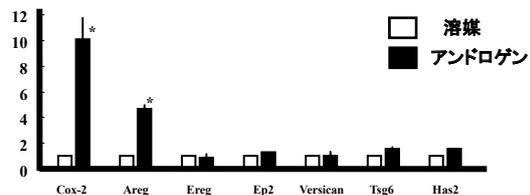


図 1. アンドロゲン投与を行ったマウス卵巣における排卵に関連する遺伝子の発現変化

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

1. **Yazawa, T.** et al. Androgen/Androgen Receptor Pathway Regulates Expression of the Genes for Cyclooxygenase-2 and Amphiregulin in Periovarian Granulosa Cells. *Mol Cell Endocrinol*, 369, 42-51, 2013.
2. **Yazawa, T.** et al.: Differentiation of pluripotent stem cells into steroidogenic cells: role of SF-1 regulator In: *Stem cells and cancer stem cells* Vol. 8, by Hayat, H.A., Springer-Company, pp169-177, 2012.
3. **矢澤隆志**ら: ES 細胞からの副腎ステロイドホ

ルモン産生細胞の分化誘導. *ACTH Related Peptides* 23, 20-22, 2012.

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 助成組織・助成制度・種目・期間・研究課題・代表/分担・採否・採択金額など
1. 科研費・基盤研究 (C)・平成 23～25 年・幹細胞からのセルトリ細胞の作製と分化機構の解明代表・採択・400 万円
  2. テルモ科学技術振興財団・一般研究助成・平成 24 年・幹細胞を用いた副腎・性腺のステロイド産生細胞再生の試み・代表・採択・100 万円

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」

## Rho-キナーゼ (ROCK) 阻害薬のアルツハイマー病に対する 治療効果の研究

研究代表者：濱野忠則（医学部・講師）

共同研究者：白藤法道（医学部・大学院生）

概 要
アルツハイマー病(AD)の主たる病理所見は、老人斑(SP)と神経原線維変化 (NFT)である。NFT の構成要素は高度にリン酸化され、重合したタウ蛋白である。我々の検討により、pitavastatin による Rho-ROCK の阻害が総タウ、ならびにリン酸化タウの減少をきたすことが示唆された。今回その機序について詳細に検討した。その結果 ROCK 阻害薬により総タウ、リン酸化タウ、およびカスパーゼ切断タウが減少すること、タウ蛋白リン酸化酵素 GSK3 $\beta$ が不活性化することが確認された。これらの作用は Akt の活性化や、カスパーゼの不活性化を介するものであることが示された。神経系細胞に対する細胞毒性は認められなかった。以上より、ROCK 阻害薬は AD の治療に有用である可能性が示唆された。
関連キーワード
アルツハイマー病、タウ蛋白、リン酸化、ROCK 阻害薬、GSK3 $\beta$

### 研究の背景および目的

高齢化社会の進展とともに、アルツハイマー病(AD)患者数は急増している。

AD の主たる病理所見は、老人斑(SP)と神経原線維変化 (NFT)である。NFT の主たる構成要素は高度にリン酸化され、重合したタウ蛋白である。タウ蛋白は微小管に結合し、安定化させるという重要な生理的作用を有するが、GSK3 $\beta$  をはじめとするタウのリン酸化酵素の働きにより、リン酸化が亢進すると、タウの重合が促進し、NFT 形成→神経細胞死に結びつく。また、カスパーゼが活性化することにより、タウの C 末端が切断し、タウの重合が開始する。

さて、以前から 2 型糖尿病、脂質異常症をはじめとする生活習慣病が AD の危険因子であることが注目されてきた。AD の神経病理学的特徴と、コレステロール代謝の変化を結びつけるエビデンスは豊富に存在する。まず、APOE  $\epsilon$  4 対立遺伝子は遅発性 AD の強力な危険因子であり、NFT (Distil et al 2003)や SP へのコレステロールの蓄積も報告されている。さらに、血漿 HDL 値が高いほど、AD の発症リスクが低下する (Reitz et al. 2010)。

スタチン服用患者に AD をはじめとする認知症の発症が有意に少ないという報告がある (Haag et al., 2009)。そこで、われわれは、HDL 上昇効果が期待できる pitavastatin を野生型タウを発現する神経細胞株に投与することによるタウ重合抑制効果について検討を行った。その結果、①タウの重合量、およびリン酸化が pitavastatin

により著しく減少すること、さらに、②これらの効果は、コレステロール代謝過程で生ずる GGPP 投与で打ち消されること、また③低分子 G 蛋白 Rho のキナーゼ (ROCK) の阻害により全く同一の結果が得られることが明らかになった。以上より、pitavastatin によるタウ重合、リン酸化抑制作用は Rho-キナーゼ (ROCK) 阻害を介するものであることが示唆された (Hamano et al., *Neurobiol Aging* 2012)。

Rho は低分子 GTP 結合蛋白の一つであり、GTP と結合することにより活性型になり、細胞内シグナル伝達をつかさどる。Rho キナーゼは分子量約 160kDa のセリンスレオニンリン酸化酵素である。Rho キナーゼを介した Ca<sup>2+</sup>濃度非依存性の血管平滑筋収縮は、異常な血管攣縮に深くかかわる。

Rho-キナーゼ阻害薬 (塩酸ファスジル<sup>®</sup>) はすでにクモ膜下出血後の遅発性血管攣縮抑制薬として市販されているが、今後多くの疾患の治療への応用が期待されている。

Rho-キナーゼ (ROCK) の阻害がリン酸化タウを減少させる分子機構の解明、ならびにタウのリン酸化酵素 GSK3 $\beta$  を阻害する機序の解明を本研究の主たる目的とする。また、Rho-キナーゼ阻害薬によるカスパーゼ活性におよぼす影響についても検討する。さらに Rho-キナーゼ阻害薬の細胞毒性の有無を検討し、安全性に関する検証を行う。

### 研究の内容および成果

Tet-Off 誘導系を導入し、野生型タウ(4R0N)を発現する神経系細胞を用い、ROCK 阻害薬 (H1152: Calbiochem) の効果につき検討した。

ROCK 阻害薬投与により総タウの減少が認められた。さらにリン酸化タウ(PHF-1)の減少が明らかに認められた (図 1)。

また、免疫組織学的検討では、同様に特にリン酸化タウ(CP13)の減少 (図 2)、ならびに Caspase3 で切断されるタウ(TauC3)の減少が確認された (図 2)。

また、タウ蛋白リン酸化酵素である GSK3 $\beta$  の不活性化も確認された (図 1)。この効果は ROCK 阻害薬投与による Akt のリン酸化亢進を介するものであることが明らかとなった。さらに、活性型 Caspase3 の減少、ならびに、サイトカイン IFN $\gamma$  の低下も認められた (図 3)。神経系細胞に対する細胞毒性は認められなかった。以上より、ROCK 阻害薬は Akt の活性化を介した GSK3 $\beta$  不活性化をきたしタウのリン酸化を抑制することが示唆された。さらに Caspase3 の不活性化、IFN $\gamma$  の不活性化により Caspase 切断タウを減少させ、タウの重合を抑制することが推察された。

以上の結果から、ROCK 阻害薬は AD をはじめとするタウオパチーの治療に有用である可能性が示唆された。

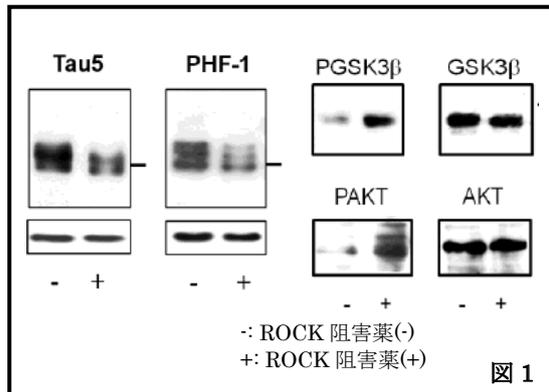


図 1

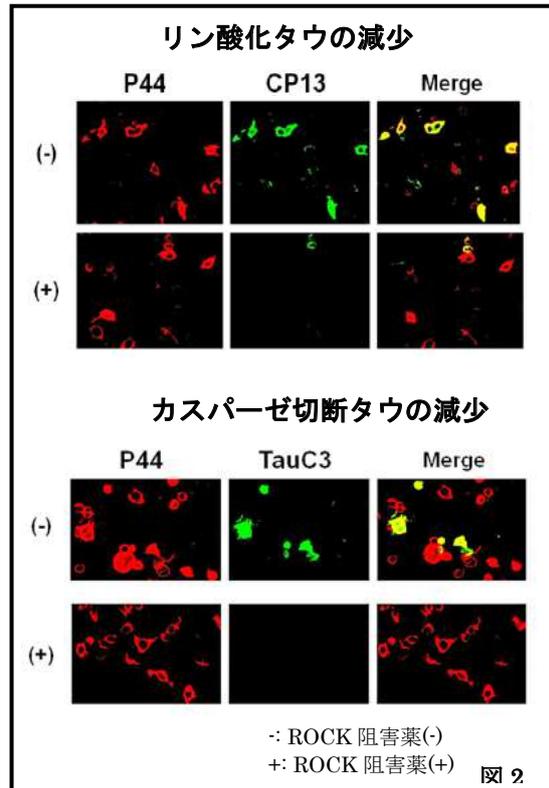


図 2

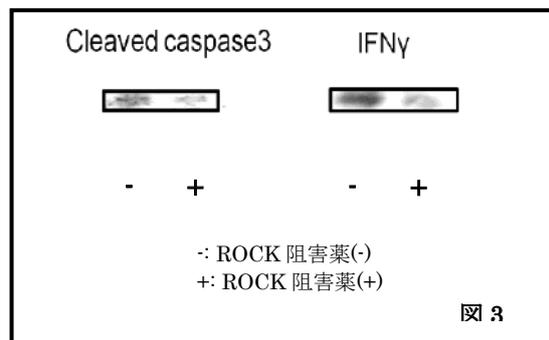


図 3

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

- 1: **Hamano T**, Yen SH, Gendron T, Ko LW, Kuriyama M. Pitavastatin decreases tau levels via the inactivation of Rho/ROCK. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(10): 2306-20.
- 2 : **Hamano T**, Mutoh T, Hirayama M, Uematsu H, Higuchi I, Koga H, Umehara F, Komai K, Kuriyama M. Winged scapula in patients with myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*. 2012; 22(8):755-8.
3. Ikawa M, Arakawa K, **Hamano T**, Nagata M, Nakamoto Y, Kuriyama M, Koga Y, Yoneda M. Evaluation of systemic redox states in patients carrying the MELAS A3243G mutation in mitochondrial DNA. *Eur Neurol*. 2012; 67(4): 232-7.

### 国際学会

1. **Hamano T**, Shirafuji N, Makino C, et al., Pioglitazone decreases phosphorylated and total tau protein. Alzheimer's Association 2012 International Conference (AAIC 2012) 2012 年 7 月, Vancouver (他 1 件)

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

独立行政法人科学技術振興機構 産学官連携ネットワーク部平成 24 年第 2 回「研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) 探索タイプ」課題番号: AS242Z03676Q 「タウ蛋白オリゴマーを介したアルツハイマー病の分子機序の解明」平成 24 年度～平成 25 年度 研究台病 採択 1,700 千円

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**進行性腎障害におけるペロキサゾール増殖薬活性化受容体 (PPAR) の  
 免疫調節作用の解析**

研究代表者：木村秀樹（医学部・准教授）

共同研究者：岩野正之（医学部・教授）、三上大輔（医学部・特命助教）

<b>概要</b>	進行性腎障害に脂質沈着と持続的な炎症が関与し、これを改善できる核内受容体として PPAR が想定される。本研究では、近位尿細管細胞に於いて、ARB である telmisartan (Telm) は特異的な PPAR- $\delta$ 活性化物質であることが判明した。TNF- $\alpha$ は主に p38/HSP27 経路を介して VEGF-C 発現を誘導したが、Telm は TNF- $\alpha$ 誘導性の VEGF-C 発現を 20-30% 程度抑制した。さらに、Telm の VEGF-C 発現抑制作用は、TNF- $\alpha$ 誘導性の p38/HSP27 リン酸化の抑制を介し、一部は PPAR- $\delta$ 依存性であることも判明した。以上から、Telm を含む PPAR- $\delta$ 活性化薬は、本来の作用である脂肪酸の酸化促進に加えて抗炎症作用を発揮することで腎障害進行を抑制する可能性が考えられた。
<b>関連キーワード</b>	Human proximal renal tubular cells, PPAR- $\delta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF-C, p38MAPK

### 研究の背景および目的

ペロキサゾール増殖薬活性化受容体 (PPAR) は、核内受容体スーパーファミリーに属し、 $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  の 3 亜型が存在する。PPAR は内因性脂質、高脂血症薬 (fibrate)、糖尿病薬 (pioglitazone) で活性化され、 $\alpha$ ,  $\delta$  型は肝・筋での脂肪酸酸化を促進し、 $\gamma$  型は脂肪細胞分化・インスリン抵抗性改善を促進する。一方、各種 PPAR は抗炎症作用も有し注目されてきた (Cell 1995/Diabetes 2010)。PPAR は、NF $\kappa$ B 等の炎症性サイトカイン誘導性の転写因子を抑制し、マクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞、肝細胞等で抗炎症作用を呈する (Science 2003)。

進行性の腎障害では、脂質毒性が重要な進展因子と考えられている。高脂肪摂取マウスや 2 型糖尿病 db/db マウスでは、糸球体細胞内の脂質合成の亢進と脂質分解低下により、細胞内に脂質が蓄積し糸球体障害を誘導して糸球体硬化や蛋白尿を増強する。また、糸球体障害から由来する尿蛋白が持続して増加する場合は、尿蛋白に結合した脂肪酸が尿細管に過剰に再吸収されることで、尿細管間質に炎症が惹起される。さらに、アンジオテンシン II 誘導性の高血圧マウスでは、脂質合成が増強し尿細管の脂質沈着と腎障害を来すと報告され

ている。また、腎実質を減少させ残存糸球体に過剰濾過を誘導したミニマム腎は進行性腎障害の代表的モデルであるが、脂肪酸合成が亢進し、分解が低下して脂質蓄積が誘導されることが示されている (Kidney International 2006)。

一方、一部のアンジオテンシン II 受容体阻害薬 [ARB; telmisartan (Telm)] には PPAR- $\gamma$  作用が認められるとの報告があり、脂肪細胞の分化誘導能 (Circulation 2004) と抗炎症作用が示されていた。さらに、最近、マウス実験で Telm に PPAR- $\delta$  作用が認められ、脂肪酸分解の促進効果も報告されている (Hypertension 2010)。

Telm は高血圧を伴う慢性腎障害の治療で汎用される ARB の 1 つであり、慢性腎障害の主体は尿細管細胞の慢性炎症であるため、Telm がヒト腎実質細胞に於いて、どのような PPAR 作用を呈し、脂肪分解作用や抗炎症作用を有するのかの知見は、基礎的にも臨床的にも有用と考えられる。

以上の背景から、本研究では、培養近位尿細管細胞 (HPTEC) を用いて、Telm の PPAR 作用の検討と同作用を介した抗炎症作用を解析した。

### 研究の内容および成果

#### 1) HPTEC に於ける Telm の PPAR 作用の検討

HPTEC に、PPAR- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の各 mRNA の発現を認め、PPAR- $\gamma$ ,  $\delta$  については蛋白発現を確認した。PPAR- $\gamma$  活性化薬である Pioglitazone (Pio: 3 $\mu$ M) は、PPRE-luc 活性を有意に増強し、PPAR- $\gamma$  阻害薬 GW9662 で完全に抑制された。PPAR- $\delta$  の活性化薬で

ある GW516 も PPRE-luc 活性を有意に増強し、PPAR- $\delta$  阻害薬 GSK0660 で抑制された。ARB である telmisartan (Telm: 10 $\mu$ M) は、PPRE-luc 活性を有意に増強し、GW9662 で抑制されず、PPAR- $\delta$  阻害薬の GSK0660 で抑制された。Pio は PPAR- $\gamma$  の標的遺伝子である心型の脂肪酸結合蛋白 (FABP) を主に増

強し、GW516 と Telm は PPAR-δ の標的遺伝子である肝型 FABP を主に増強した。さらに、Telm の肝型 FABP 発現増強は、PPAR-δ 阻害薬で有意に抑制された。以上より、ヒト近位尿細管細胞では、Telm は PPAR-δ 作用を有し、内因性 PPAR-δ 蛋白を活性化することが判明した。

## 2) HPTEC に於ける Telm の抗炎症作用とその PPAR 依存性の検討

Telm は基底状態の MCP-1, PAI-1, VEGF-C 発現を抑制した。さらに、Telm は TNF-α 誘導性の VEGF-C 発現も 20-30% 程度抑制した (図 1)。TNF-α 誘導性の VEGF-C 発現は、p38MAPK 阻害薬 SB203580 で 50% 程度抑制され、p38 経路が主体であった。リン酸化蛋白の解析から TNF-α 刺激で p38 リン酸化、HSP27 リン酸化の誘導が確認され、p38 リン酸化のピークは刺激後 5-15 分に、HSP27 リン酸化のピークは 15-30 分に認められ、HSP27 は p38 の下流シグナルと考えられた (図 2)。また、siRNA を用いた HSP27 発現抑制では、TNF-α 刺激性 VEGF-C 発現の減弱が確認された。以上より、TNF-α 刺激性の VEGF-C 発現は、主に p38/MAPK/HSP27 経路を介すると判断した。

次に、PPAR-δ 阻害薬 GSK0660 を用いて、Telm による VEGF-C 発現抑制作用の PPAR-δ 依存性を解析したところ、GSK を使用して PPAR-δ 阻害した場合に TNF-α 誘導性 VEGF-C 発現の抑制率が有意に低下した (23% vs. 9%,  $P < 0.05$ )。また、Telm は、TNF-α による p38 と HSP27 のリン酸化を各々 60% と 43% 有意に抑制した (図 3)。その一方で、PPAR-δ 阻害薬により Telm の p38 リン酸化抑制率が有意に減弱した (38% vs. -4.7%,  $P < 0.05$ )。さらに、PPAR 活性を有さない ARB である eprosartan は TNF-α 誘導性 VEGF-C 発現を抑制しなかった。以上の結果から、ヒト腎尿細管細胞に於いて、Telm は TNF-α に対して抗炎症作用を有し、その機序の一部は PPAR-δ 作用を介した p38MAPK 経路のリン酸化の抑制と考えられた。

私たちは、本研究の他にヒトメサンギウム細胞においても、Telm の PPAR-δ 活性化作用を確認し、その成果を投稿中である。腎障害の進行過程で、腎組織での脂質沈着と慢性炎症の持続が認められるが、Telm を含めた PPAR-δ 活性化薬がこれらを改善し、腎障害を抑制する可能性が考えられた。

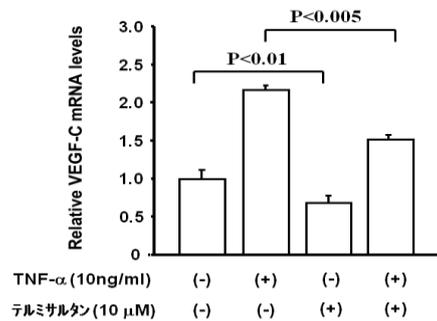


図 1. テルミサルタンは TNF-α 誘導性の VEGF-C 発現を抑制する

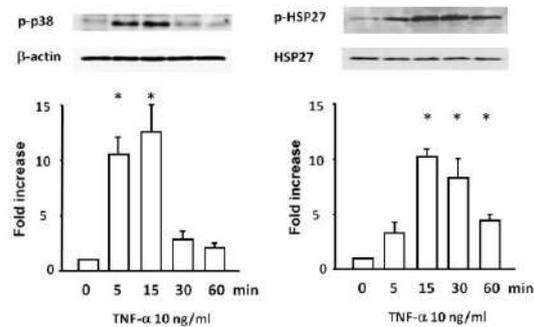


図 2. TNF-α 刺激後の p38 MAPK と HSP27 のリン酸化の経時的推移 (\*  $P < 0.01$  vs. 0 min)

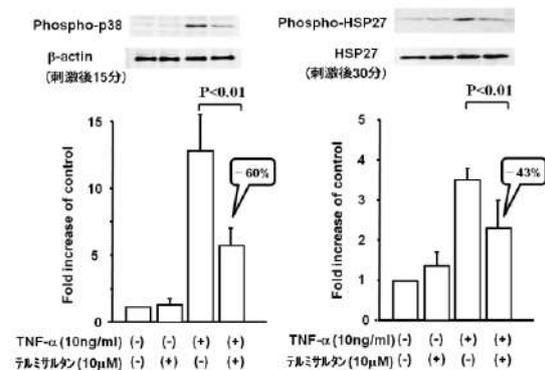


図 3. テルミサルタンは TNF-α 誘導性の p38, HSP27 のリン酸化を抑制する

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

**学会発表:** 2012 年 米国腎臓学会, Takahashi N, Kimura H et al: Role of Renal Hypoxia in the Progression of Experimental Diabetic Nephropathy.

**論文:** Mikami D, Kimura H. et al: Telmisartan activates endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-δ and has anti-fibrotic effects in human

mesangial cells. submitted to Journal of Hypertension.

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・基盤研究(C)・2012-2014・脂質応答性転写因子の抗線維化作用の解析と新規治療薬の探索 — 低酸素性腎障害を中心に — ・木村秀樹・採択・直接経費 4000(千円)

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**食物アレルギーの耐性獲得機序の解明と新規治療法の開発**

研究代表者： 大嶋 勇成（医学部・教授）

共同研究者： 安富 素子（医学部・助教）、林 仁幸子（医学部・医員）、  
 河北 亜希子（医学部・医員）

<b>概 要</b>	マウスの皮膚にオボアルブミン(OVA)を反復塗布後、OVA を経口チャレンジし、即時型アレルギー症状の誘発の有無を検討した。また、制御性T細胞誘導効果が示唆されるビタミン D <sub>3</sub> (Vit.D <sub>3</sub> )を同時に塗布し、アジュバンド効果を検討した。その結果、OVA 塗布により OVA 特異的 IgE が産生され、経口チャレンジにより即時型アレルギー性下痢症状の誘発、消化管粘膜への好酸球浸潤、OVA 塗布皮膚局所への炎症細胞の浸潤が誘発された。Vit.D <sub>3</sub> の同時塗布では誘発症状の増強が観察された。特異的 IgE の割に IgG 1 の産生が弱く、脾臓細胞中の myeloid derived suppressor cells が減少していた。経皮感作による食物アレルギーでは、腹腔感作による食物アレルギーとは異なる病態が関与することが示唆された。
<b>関連キーワード</b>	食物アレルギー、経皮感作、ビタミン D <sub>3</sub> 、免疫療法

### 研究の背景および目的

食物アレルギーの患者は近年増加傾向にあり、加水分解小麦成分含有する石鹼による健康被害や、学校給食での誤食による死亡事故など社会的問題になっている。

食物アレルギーの治療は原因食物の除去が基本となるが、食物除去は患者とその家族に身体的・精神的・経済的負担となり、QOL を著しく低下させる。また、誤食時に重篤な症状が誘発されるという危険が常につきまとうことになる。そこで、原因食物を摂取してもアレルギー症状が惹起されないよう原因食物に対する耐性獲得を誘導する方法の確立が求められている。ここ数年、原因食物を少量ずつ摂取して耐性獲得をめざす経口免疫療法が検討されつつあるが、治療経過中に軽微な即時型反応の誘発は必発で、時にアナフィラキシーや好酸球形胃腸炎などの重篤な副作用が誘発される問題がある。そこで、本研究では、食物アレルギーの新規治療法として免疫寛容の誘導を利用し安全に耐性を獲得する方法の確立を目的とする。

我々はこれまでに、抗原特異的 IgE 存在下でも、クローン除去・アナジー、制御性 T 細胞の誘導により経口免疫寛容が誘導されること (J Allergy Clin Immunol 2005)、抗原感作マウス脾臓中に即時型アレルギー症状を抑制する調節性 CD8 陽性 T 細胞が存在することを明らかにした (J Allergy Clin Immunol 2009)。これらの結果に基づき抗原

特異的制御性 T 細胞を誘導することで経口免疫寛容を誘導させる食物アレルギーの新規治療法の開発を目的とした。

食物抗原のような外来性抗原に対し CD8 陽性 T 細胞が反応するためには、抗原提示細胞のクロスプレゼンテーション機能により食物抗原が提示される必要がある。表皮中のランゲルハンス細胞はクロスプレゼンテーションにより CD8 陽性 T 細胞を活性化しうることから、経皮的抗原投与により制御性 CD8 陽性 T 細胞を誘導することで免疫寛容を誘導させる免疫療法が可能か否かを検討する。

一方、食物アレルギーの原因となる食物抗原への感作は経口摂取により生じると考えられてきた。そのため、食物アレルギーの発症予防として、アレルギーとなりやすい食品の摂取開始を遅くする試みが行われてきた。しかし、加水分解小麦成分含有する石鹼で問題となったように、石鹼中に含まれる加水分解小麦成分への経皮暴露によって小麦アレルギーになるという新たな食物アレルギーの発症機序が注目されている。経皮暴露によっても抗原感作が起きることから、経皮感作を防ぎ免疫寛容を誘導する方法を確立しなければ、食物アレルギーの発症を完全に予防することは困難といえる。本研究により経皮膚感作の成立機序とその制御法が確立できれば、食物アレルギーの発症予防につながると期待される。

### 研究の内容および成果

#### 1) 抗原塗布による食物アレルギーモデルの作成

マウスの耳介皮膚にオボアルブミン (OVA) を 1 週間毎 48 時間貼付塗布を 3 回実施した後、OVA 経口チャレンジを行い、アレルギー症状誘発の有無

を検討した。その結果、OVA 反復塗布後に OVA 得定期 IgE 産生が誘導され、OVA 経口チャレンジにより即時型下痢症状が誘発された。OVA 経口チャレンジ後には、消化管粘膜への好酸球の集積を認めるだ

けでなく、OVA が再投与されていない耳介皮膚にも好酸球をはじめとした炎症細胞の浸潤増加を認めた。

加水分解小麦成分含有する石鹼による小麦アレルギーでは、小麦摂取によりアナフィラキシー症状以外にも石鹼使用部位の発赤を認めることを特徴とするが、今回確立した経皮感作による食物アレルギーモデルは、この病態を解析する上で有用と考えられた。

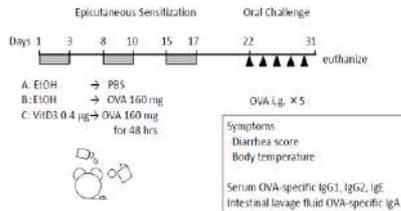


図1 経皮感作による食物アレルギーモデル

## 2) ビタミン D3 (Vit.D3)による経皮感作増強

VitD<sub>3</sub>は、制御性 T 細胞の誘導作用を持つことが報告されていることから、経皮的抗原暴露時に VitD<sub>3</sub>をアジュバントとして経皮投与すると、抗原感作が抑制されるか否かを検討した。その結果、VitD<sub>3</sub>同時投与により OVA 特異的 IgE 産生が増強されると共に、経口チャレンジによる即時型下痢症状も増悪し、低体温を呈するようになった。さらに、消化管粘膜への好酸球の増加と、耳介皮膚の

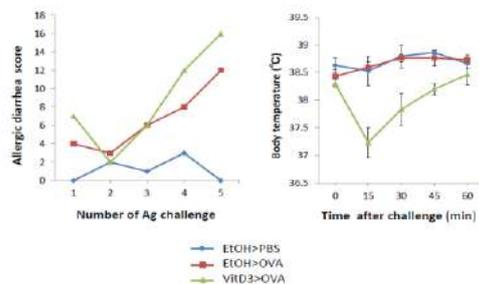


図2 経口チャレンジで誘発される下痢・低体温

肥厚、炎症細胞浸潤の増強を認めた。このことより VitD<sub>3</sub>は作用部位によりアレルギー発症に及ぼす影響は異なり、皮膚塗布では経皮感作を増強し、誘発症状を増悪させたことから、作用箇所により VitD<sub>3</sub>はアレルギー増悪因子になると考えられた。

## 3) 経皮的抗原感作と腹腔感作との比較

アレルギー動物モデルとしては通常、アラムと共に抗原を腹腔内投与する腹腔感作が用いられる。腹腔感作では、特異的 IgE に比べ特異的 IgG1 が大量に産生されるが、経皮感作の場合、特異的 IgE の割に、特異的 IgG1 の産生が多くなかった。

免疫抑制作用を持つ細胞群を比較すると、腹腔感作では脾細胞中の myeloid derived suppressor cells (MDSC)の割合は感作によっても変化しないのに対し、経皮感作では、脾細胞中の MDSCのうち CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>dim</sup>の比率には変化がなかったが、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>bright</sup>の比率の減少を認めた。アレルギー性疾患の病態における MDSC の役割についてはほとんど明らかにされておらず、今回確立した経皮感作食物アレルギーモデルは MDSC の機能解析に有用と考えられた。

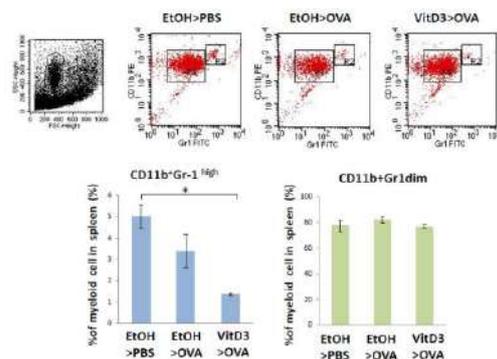


図3 経皮感作では MDSC が減少する

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

#### 原著論文

- IL-17A/F modulates fibrocyte functions in cooperation with CD40-mediated signaling. Inflammation. (2013 in press)
- Biotin and carnitine profiles in preterm infants in Japan. Pediatr Int (2013 in press)

#### 総説

- 食物アレルギー診療ガイドライン 2012 解説 第3章病態生理と成立機序 日児アレルギー会誌 26:652-658(2012)(他 10 件)

#### 書籍

- 最新アレルギー疾患の免疫療法と分子標的治療—理論と実際—免疫療法の機序 近藤直実編 診断と治療社 東京 pp16-20 (2012)

### 「特記事項」

- 第 49 回日本小児アレルギー学会において モーニングセミナー 1 「知っておきたい経口免疫療法の基礎」で結果の一部を発表

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 基盤研究 (C) 食物アレルギーに対する制御性 T 細胞誘導を利用した経皮免疫療法の開発 (代表) 申請中

## 福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」 プラズマアシスト燃焼のラジカル反応制御機構の解明

研究代表者： 酒井 康行（工学研究科・助教）

<b>概 要</b>	自動車用エンジンの着火制御に非平衡プラズマを有効利用するためには、着火制御に必要な活性種の種類、添加タイミング、添加量または熱量、それに必要な非平衡プラズマを生成するための放電パラメータを示す必要がある。本年度は、着火制御のために燃料側が必要とする活性種の添加方法について明らかにするために、これまでに代表者らが蓄積してきた炭化水素燃料の反応機構に関する知見を基に、燃焼反応シミュレーションを利用してラジカル添加効果の解析を行った。ラジカル添加による着火促進効果が現れる条件は、ラジカル連鎖分岐反応が反応系の進行を支配する状況下でのみ現れる。つまり、低温酸化反応が進行中の燃焼初期段階においてのみ、数 ppm のラジカル添加で燃料の着火を制御することが可能になる。
<b>関連キーワード</b>	非平衡プラズマ、炭化水素燃料、着火、制御

### 研究の背景および目的

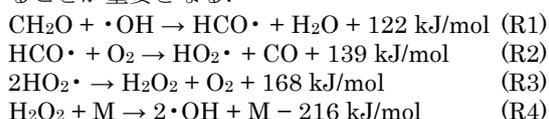
非平衡プラズマを利用した着火制御、火災安定化が、レシプロエンジン、ガスタービン、ジェットエンジンなどの燃焼機器で検討されている。これまでに印加時間や印加電場をパラメータにして、生成する励起化学種やイオンの分光測定、水素やメタンの燃焼試験などが行われてきた。しかしながら、反応場の温度や圧力により複雑な挙動を示す炭化水素燃料の反応機構に対しては、振動または電子励起化学種の反応が与える影響や活性種の緩和過程が与える熱的影響が明らかにされていない[1]。自動車用エンジンの着火制御に非平衡

プラズマを有効利用するためには、着火制御に必要な活性種の種類、添加タイミング、添加量または熱量、それに必要な非平衡プラズマを生成するための放電パラメータを示す必要がある。本年度は、着火制御のために燃料側が必要とする活性種の添加方法について明らかにする。これまでに代表者が蓄積してきた炭化水素燃料の反応機構に関する知見を基に、燃焼反応シミュレーションを利用してラジカル添加効果の解析を行った。

[1] A. Starikovskiy and N. Aleksandrov, *Prog. Energy Combust. Sci.* **39** (2013) 61-110.

### 研究の内容および成果

図 1 に典型的な炭化水素燃料が有する二段階自着火の温度・熱発生履歴を示す。反応開始から一段目熱発生の期間中は、低温酸化反応機構と呼ばれているヒドロキシルラジカル (OH) を連鎖担体とした炭化水素化合物のラジカル連鎖分岐反応過程が反応系の進行を支配している。二段目熱発生(着火)は、酸水素系の反応によるラジカル連鎖分岐反応が反応系の進行を支配している。一方、一段目熱発生終了後から着火直前までの期間(熱着火準備期間)は、中間生成物による (R1) から (R4) までの反応による熱発生が反応系の進行を支配する。(R1) から (R4) の総括反応は (R5) で表わされる。この期間では、中間生成物であるアルデヒドの酸化反応からの熱発生により反応系の温度を上昇させ、活性化エネルギーの高い酸水素系の連鎖分岐過程が支配的になる温度に到達させることが重要となる。



$2\text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO} + 473 \text{ kJ/mol}$  (R5)  
したがって、炭化水素化合物の自着火過程に対するラジカル添加効果は、ラジカル連鎖分岐反応に支配される低温酸化期間と、熱発生に支配される熱着火準備期間で異なることが示唆される。

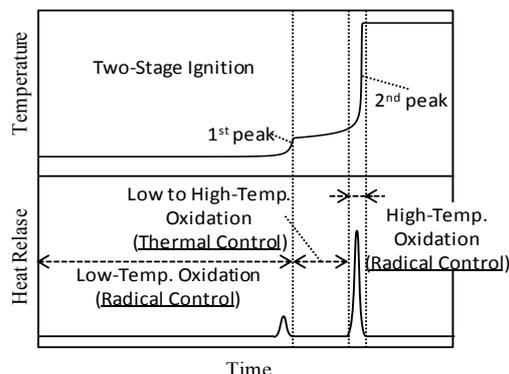


図 1. 炭化水素燃料の二段階自着火過程

初期温度 650 K, 初期圧力 2 MPa, 当量比 0.5 のイソオクタン/空気混合気 (ガソリン模擬燃料) に対して, OH (ラジカルの代表として. ただし, 放電により生成されるラジカルの種類や生成量については, さらなる検討の必要がある) を添加した時の自着火過程の温度履歴を図 2 に示す. 反応方程式のソルバーには CHEMKIN-PRO を用い, 断熱定容条件下での自着火を仮定した. OH を添加しない通常の自着火では, 低温酸化による一段階目の発熱ピークが約 166 ms, 着火が約 186 ms となる. 図 2 (a) は反応開始時点, つまりラジカル連鎖分岐反応が支配的な条件下にラジカルを添加した場合である. 添加量の増加に伴い着火は促進され, 数 ppm の添加量で着火までに要する時間が約 1/10 となる. また, 反応開始から一段目熱発生が短縮されていることがわかる. 一方, 図 2 (b) は熱着火準備期間中, つまり熱発生が支配的な条件下にラジカルを添加した場合である. 図 2 (a) と比較すると, 同一量の OH 添加でも得られる着

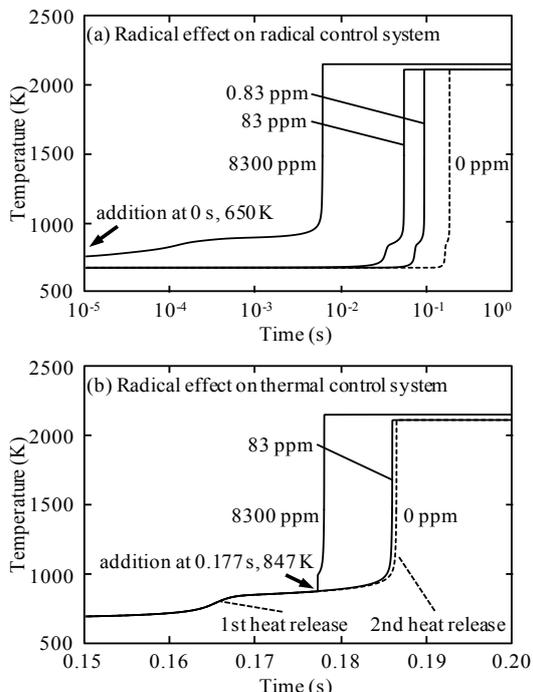


図 2. ラジカル添加が自着火過程に与える影響. イソオクタン/空気混合気 (初期温度 650 K, 初期圧力 2 MPa, 当量比 0.5) に対して, 左図は 0 s, 右図は 0.177 s に OH ラジカルを添加した. 破線は OH ラジカルを添加しない通常の着火.

火促進効果はほんのわずかとなる. したがって, ラジカル連鎖分岐反応が支配的する状況下でのみ, ラジカル添加による着火促進効果が現れることが明らかになった.

図 3 に図 2 (a) と同一条件下での OH 濃度の時間履歴を示す. 低温酸化反応期間中において OH 濃度は指数関数的 (傾きが直線になることに対応) に増加する. この期間中の OH は主に燃料分子と反応しており, 反応系の温度上昇も指数関数的に増加する. OH 濃度が約 0.1 ppm になる付近で, 反応系の温度上昇量が数 K になり, 図 1 に見られるような一段階目の熱発生が観測される. この低温酸化反応の熱発生により反応系の温度が約 900 K に到達すると, 反応の分岐率が変化して熱着火準備期間に至る. 図 3 から OH を添加した場合においても, 低温酸化期間中の OH 濃度増加の傾きや一段目熱発生を観測される濃度が変化しないことがわかる. OH 添加の反応論的意味は, この低温酸化反応期間中の OH 濃度の増加開始点を高濃度側にシフトさせることである. これにより, 反応開始から一段階目熱発生が観測されるまでの時間が短縮され, 全体として着火時期が促進されることになる.

非平衡プラズマを利用して着火・燃焼を制御するためには, 対象となる反応系の進行がラジカルにより支配されている低温酸化反応期間中であることが必要条件となる. この条件が成立すれば, 数 ppm の OH でも着火を促進することができる. また, 着火時期は OH 投入量によりかなり広い範囲で変化させることができる.

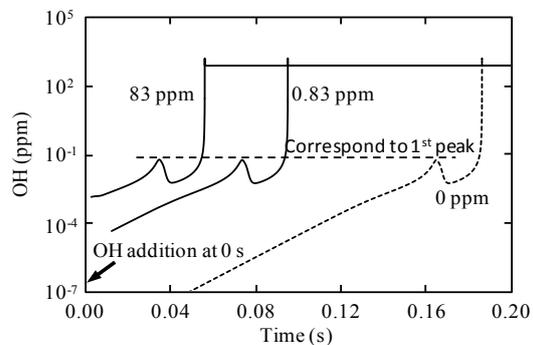


図 3. OH 濃度の時間履歴. 燃焼条件は図 2 (a) を参照.

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

投稿予定 1 編

- [1] Y. Sakai et al., "Radical addition impact on the auto-ignition of hydrocarbon compounds." *Combustion and Flame*

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

申請中 1 件

- [1] 日本学術振興会・科学研究費助成事業・若手研究 (B)・平成 25 - 26 年度・炭化水素燃料の自着火反応機構を解きほぐす・代表

## 福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」 緊急災害情報の高信頼伝送を可能にする すれ違い通信技術の研究開発

研究代表者： 橘 拓至（工学研究科・准教授）

<b>概 要</b>	本研究課題では、被災地のユーザ間で緊急災害・避難情報を迅速に伝達するために、すれ違い通信技術を利用した災害情報共有システムの開発を目指す。特に、本研究課題では、誤った情報の伝達を防いで伝達情報の信頼性を向上させるために、高信頼のユーザにのみ情報を伝達する方式を検討する。具体的には、ユーザの通信履歴を利用して各ユーザの信頼度を計算し、その信頼度を基にして信頼度の高いユーザにのみデータを転送する。本方式の性能をコンピュータシミュレーションで評価し、高信頼なデータ伝送が実現できることを示す。また、本方式を利用したスマートフォン用アプリケーションを作成する。本アプリは、iOS5.0以降のiPhoneで利用することができる。実装実験から、すれ違い通信処理と信頼度計算処理が短時間で完了し、本アプリが実用可能であることを示す。
<b>関連キーワード</b>	すれ違い通信，災害情報，高信頼化，スマートフォンアプリ，実装実験

### 研究の背景および目的

現在、近距離無線通信技術を利用したすれ違い通信によって、緊急災害時に災害情報や安否情報を共有することが期待されている。その一方で、災害情報を共有する際に、Twitterなどのソーシャルネットワークサービス（SNS）では、デマ情報の流布が問題となっている。

それゆえ、すれ違い通信で緊急災害情報を交換する場合においても、デマ情報の流布や情報の改ざんなどが発生することが想定される。しかしながら、これまで、すれ違い通信において情報伝達の信頼性を考慮した研究はほとんど行われていない。また、情報収集サーバを使用せずに、携帯端

末のみで情報の信頼性を考慮することは検討されていない。

そこで、本研究課題では、ユーザ間で緊急災害情報を迅速に伝達することが可能な、高信頼なすれ違い通信技術の研究開発を目指す。特に、ユーザの通信履歴を利用して、信頼できる情報・ユーザの判定方法、信頼できる情報のみを伝達する技術を確立する。さらに、本技術を利用したスマートフォン用アプリケーションを作成する。コンピュータシミュレーションとアプリケーションの実装実験によって、提案技術の実用可能性を調査することを目指す。

### 研究の内容および成果

本研究課題では、ユーザの通信履歴を利用して、信頼できるユーザ間でのみ情報を伝達する方式を提案する。ここで、送信ユーザがデータを送る宛先ユーザは、送信ユーザにとって友人や家族、同僚など親密な関係にあり、面識のないユーザにデータを送ることはほとんどないことが多い。

そこで本方式では、データの宛先になった回数を基に、各ユーザの信頼度を評価する。具体的には、時刻 $t$ におけるユーザ $i$ のユーザ $j$ に対する信頼度 $r_{ij}(t)$ を

$$r_{ij}(t) = \alpha r_{ij}(t-1) + (1-\alpha)I_{ij}(t)$$

で計算する。

ここで、 $\alpha$ は重みパラメータを表し、 $I_{ij}(t)$ は、ユーザ $i$ がユーザ $j$ にデータを送信した時のみ1となる関数を表している。それゆえ、ユーザ $i$ がユーザ $j$ にデータを送るほど $r_{ij}(t)$ の値は増加し、ユーザ間の親密度を考慮した信頼度設定が可能になる。

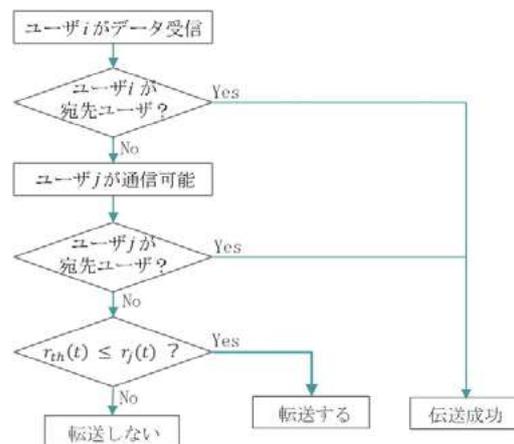


図1. 提案法での経路制御

図1は、提案方式におけるデータの経路制御を示している。この図に示されているように、デ

ータを受信したユーザ $i$ は、データの宛先ユーザを確認した後、転送先を決定する。このとき、信頼度 $r_{ij}(t)$ と事前に設定した閾値を比較して、データが高信頼ユーザのみを中継されるように転送先を決定する。

本技術の性能を、コンピュータシミュレーションで評価する。本シミュレーションでは、常に30人程度のユーザが移動している環境で行っている。図2のシミュレーション結果から、提案方式を用いることで、不正されたデータが宛先ユーザに転送される確率が減少することが分かる。また、提案方式のデータ転送効率が最も高く、無駄なデータの中継処理を回避できていることが分かる。

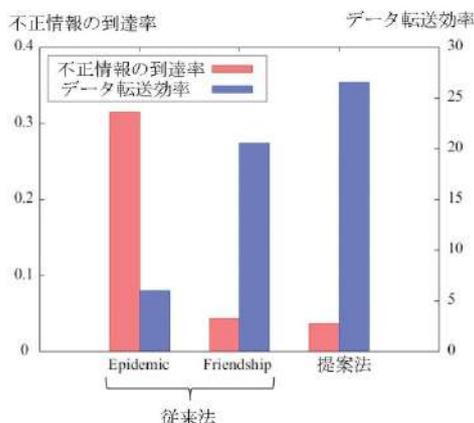


図2. シミュレーション結果



図3. 作成したiPhoneアプリの起動画面

さらに、Bluetoothを用いてすれ違い通信を実現するスマートフォン用アプリケーションを作成する。本課題では、特に、代表的なスマートフォンであるiPhoneで利用するために、iOS5.0に対応アプリケーションを作成する。

図3は、本課題で作成したアプリケーションの起動画面を示している。本アプリケーションでは、各ユーザの信頼度を計算するために、ユーザの識別が必要となる。今回の実装では、UUIDと呼ばれるIDを用いて、ユーザの識別を行った(図3の上部)。また、図3の中央に送信ボタンが示されているが、このボタンは送信ユーザだけがクリックし、中継ユーザは、このボタンを押すことなく自動的にデータの転送処理が行われる。

表1は、本アプリケーションを用いたiPhoneによるデータ転送処理の実験結果を示している。表1の結果から、ユーザとの接続に要する時間、及び送信処理に要する時間ともに、0.1秒以下の非常に短時間であることが分かる。それゆえ、ユーザ同士が接近している短い時間でデータ転送処理が完了することが期待できる。

また、表2は、iPhone端末で信頼度を計算するために要する時間を示している。信頼度の計算処理に要する時間は、ユーザ数が増加するにつれて増加するが、1万人の場合でも2秒以下で終了することが分かる。

以上の結果から、本課題で確立した方式およびアプリケーションは、実環境で利用可能であり、その有効性が高いことが示された。

表1. データ転送完了時間

接続時間[秒]	0.0026162
送信時間[秒]	0.0250463

表2. ユーザ数の影響

ユーザ数	信頼度計算[秒]	グループ更新[秒]
10	0.001509	0.000030
100	0.002002	0.000117
1000	0.073479	0.019002
10000	1.130653	0.134881

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

- 山本 拓郎, 橋 拓至, “ユーザの通信履歴を利用したすれちがい通信の高信頼化技術の提案,” 電子情報通信学会研究報告 IN2012-67, vol. 112, no. 209, pp. 93-98, Sep. 2012.
- 山本 拓郎, 橋 拓至, “通信履歴を利用してデータ転送を制限するDTN技術の実装,” 電子情報通信学会研究報告 IN2012-159, vol. 112, no. 464, pp. 31-34, Mar. 2013.

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 総務省・平成25年度 戦略的情報通信研究開発推進制度(SCOPE)・地域ICT振興型研究開発・2年・ソフトウェア制御と近距離無線通信を利用して地域の賑わいと安全を創出する多目的情報通信システムの研究開発・代表・申請予定

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**エネルギーを生む基礎工・地盤改良技術の開発に向けた  
 フィージビリティ研究**

研究代表者： 小林 泰三（工学研究科・准教授）  
 共同研究者： 寺崎 寛章（工学研究科・博士研究員）、玉井 俊行（旭化成建材㈱）

概 要
<p>本研究では、自然エネルギー利用のひとつとして期待が高まる地中熱利用技術に着目し、戸建住宅や小規模商業施設の駐車場等を対象とした無散水融雪技術を提案する。具体的には、小規模建築物の基礎杭として多用される鋼管ソイルセメント杭を介して地中の熱を採取し、水を媒体として送水管で地表に送り、熱交換パネルを敷設した駐車場や歩道、エントランス部等で放熱して融雪を行おうとするものである。当該研究期間では、フィージビリティ研究として、1) 杭や種々の土質の基本的熱特性を実験的に求めた上で、2) 採熱（地中）と融雪（地表）の連成シミュレーションを介して全体システムとしての熱的成立性評価を行った。その結果、建物規模に応じて必要とされる程度の駐車場面積であれば、十分に融雪が可能となることを示す結果を得ることができた。</p>
<p><b>関連キーワード</b>      基礎工事、鋼管ソイルセメント杭、地中熱、融雪、小規模建築物</p>

**研究の背景および目的**

建物を建造する際、程度の差はあれ、構造物の荷重を地盤にうまく伝達させるための基礎工事・地盤改良が必ず行われる。建物基礎は、構造物の安定に欠かすことのできない重要な工事であるにも関わらず、建物の外観には直接関わってこないことや費用対効果が見えにくいことなどを理由に施主側は出来る限りコストを抑えたいと考えるのが通例である。著者らは、基礎としての工学的機能面にプラスアルファの付加価値を付与して基礎工事への理解と積極性は高め、延いては安全・安心かつ豊かな暮らし実現の一助として貢献できる技術を提案できないかと考えている。

そこで本研究では、自然エネルギー利用のひとつとして期待が高まる地中熱利用技術に着目し、戸建住宅や小規模商業施設の駐車場等を対象とした無散水融雪技術を提案する。具体的には、小規模建築物の基礎杭として多用される鋼管ソイルセメント杭を介して地中の熱を採取し、水を媒体として送水管で地表に送り、熱交換パネルを敷設した駐車場等で放熱して融雪を行おうとするものである（図-1）。

本研究では、フィージビリティ研究として、1) 杭や種々の土質の基本的熱特性を実験的に求めた上で、2) 採熱（地中）と放熱（地表融雪）の連成シミュレーションを介して全体システムとしての熱的成立性評価を行った。

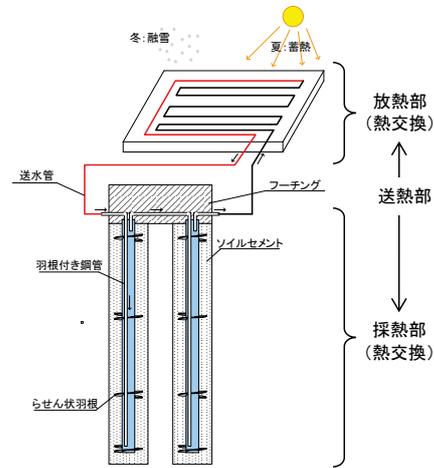


図-1 システム概念図

**研究の内容および成果**

本研究で対象とする鋼管ソイルセメント杭とは、機械式深層混合処理工法（地盤中にセメントミルクを注入攪拌しながら杭をつくる工法）により築造されたソイルセメントと、外面に突起等を持つ鋼管を一体化した基礎構造である（図-2左）。鋼管は中空のまま供用されるが、ここではその中に採熱管（U字管）を挿入し、周囲を砂で間詰めして周囲地盤との熱交換を行う（図-2右）。すなわち、

構造物の支持機能と地中熱の採熱機能を同時に果たそうとするものである。

**1) 原地盤およびソイルセメントの熱的特性**

杭や周辺地盤の熱的特性は、地中熱の採熱効率に大きく関わってくる重要なパラメータである。ここでは、複数の土質試料を対象に、間隙比や飽和度を変化させた条件下で熱伝導率と比熱を計測した。その結果、熱伝導率は乾燥した砂試料（豊

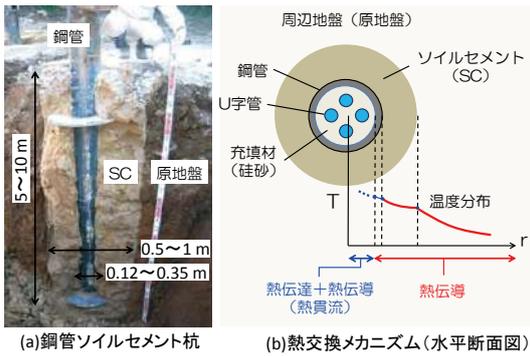


図-2 鋼管ソイルセメント杭と熱交換

浦砂)で0.24~0.27 W/mK、飽和した同試料で2.25~2.29 W/mK、飽和粘土試料(藤森粘土)では1.34~0.38 W/mKとなり、さらに実施現場から採取した試料(砂質系)は砂と粘土の中間的な値を示すことが分かった。このことから、土の熱伝導率は、間隙率には大きな影響を受けない一方、間隙が水で飽和することによって最大で8~9倍も増大することが分かる。また、原地盤をセメント固化した試料に対する計測を行った結果、熱伝導率には大きな変化は見られなかった。採熱効率の観点では、地下水の有無が大きく影響すること、また、ソイルセメントの存在が有利に働くことはあまり期待できないことなどが分かった。

比熱に関しては、粉末状にした試料に対する計測を行った結果、セメント固化材を含む全ての試料が1.15~1.53 J/gKの範囲に収まることが分かった(粘土が若干大きい値を示す傾向にある)。空気および水の比熱がそれぞれ1.0 J/gK、4.22 J/gK程度であり大きく異なることに鑑みると、間隙を考慮した土のマスとしての比熱は、土粒子の鉱物特性には大きな影響を受けない一方、間隙率やその空隙を占める空気と水の割合に大きく依存することが示唆される。

本研究では、さらに鋼管内の熱収支を支配する熱貫流率(熱伝達物質~U字管~管内充填材の間に生じる熱伝達と熱伝導の複合問題を統一的に扱うための実験パラメータ)を求めた。その結果、U字管に高性能ポリエチレン管を用いた場合、35.9 W/m<sup>2</sup>Kの熱貫流率が得られ、熱伝達物質(水)の流量にはほとんど影響を受けないことが分かった。

## 2) 採熱と放熱の連成シミュレーション

本研究では、図-1に示した地中の採熱過程(採熱部)と地表の融雪過程(放熱部)を連成しながら解くことのできる数値シミュレータを開発し、システムとしての成立性を評価するための融雪シミュレーションを行った。

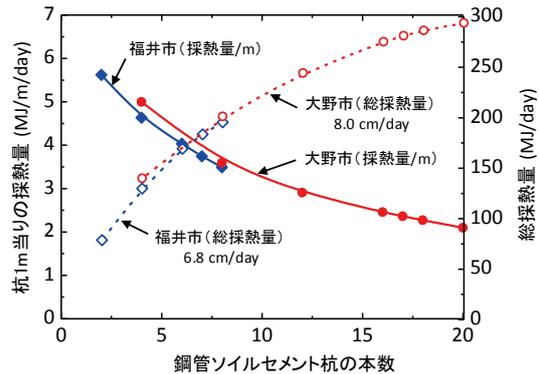


図-3 12時間降雪を想定した採熱シミュレーション結果

図-3にシミュレーション結果の一例を示す。これは、福井市と大野市の冬季気象をモデル化した環境下において、駐車場2台分に相当する25m<sup>2</sup>の融雪パネルを敷設した場合に得られる採熱量を示したものである。ただし、杭の長さは施工実績の多い7mとした。図中、杭本数が増えると杭1m当りの採熱量が低下していることが見てとれるが、これは、所定の融雪エネルギーに対して、杭本数が増加すると1本当りの負荷が小さくなることを示すものである。当然のことながら、システム全体としての総採熱量は、杭本数の増加に伴って増大しているが、杭本数と比例関係にないことが興味深い。なお、融雪状況のモニタリング結果から、積雪が10mmを超えないように融雪するには、福井市で195 MJ/day、大野市で290 MJ/day程度の熱量が必要であり、それを実現するには7mの杭が各々の地域で8本および18本必要となることが判明した。杭の必要本数にこのような大きな差異が見られたのは、両市間の降雪量の違いに加え、大気温度差等の影響が大きく影響したものと考えている。本研究で対象とした鋼管ソイルセメント杭は、福井市内においても、例えば公民館(6m×33本)、動物病院(8m×19本)、個人邸(RC3階建)(6m×20本)等、多くの施工実績がある。これらの杭施工条件であれば、公民館と動物病院で4~7台、個人邸で3~5台の融雪が可能となることが判明した。建物規模に応じて必要とされる程度の駐車場の融雪が十分行えることを示す結果といえる。

融雪システムを構築するためには、杭の打設の他、送水管と融雪パネルの敷設が必要となるが、これらはいくつかの企業ですでに実用化されており開発リスクはほとんどない。また、システム稼働には送水ポンプが必要となるが、大きな負担とはならないはずである。今後は、実証実験等を経て早期の実用化を目指していきたい。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

本研究は、本年度からの新規研究であり、現時点では発表論文実績はない。現在、土木・建築系の査読付き論文集投稿に向けて準備中。冰雪研究

大会(日本冰雪学会)(平成25年9月)、寒地技術シンポジウム(平成25年10月)等でも講演発表予定。

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**難揮発性成分の質量分析に向けた基礎研究**

研究代表者： 内村 智博（工学研究科・准教授）

概 要
<p>レーザーイオン化飛行時間型質量分析法は芳香族化合物の高選択的な分析に有効である。通常、本法の測定対象は気体試料であり、溶液試料については加熱などにより気化させる必要がある。しかし、試料の分解やコンタミとして残留するなど問題点も多い。また、溶液試料のイオン化法として電子スプレーイオン化法があるが、多価イオンの発生によるスペクトルの複雑化が問題となる場合がある。</p> <p>溶液の導入・測定が可能なレーザーイオン化飛行時間型質量分析法が確立すれば、熱に弱い成分や難揮発性成分に対し、これまでにない高精度分析が実現できる。本研究では、溶液試料の導入法を検討するとともに、難揮発性成分の分析に向けた基礎研究を実施した。</p>
関連キーワード
レーザーイオン化法、質量分析法、芳香族化合物、溶液

### 研究の背景および目的

レーザーイオン化飛行時間型質量分析法(Laser ionization/time-of-flight mass spectrometry; LI/TOFMS)は芳香族化合物の高選択的な分析に有効である。これまでに、ダイオキシンや農薬、多環芳香族炭化水素など、様々な環境汚染物質の分析が行われている。また研究代表者は、揮発性化合物の高感度分析を目的として、レーザーイオン化飛行時間型質量分析法の試料導入部およびイオン化部の開発などに従事してきた。一例として、新規試料導入法であるオンラインコールド法を考案し、世界最小の試料ガスパルスの実現と2桁の感度向上を達成している。

通常、本法の測定対象は気体であり、溶液試料については加熱などにより気化させる必要がある。しかし、試料の分解やコンタミとして残留するなど問題点も多い。また、溶液試料のイオン化法と

して電子スプレーイオン化法があるが、多価イオンの発生によるスペクトルの複雑化が問題となる場合がある。従って、溶液の導入・測定が可能なレーザーイオン化飛行時間型質量分析法が確立すれば、熱に弱い成分や難揮発性成分に対し、これまでにない高精度分析が達成できる。

前年度までの研究において、微量の溶液試料を導入した場合の真空度の変化や検出に関する基礎的検討を行った。しかし、溶液の導入量が実用レベルに対してかなり少なく、結果的に十分な信号強度が得られていなかった。

そこで本研究では、溶液試料の導入法を検討するとともに、難揮発性成分の分析に向けた基礎研究を実施した。

### 研究の内容および成果

本研究では、溶液試料の連続導入がどの程度可能であるか、難揮発性成分がどの程度イオン化・検出できるか、またその際の問題点についての知見を獲得することを目的に、以下の実験を実施した。

①レーザーイオン化質量分析法における液体試料導入法の開発

本研究で使用した実験装置図を図1に示す。試料導入には、飛行時間型質量分析計に取り付けられている不活性化キャピラリーカラムを使用した。試料導入に関しては、必要に応じて実験条件を種々変更した。イオン化レーザーとして、Nd:YAGレーザーの第四高調波(波長 266 nm、繰り返し周

波数 10 Hz)を用いた。このレーザー光は、焦点距離 200 mm のレンズにより集光した。イオン化さ

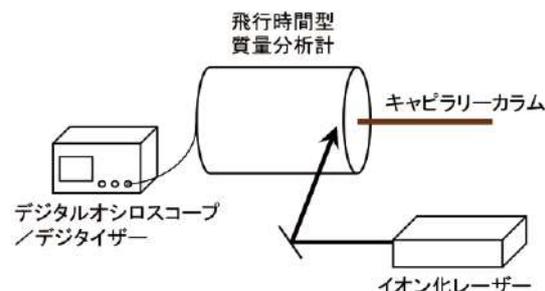


図1 実験装置図

れた分子は2段階加速され、アインツェルレンズ、偏向電極、およびドリフト領域を通過し、2枚組のマイクロチャンネルプレート検出器により検出した。イオン信号は、デジタルオシロスコープ、または高速デジタイザーにより記録した。本研究では、特に試料導入時に想定される諸問題と、その解決法について検討した。一例として、図2のようなピークの信号強度の不安定性を抑制するための実験条件に関する知見を得た。

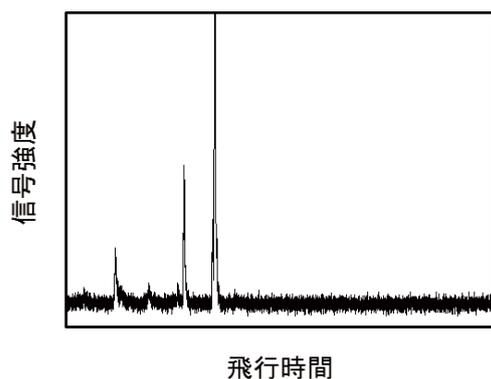


図2 試料Aの質量スペクトル

## ②レーザーイオン化質量分析法による難揮発性成分の測定

主な実験装置は上述①と同じである。本実験では、加熱等による試料導入時の挙動について調査した。試料としてスチレン系試料などを用いた。その後、企業等から提供頂いた難揮発性成分などの分析を試みた(図3)。その結果、幾つかの試料については、分子イオンピークを含む複数のピークを観測することができた。特に、これまでピークが観測されたことが無い成分について初めてピークを確認することができ、本法の有効性が示された。

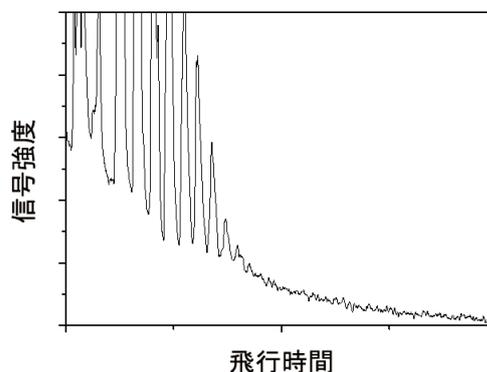


図3 試料Bの質量スペクトル

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「発表論文」

“レーザーイオン化飛行時間型質量分析法による水溶液中芳香族化合物の直接分析”  
徳元吾郎, 佐分浩亮, 宮川しのぶ, 内村智博  
分析化学, 投稿中.

上記の他、2報の原著論文(印刷中1報を含む)がある。また次年度にも論文投稿を予定している。

### 「学会・セミナー発表」

“MSを利用した研究について”

内村智博  
福井大学質量分析計(MS)利用説明会(2012).

“レーザーイオン化質量分析法による迅速・高感度分析”

内村智博  
第18回福井大学出前塾 in 日華化学株式会社(2013).

上記の他、3件の学会発表、1件の依頼講演、1件の依頼発表がある。また次年度にも学会発表、依頼講演を予定している。

### 「特記事項」

本年度、新聞、テレビ、ラジオにて報道された。また本研究の研究内容・成果については、特許出願を予定している。

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

本研究を発展させた研究内容について、現在、科学研究費補助金に申請中である、また次年度以降も競争的資金への申請を行う予定である。

## 福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」 不斉自己触媒型アミノ酸合成法の開発

研究代表者：川崎 常臣（工学研究科・准教授）

概要	
<p>生体を構成する代表的なキラル化合物はアミノ酸であり、如何にしてキラルアミノ酸が生成し、ホモキラリティーに至ったのかという化学進化過程を解明することは極めて興味深い。また、アミノ酸はタンパク質の構成成分および生体内での情報伝達を担う物質として重要であり、医薬品や機能性材料の原料としての有用性も高い。本研究では、アキラルイミンが形成する単結晶中での分子配向（二次元不斉）のみを不斉源として利用した不斉アミノ酸合成法（不斉ストレッカー反応）を見出すことを目的とした。その結果、不斉ストレッカー合成の反応基質となり得るアキラルイミン単結晶を合成することに成功した。さらに、アキラル馬尿酸が形成するキラル結晶を溶媒に懸濁し、攪拌・粉碎することにより、その粉末結晶の鏡像体過剰率が増幅する現象を見出した。</p>	
関連キーワード	不斉の起源、不斉合成、不斉ストレッカー反応、エナンチオトピック面、アミノ酸合成

### 研究の背景および目的

不斉自己触媒反応は、生成物が次の反応の不斉触媒として作用して、触媒と同一構造・同一絶対配置の化合物を与える反応である。キラル化合物が自分自身を生成する触媒として作用する反応であるため、生命の自己複製機能との関連から、L-アミノ酸などの生体関連化合物がホモキラリティーに至った起源を解明する鍵となる化学プロセスである可能性が指摘されている。これまでに不斉自己触媒反応とりわけエナンチオマー過剰率が上昇する反応は、ピリジン化合物およびアルキル金属試薬を用いた1例が報告されている。不斉自

己触媒機構によるアミノ酸の不斉合成法を確立し、L-アミノ酸がホモキラリティーを獲得した反応機構を解明する糸口を与えることを主目的とする。さらに、高効率なアミノ酸製造プロセスの確立を目的の一つとする。生体が利用するアミノ酸がなぜL-アミノ酸に偏ったのか、さらにはどのようにして不斉増幅してホモキラリティーに至ったのかという生体関連化合物の化学進化過程を解明する鍵を与える可能性を含んでおり、不斉合成（有機合成）分野や不斉の起源源解明を目指す研究分野に大きなインパクトを与える意義を持つ。

### 研究の内容および成果

アキラルイミンが単結晶中で配向することにより、エナンチオトピックな結晶表面を形成する基質検討を行った。得られたイミン単結晶の特定の単結晶表面に対してシアン化物イオンを作用する

ことにより、不斉シアン化水素付加反応を行い、エナンチオ選択的に $\alpha$ -アミノニトリルを生成する。さらに、加水分解することによりキラルアミノ酸を合成することを目的とした（図1）。

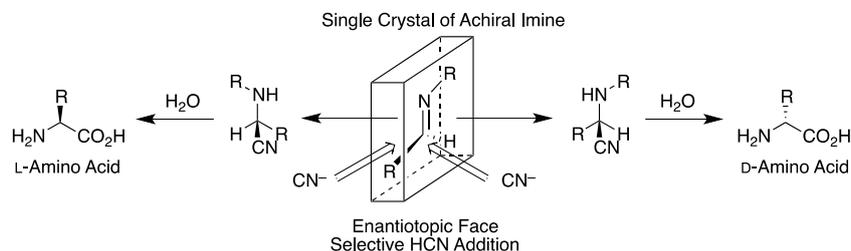


図1. アキラルイミンが形成する単結晶へのエナンチオ選択的シアン化水素付加反応のモデル

まず、ベンズアルデヒドを対応するジメチルアセタールに変換し、*para*-トルエンスルホンアミドと縮合反応を行うことにより、トシルイミン **1** を合成した（図2）。さらに、*para*-アニスアルデヒドとジフェニルホスフィンアミドを四塩化チタン存

在下で反応することにより縮合し、ジフェニルホスフィンイミン **2** を調製した。得られたイミン **1** および **2** をそれぞれ溶媒蒸発法により単結晶化を行った。

続いて、得られたイミンの X 線結晶構造解析を

行ない、結晶中および結晶表面における分子配向の決定を行った。また、得られた単結晶の面指数を決定し、二次元不斉を有するエナンチオトピックな単結晶表面を確定した。

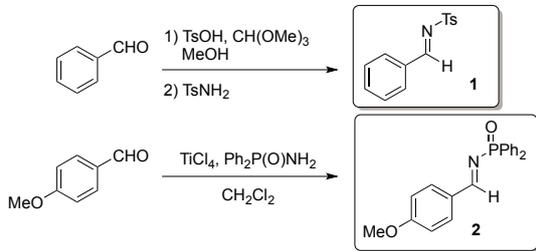


図2. アキラルイミン 1, 2 の合成

まず、トシルイミン 1 の X 線構造を示す(図 3)。結晶は、空間群  $P-1$  に属するアキラルなものであることがわかった。さらに、 $a$  軸および  $b$  軸に垂直な(100)および(010)面に対してイミンは一方のエナンチオトピック面を向けて配向していることが判明した。

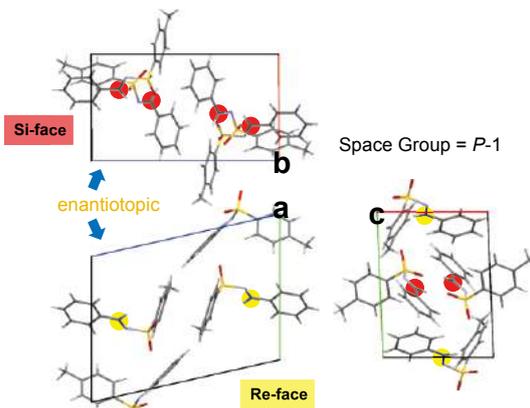


図3. トシルイミン 1 の各軸投影図

また、ホスフィンイミン 2 についても、その X 線結晶構造解析から、分子が二次元配向したエナンチオトピック面を有するアキラル結晶を形成することが判明した(図 4)。

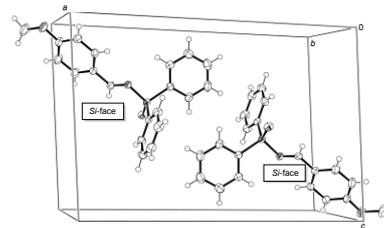
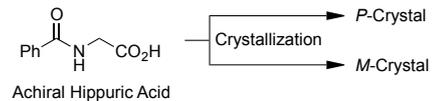


図4. イミン 2 の単結晶中における分子配向

今回得られた単結晶に対して、エナンチオトピック面選択的にシアン化水素を作用し、生成するアミノニトリルの鏡像体過剰率を、キラルカラムを装着した HPLC によって決定する計画である。

一方、アキラル化合物のキラル結晶化は、不斉の起源を考察する上で極めて重要な現象の一つである。 $N$ -ベンゾイルグリシン(馬尿酸)は、アミノ酸であるグリシンの誘導体であり、結晶化により  $P$  および  $M$  体の鏡像結晶を与えることが知られている(図 5)。両鏡像結晶を 20% ee となるよう混合してメタノール懸濁液中で粉砕・攪拌を行うことにより、結晶の鏡像体過剰率が約 80% ee まで向上する不斉増幅現象を見出した。

#### Chiral Crystallization of Achiral Hippuric Acid



#### Amplification of Crystal ee of Hippuric Acid

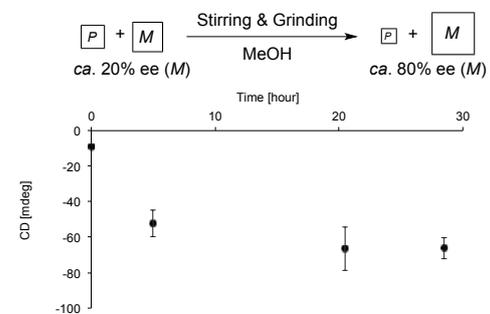


図5. 馬尿酸キラル結晶化および攪拌・粉砕実験

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「研究発表」

平成 25 年度北陸地区有機合成化学若手研究会(平成 25 年 4 月 7 日、富山大学・富山)にて発表予定

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

公益財団法人 第一三共生命科学研究振興財団・平成 24 年度(第 30 回)研究助成・平成 25 年 1 月~平成 26 年 3 月・アキラルイミンの単結晶

中における二次元配向を利用した不斉アミノ酸合成法の開発・代表・採択・200 万円

公益財団法人 長瀬科学技術振興財団・平成 25 年度研究助成・平成 25 年 4 月~平成 26 年 3 月・アキラルイミン結晶の二次元分子配向を利用したエナンチオ選択的アミノ酸合成法の開拓・代表・採択・250 万円

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」

## 環境調和型メタルフリーリビング重合による スマートポリマーの合成

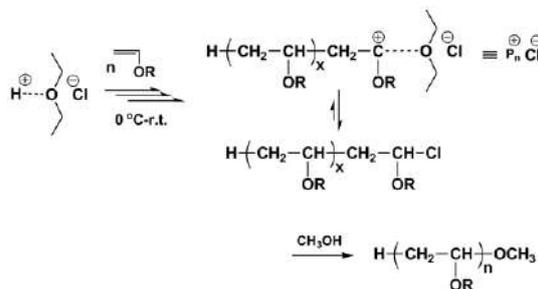
研究代表者： 杉原 伸治（工学研究科・准教授）

概要	
メタルフリーリビングカチオン重合は、通常のリビングカチオン重合とは異なり、金属ルイス酸触媒を用いず、HCl·Et <sub>2</sub> O 開始剤系による環境負荷低負荷型重合法である。本系を見出して以来、種々のポリビニルエーテルの合成を検討してきた。しかし、ポリマーの開始末端は開始剤 HCl 由来であり、得られるポリマー末端の修飾が困難であった。そこで、HCl·Et <sub>2</sub> O を用いたメタルフリーリビングカチオン重合系に可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 機構を導入し、ポリマーの末端基制御を試みた。これにより、使用する HCl 濃度を極力減少させ、より工業的に使用可能な重合系を構築した。得られた重合系はスマートポリマーの合成に有効なリビングカチオン重合系であり、続く RAFT 重合によるラジカル重合性モノマーとのブロック共重合も検討した。	
関連キーワード	リビングカチオン重合, RAFT 重合, メタルフリー, スマートポリマー

### 研究の背景および目的

プラスチックを中心とする日本の高分子産業は、年 1300 万トン（2010 年）にもおよぶ大産業である。しかしその合成には、レアメタルを中心とした金属触媒を使用しているため、資源の問題だけでなく、電子材料として使用する際、ナノレベルで大きな影響を及ぼすことが考えられる。昨今 IT 技術が発展し、デバイスの軽量化が求められる中、このような高分子の金属残渣の影響を排除する必要があり、よりグリーンな高分子合成法へと改善する必要に迫られている。例えば、高感度なスマートポリマーの合成に適したビニルエーテル類のリビングカチオン重合では、カチオン源である開始剤と金属ルイス酸を活性化剤として用いて重合を行う。この際、カチオン種の濃度を下げ、β-脱離反応等の副反応を抑制し、イオン種と共有結合を有するドーマント種との可逆的な平衡を作る必要がある。このようにしてうまく重合が進行した後、使用した金属ルイス酸触媒残渣を除去する操作を行う。この操作は煩雑であり、得られた高分子によって組織体を合成する場合 unnecessary な過程であった。一方、メタルフリーリビング重合の場合、触媒残渣除去行程が不要になるため、組織体形成に有効であることも知られている。<sup>1</sup> 特に、我々が以前に見出した HCl·Et<sub>2</sub>O を用いる方法 (Scheme 1)<sup>2</sup> は、0 °C~室温にて、ビニルエーテルモノマーに、HCl·Et<sub>2</sub>O を加えるだけでカチオン重

Scheme 1. Metal-free living Cationic polymerization of vinyl ethers using HCl·Et<sub>2</sub>O.



合がリビング的に進行する。使用する Et<sub>2</sub>O は、HCl の解離を促し、さらに生長反応中では、ドーマントへ平衡を傾ける添加塩基としての役割を持つ。この重合終了後は、溶媒除去のみでポリマーが得られるため、比較的操作性も簡便である。しかし、ポリマーの開始末端は、必ず開始剤 HCl 由来であり、得られるポリマーの末端修飾が困難であった。また本系はポリマー鎖数分の HCl を用いる方法であり、工業的に使用可能な重合系とするためには、使用する酸濃度を極力低下させる必要があった。これらを解決し、さらにスマートポリマーとして機能化させ、最終的にはナノ組織を得ることを目的として、本研究を行った。

### 研究の内容および成果

ビニルエーテルとしてイソブチルビニルエーテル (IBVE) を用い、そのメタルフリーリビングカチオン重合を行った。0 °C にて、Et<sub>2</sub>O 中、HCl·Et<sub>2</sub>O を添加することで重合を行った。[IBVE]<sub>0</sub> = 0.76 M,

[HCl]<sub>0</sub> = 4 mM では、重合は誘導期なく進行し、約 5 時間で重合率が 100 % となった。Et<sub>2</sub>O の濃度を変化させた（ヘキサンに置き換えた）ところ、[Et<sub>2</sub>O]<sub>0</sub> = 0.96 M 存在下、約 30 分で重合が終了し、

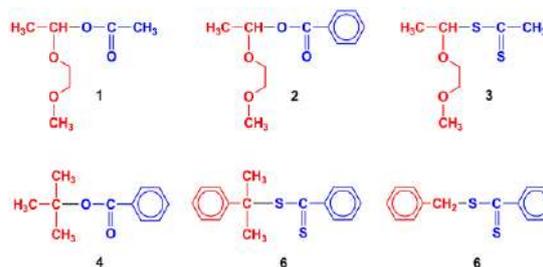
$[\text{Et}_2\text{O}]_0 = 37 \text{ mM}$  のエーテル存在時には、約 1 分で重合が終了した。例えば、 $[\text{Et}_2\text{O}]_0 = 0.96 \text{ M}$  で  $M_n = 17000$ ,  $M_w/M_n = 1.09$  (conv. = 90%, time = 25 min) の PIBVE が Scheme 1 に従って定量的に得られた。

次に、Chart 1 に示す様々なカチオン源を用意し、 $[\text{Et}_2\text{O}]_0 = 0.96 \text{ M}$  存在下、 $\text{HCl} \cdot \text{Et}_2\text{O}$  により重合を行った ( $[\text{HCl}]_0 = 2.8 \text{ mM}$ )。例えば、 $[\mathbf{1}]_0 = 6.0 \text{ mM}$  を用いた場合、 $\mathbf{1}$  に対しポリマー鎖が 1 つできると仮定した計算値とほぼ一致し、分子量分布も狭いものが得られた ( $M_n = 14000$ ,  $M_w/M_n = 1.22$ , conv. = 96 %, time = 16 h)。 $^1\text{H NMR}$  および MALDI-TOF-MAS スペクトルから、開始末端にはほぼ定量的にカチオン源部位が導入されており、停止末端にも通常の  $\text{HCl} \cdot \text{Et}_2\text{O}$  によるメタルフリーリビングカチオン重合の停止末端と異なるアセート基が導入されていた。また、 $[\mathbf{1}]_0 = 6.0 \text{ mM}$  の場合、 $\text{HCl}$  濃度が  $2.5 \sim 6.0 \text{ mM}$  の範囲で、最終的に得られる  $M_n$  がほぼ同じ値 ( $M_n \sim 14100$ ) になったため、 $\text{HCl}$  が重合開始に関与するものの、 $[\mathbf{1}]_0$  以下の極少量でよく、実際の開始末端はカチオン源  $\mathbf{1}$  であることがわかった。つまり、Scheme 1 の  $\text{HCl}$  による開始が一部起こった後に、 $\mathbf{1}$  のカチオン源が可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 剤となり、可逆的に生長炭素カチオンを生成したと示唆される (Scheme 2)。このような RAFT 機構によるメタルフリーリビングカチオン重合の結果は、 $\mathbf{1} \sim \mathbf{3}$  のカチオン源で達成された。一方、 $\mathbf{4} \sim \mathbf{6}$  ではうまく重合が進行しなかった。

次に、本重合プロセスを用いて、スマートポリマーである温度応答性ポリマーの前駆体 2-メトキシエチルビニルエーテルを重合したところ、IBVE と同様に重合が進行した。また、ジチオエステル末端を導入した  $\mathbf{3}$  を用い、PIBVE をマクロ連鎖移動剤 (Macro-CTA) を合成した後に、極性変換法によるアクリル酸エチル (EA) やスチレン (St) のブロック共重合を検討した。例えば、IBVE119 を用いた場合、 $\text{IBVE}_{119}\text{-}b\text{-EA}_{198}$  ( $M_n = 22000$ ,  $M_w/M_n = 2.14$ )  $\text{IBVE}_{119}\text{-}b\text{-St}_{165}$  ( $M_n = 17000$ ,  $M_w/M_n = 1.53$ ) を得た。

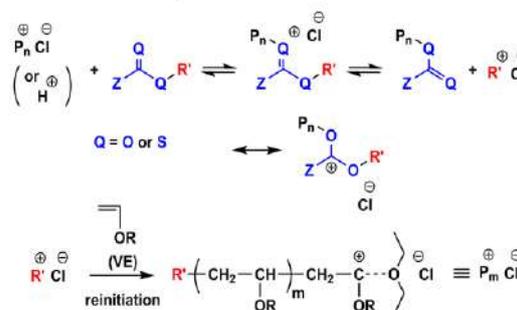
<sup>1</sup> S. Sugihara et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 15707-15713 (2011). <sup>2</sup> S. Sugihara et al., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **46**, 1913-1918 (2008).

Chart 1.  $\text{R}^+\text{QCQZ}$  cationogens (Q = O or S)

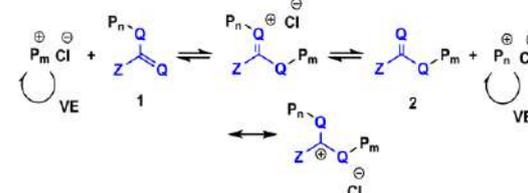


Scheme 2. Metal-free living cationic vinyl polymerization using  $\text{HCl} \cdot \text{Et}_2\text{O}$  with RAFT process (initiation for  $\text{P}_n^+\text{Cl}^-$ : see Scheme 1).

Addition-carbocation fragmentation



Equilibration



Overall reaction



本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文」

<sup>1</sup> S. Sugihara, K. Iwata, S. Miura, A. H. Ma'Radzi, Y. Maeda, *Polymer* **54**, 1043-1052 (2012)

<sup>2</sup> 杉原 伸治, *高分子論文集*, **7**, 567-579 (2012) 等

「主な学会発表」

<sup>3</sup> 杉原 伸治, 古根川 直人, 若山 友理, 前田 寧, “ $\text{HCl} \cdot \text{Et}_2\text{O}$  によるビニルエーテルのメタルフリーリビングカチオン重合: RAFT 機構の導入”, 第 60 回高分子討論会 (口頭) 等

「特許出願」

<sup>4</sup> 杉原 伸治, 特願 2012-191625

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

<sup>5</sup> 日本学術振興会・科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究 (2011.4~2013.3) “非ラジカル重合性モノマーのリビングラジカル重合” (代表)

<sup>6</sup> 科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業・さがし (2012.10~2015.3) “ナノ分子材料を目指した自己組織化高分子の精密直接水系重合” (代表)

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**ニューロン・グリア細胞活動の同時イメージングによる  
 痛覚過敏メカニズムの解明**

研究代表者：池田 弘（工学研究科・教授）

<b>概要</b>	近年、中枢神経系での情報伝達におけるグリア細胞の役割が注目されている。本研究では、痛覚情報処理におけるグリア細胞の役割について、ニューロンの活動およびグリア細胞の活動をイメージングすることによって、明らかにすることを目的とした。Sulforhodamine101(SR101)とFluo-4/AMを同時に投与してアストロサイトの同定とその細胞でのカルシウムイオンの定量を行った。また、プリン受容体の作動薬であるATPおよび代謝型グルタミン酸受容体の作動薬であるDHPGを投与して脊髄後角でのカルシウムイオン動態を解析した。実験の結果、コントロールマウスに比べ、末梢組織に炎症を起こし、痛覚過敏となっているマウスでは、ATPに対してカルシウム応答を示す細胞がSR101陽性細胞で有意に増加していた。また、カルシウム応答を示した細胞の数は、ATPの受容体のうちのP2X受容体の阻害薬であるBrilliant Blue Gによって有意に減少した。
<b>関連キーワード</b>	カルシウムイメージング、膜電位イメージング、神経可塑性、アストログリア

### 研究の背景および目的

中枢神経系を構成する細胞の1つであるグリア細胞は、古くからニューロンの生存と細胞外空間の環境を整えるなどのニューロンのサポート的な役割を持っており、神経情報処理には、積極的に関わっていないとされてきた。しかし、近年、グリア細胞がニューロンと同様に神経伝達物質を放出する機能を持っていること、受容体が膜上に存在することが明らかとなり、記憶や学習の研究を中心に、神経情報処理に積極的に関わっていることがわかってきた。本研究は、痛覚過敏と呼ばれる現象におけるグリア細胞の役割を明確にすることを目的とした。

痛覚過敏とは、組織の炎症や、神経の損傷によって起きる痛みで、灼熱痛や電撃痛などの激しい痛みを感じたり、触っただけでも痛みを感じる現象である。痛覚過敏の機構は不明であるが、近年、脊髄後角の神経回路の可塑的变化が関与していることが示唆されている。具体的には、ニューロン間のシナプスの伝達効率が上がり、それによって

ニューロンが過剰興奮する状態になると考えられている。また、このような変化は中枢性感作と呼ばれている。一方で、痛覚過敏時には、脊髄後角におけるアストログリアの増殖が起きることや、アストログリアの代謝抑制剤を脊髄に注入することによって痛覚過敏が緩和されることなどが報告されており、痛覚過敏におけるグリア細胞の関与が示唆されている。

しかし、これらの報告は、グリア細胞の活動を直接計測したものではないため、どのような機序で、グリア細胞が痛覚過敏に関与しているのかは明らかではない。また、中枢性感作に対して、どのように関わっているのかについても明らかではない。そこで、本研究では、グリア細胞の活動をイメージングするためのシステムを構築すること、構築したシステムで正常マウスと痛覚過敏マウスのアストログリアの活動を比較すること、中枢性感作に関与しているのかを明らかにすることを目的とした。

### 研究の内容および成果

実験には脊髄スライス標本を用い、膜電位感受性色素、カルシウム感受性色素、およびグリア細胞を選択的に染色する染料で染色した。膜電位感受性色素は、細胞膜内の電位差の変化に反応する。神経細胞の活動は、電位変化によって他の細胞へと伝えられることが知られており、一方、グリア細胞の電位変化は神経細胞の電位変化に比べて非常に僅かであることが知られており、この染色液によって神経細胞の活動が計測できる。カルシウム感受性色素は、細胞内のカルシウムイオンの濃度上昇をイメージングするために用いた。カルシ

ウムイオンの濃度上昇は、神経細胞、グリア細胞のいずれの細胞にも起きると考えられるが、その細胞がグリア細胞を選択的に染色する色素で染まっているか否かで神経細胞とグリア細胞を識別することが可能となる。sulforhodamine 101(SR101)は、細胞が生きた状態でグリア細胞のみを染めることが可能であることが報告されているため、本研究でもSR101で染色することによってアストログリアを識別した。また、プリン受容体の作動薬であるATPおよび代謝型グルタミン酸受容体の作動薬であるDHPGを投与して脊髄後角でのカルシ

ムイオン動態を解析した。実験の結果、SR101 で標識された細胞は、持続時間の長いカルシウムシグナルを示し、SR101 で標識されなかった細胞は、持続時間の短いスパイク状のシグナルを数回示すという特徴が見られた(図1, 図2)。

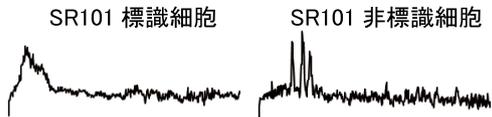


図1. カルシウムシグナルの例

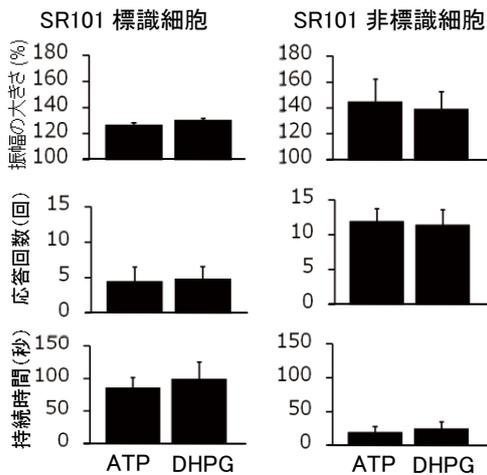


図2. カルシウムシグナルの解析

また、コントロールマウスに比べ、末梢組織に炎症を起こしたマウスでは、ATP に対してカルシウムシグナルを示す細胞が SR101 陽性細胞で有意に増加していた(図3)。

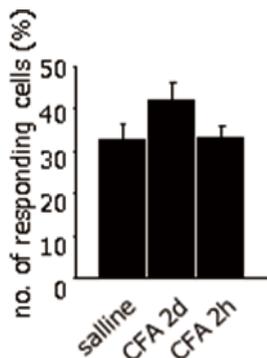


図3. SR101 標識細胞のうち ATP に反応した細胞数の割合

しかし、個々の細胞のカルシウムシグナルの振幅の大きさ、持続時間の長さについては変化が見られなかった。SR101 非標識細胞のカルシウムシグナルについては、振幅の大きさ、持続時間の長さおよび反応を示した細胞の数のいずれも差は見られなかった。また、カルシウムシグナルを示した細胞の数は、ATP の受容体のうちの P2X<sub>7</sub> 受容体の阻害薬である Brilliant Blue G によって有意に減少したが、その他の ATP 受容体の阻害薬である PPADS では変化が見られなかった(図4)。

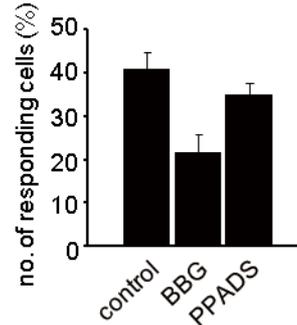


図4. ATP 受容体阻害薬下での ATP に反応した細胞数の割合

次に、感作にこのようなアストログリアの変化が関与しているかを調べた。実験の結果、膜電位イメージングによって計測される神経興奮の遅い成分が、正常マウスに比べて、痛覚過敏マウスで増大していた(図5)。また、痛覚過敏マウスの神経興奮の遅い成分は Brilliant Blue G によって、49±15%まで減少した(図5)。

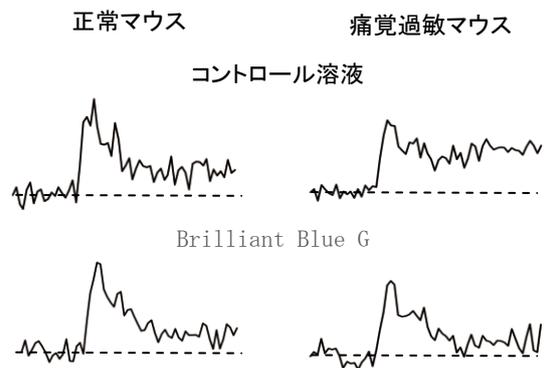


図5. 正常マウスと痛覚過敏マウスの神経興奮

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」  
学術論文

Ikeda et al. Mol Pain (2012)  
Omata et al. Neurosci Lett (2012)  
Ikeda et al. Pain (under review)

Morita et al. Neuroreport (under review)  
学会発表

池田他. 神経科学学会 2012 (他3件)  
「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」  
科研費・若手研究 A, 挑戦的萌芽研究

## 福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」 ダークマターアクシオンの探索研究

研究代表者： 小川 泉（工学研究科・准教授）

共同研究者： 玉川 洋一（工学研究科・教授）、松木 征史（京都大学・客員研究員）

概 要	
宇宙のダークマターの正体はいまだ明らかではない。その有力な候補であるアクシオンの探索実験は、強磁場中に設置された共振空洞中でプリマコフ効果により、地球近傍に存在しているアクシオンをマイクロ波光子に転換し、その転換光子を検出するという手法で行うことができる。本研究（CARRACK）は、マイクロ波光子検出器として、リドベルグ原子による単光子検出器を使用し、かつ希釈冷凍機による冷却で黒体輻射光子を抑えることで、高いS/N比で検出実験を行うことを可能にするものである。本年度はCARRACK実験をより高感度化すべく、1) 実験装置、特にレーザー系の改良、2) リドベルグ原子パンチ化ビーム法の開発、3) 残留磁場・電場中でのリドベルグ原子のエネルギー準位の振る舞いについての理論的計算を行った。	
関連キーワード	ダークマター、アクシオン、リドベルグ原子、レーザー、マイクロ波

### 研究の背景および目的

現代宇宙物理学における重要な未解決問題の一つとして暗黒物質（dark matter; DM）をあげることができる。そのDMを構成する素粒子の候補と考えられているアクシオン（axion）は、もともとは強い相互作用におけるCPの破れを救うために導入されたPQ対称性の自発的破れ（破れのスケール $f_a$ ）によって、存在を予言された粒子である。これまでの探索実験では発見されておらず（実験・観測からの制限; $f_a > 10^9$  GeV）、その存在の検証は重要である。なお、その質量（ $m_a$ ）は未知であるが、様々な実験・観測から $10^{-6}$  eV  $< m_a < 10^{-3}$  eVの範囲に制限されており、この質量領域にわたって探索実験を行う必要がある。

DM axionを検出するための最も有力だと考えられている方法は、強磁場中に設置された共振空洞中で、プリマコフ効果により、地球近傍に存在

しているDMアクシオンをマイクロ波光子に転換し、その転換光子を検出するものである。このマイクロ波光子の強度は非常に微弱（ $P \sim 10^{-(22-23)}$  W）なものであるため、低雑音・高感度検出器が必要である。また探索する $m_a$ に合わせて共振空洞・検出器の周波数を調整する必要がある。本研究はマイクロ波の検出器として、リドベルグ原子による単光子検出器を使用し、かつ希釈冷凍機により黒体輻射光子を抑えることで、高いS/N比で検出実験を行うことを可能にするものである。このaxion探索装置を用いてターゲット $m_a = 10^{-5}$  eV付近5%の範囲で探索実験を行う。

この研究により、DMアクシオンが発見されれば、宇宙をマイクロ（素粒子・原子核）・マクロ（宇宙物理）双方の観点から統一的に理解することが可能になり、新たな発展が期待できる。

### 研究の内容および成果

前述のようにaxion探索実験装置では、微弱なマイクロ波に対する感度が重要なパラメータである。現在試運転中のaxion探索実験装置CARRACKでは、最終的な探索感度は共振空洞中の残留浮遊電場に依存している。高リドベルグ状態では、そのエネルギー準位は、わずかな浮遊電場・磁場にも影響を受け、結果として状態の混合が起こり、それが雑音源となってしまう。本年度はこの雑音源を低減しより高い感度を得るため、主として、以下の3点についての開発・研究を行った。

1. 京都大学低温物質科学研究センターに設置されたCARRACKの主としてリドベルグ原子ビーム系の改良・整備。
2. より高感度な測定を目指したリドベルグ原子

パンチ化ビーム法の開発。

3. 残留（浮遊）磁場・電場中でのリドベルグ原子のエネルギー準位の振る舞いについての理論的計算。

以下、順番に詳細を記す。

1) について、リドベルグ状態に励起する原子ビームとしてカリウム（K）原子を採用することにした。これまで励起の容易さなどいくつかの理由からルビジウム原子を使用してきたが、浮遊電場の影響を抑えるべく、より外場の影響を受けにくいKに変更することにした。それに伴って励起に必要な光子の波長が変わるため、レーザー系（2段励起）の更新を行った。初段励起用レーザーは整備済みであるため、本年度は2段目のレーザーの整備を行った。2段目レーザーには、探索実験で求められ

る特定のリドベルグ準位に安定して励起する必要性から、十分狭い線幅と安定的な発振が必要である。また axion はその質量が未知であるため、ターゲット質量を徐々に変化させながら探索していく必要がある。そのため、ターゲット質量に合わせてリドベルグ準位の主量子数も変化させ、従って発振周波数も変えていく。そこで、外部共振器型半導体レーザー (ECDL) を整備し、また PDH 法により外部の Fabry-Perot 共振器にロックさせるシステムとした。動作試験を行い、必要な性能を満たしていることを確認した。

2 については、空洞中の浮遊電場を人為的に補正することを目指している。すなわち、リドベルグ原子をバンチ化して空間的・時間的に広がり小さな集団にして局所化し、時間的に変化する外部電場をかけることにより電場を消去・補正する。この目的のため、レーザー冷却・加速系を用いたリドベルグ原子バンチ化ビーム法 (図 1) を考案した。まず、レーザー冷却 (横方向成分)・加速 (縦方向成分) により、速度広がり小さく輝度の大きな、(基底状態にある) アルカリ原子群を生成する。次に、この原子群を速度選別することにより、時間的・空間的にバンチ化された原子群を空洞内に導入する。空洞直前でレーザー励起によりリドベルグ原子を生成し、バンチ化したリドベルグ原

子群を 1 群だけ空洞内に存在するように配置する。この原子群の進行に応じて、外部より電場をかけて浮遊電場を打ち消すようにコントロールする。1 個のバンチ化リドベルグ原子群に存在する原子数は  $10^3$  から  $10^5$  個程度である。空洞中でのリドベルグ原子と空洞電磁場モードとの相互作用の大きさは、原子数の平方根に比例する。従って、空洞内では、リドベルグ原子が通過する時間内に光子を吸収して上位の準位に励起される確率が、リドベルグ原子数に応じて増加する。リドベルグ原子数を増減することにより、吸収確率を制御することが出来、検出効率の最適化が可能である。この方法に基づき、理論計算とシミュレーションを行い、有効性を確認した。この結果は論文にまとめるべく、投稿準備中である。またこれを実験的にも検証すべく、テスト装置の設計を開始した。

3 について、高励起リドベルグ状態におけるエネルギー準位の浮遊電場・磁場への依存性をより深く理解すべく、計算コードの開発を行っている。これまで電場・磁場個別の影響についての計算を行ってきたが、これを電場・磁場双方の影響を同時に受けた場合について正しく評価できるように計算プログラムの開発を進めている。

以上の開発・研究により、より高感度な axion 探索実験が可能になることが期待される。

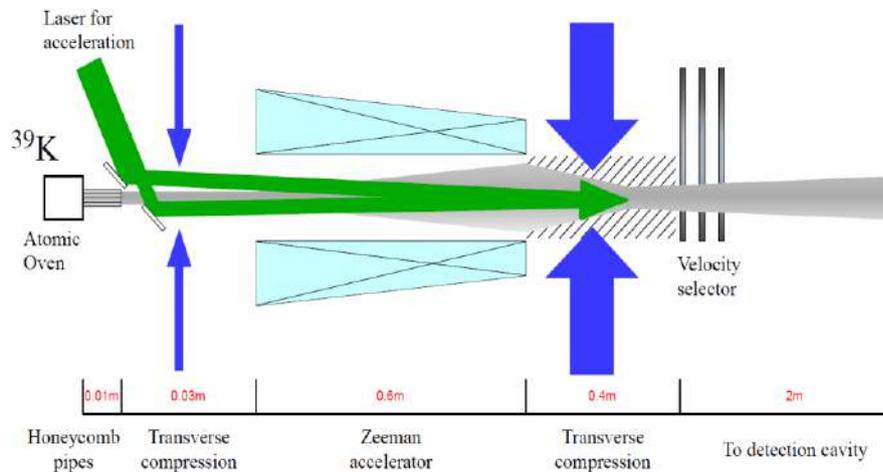


図 1. リドベルグ原子バンチ化ビーム法の概念図

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

M. Saeed, K. Imai, S. Matsuki, I. Ogawa, A. Sawada and Y. Takahashi, “A bunched atomic-beam with laser compression to improve the detection sensitivity in the Rydberg-atom dark-matter axion detector”, 投稿準備中。

上記以外にも学会発表を予定している。

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

助成組織：公益社団法人 松尾学術振興財団  
助成制度・種目：松尾学術研究助成  
期間：平成 24 年度  
研究課題：「レーザー加速バンチ化リドベルグ原子ビームと基礎物理への応用」  
代表/分担：研究代表者  
採否：採択  
採択金額：320 万円

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**腐食環境で疲労負荷を受けるステンレス鋼の  
 腐食速度と負荷速度の関係**

研究代表者： 桑水流 理（工学研究科・准教授）

<b>概 要</b>
<p>ステンレス鋼は耐食性に優れており、原子炉の炉内構造物から一般家庭用品まで、広く使用されている。強い耐食性の要因は材料表面の酸化皮膜（不動態皮膜）である。材料に応力が負荷された場合、酸化皮膜が損傷し、新生面と酸化皮膜の間でガルバニック腐食が発生する。本研究では、腐食速度に対する応力の影響を定量的に予測することを目的に、電気化学計測装置を組み込んだ腐食疲労試験システムを開発した。任意波形の応力下で、試験片のひずみ、腐食電位、腐食電流が計測可能である。また、腐食面の CCD その場観察も可能である。腐食環境に NaCl 水溶液を使用し、SUS304 オーステナイト系ステンレス鋼の応力下腐食特性試験を実施した。一定応力下の分極曲線に対する応力の影響と、正弦波応力下の腐食電流波形を明らかにした。</p>
<p><b>関連キーワード</b> 腐食、疲労、環境強度、ステンレス鋼、分極、酸化皮膜</p>

**研究の背景および目的**

ステンレス鋼は耐食性、耐熱性、加工性、リサイクル性などの利点により、原子炉から一般家庭用品まで様々な製品で使われている。特に耐食性と高温強度に優れたオーステナイト系ステンレス鋼は、軽水炉の炉内構造物でも使われているが、溶接熱による鋭敏化や残留応力、溶存酸素の影響などにより、応力腐食割れや腐食疲労を起こし、多数の損傷事例が報告されている。

ステンレス鋼の腐食特性データは多数存在するが、腐食セル内での材料試験の困難さから、応力の影響を考慮したデータは少ない。ステンレス鋼の耐食性は強い不動態皮膜（酸化皮膜）に由来するが、酸化皮膜は硬く脆いため、応力を負荷すると母材より先に破損する。それにより新生面と酸化皮膜でガルバニック腐食を生じ、腐食が促進される。一方、疲労応力下で腐食が進行すれば、腐食ピットからき裂が発生し、破壊に至る。

本研究の最終目的は、腐食疲労等の応力と腐食が連成する破壊挙動を予測するシミュレーション技術の開発である。それにより、腐食と破壊の挙動評価を可能とし、高経年化プラントあるいは廃炉プラントの安全性評価の高度化に貢献する。また一般構造物においても、省資源・省エネルギー設計や効率的リサイクルが可能となる。

本研究では、初期開発段階として、腐食速度を計測するための電気化学測定装置を組み込んだ、腐食疲労試験システムを開発する。開発したシステムの検証例として、NaCl 水溶液中で一定引張応力を受ける SUS304 オーステナイト系ステンレス鋼の分極曲線を計測し、定応力下の腐食特性（電気化学特性）を評価する。更に負荷応力を変化させ、分極曲線に対する応力の影響を評価する。また、疲労負荷を与えた場合の腐食電流計測も行い、電気化学計測システムの妥当性を検証する。

**研究の内容および成果**

既存の油圧疲労試験機を利用し、そこに設置可能な腐食環境槽を開発した。試験装置の概略を図1に、試験中の腐食環境槽の様子を図2に示す。環境槽は、外から試験片のその場観察ができるようにアクリル製とし、下側の治具で固定する。上側の治具と環境槽は締結しない。水環境を一定に保つため、環境槽の体積と比べて十分大きい容積の電解質溶液を、ポンプにより循環させる。

図3に示す厚さ2mmの平板試験片を上下の治具に固定し、環境槽内で引張負荷を与える。圧縮荷重は負荷できない。試験片は鏡面研磨した後、片面にひずみゲージとリード線を貼付し、反対面の中央部に2mm×2mmの電極面を設け、それ以外は全てエポキシ樹脂によりコーティングした。電

極面を CCD 顕微鏡により観察できるようになっているが、今回は電気化学特性を計測するだけなので、CCD 顕微鏡は使用しない。

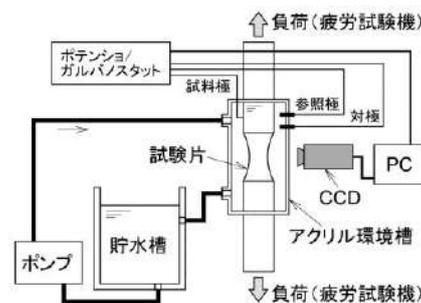


図1 腐食疲労試験電気化学計測システム



図2 腐食環境槽

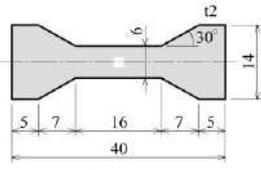


図3 腐食引張試験片

電気化学測定を行うため、参照極と対極を環境槽に挿入し、試験片にはリード線を取り付け、三電極法により電位と電流を計測する。計測にはポテンショ／ガルバナスタット（東陽テクニカ VersaSTAT3）を使用する。ただし、対極は白金、参照極は銀／塩化銀である。参照極はルギン管に入れて使用する。

試験片は SUS304 オーステナイト系ステンレス鋼、環境水は 1%NaCl 水溶液とし、一定応力下の分極曲線測定と、正弦波応力下の電位・電流計測を行った。一定応力の条件は、0、30、60、90 MPa の4通りで測定し、分極曲線測定は掃引速度 1 mV/s の動電位法で行った。正弦波応力の条件は、応力比 0.1、最大応力 150 MPa、加振周波数 0.1 Hz とし、サンプリング周期 0.1 s で、荷重、チャック変位、ひずみ、電位、電流を計測した。

一定応力試験から得られた分極曲線を図 4 に示す。電流は電流密度に換算し、電位は標準水素電極電位に換算してある。測定は各応力で 3 回ずつ行い、自然電位（電流が 0 A になる電位）の平均値を求めた。3 回中、最も中間的な曲線を代表曲線とし、その自然電位が平均値になるように、電位をシフトさせたものが図 4 である。応力の上昇とともに、自然電位は上昇する傾向を示したが、その変化は微小である。一方、高電流側で見ると、アノード反応（自然電位より上側）でも、カソード反応（自然電位より下側）でも、応力の上昇に伴い、電流密度が増加した。よって、応力の上昇により腐食反応が活性化するとと言える。

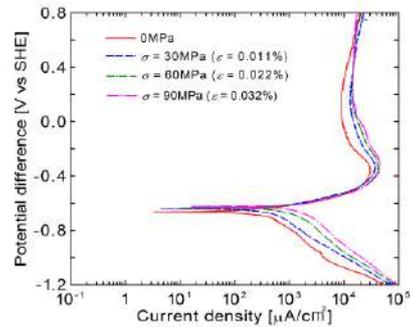


図4 SUS304 の分極曲線

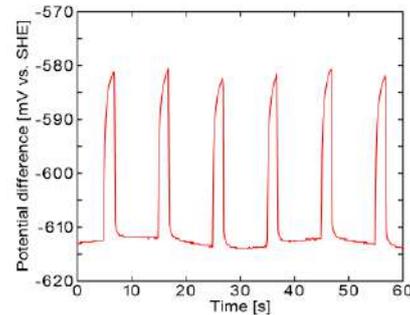


図5 正弦波応力下の腐食電位の変化

正弦波応力に対する腐食電位の変化を図 5 に示す。応力とひずみは正弦波であったのに対して、腐食電位はステップ状の波形を示し、応力がある一定値を超えると、腐食電位が急激に上昇し、応力が負荷から除荷に転じた瞬間に、元の自然電位に戻っている。つまり、応力あるいはひずみがある限界値に達すると、酸化皮膜が損傷あるいは原子間距離の変化により、表面の電気化学状態（電場）が変化するため、腐食電位が変化したと思われる。ただし、腐食電流はほとんど流れておらず、大きな腐食には至らなかった。実際の腐食には時間を要するので、更に長時間の計測を行い、疲労下の腐食挙動を調べる必要がある。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

- 1) 渡邊究, 高橋一将, 桑水流理, 応力の影響を考慮した腐食環境中におけるステンレス鋼の電気化学特性評価, 日本機械学会北陸信越支部第 50 期総会・講演会講演論文集 (2013), GS08904.
- 2) 渡邊究, 桑水流理, 半谷禎彦, 宇都宮登雄, 北原総一郎, アルミニウム合金ダイカストの電気化学特性に対する引張の影響, 日本鑄造工学会第 162 回全国講演大会 (2013), 発表予定.

### 「特記事項」

特になし。

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 1) 科研費・若手研究(B)・H24～H25・腐食と疲労

- の連成破壊に対するマルチフィジックス計測システムの開発・代表・採択・4,550,000 円.
- 2) 科研費・基盤研究(S)・H24～H28・リバーズ 4D 材料エンジニアリングによる材料開発プロセス革新・分担・採択・22,050,000 円 (予定).
- 3) 日本アルミニウム協会・平成 23 年度アルミニウム研究助成・H23～H24・Al 合金ダイカストの引け巣と組織を考慮した疲労破壊メカニズムの解明・代表・採択・800,000 円.
- 4) 科研費・基盤研究(B)・H26～H28・応力腐食割れの 4D 画像計測と電気化学・力学計測システムの開発・代表・申請予定・20,000,000 円.

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**チェレンコフ位相整合と超集束効果を用いたテラヘルツ波の高効率  
 検出の研究**

研究代表者： 谷 正彦（遠赤外領域開発研究センター・教授）

共同研究者： 山本 晃司（遠赤外領域開発研究センター・准教授）

<b>概 要</b>	テラヘルツ(THz)波の非破壊検査等への産業応用の本格的な実用化のためには、THz 波の発生効率と検出感度をさらに改善することが求められている。本課題では非線形光学結晶中のチェレンコフ位相整合と金属 V 溝構造におけるテラヘルツ(THz)波の超集束効果を組み合わせ、電気光学 (EO) 効果を用いた THz 波の高効率検出の研究を行う。チェレンコフ位相整合に用いる非線形光学結晶 (LiNbO <sub>3</sub> ) に光導波路構造を導入し、さらに金属導波路における THz 波の超集束効果を用いることで約 20 倍の EO サンプリグ検出感度の向上を達成した。本手法は用いるレーザー光の波長に依存せず適用できるので、通信波長帯の 1.55 $\mu$ m のフェムト秒ファイバーレーザーを用いることができる。このため、安価な通信波長帯のレーザー光源を用い、光源と素子間を光ファイバーで結合することが可能で、小型、安価、堅牢な THz 波分光・計測システムを実現することを目指す。
<b>関連キーワード</b>	テラヘルツ波、電気光学サンプリグ、金属プラズモン、金属 V 溝構造、超集束効果

### 研究の背景および目的

テラヘルツ(THz)波は電波と光の中間にあり、これまで未開拓な電磁波とされてきたが、その物質透過特性を利用して、非破壊・非接触で物質内部の状態を探索したり、テラヘルツ領域特有の分子や結晶の吸収スペクトルを利用して物質の分析、判別を行うことができるため、薬の錠剤の非破壊検査、郵便物における危険物質、違法薬物の探知など、品質管理や安全管理等への応用の期待が高まっている。一方で、その本格的な実用化のためには、THz 波の発生効率と検出感度をさらに改善することが求められている。

本課題では非線形光学結晶中のチェレンコフ位相整合と金属 V 溝構造におけるテラヘルツ(THz)波の超集束効果を組み合わせ、THz 波の高効率検出の研究を行う。チェレンコフ位相整合は近年、高強度の THz 波を発生する手法として注目を浴びており、申請者らのグループでは、発生のみでなく、検出にも適用することで、最近高効率な THz 波の電気光学 (EO) サンプリグに成功している。また、一方で金属 V 溝構造を用いて THz 波を波長よりもずっと小さい数 $\mu$ m の領域に効率よく集束(超集束)させる方法を開発している。超集束により、THz 波の電場は数十倍に増強することが可能である。本研究の目的はこの2つの手法、すなわちチェレンコフ位相整合と THz 波の超集束による電場

増強効果を同時に用いることで、高効率な THz 波検出を実現することである。

これまで THz 波の光源開発はさまざまに行われているが、検出器を高感度化する研究はあまり行われていない。しかし、計測システムにおいては必ず光源と検出器は対になって用いられるので、検出器を高感度化することは、光源の強度を増大させるに等しい。例えば検出器感度を 10 倍にすることは光源の強度を 10 倍にすることに等しい。また、感度が 10 倍になると、同じ信号対雑音比を得るために必要な計測時間は 1/100 に低減することができる(信号対雑音比はランダムノイズが支配的な場合、計測時間の自乗に比例するため)。

本研究課題では、チェレンコフ位相整合に用いる非線形光学結晶に光導波路構造を導入すること、及び超集束効果による THz 波の電場増強で、約 2 桁の EO サンプリグ検出感度の向上を目指した。本手法は用いるレーザー光の波長に依存せず適用できるので、通信波長帯の 1.55 $\mu$ m のフェムト秒ファイバーレーザーを用いることができる。このため、安価な通信波長帯のレーザー光源を用い、光源と素子間を光ファイバーで結合することが可能で、小型、安価、堅牢な THz 波分光・計測システムを実現することができる。

### 研究の内容および成果

THz 波とサンプリグレーザー光をチェレンコフ位相整合角で交差させ、疑似的な位相整合を得るチェレンコフ位相整合 EO サンプリグの手法を確立した。これにより今まで大きな非線形光学係数を持ちながら THz 帯と光学領域の屈折率差が

大きいために利用できなかった LiNbO<sub>3</sub> (LN) 結晶を用いた THz 波の EO サンプリグが可能になった。このチェレンコフ位相整合 EO サンプリグの感度を、金属 V 溝構造を用いて THz 波を、回折限界を超えてサブ波長領域に超集束させ、超集

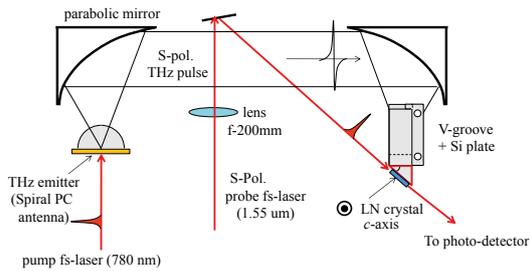


図1. THz波のEOサンプリング実験装置の模式図

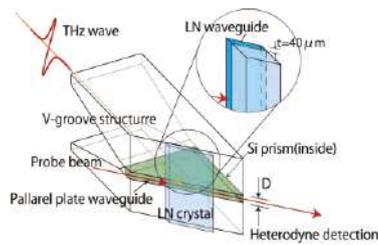


図2. 金属V溝構造とチェレンコフ位相整合EOサンプリング素子の模式図

束による電場増強効果を利用して、飛躍的に高めることに成功した。

図1に用いたTHz波のEOサンプリング実験装置の模式図を示す。図2に金属V溝構造とチェレンコフ位相整合EOサンプリング素子の模式図を示す。金属V溝構造によりTHz波を金属平行平板導波路に効率良く導波させることができる。平

行平板導波路に厚さ0.3mmのSiプリズムプレートを挿入し、平行平板導波路の終端に厚さ40μmのLN結晶スラブ型光導波路を配置することで約12倍の感度増強を得た(図3の1点鎖線の信号波形)。さらに、平行平板導波路に挿入するSiプリズムプレート厚さを0.1mmに薄くすることで約20倍の感度増強を達成した(図3の実線で示す大きな信号波形)。目標とした100倍の感度増強に達しなかったのは、LN光導波路が思ったほど感度増強に寄与しなかったこと、加工技術の問題でSiプリズムプレートの厚さを0.1mm以下にできなかったことがあげられる。現在、40μm幅のものを準備しており、さらなる感度向上を目指す。

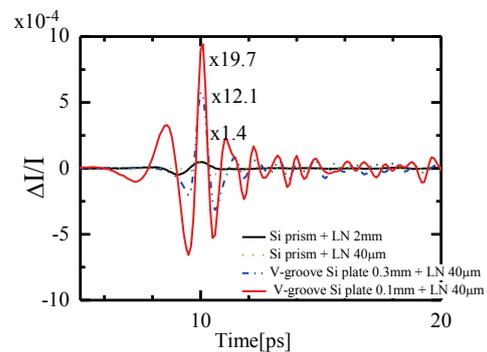


図3. 金属V溝構造を用いた場合のTHz波のEOサンプリング信号波形

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

1. M. Tani, K. Yamamoto, 他7名: “Photoconductive emission and detection of terahertz pulsed radiation using semiconductors and semiconductor devices,” In special issue of *International Journal of Infrared and Millimeter Waves*, Vol.33, No.4, pp. 393-404 (2012). (査読有)
2. M. Tani, M. Hibi, K. Yamamoto, 他4名: “Low-frequency Coherent Raman Spectroscopy Using Spectral-focusing of Chirped Laser Pulses,” *Vibrational Spectroscopy*, Chapter 7, pp.153-168 (2012 from InTech). (査読有)
3. 谷正彦, バクノフ・マイケル, 山本晃司, 他3名: 「ヘテロダイン電気光学サンプリングによるテラヘルツパルス波の検出」, 電気学会論文誌A部門誌, 2012年9月号(Vol.132, No.9), pp. 727-733, 査読有)

他6件, 投稿中1件, 国際会議発表22件, 国内会議発表27件, 著書(3名による共著)1件

### 「特記事項」

本研究課題に関係して下記の特許を出願した。  
発明の名称: 電磁波検出方法及び電磁波検出装置

発明者: 谷正彦, 栗原一嘉, 山本晃司, 桑島史欣  
特許出願人: 国立大学法人福井大学 (識別番号 504145320), 学校法人金井学園 (識別番号 390013815)

特許出願番号: 特願 2012-155368, 特許出願年月日: 2012年7月11日

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. JST 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) フィージビリティスタディ (FS) ステージ 探索タイプ 「高速動作が可能で安価な非破壊検査用テラヘルツ波ラインセンサーの開発」 (AS242Z00696J), 採択, 代表, H24.11 ~ H25.10, 1,307,693 円 (H24 年度 468,000 円, H24 年度 839,693 円) (間接費含め 170 万円)
2. 日本学術振興会・基盤研究 B(一般) 「チェレンコフ位相整合 EO サンプリングの高度化と THz 波イメージング計測への応用」, 申請中, 代表, H25-H27, 申請金額 20,000 千円 (直接経費)

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**周波数連続可変ジャイロトロン用ガウスビーム変換器の開発**

研究代表者：立松 芳典（遠赤外領域開発研究センター・准教授）

<b>概要</b>	遠赤センターでは、遠赤外領域を発振帯にもつ電磁波光源であるジャイロトロンの高度化研究として、出力電磁波形状を応用に便利なガウスビームへ変換するモード変換器を内蔵し、かつ発振周波数を連続的に変えられるジャイロトロンの開発が大きな柱となっている。発振する電磁波の周波数が変化したとき、1つのモード変換器でうまくガウスビームに変換される保証がない。このため、周波数が変化しても対応できるモード変換器を開発するための検討を行った。周波数が変化したときに出力されるビーム形状がどのように変化するかを計算するコードを開発し、既存のジャイロトロン FU CW GI についてこのコードを適用した。放射ビームの方向を調整するための機構をこのジャイロトロンに組み込み、実際の放射のビーム形状と計算結果を比べた。
<b>関連キーワード</b>	ジャイロトロン、モード変換器、ガウスビーム、周波数可変

### 研究の背景および目的

遠赤外領域の電磁波を発振帯にもつジャイロトロンの高度化が遠赤センターでの重要研究課題の1つである。その中でも、発振した電磁波形状を、利用に便利なガウスビームへ変換するモード変換器を内蔵するジャイロトロンの開発、および発振周波数を連続的に変えられる周波数連続可変ジャイロトロンの開発が、このジャイロトン高度化研究課題の大きな柱である。

遠赤センターにおけるモード変換器内蔵のジャイロトン開発は2010年度から開始し、昨年度までに Gyrotron FU CW GI, FU CW GII, FU CW GIII の3台のジャイロトロンを開発した。(Y. Tatematsu et al., Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves **33**, 292-305, 2012, Y. Tatematsu et al., The 4th International Workshop on Far Infrared technologies 7a-6, 2012.)

一方、周波数連続可変ジャイロトロンの開発は、数年前から行われており、すでに、大阪大学において、福井大学で開発した Gyrotron FU CW VI を用いて動的核偏極・核磁気共鳴 (DNP-NMR) 分光実験で成果をあげている。ただし、これまで、設計段階で意図した周波数通りに周波数が変化するジャイロトロンの実現までは達成されていなかった。しかし、周波数連続可変の原理に関する理解も進み、その理論的基盤の上に設計した周波数可変ジャイロトロンを開発中である。

モード変換器内蔵、周波数連続可変の2つの特長を同時に兼ね備えたジャイロトロンの開発が、次の目標である。このジャイロトロンの実現にあたっては、周波数変化に対応するモード変換器の開発が不可欠である。

発振電磁波の周波数が変わると、ジャイロトン内での電磁波ビームの伝搬方向が変わるため、ジャイロトン窓から垂直に電磁波ビームを出射するためには、真空容器内にあるモード変換器を構成するミラーの位置・角度を外から変えられる機構が必要である。さらに、同じモード変換器で周波数が異なる電磁波ビームをガウスビームに変換できる必要がある。本課題は、これらの条件を満足する周波数連続可変ジャイロトン用モード変換器を設計・製作するための検討を行い、その有効性を確かめることを目的とする。

まず、周波数が変化したときに出力されるビーム形状がどのように変化するかを計算できるコードを開発する。次に、既存の Gyrotron FU CW GI を対象にこのコードを適用し、ビームを窓から垂直に出すために要請されるミラーの並進距離、回転角度を出し、そのときに射出されるビーム形状を計算する。実際に放射ビームの方向を調整するための機構をこのジャイロトンに組み込み、放射パターン測定を行い、ビーム形状を計算結果と比較する。

### 研究の内容および成果

周波数変化に対応したモード変換器を設計するため、既存の放射パターン計算コードを拡張し、次の2つの場合に対応できるようにした。

- ① 発振モードは同じで、周波数が変わるとき
- ② 発振モードが変化することにより周波数が変わるとき

①の場合、周波数が変わること導波管内での電磁波が伝搬する角度が変わるため、ジャイロトン窓から放射される電磁波ビームは鉛直方向に移動し、形がくずれる。②の場合、窓からのビームの出射方向は水平方向にずれる。このため、周波数が変化した時に、窓から垂直にビームをとり

だすには、モード変換器の構成要素であるミラーに並進および鉛直または水平方向に回転する機能を持たせ、ビームの出射方向を調節する必要があることがわかった。

次にこの計算コードを Gyrotron FU CW GI に対して適用した。Gyrotron FU CW GI のオリジナルの設計周波数は 203 GHz である。しかし、ポジトロニウム超微細構造準位差のエネルギーを測定するための光源として利用されることになり、信号の周波数依存を測定するため、発振周波数を 201.5 GHz から 205.5 GHz の約 4 GHz の周波数幅変える必要が出た。これだけの範囲にわたって周波数が変化し、かつ出力も 100 W を超えるような光源は存在しない。そのため、Gyrotron FU CW GI がフランジ接合の組立管であるという特徴を利

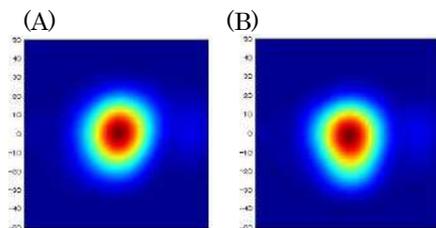


図 1. 周波数が変化した時の放射ビーム計算  
(A) 203.0 GHz, (B) 205.5 GHz

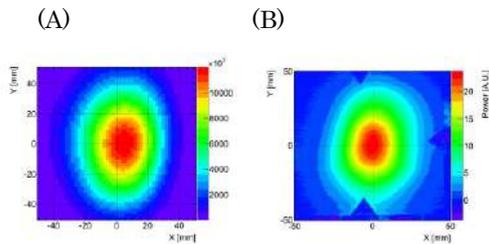


図 2. 203.7 GHz に対する放射の(A)計算パターンと(B)実測パターン

用し、共振器をとりかえることで、発振周波数を変えることにした。

上で拡張したコードを Gyrotron FU CW GI に対して適用し、計算した結果を図 1 に示す。(A)は設計周波数 203 GHz に対する放射ビーム断面形状、(B)は発振周波数が 205.5 GHz にずれたときの形状である。(B)では、モード変換器を構成するミラーのうち、最後に反射するミラーに 2.5mm の並進と鉛直面内に 0.16° の回転を与えることで、放射ビームが窓から垂直に出射するようにしている。周波数が 2.5 GHz ずれることで、多少ビームの断面形状はゆがむが、予定されている実験においては、実際上の問題はほとんどない。

このように、周波数が変化する場合、モード変換器のミラーを可動にする必要がある。Gyrotron FU CW GI では、共振器半径を変えるだけで、発振モードは変化させないため、周波数が変わっても、ビームの水平方向の伝搬方向は変わらず、鉛直面内での伝搬角だけがわずかに変化するため、最終ミラーは鉛直平面内での並進及び回転だけで、窓の中心から水平ビームをとりだすように調整できる。このため、本研究予算で 2 本の直線導入端子を購入し上下にならべ、その押しこみ具合の組み合わせで、要求する並進・回転をさせる計画であった。しかし、このジャイロトロンは本年度の早期からポジトロニウム実験の光源として実際に使用されることになったため、直線導入端子の代わりに、急遽簡易的にペローズを用いてミラーを可動にした。オリジナルの周波数から変えて実験を行い、ミラー位置、向きを調節して測定した。その例を図 2 に示す。測定された窓からの放射ビーム形状は計算結果とよく一致した。

この研究により、モード変換器を内蔵しかつ発振周波数を連続的に変えられるジャイロトロンの実現の目途をつけることができた。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

学会発表

- ・立松他「周波数可変実験用モード変換器内蔵ジャイロトロン」の検討」日本物理学会 2012 秋季大会 18aFJ-4
- ・春木、立松他「サブモード発振時のブラッグアンテナからの放射ビームパターン解析」2012 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会 A-p12
- ・立松他「多周波数発振ガウスビーム出力ジャイロトロン FU CW GV の開発」日本物理学会第 68 回年次大会 28pEC-5
- ・Y. Tatematsu et al., "Development of Gyrotron FU CW G-series" in International Symposium on Development of Terahertz Gyrotrons and Applications 15P-1-2 (2013).

### 「特記事項」

特になし

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 科学研究費補助事業・基盤研究 (C) (一般)・H25~H27・電子ビームクオリティがジャイロデバイス発振に及ぼす影響の解明と高効率化の実現・代表・申請中
- 科学研究費補助事業・基盤研究 (A) (一般)・H25~H27・高出力サブテラヘルツジャイロトロンの実現—新規高効率発振機構の適用—・分担・申請中
- 科学研究費補助事業・挑戦的萌芽研究・H25~H26・赤外線熱画像計測によるテラヘルツ帯ジャイロトロン出力評価法の開発・分担・申請中

福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」  
**量子計算への応用を目指した希薄ドープ半導体中の  
 孤立スピン系の研究**

研究代表者： 藤井 裕（遠赤外領域開発研究センター・准教授）

共同研究者： 光藤 誠太郎（遠赤外領域開発研究センター・教授）、

菊池 彦光（工学研究科・教授）

<b>概 要</b>	量子コンピュータを実現するための候補デバイスとして注目されているシリコン(Si)の中にリン(P)原子を希薄にドープした固体試料 (Si:P) について、最低温度約 1.4 K までの極低温域、2.8~3.6 T 程度の強磁場下において、磁気共鳴法を用いてスピン状態、スピンドYNAMIXSの研究を行った。電子スピン共鳴(ESR)および核磁気共鳴(NMR)を同時に行う二重共鳴システムを開発し、NMRを引き起こすことにより ESR スペクトルが変化する二重共鳴測定に成功した。動的核偏極による核スピンの超偏極は最大 20 %まで得られた。ESR スペクトルの時間変化を通して、 $^{31}\text{P}$ 核スピン緩和時間 $T_{1N}$ の測定に成功した。 $T_{1N}$ は、電子スピンのゼーマンエネルギーを超える熱励起によって支配されていることが示唆された。
<b>関連キーワード</b>	量子計算、希薄ドープ半導体、動的核偏極、電子スピン共鳴、核磁気共鳴

### 研究の背景および目的

現在提案されている量子コンピュータの中で、大きな量子ビット数演算の可能性（スケラビリティ）、個別アクセス、コヒーレンス時間等の観点から最も現実性の高いものは B. Kane の提唱したモデルである[1]。これは、シリコン(Si)の中にリン(P)原子をドープした固体試料（以下 Si:P）を用い、 $^{31}\text{P}$  核スピンを qubit とする量子演算を行うものである。このとき電子スピンの自由度を消滅させるために数テスラの強磁場と 0.1 K 程度の超低温が要求される。しかし強磁場・超低温下での系統的な研究は無く、スピンドYNAMIXSについて多くの謎が残されている。特に、1) qubit となる  $^{31}\text{P}$  核スピンの振る舞いを調べる必要があるが、希薄ゆえに信号強度が小さいという困難さのために、これまで  $^{31}\text{P}$ -NMR 信号が直接観測された例はなく、

2) qubit を初期化する（＝核スピンを完全に偏極させる）技術も未熟である。

本研究はこの1と2の解決を目指し、スピンドYNAMIXSの物理学的描像を明らかにするものである。本学には、磁気共鳴(ESR および NMR)装置および超低温を実現するための希釈冷凍器といった、この研究に必要な主要機器がそろっているが、ESR/NMR 二重共鳴測定技術や測定に適したプローブ等の開発が必要であった。ここでは、1.4 K までの ESR/NMR 二重磁気共鳴測定と、ESR を通して見た核スピン緩和測定について報告する。これらの成果をふまえて、数年以内に、希薄ドープ Si:P 試料の NMR 信号の直接観測を世界に先駆けて成功させることを目指している。

### 研究の内容および成果

実験方法：ESR 測定には、遠赤センターのベクトルネットワークアナライザーと超伝導マグネットを用い 78~110 GHz の周波数(外部磁場 2.7~3.6 T)において、最低温度 1.4 K まで測定した。試料は P 濃度  $n = 6.5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$  のシリコン（自然存在比の同位体を含む）を用いた。基本的なセットアップは文献[2]を参照されたい。

臨界濃度  $n_c = 3.7 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$  よりも十分薄いドープ濃度の Si:P 中では、量子コンピュータモデルと等価な、孤立したドナー電子と核スピンの 2 スピン系が成立する。このような希薄ドープ Si:P では、超微細相互作用によって、 $^{31}\text{P}$  核スピンの up/down に対応して電子スピン共鳴(ESR)線が 2 本に分裂す

ることが知られており、ESR を通して核スピンの up/down 存在比を間接的に知ることができる（図 1 参照）。また、高磁場側の共鳴線(H-line)を強く励起すると、動的核偏極(DNP)効果によって核スピンの熱平衡状態よりも格段に偏極する「超偏極」が生じ、共鳴線の積分強度がもう一方(L-line)に偏る。我々は、前節で述べた目標達成へのステップとして、ESR と NMR の二重磁気共鳴プローブを作成し、NMR 遷移を観測することを試みた。図 1 はその一例である。上述の核スピン超偏極状態を初期状態として、ESR 測定中に NMR に相当するラジオ波(RF)を印加すると、共鳴遷移によって核スピンの偏極が乱され、熱平衡状態とほぼ同じスペクトルと

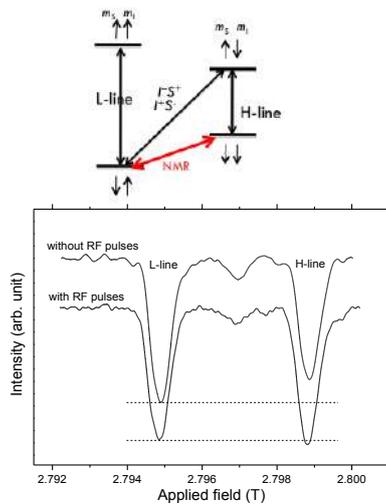


図 1. (a) Si:P 中のドナー電子と核スピンからなる 2 スピン系のエネルギーダイアグラム。縦方向が ESR 遷移、横方向が NMR 遷移を表す。クロス遷移によって DNP 効果が引き起こされる。(b) 1.5 K, 78.45 GHz での ESR スペクトル測定結果。上側は核偏極した状態、下側は 107.1 MHz の RF パルスを印加しながら測定することによって核偏極が熱平衡に戻った状態。

なった。これは二重磁気共鳴によって核スピン偏極をコントロールできる可能性を示している。さらに、cw-NMR を ESR 信号強度の変化として観測するいわゆる ENDOR 信号の検出にも成功し、将来的な NMR 信号検出のための基礎データを収集できた。なお、1.4 K 近傍で得られた偏極度の最大値は約 20% で、熱平衡値のおよそ 200 倍であった。しかし、「qubit の初期化」といえるほどの偏極度ではない。効率よく偏極度を高めるためには、より低温が必要と考えている。

次に核スピンダイナミクスの観測を目指した。これまで希薄 Si:P の  $^{31}\text{P}$  の  $T_{1N}$  測定例は間接的なものに限られ、データも不十分である。我々は、偏極した状態から、十分小さい強度のマイクロ波によ

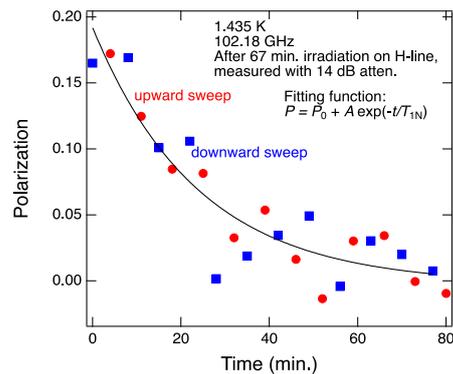


図 2.  $^{31}\text{P}$  核スピン緩和時間  $T_1$  測定例。温度 1.4 K, ESR 周波数 102.18 GHz。1 回 2 分程度で取得された磁場掃引 ESR スペクトルの H-line と L-line の強度比から、その時間の核偏極度を算出し、測定時間に対してプロットした。従って、DNP 効果により核偏極した状態から熱平衡状態へ緩和する過程を観測したことになる。実線は図中の式のベストフィット。

って 2 本の ESR 共鳴線強度の時間変化を測定することにより、 $^{31}\text{P}$  核スピンの緩和時間  $T_{1N}$  を得ることに成功した。さらにフィンランド・トゥルク大学と共同で 0.8 K までの測定を行ったところ、 $T_{1N}$  は電子スピンのゼーマンエネルギーを超える熱励起によって支配されていることがわかった。広い磁場・温度範囲での測定が可能であるという本学の装置の特徴をいかしてデータを収集し、スピンダイナミクスの物理的描像を明らかにしたい。

さらに、1 K 以下の超低温域での測定を行うための装置開発を開始した。本年度は素子の周波数特性等の評価、共振器の開発に取り組んだ。今後、実際に装置をくみ上げ、超低温での ESR 測定を開始し、 $^{31}\text{P}$ -NMR 信号観測へのステップを積み重ねていく予定である。

#### References

- [1] B. Kane, Nature **393** (1998) 133
- [2] M. Song, S. Mitsudo, Y. Fujii, *et al.*, J. Phys.: Condens. Matter **22**, 206001 (2010)

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

学会発表：招待講演 “ESR studies of low P-doped Si:  $T_1$  measurement at high fields and DNP at low temperatures”, Y.Fujii, International Workshop on Nonequilibrium Phenomena in Complex Quantum Systems (NPCQS2012), Okinawa, ほかに国内学会発表 2 件

### 「特記事項」

本研究の一部は、二国間交流事業（韓国との共同研究）により行われた。また、本研究はフィンランド・トゥルク大学との共同研究に発展した。

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 1) 科学研究費補助金・基盤研究（一般）(C)・H25-27 年度・量子計算への応用を目指した希薄ドープ半導体の超低温・高磁場中での二重磁気共鳴測定・代表・申請中・申請総額 5,000 千円
- 2) 日本学術振興会・二国間交流事業共同研究（韓国との共同研究 (NRF)）・H23-25 年度・固体量子コンピュータへの応用を目指した Si:P 結晶の超低温・強磁場下の磁気共鳴・代表・採択・採択総額 2,400 千円

## 福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究の支援」 顔刺激による愛着障害の検討

研究代表者：友田 明美（子どものこころの発達研究センター・教授）  
 共同研究者：小坂 浩隆（子どものこころの発達研究センター・准教授）  
 藤井 猛（子どものこころの発達研究センター・講師）  
 斎藤 大輔（子どものこころの発達研究センター・准教授）  
 滝口慎一郎（大学院医学系研究科・博士課程院生）  
 小泉 径子（日本学術振興会・DC1 研究員）  
 水野 敬（理化学研究所分子イメージング科学研究センター・研究員）

<b>概 要</b>	「愛着障害」は小児期の虐待・ネグレクト（母子間の愛着形成の歪み）により引き起こされるが、患者の多くで顔表情認知能の失調を伴う。顔表情認知の失調は情動や社会適応に関する発達に悪影響を及ぼすと考えられる。本研究では、①愛着障害患児の顔表情認知に関する脳内情報処理機構を、顔表情認知課題（表情読み取り課題）施行時の前頭前野機能系の障害の程度を神経賦活計測により検索した。被虐待経験を持つ児童を対象に表情読み取り課題を実施したところ、トラウマ体験のない対照児童と比べ、「幸せな気持ちでいる」などのポジティブな表情の読み取りにおいて有意に低得点を示した。②金銭報酬獲得時の神経賦活度を fMRI を用いて検討した結果、報酬の高低にかかわらず、金銭報酬獲得時の背側線条体と視床の賦活度が有意に低かった。本研究課題から得られた成果は、愛着障害の病態解明および治療開発につながると考えられた。
<b>関連キーワード</b>	反応性愛着障害、表情読み取り課題、顔表情認知、fMRI、アタッチメント

### 研究の背景および目的

「愛着障害」は小児期の虐待・ネグレクト（母子間の愛着形成の歪み）により引き起こされるが、患者の多くで顔表情認知能の失調を伴う。顔表情認知の失調は情動や社会適応に関する発達に悪影響を及ぼすと考えられる。本研究では、愛着障害患児の脳内情報処理機構を、①顔表情認知課題（表情読み取り課題）施行時の正解率、②非侵襲的脳

イメージング（機能的 MRI）を用いて、金銭報酬獲得課題施行時の前頭前野機能系の障害の程度を神経賦活計測により検索した。本研究課題から得られる成果は、愛着障害の病態解明および病態特徴に基づく小児期における適切な早期診断と治療薬開発を目指した臨床応用へと展開するための足掛かりになると考え、本研究を行った。

### 研究の内容および成果

DSM-IV-TR に基づき反応性愛着障害(RAD) (DSM-IV-TR 313.8) と診断された患児と定型発達児を対象とした。被験者の選定にあたっては、健康状態、症状、年齢、性別、同意能力等を考慮し、慎重に検討した上で被験者の自発的な同意の得られた場合のみ、顔表情認知課題および fMRI 検査を行った。

①顔表情認知課題（表情読み取り課題）施行時の正解率：被虐待経験を持つ児童 44 名と定型発達児 85 名を対象に表情読み取り課題（図 1）を実施したところ、一般家庭の児童と比べ、「幸せな気持ちでいる」などのポジティブな表情の読み取りにおいて有意に低得点を示した（図 2）。受けた虐待の性質によって脳の発達に異なる影響があることが報告されている。今後の研究では、受けた虐待の種類が判断に及ぼす効果を検討し、また表情判断時の脳活動を測定することによって、ポジティブな表情の理解の困難にはどのような機構が関わ

っているのかを明らかにし、虐待を受けた子どもの表情理解のメカニズムを解明することを目的としている。目標到達への努力を鋭意進めている。

②金銭報酬獲得時の fMRI を用いた神経賦活度：既報 (Izuma, Neuron 2008) の Monetary Incentive Task による報酬系課題を被験者（患児 6 名と定型発達児 17 名）に遂行させ、fMRI 計測で得られた BOLD シグナルの変化による脳血流計測を行った。その結果、RAD 群では金銭報酬の高低にかかわらず、金銭報酬獲得時の背側線条体や視床の賦活が低下している傾向が認められた（図 3, 4）。本研究により、RAD 患者の報酬への反応性の低下が示唆された。この機能不全は、報酬の感受性の低下を示唆する、注意欠陥多動性障害(ADHD)患者の金銭報酬獲得時の側坐核と視床における賦活度低下とは明らかに異なっていた。今後も被験者サンプル数を増やし研究を進めることで RAD の報酬系機能低下や抗多動薬の治療効果を評価したい。



図 1. 顔刺激 (表情読み取り) 課題

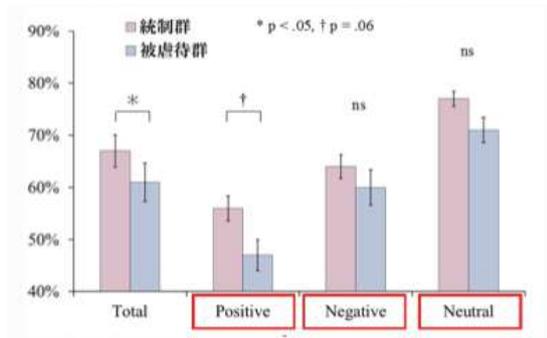


図 2. 顔刺激 (表情読み取り) 課題

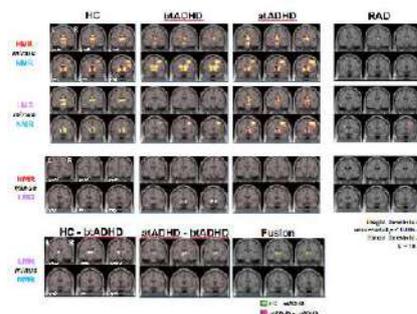


図 3. 愛着障害患者の fMRI を用いた神経賦活度

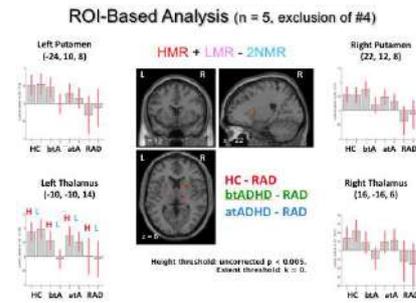


図 4. 愛着障害患者の fMRI-ROI 解析

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

浅野みずき, 石飛 信, 平谷美智夫, 小坂浩隆, 水野智之, 高橋哲也, 村田哲人, 川谷正男, 友田明美, 和田有司. 描画検査が虐待の早期発見・介入につながった被虐待児の 1 例. 第 32 回日本精神科診断学会, 那覇市

Tomoda A, et al. Reduced visual cortex gray matter volume and thickness in young adults who witnessed domestic violence during childhood. *PLoS One*, 7(12):e52528, 2012

Mizuno K, et al. Osmotic release oral system-methylphenidate improves neural activity during low reward processing in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *NeuroImage: Clinical*, 10.1016/j.nicl.2013.03.004, 2013.

Yatsuga C, et al. Early-onset anorexia nervosa is associated with decreased gray matter volume in the inferior frontal gyrus. *BMC Psychiatry*, (投稿中)

Tomoda A, et al. No interaction between serotonin transporter gene (5-HTTLPR) polymorphism and adversity on depression among Japanese children and adolescents. *BMC*

*Psychiatry*, (投稿中)

Tomoda A. What Changes Does Children's PTSD Bring about to Their Brains? 日本発達障害福祉連盟『発達障害白書 2013 年英語版』

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」  
科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究 (平成 24 年度)  
「fMRI を用いた愛着障害の神経基盤の評価システム」, 友田明美 (代表) 1,560 千円

科学研究費補助金 基盤研究 (B) (平成 24 年度)  
「脳画像解析と遺伝子多型解析の融合による注意欠陥多動性障害(ADHD)の病態解明」, 友田明美 (代表) 7,800 千円

科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「顔刺激 fMRI による愛着障害へのオキシトシン治療効果判定システム開発」(申請中)

科学研究費補助金 新学術領域研究「発達障害としてのトラウマ関連障害の神経基盤評価システムと治療法開発」(申請中)

## 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」 日本中世・近世における土地所有および年貢請負体制に関する研究

研究代表者：長谷川 裕子（教育地域科学部・准教授）

<b>概 要</b>	本研究は、日本中世・近世における土地所有および年貢請負に関する史料を収集、データベース化し広く公表することで、当該期社会に関する研究の進展を促すことを目的としている。日本中・近世移行期は、史料量が増えることもあり、いまだ翻刻・公表されていない資料が数多く存在し、それが特に時代区分を含む従来の通説に対する批判を困難にしている。そのため本研究では、特に時代区分に関わって戦後歴史学のなかで中心的に議論されてきた土地所有や年貢請負に関する13～17世紀の史料を、各自治体の文書館や図書館・博物館および大学図書館や研究機関などから収集・翻刻・データベース化する。時代的な共通性や地域的な差異を捉えるためには、東北から九州までを範囲として史料を収集することが望ましいが、本研究では特に近江（滋賀県）、越前・若狭（福井県）・出雲・隠岐（島根県）を対象に調査を行い、史料の収集、データベースの作成に努めた。
<b>関連キーワード</b>	日本中世史、日本近世史、土地所有、村請、検地

### 研究の背景および目的

中世から近世における土地所有の問題は、日本史の時代区分を決定づけるものと捉えられ、戦後歴史学のなかでも中心的な課題として、これまでもさまざまに議論されてきた。特に、中世・近世移行期については、豊臣秀吉の行った「太閤検地」「兵農分離」が中世と近世を分ける画期と捉えられ、現在ではそれがほぼ通説となっている。それは、歴史発展の基軸を、生産力の発展とそれに伴う生産様式の転換に求めたことにより、各時代における経済的諸関係の解明が課題とされ、各時代の生産様式、とりわけ土地所有形態の解明が主要命題として議論されてきたためである。しかし、こうした研究は、近代資本主義社会の前段階として、中世・近世を封建制社会と位置づけるために理論的に組み立てられた議論であり、当該期の史料を用いて立ち上げられた議論ではない。そのため、「太閤検地」論に対しては、史料の面からの根本的な批判が早くから提示されていたにもかかわらず、特に日本近世史研のなかで、それらの批判は「辺境地」における「例外的」な事例として退けられ、また近年では中近世移行期を連続的に把握する視角から「太閤検地」論に対する見直しが進められつつあるものの、いまだ通説を覆すに至っていない。

こうした研究の停滞は、中近世移行期と呼ばれる15～17世紀において、いまだ未調査・未公表の史料が多い現状がもたらしているものであり、また史料の絶対的不足が、新たな研究者による当該期・当該分野の研究への参入を阻んでいるといえる。したがって、中世から近世における土地所有の問題、およびそれを基盤とした年貢請負体制に関する研究を進め、「太閤検地」論を再検討し、中世・近世社会の実像を解明するためには、とりわけ13～17世紀、東北から九州までの範囲で該当史料を収集することが必要となる。現在、各自治体の文書館や博物館ならびに大学図書館などの公共機関には、翻刻・刊行されていない史料が多く所蔵されている。また、各自治体史編纂の際に調査をしたものの、史料集に載せきれなかった史料の写真についても、各自治体の図書館や文書館など保管されている。本研究では、そうした史料を収集し、データベース化して公表することで、当該期社会に関する研究の進展に資するとともに、その史料分析を通じて現在通説となっている議論に一石を投じることを目的とする。さらに本研究の成果をもとに、「中世」「近世」という時代区分そのものを再検討し、中近世移行期社会の新たな枠組みを構築することを最終的な目的としている。

### 研究の内容および成果

本研究では、土地所有・年貢請負体制に関わる史料の収集・翻刻とデータベース化が目的であるため、中世・近世の原文書および影写本・写真帳・マイクロフィルムなどが数多く所蔵されている東京大学史料編纂所と国文学研究資料館を中心に、該当史料を保管する各自治体の文書館や博物館・大学図書館・各種研究機関において、史料の閲覧・

筆耕、可能な場合は複写・撮影という方法で史料の収集を行った。なお、研究期間に限りがあり、東北から九州までの範囲での調査は困難であるため、研究代表者がこれまで研究を進めてきた近江（滋賀県）を中心に、越前・若狭（福井県）、さらには両地域と領主を同じくする出雲・隠岐（島根県）を調査対象地と定め、いまだ未調査および未

公表の史料を中心に調査を行った。また未調査・未翻刻の史料がどれであるかを確認するために、同時に各自治体史において翻刻されている該当史料の収集も行った（滋賀県については以前の研究で確認済みであるため、本研究では福井県と島根県に関して実施した）。本研究において調査した史料群は以下の通りである。

①滋賀県

\* 東京大学史料編纂所（所蔵写真帳の閲覧・筆耕）  
石田文書・垣見区有文書・古橋共有文書  
御神神社文書・居初文書・唐川区有文書  
木村善光氏所蔵文書・永源寺文書・中野文書  
明性寺文書・西教寺文書・（芦浦）観音寺文書  
長命寺文書・竹生島宝蔵寺文書・松尾寺文書  
春日匡氏所蔵文書・馬見岡綿向神社文書  
大津市歴史博物館所蔵文書

→このうち、8つの文書群から必要部分を筆耕し、目録データベースを作成。

\* 国文学研究資料館（所蔵古文書の閲覧・撮影）  
中島家文書・駒井沢村文書・大原家文書  
→このうち、2つの文書群から検地帳を含む32の文書を撮影し、翻刻および目録データベースを作成。

②福井県

\* 東京大学史料編纂所（所蔵写真帳の閲覧・筆耕）  
小笠原文書・（小浜）古川文書・大瀧神社文書  
高島居文書・大成寺文書・永建寺文書  
道川文書・中山文書・秦文書・善妙寺文書  
恵光寺文書・永昌寺文書・大光寺文書  
平野文書・溝江文書・長慶寺文書・奥田文書  
山本秋郎家文書

→このうち、5つの文書群から必要部分を筆耕し、目録データベースを作成。

\* 自治体史の確認  
『福井県史』資料編3～9（中・近世1～7）  
→売券・借用状を中心に抽出し、目録データベースを作成。

③島根県

\* 東京大学史料編纂所（所蔵写真帳の閲覧・筆耕）

多賀文書・坪内文書・平岡文書・藤間文書  
村上文書・朝山文書・北島文書・小原文書  
雲樹寺文書

→このうち、5つの文書群から必要部分を筆耕し、目録データベースを作成。

\* 島根県立図書館（所蔵古文書の閲覧・撮影）  
齊藤家文書・藤村家文書・永瀬家文書

→このうち、1つの文書群から検地帳を含む2つの文書を撮影し、翻刻および目録データベースを作成。

\* 自治体史の確認

『出雲尼子史料集』（上・下）

『出雲国造家文書』

『新修島根県史』史料編1～3

『大社町史史料編』古代・中世（上・下）

→売券・借用状を中心に抽出し、目録データベースを作成。

以上が本研究の成果であるが、博捜しなければならない史料量が膨大であるため、残された課題も多い。以下、今後の課題を列記する。

①滋賀県

- ・東京大学史料編纂所における写真帳の確認
- ・国文学研究資料館における原文書の調査
- ・滋賀県下および滋賀県に関する新出史料の確認

②福井県

- ・自治体史翻刻史料の確認（未調査・未翻刻史料の確認）
- ・東京大学史料編纂所における写真帳の確認
- ・福井県立文書館における『福井県史』編纂史料写真帳および所蔵古文書の調査・確認
- ・福井大学附属図書館所蔵「小島家文書」から該当史料の抽出
- ・福井県下における新出史料の確認（県下の博物館・文書館との連携）
- ・17世紀の福井藩に関する研究（特に知行制・地方知行に関する先行研究が少ないため）

島根県に関しても同様の課題が残っている。来年度以降も継続して調査・研究を行う予定である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- ①東京歴史科学研究会 2013 年度大会「生存の危機」と人々の主体性」コメント報告（2013 年 4 月 28 日（日） 於早稲田大学）
- ②北近江歴史大学「豊臣秀吉政権と村落」講演（2013 年 5 月 18 日（土） 於長浜市長浜城歴史博物館）
- ③戦国史研究会 2014 年度地方例会「越前福井藩の知行制と地方知行」（仮）報告（2014 年度 9 月 於福井大学）

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- ①日本学術振興会・科学研究費助成事業・基盤研究 B・2013～2016 年度（申請中）、「日本中世・近世における検地と村請に関する総合的研究」（研究代表者・一橋大学渡辺尚志）研究分担者
- ②日本学術振興会・科学研究費助成事業・基盤研究 C・2013～2016 年度（申請中）、「日本中世・近世における土地所有および売買・貸借に関する総合的研究」研究代表者

## 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」 バイオマス環境修復材の実用化のための適性評価

研究代表者： 三浦 麻（教育地域科学部・准教授）

<b>概 要</b>	本研究の最終目的は、廃棄物として扱われるバイオマス地域資源を環境資材として加工し、その環境修復効果を農業地域、鉱工業地域に還元することによって、地域内資源循環システムの構築を図ることである。そのために環境負荷の少ない環境修復材の開発が必要であり、管理の手間とコストを抑えた合理的な技術が不可欠である。これまでの研究において Cd の作物吸収抑制基盤構造を提案した。この基盤整備構造の実用化を目指すには、現地に適用するバイオマス修復資材の環境影響を評価する必要がある。そこで本研究では本資材を実用化するために3種類の室内実験を行うことによって検討することを目的とした。その結果、溶液中に複数の重金属が存在下した場合には、低濃度の場合において競合せずにすべての重金属の同時吸着が確認された。また、使用済環境資材は環境中において降雨に直接暴露しても Cd は脱着されにくいことが示唆された。一方、Cd は強酸によって脱着することが確認され、Cd 吸着資材の処理方法の提案が可能となった。降雨現象による Cd 再溶出率は低くなったが、低濃度溶出が継続することが懸念されるため、溶出の経時変化および蓄積溶出量の監視を必要とする。
<b>関連キーワード</b>	吸着・脱着・木炭・重金属・降雨現象

### 研究の背景および目的

安全な食料を安定的に提供するためには、周辺環境との調和を保ちつつ、食料生産基盤となる農地力の維持と増進、それと同時に健全な水・土環境を保つことが重要である。一方、現在もなお農地の近隣に立地する鉱工業地域からの有害重金属流出は深刻である。そのために環境負荷の少ない環境修復材の開発が必要であり、管理の手間とコストを抑えた合理的な技術が不可欠である。

我が国の農用地のカドミウム (Cd) 濃度は他国と比較して高くなっている。これは、製錬所等の鉱工業地帯に農用地が隣接して存在しているためである。Cd はコメ等の農作物に吸収されやすく、経口摂取により人の体に蓄積されることが問題である。作物中のカドミウム濃度は、Codex (2005) によって定められた国際基準値とともに、わが国では国内暫定基準値によって規制されている。また、規制以外の対策では、栽培管理手法としてはイネ栽培であれば湛水管理、また技術的手法としては、客土およびファイトレメディエーションがある。農林水産省では、作物中の低減化に関する

新技術をさらに模索中である。

そこで本研究では、バイオマス環境資源を環境修復材として提案したいと考えている。最終目的は、廃棄物として扱われるバイオマス地域資源を環境資材として加工し、その環境修復効果を農業地域、鉱工業地域に還元することによって、地域内資源循環システムの構築を図ることである。

これまでに Cd の作物への吸収抑制技術として、土壌基盤中にバイオマス環境修復材として木炭を活用する方法を提案した (特許第 4962331 号)。その効果は作物栽培実験によって作物への吸収抑制が認められた (Miura *et al.*, 2010)。しかし、本環境資材を実用化するには、さらに環境条件および環境影響の検討が必要である。すなわち (1) Cd が環境中に存在する他種の重金属類との競合吸着、

(2) Cd が吸着された後の吸着材から脱着した Cd の環境中への再溶出の影響、(3) 土壌に適用し、長期間滞留させた場合に降雨現象による環境中への再溶出について、本研究において室内実験を行い検討した。

### 研究の内容および成果

本研究で行った 3 つの実験の内容とその結果について以下に記述する。

#### (1) 複数の重金属類存在条件下における選択吸着

Cd, 鉛 (Pb), 銅 (Cu), 亜鉛 (Zn) の混合溶液 100ml にバイオマス環境資材 (木炭) 1g を投入し攪拌した。一定時間ごとにサンプリングを行い、溶液中の各種重金属濃度を分析した。溶液は、重金属の低濃度 (Cd:0.2 ppm, Pb:0.02 ppm, Cu:0.2 ppm, Zn:0.5 ppm) および高濃度 (Cd:1 ppm, Pb:2 ppm, Cu:10 ppm, Zn:10 ppm) を検討した。その結果、初

期溶液条件を低濃度とした場合では、すべての重金属は木炭との接触攪拌 1 時間後に吸着率 90%以上で溶液中から除去された (図 1)。一方、高濃度溶液の場合では、攪拌 24 時間後においても Cu および Pb はそれぞれ 11%, 10%, Zn は 1% と低濃度溶液と比較して吸着率は低くなった。また、Cd については全く吸着されなかった。しかし、高濃度溶液において、重金属を 4 種から Cu および Cd の 2 種類に減らした場合には、Cd が 96%, Cu が 99% の吸着率を示した。この結果から、低濃度で

あれば、複数重金属の同時吸着に期待ができる。一方、高濃度においては、濃度および種類の組み合わせをさらに検討する必要がある。

**(2) 使用済木炭からの重金属脱着実験**

Cdのみを吸着した木炭 (0.98 mg-Cd/g-木炭) および Cd と Cu を吸着した木炭 ([0.97 mg-Cd + 9.94 mg-Cu]/g-木炭) を用いて重金属脱着実験を行った。蒸留水 (pH 6.8) に接触攪拌させた場合では、攪拌 24 時間で脱着率が 1%以下に抑えられ、木炭からの重金属脱着は溶液の pH 値に依存することが分かった。pH の値を 4 段階 (1.5, 3.5, 4.5, 5.5) に調整しそれぞれの溶液 (100mL) に木炭 1g を接触させ、24 時間攪拌した。その結果、酸性度が増すほど脱着されやすく、もっとも顕著に脱着したのは強酸溶液 (pH1.5) であった。特に Cd および Cu を吸着させた木炭からは Cd が 100%の脱着率を示した。また、pH4.5 以上の溶液における同木炭からの脱着率は 1 %以下となった (図 2)。この結果から、使用済木炭を酸性雨相当の溶液に直接接触した場合の脱着の可能性は低いことがいえる。さらに、木炭に吸着した重金属は強酸によって脱着率が高まることが明らかになったため、現地適用後の使用済木炭の取扱いについて、重金属を回収し無害化した上で処分が可能である。

**(3) 土壌に適用した場合の再汚染評価**

使用済木炭を環境中に滞留させておくことを想定した場合、降雨の影響による木炭からの重金属溶出について調べるためにカラム実験を行った。

カラム内部は土壌層 (9cm) 2 層の間に Cd 吸着済木炭を 1cm の厚さ (5.9 mg-Cd/7 g-木炭) で敷設した構造である。カラム最上面に酸性雨を想定した溶液 (pH4.5) を滴下した。滴下流量は降雨強度 10 mm/h および 100 mm/h を想定とし、42 mL/h および 392 mL/h とした。また、土壌条件として、飽和および不飽和条件の検討を行った。その結果、土壌条件にかかわらず 0.1%以下の Cd 溶出率であった。また、土壌条件からみると不飽和よりも飽和条件のほうが相対的に溶出率は小さくなった。これは、飽和条件である場合には、酸化還元電位が低くなることにより、木炭から溶出した土壌間隙中の Cd の存在形態が CdS (硫化カドミウム) などの硫化物を形成し、水溶態 Cd が減少したためであると考えられる。降雨条件からみると、飽和条件であれば、降雨強度が高いほど溶出されにくく、不飽和条件では降雨強度が低いほど溶出され

いくいことが分かった。したがって本実験では、高い降雨強度によって不飽和条件の土壌からの溶出量が蓄積されることが懸念されることが明らかになった。

以上の 3 つの実験から、本研究で提案するバイオマス環境資材である木炭の実用化の可能性が、次の 3 つの結果から見出された。

1. 低濃度であれば、複数重金属の同時吸着効果に期待できる。
2. 使用済木炭の通常降雨または酸性雨に対する直接曝露では重金属脱着率は低い。
3. 強酸で脱着されるため、使用済木炭からの重金属回収が可能となる。

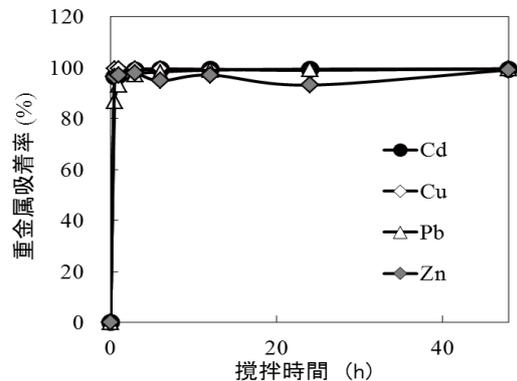


図 1 複数重金属存在下における木炭による選択吸着率

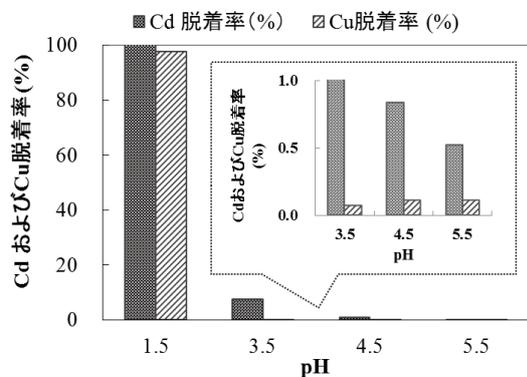


図 2 吸着済み木炭からの Cd および Cu 脱着率

引用: Miura et al.,(2010)Control of cadmium accumulation in topsoil and crops from contaminated farmland. *Desalination and Water Treatment*, 19.1-6.

**本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況**

**「主な発表論文等」**

本研究の成果は、『The 16th International Conference on Diffuse Pollution and Eutrophication, Beijing, China, 18-23 August, 2013』にて発表する予定である。

**「特記事項」**

追加実験を重ね、環境中における木炭の吸着効果についてのデータおよびカラム実験の長期溶出デ

ータを蓄積した成果を論文としてまとめる予定である。

**「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」**

今後予定している研究助成への申請:平成 25 年度公益信託奥村組建設環境技術助成基金、種目「自然環境および生活環境の保全、修復および創出に関する研究」

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」  
**心的動揺に対する運動制御の中枢及び末梢神経機構**

研究代表者： 田中 美吏（教育地域科学部・講師）

<b>概 要</b>	<p>心理的プレッシャーの克服は多くの人が抱える共通の悩みである。この問題の背景にある、中枢および末梢における神経生理メカニズムを明らかにするために、本研究ではバランスディスク上での姿勢制御運動を用いて、プレッシャー下での下肢筋の筋活動ならびに脊髄反射の興奮性を調べることを目的とした。13名を対象とした実験の結果、プレッシャー下では前脛骨筋の筋活動が高まり、それに伴いヒラメ筋と前脛骨筋間の共収縮も増大することが示された。脊髄を介した反射応答による運動ニューロン活動の興奮性に関してはプレッシャーによって脊髄反射が抑制されることが示された。脊髄および末梢におけるこれらの神経生理機構の機能変化が、プレッシャー下での姿勢制御運動のパフォーマンスに関与することが本研究の結果から示唆された。</p>
<b>関連キーワード</b>	心理的プレッシャー、姿勢制御、筋活動、脊髄反射、運動ニューロン

**研究の背景および目的**

我々は社会生活において、緊張、怒り、注意散漫などの多種多様な心理的变化が生じるなかで、適切な行動を取らなければならない。このような行動は、大脳から脊髄にかけての中枢神経、ならびに脊髄から筋出力に至るまでの末梢神経機構によって巧みに制御されているが、この制御機構の機能不全は、社会生活における様々な場面でのヒューマンエラーの引き金にもなる。このような背景から私の研究では、緊張、快・不快感情、注意バイアスといった心理的变化（心的動揺）を実験的に誘発し、これらが脳皮質の興奮性、脊髄反射、筋活動といった神経生理変数や、身体動作、運動の速さや正確性といった行動パフォーマンス変数に対する影響を詳細に調べてきた。

本研究では、多種多様な心理的要因のなかから行動パフォーマンスに対する心理的プレッシャーに着目する。スポーツにおける重要な試合場面や、学校教育における試験場面、ならびに人前でのプレゼンテーション場面などに代表されるように、我々はプレッシャーを感じる中で適切な運動行動をとり、目標とするパフォーマンスを発揮しなければならない。その際、プレッシャーによってパフォーマンスが促進される場合もあるが、目標に反してパフォーマンスが阻害される場合も多く、プレッシャーの克服は多くの人が抱える共通の悩みである。

この現象の神経生理メカニズムを明らかにすることを目的に、近年、プレッシャー下での運動行動に関わる中枢および末梢での神経機構を調べる研究が行われ始めている。私のこれまでの研究もその一端を担っており、動作や筋活動に関しては、プレッシャーによってスポーツ動作の縮小などの動作変化が生じることを明らかにしてきた。筋活動に関しては、動作に関わる主動筋のみならず、共同筋や運動遂行に関与しない筋においても筋活

動が亢進することを示してきた。さらに中枢神経活動に関しては、経頭蓋磁気刺激（TMS）を用いることで、大脳の一次運動野から支配筋に至るまでの皮質脊髄路における運動ニューロン活動の興奮性を調べる研究に取り組み、プレッシャーによって皮質脊髄路の興奮性が増大することを明らかにした（主な発表論文を参照）。

これらの私のこれまでの研究や、関連分野のその他の先行研究に対して2つの問題を提案したい。1つ目に、プレッシャー下において運動行動をとる際の筋活動について、腕や手などの上肢の筋活動を調べた研究は数多く報告されているが、下肢の筋活動を調べた先行研究は非常に少ないことが挙げられる。多くの運動行動は上肢とともに下肢の筋活動を基に成立するため、プレッシャーが下肢の筋活動に及ぼす影響を調べる研究も必要である。2つ目に、脊髄レベルでの低次中枢における運動ニューロン活動の興奮性を調べた研究が実施されていないことが挙げられる。運動行動は、大脳を中心とした高次中枢と、脊髄を中心とした低次中枢の運動ニューロン活動の興奮を経て発現するため、高次中枢のみならず低次中枢の機能を調べる研究も必要といえる。

以上より本研究では、運動行動課題として立位片足でのバランス運動を採用し、バランス運動中の下腿ヒラメ筋と前脛骨筋の筋電図を記録することで、プレッシャーが下肢筋の筋活動に及ぼす影響を調べることを第1の目的とした。さらに、ヒラメ筋にHoffmann反射(H反射)を誘発することで、プレッシャーが運動課題遂行中の脊髄反射活動に及ぼす影響を調べることを第2の目的とした。立位でのバランス機能は姿勢保持や歩行などの日常生活動作や、種々のスポーツ動作において重要な機能であり、リハビリテーションならびにスポーツ選手の筋力トレーニングにおいてもその強化が重要視されている。

## 研究の内容および成果

健康な男子 13 名の大学生および大学院生が実験に参加した。なお実験開始前に、研究内容や実験参加に対するインフォームド・コンセントを得た。運動課題として、バランスディスク上に利き足である右足で片足立ちをし、20 秒間ディスク上で右足のみで姿勢を保持することを求めた。20 秒間姿勢を保持できた場合を成功試行とし、左足や他の身体部位が床や壁に触れた場合には失敗試行とした。課題に慣れさせるために 6 試行の練習試行を行わせた後に、非プレッシャーテストとプレッシャーテストを各 1 試行実施した。本研究では、課題の成否に対する報酬と罰をプレッシャーとして用いた。プレッシャーテストを開始する前に実験参加に対する謝礼として 1,000 円が渡されることを実験参加者に伝え、プレッシャーテストにおいて 20 秒間の姿勢保持に成功した場合には謝礼が 1,000 円増額となり、逆に失敗した場合には謝礼が 0 円になることを教示した。罰に関しては、実際に失敗した場合にも減額は無い偽教示であった。

図 1 には、非プレッシャーテストからプレッシャーテストにかけて典型的な筋活動の変化を示した 1 名の実験参加者の筋電図を示した。全実験参加者の平均においても、プレッシャーテストでは前脛骨筋の筋放電振幅 ( $p=.023$ )、ならびにヒラメ筋と前脛骨筋間の共収縮率 ( $p=.005$ ) が非プレッシャーテストに比べて有意に大きかった。図 2 には、運動ニューロン活動の興奮性を示す指標である M 波と H 波について、非プレッシャーテストとプレッシャーテストにかけて典型的な変化を示した 1 名の実験参加者の生波形 (下部) と加算平均波形を示した (上部)。全実験参加者の平均においても、M 波の振幅においてはテスト間の有意差は見られなかったが ( $p=.364$ )、H 波の振幅においてはテスト間の有意差が認められ ( $p=.040$ )、プレッシャー下では脊髄反射を介した運動ニューロンの興奮性が抑制されることが示された。

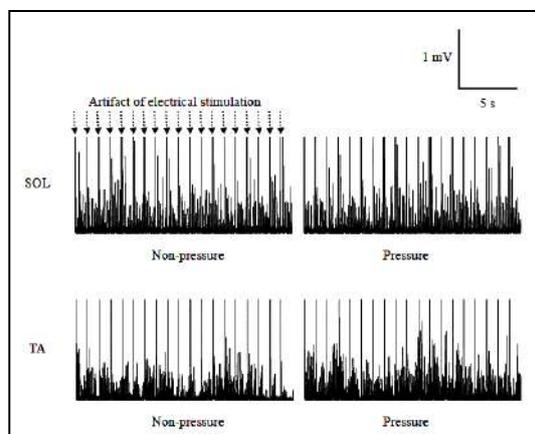


図 1. ヒラメ筋 (SOL) と前脛骨筋 (TA) の筋活動

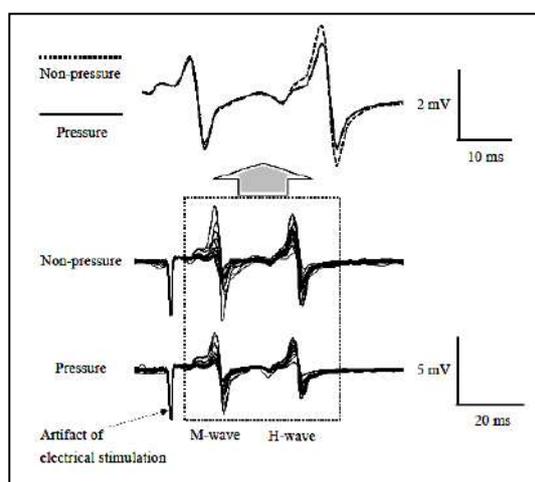


図 2. M 波と H 波

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」(査読付原著論文)

Tanaka, Y., et al. (2012). Modulation of corticospinal motor tract excitability during a fine finger movement under psychological pressure: A TMS study. *International Journal of Sport and Health Science*, 10, 39-49.

Tanaka, Y. (under review). Modulation of EMG activity and spinal reflex during a lower limb balancing task under psychological pressure. *Biological Psychology*.

「特記事項」(国際学会発表)

Tanaka, Y., et al. Effects of emotional stimuli and psychological pressure on spinal Hoffmann reflex amplitude. 2012 North American Society for the Psychology of Sport

and Physical Activity Conference. USA.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

田中美吏 (代表者) 心的動揺に対する運動制御機構—脊髄反射回路の解明と非侵襲的脳刺激の導入—. 平成 23~24 年度科学研究費補助金・若手研究 (B).

田中美吏 (代表者) 脊髄反射運動制御機構に対する感情および注意の影響. 財団法人ミズノスポーツ振興会 2012 年度スポーツ科学等研究助成.

田中美吏 (代表者) 心的動揺に対する運動制御機構—姿勢制御機能と皮質脊髄路の興奮性の精緻な解明—. 平成 25~27 年度科学研究費補助金・若手研究 (B). (申請中)

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」

## 外部支援者が住民自治の力量形成に果たす 役割と効果に関する調査研究

研究代表者： 田中 志敬（教育地域科学部・助教）

<b>概要</b>	住民自治の力量形成を促すコーディネーター型の支援者像を明確にする。 本研究は、成果物主義のまちづくり支援業務の評価（イベント開催、冊子作成、ルール策定、報告書等）の弊害として、外部の支援者側の事業ペースに、被支援者側の地域住民自治組織等が対応することになり、支援者の手段の目的化や支援者論理の優先が生じる一方で、非支援者の受動的享受や住民自治力の未形成が生じ、本来目的の住民自治力形成に結びつかないことを問題視する。そこで、この問題状況を打開する支援のあり方の一助として、京都市明倫学区を事例に、非支援者の状況に応じて、柔軟に対応するコーディネーター（調整・仲介）型の支援者像を明らかにした。そして、本来業務との両立の中で、諸属性でコーディネーター型の支援が可能である点と、有期的支援の場合には、自己の役割を減じていくことで自治力形成を促す工夫等が明らかになった。
<b>関連キーワード</b>	コーディネーター型まちづくり支援者、住民自治の力量形成、地域公共人材育成

### 研究の背景および目的

行政職員や公的機関の職員および委託先のコンサルタント等の外部支援者は、通常、本来業務に基づき、既定の支援制度や事業計画に準じたプロセスで、地域活動やまちづくり活動等の支援にあたる。そして、効率的な任務遂行と形式的な成果が評価対象となる。しかし、その成果の基盤づくりのための、住民自治の複合領域への継続的な関与等に対する評価基準や評価体制は乏しく、本来

業務や委託業務の仕様やコストに見合わないものとして、ネグレクトされるかアンペイドワークとなっているのが実情である。

これに対し、本研究では、これらの住民自治の複合領域への継続的関与を行う外部支援者を、コーディネーター（調整・仲介）型の外部支援者と位置づけ、その住民自治の力量形成に果たす役割と効果を明確にすることを目的とする。

### 研究の内容および成果

研究対象の地区は、ボトムアップ型の地区計画の住民提案を策定した京都市中京区の明倫学区となる。この地区は、京都市都心部の商業地域に立地し、かつては繊維関係の間屋街であった。また、祇園祭の山鉦町が数多くあるなど歴史的市街地でもある。さらに、住民自治においても、室町後期の町と町組が起源となった町と元小学校区単位の伝統的地域運営が行われている。現在、明倫学区には、1584世帯2793人の地域住民が居住するが、近年、分譲マンションが急増し、賃貸マンションも含めると地区世帯の80.5%をマンション居住者が占めている。そのため、マンション居住者と非マンション居住者の関係構築と連携が地域の自治課題やまちづくり課題となっている。

そこで、明倫学区では表1の通り、2001年にまちづくり委員会を結成し、地区内の諸団体と連携しながら現状調査やイベント、広報活動等を通じて、地域課題の問題意識を高め、地域住民への浸透を図っていった。その結果、現在では、京都市の条例に位置づけられる地区計画の策定や、マンション居住者の組織化を実現している。

その間に、多様な外部の支援者が明倫学区に関与している。地区計画策定に関与する京都市都市

づくり推進課やその委託を受けたコンサルタント（委託外においても関与し、まちづくり委員会の事務局をボランティアとして引き受ける）が主に関与し、研究者や学生もイベントや調査等で関与している。その後、景観保全やマンション居住者との連携等で、京都市景観・まちづくりセンターも関与している。

	取組	支援者
(バブル期)	(マンション反対運動)	(社会運動家、革新系弁護士)
初動期2001年～	まちづくり委員会結成 リサーチ:マンション実態調査 イベント:座談会や文化祭 広報:広報誌・HP・blog	都市づくり推進課 コンサルタント 研究者 学生
活動期2006年～	地区計画の方針策定→PR冊子 まちなか景観保全系の活動 明倫マンションネットワーク結成	都市づくり推進課 景観・まちづくりセンター コンサルタント 研究者 学生
成熟期2011年～	地区計画推進委員会に改称 自治連合会の組織改革 明倫マンションネットワーク結成の各種団体化 地区整備計画要望書提出	都市づくり推進課 研究者 学生

表1 明倫学区のまちづくりと支援者の関与

研究手法は以下の通りである。①まず地域住民自治組織（自治連合会・まちづくり委員会）の代表者経験者のヒアリングを行い、地区のまちづくりの動きの年表（表1は短縮版）を作成し、まちづくりの段階ごとに関与した外部支援者の役割把握を行った。②それを踏まえて、特にコーディネーター型の外部支援者であった行政（京都市都市づくり推進課）と公的団体（京都市景観・まちづくりセンター）の職員へのヒアリングを行い、実際の関与形態と関与の際のポイントを明確にした。

本研究では、大きく3つの成果が得られた。第一の成果として、表2の通り、外部支援者の各属性に親和的な地域関与の傾向を確認し分類した。今回は一地区のみの事例となるので、普遍化はできないが、①イベント型（行事の企画運営者・協力者）型の関与は、学生が研究活動の実践の一つとして関与する場合が見られた。そして他の属性の支援者では地域住民のイベント実施に補助的に関与していた。②リサーチャー（現状や課題の調査者）型の関与は、学生、研究者、コンサルタント、行政、まちづくりセンターのどの属性においても事業や研究の基盤として実施していることが確認された。③アドバイザー（専門知識の提供者・助言者）型の関与は、学生をのぞく、研究者、コンサルタント、行政、そして補助的にまちづくりセンターで確認された。④ファシリテーター（会議の進行者・整理者）型の関与は、コンサルタント、まちづくりセンターや補助的に行政や研究者で確認された。⑤コーディネーター（取組や組織の調整者・仲介者）型の役割は、行政、まちづくりセンターで確認されたほか、特異的ではあるがコンサルタント（故人）もボランティアとして事務局の役割を担っており、研究者（筆者）も関与していた。この事例結果を勧案すると、学生（特に学部生）は、経験値として、アドバイザーやファシリテーター、コーディネーターを担うことは難しいが、概ね他の属性では、本来業務の制約はあるが、コーディネーター型も含む多様な役割での関与が可能であることが確認できた。

	イベント	リサーチャー	アドバイザー	ファシリテーター	コーディネーター
学生	●	●			
研究者	▲	●	●	▲	▲
コンサルタント	▲	●	●	●	●
行政	▲	●	●	▲	▲
まちセン	▲	●	▲	●	●

表2 外部支援者属性に親和的な地域関与形態

第二の成果として、コーディネーター型の外部支援者のもたらす役割と効果として、外部支援者の属性を問わず、活動段階に応じて、下記のように役割と効果が推移する傾向にあることを明らかにした。まず初動期は、やや表側に出て、①多様な立場や利害関係者の関係をつなぎ、同じ議論のテーブルにつかせて議論の糸口を作る。②まちづくりの基礎知識やプロセス等の情報提供や、アドバイザーによる専門知識等の解釈を行い、参加住民の問題意識を高め共有を促す。③住民主体の組織化に向けた事務局機能を担保する。次に活動期は、裏方として、活動の活発化や組織の自立化を狙い、①地域の状況に応じて、他の外部支援者の選定や仲介、関与のタイミングを計る。②活動のための外部資金の調達を行う。③記録媒体や広報等による地域内外の協力を確保・拡大する。④事務局機能の地元化を促す。さらに成熟期は、①地域住民組織の世代交代を見守る。②活動や組織の日常化や平常化を見守る等が抽出された。

つまり、初動期は地域住民の牽引役として、イベントからファシリテーターまで多様な役割を担い、活動期では、裏方として、他の外部支援者の協力も得ながら足りない部分を補助的に担保し、成熟期には見守り役として、徐々に外部支援者の役割を減じ、住民自治の力量形成を行っていることが分かる。

第三の成果として、コーディネーター型の外部支援者自身が意識する、支援スタンスや本来業務との両立化のポイントを明らかにした。住民論理の優先に関する項目として、①地域に寄り添うスタンスを明確にする。②地域・当事者の発意に軸足を置く。③信頼関係を構築する。④地域の中のポジションをつくる。⑤地域の文脈に配慮した進め方や人の呼びかけ方をする等が明らかになった。また、コーディネーター型支援者の職能に関する項目として、⑥外部支援者間のネットワークを活用する。⑦アクターや外部支援者の職能の隙間を埋める。⑧外部支援者の専門用語やアクターの思いの通訳と解釈を行う等が明らかになった。さらに、本来業務との両立に関する項目として、⑨顔（立場）を使い分ける。⑩正論や明確な指針も語る。⑪諸制度の読み替えや柔軟な運用をする。⑫本来業務でできない部分の外部資金の調達をする。⑬異動後のフォロー等が明らかになった。

次年度以降は、これらの知見の普遍化に向け、大都市の他事例の検証や、地方都市の外部支援の事例の検証を行う。

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

コミュニティ政策学会第12回大会自由報告・2013年7月7日・予定

#### 「特記事項」

特になし

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費助成事業・若手研究(B)・H25-27・住民自治の力量形成を培う外部支援者の支援モデル構築に関する研究・代表・申請中

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」  
**授業の不確実性に立ち向かう教師の特性と学校組織の探究**  
**—情動を媒介とした教職専門性開発の道筋とそれを支え促す学校モデルの生成—**

研究代表者： 木村 優（教育学研究科・准教授）

概 要
<p>教師の情動を検討したこれまでの研究では、授業において教師に生起する喜びや楽しさといった快情動が教師自身の情報処理や意思決定過程、教師の生涯学習や授業改善に向かう内発的動機づけを高めると指摘されてきた。しかし、学校において生徒たちは成長し続け、学級内生徒の関係性も日々刷新され、教師は学級に応じて学習課題や教育方法を選択する必要がある。これらは授業の“不確実性”と呼ばれる教職の職業的特質であり、教師に恒常的な不安を生起させる。そこで本研究では、授業の不確実性に教師がいかにか立ち向かい、新たな授業実践に挑戦可能となるのかを分析する。そして、授業の不確実性から教師に生起する情動を媒介とした教職専門性開発の道筋と、教師個々人の専門性開発を支え促す学校組織モデルを生成する。</p>
関連キーワード
<p>教師の情動、授業の不確実性、授業改善、教職専門性、教職専門性開発学校</p>

### 研究の背景および目的

教職専門性は、教師が授業中に用いる知識や思考の特徴、学習過程を示した研究知見に基づきこれまで論じられてきた。例えば、教師は瞬間的な情報処理と意思決定を絶えず行いながら、生徒の発言や活動の意味を教育内容や授業展開に関わる実践的知識に結びつけ、必要な手立てを即興的に判断し実行する。この進行中の意思決定と自由裁量の判断は“行為の中の省察”(Schön、 1983)と呼ばれ、教職専門性を特徴づける思考様式とされる(佐藤、 1997)。さらに、教師は“行為の中の省察”を基盤に、授業後に自らの行為を振り返り実践を再構成する“行為についての省察”(Schön、 1983)を行い、この一連の省察過程が教師の学習と教職専門性開発を支え促すことになる(坂本、 2008)。

しかし、教職は知識や思考を基盤とする認知的実践であると共に情動に媒介された“情動の実践”でもある。教職専門性の言説分析を行った Hargreaves & Goodson(2005)は、教職専門性が認知的次元に収斂して論じられてきた点を批判し、今後は教職の情動的次元を認め、教師の経験世界へのさらなる探究を進める必要性を提起している。つまり、教師の経験世界、教職専門性への探究を進めるには、教師の知識や思考に情動がいかにか関与し影響を及ぼすのかを明らかにする必要があり、情動は教師の専門性開発や生徒との関わりにいかなる意味を有するのかを検討する必要がある。

教師の情動を検討したこれまでの研究では、授業において教師に生起する喜びや楽しさといった快情動が教師自身の情報処理や意思決定過程、教師の生涯学習や授業改善に向かう内発的動機づけを高めると指摘されてきた(Zembylas、 2004; Nias、 1989)。しかし、学校において生徒たちは成長し続け、学級内生徒の関係性も日々刷新され

(秋田・坂本、 2012)、教師は学級に応じて学習課題や教育方法を選択する必要がある(佐藤、 1997)。これらは授業の“不確実性”(Lortie、 1975)と呼ばれる教職の職業的特質であり、教師に恒常的な不安を生起させる。この恒常的な不安を払拭するために、例えば、学習課題や教育方法のマニュアルを追い求めたり、同一教科・学年教員で派閥を形成し画一的な授業を行ったりする教師がいる(Hargreaves、 1994)。その一方で、授業の不確実性から生起する不安を受容しながら、協働学習や探究学習といった新たな教育方法を取り入れ、授業実践に専心没頭する中で喜びや楽しさを豊かに経験する熟練教師も存在する(佐藤、 1997)。したがって、教師は個々人のパーソナリティ特性や熟達化の程度に基づきながら、恒常的な不安と瞬間的な喜びや楽しさという、授業の不確実性を起源とした異質的情動を経験し、これら情動が教師の実践を支え促すと推察される。

以上の課題を踏まえ、本研究では、教師が授業の不確実性を起源とする情動を教師がいかにか受容し意味づけ、新たな授業実践に挑戦可能となるのかを、教師のパーソナリティ特性、熟達度、学校組織の3側面から分析する。そして、教師の教育実践と専門性開発過程に情動がいかなる影響を及ぼすのかを明らかにすると共に、情動を媒介とした教師の専門性開発とそれを支え促す学校組織の在り方を統合した理論モデルの構築を目指す。

本研究の目的に従い、平成24年度には、(1)授業の不確実性に教師がいかにか立ち向かい、実践を改善し続けていくのか、(2)教師は授業実践に係わっていかにか不安を経験し、その不安にいかにか対処し、新たな授業実践に挑戦することが可能になるのか、の2点を検討課題に設定し調査を実施した。

## 研究の内容および成果

### 【調査 1 の内容および成果】

授業の不確実性に教師がいかに立ち向かい、実践を改善し続けていくのかを、中学校・熟練 O 教諭 1 名(50 代・教職歴 30 年)の授業改善過程とそこで生起する情動の分析から検討した。2 学級(A 組、B 組)で当該教師が行う同一単元授業 4 回の授業参観、授業直後に振り返りと情動の経験を尋ねる面接を実施し、さらに、2009 年度に教諭自身が執筆した同単元の実践記録も分析対象とした。

結果、2009 年度の実践記録、2 学級での授業 4 回(計 8 回)の授業展開、教師の授業方略を比較したところ、4 場面、2009 年度の実践記録、A 組授業、B 組授業に顕著な相違が見出された。該場面の教室談話の分析、教師の語りの分析を統合し、検討したところ、(1)教師は各学級生徒の特性や学習状況に応じながら、先行する授業での楽しさや驚き、悔しさ等の情動経験の省察に基づき授業を改善する、(2)教師の即興的思考は授業進行中に生起する喜びや楽しさ等の情動と授業後に回顧される(振り返りによる)相同的な情動により支えられている、の 2 点が明らかとなった。

この結果から、教師は先行する授業での情動の経験とそれに基づく省察により実践を改善・再構成しながら授業の不確実性に挑戦しており、授業の不確実性に対処する教師の即興的思考は、授業進行中に生起する多種多様な情動に支えられなが

ら、回顧的情動の最経験も支えられると示された。

### 【調査 2 の内容および成果】

調査 1 の結果を受け、教師は授業実践に係わっていかなる不安を経験し、その不安にいかに対処し、新たな授業実践に挑戦することが可能になるのかを、ベテラン教師 2 名(40 代・教職歴 20 年)と初任教师 2 名(20 代・教職歴 1 年)への面接調査に基づき、検討した。

分析の結果として生成された教師個人の授業改善志向モデルと学校組織の教職専門性開発モデルを統合した仮説的現象モデルを図 1 として示す。

ベテラン教師も初任教师も、自らの教材研究不足や生徒たちのテスト結果、学級生徒の個別具体的な特性に対して恒常的な不安を経験することが明らかとなった。それでも、教師たちは教材研究や授業準備の充実、生徒の心情・学級間関係性・家庭環境等への理解深化により不安を受容し、実践にあたっていることが示された。

さらに、学校が“学習する組織”としての機能を有し、同僚間で学び合うコミュニティが担保されること、地域や保護者による学校や教師への信頼が担保されること、の 2 現象が同時に達成されることにより、あらゆる教師が授業の不確実性から生起する不安に対処しながら、新たな授業実践に挑戦し易い、教職専門性開発学校が創造されると示唆された。

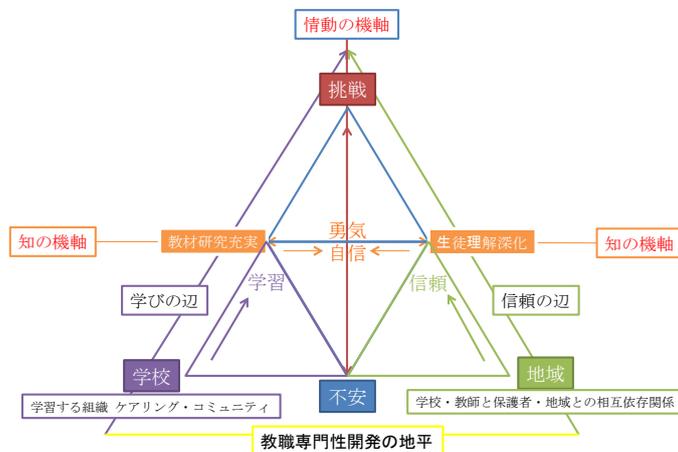


図 1 教師の授業改善志向とそれを支える学校組織モデル

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

木村 優 (2012) 教師の授業改善と即興的思考を支える情動の探究 -中学校教師が 2 学級で行う同一単元授業を事例として-、日本教育方法学会第 48 回大会発表要旨 105 頁。  
平成 25 年 8 月 日本教育心理学会第 55 回総会・シ

ンポジウム報告予定 (法政大学)

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・平成 25 年度科学研究費補助金・若手研究 B・研究課題：授業の不確実性を起源とする情動を媒介とした教師の専門性開発とそれを支える学校組織・代表・申請中

## 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」 大脳皮質と皮質下の神経核を結ぶ軸索走行制御機構の解明

研究代表者： 尾身 実（医学部・特命助教）

共同研究者： 佐藤 真（医学部・教授）、

猪口 徳一（子どものこころの発達研究センター・特命助教）

<b>概 要</b>	
	<p>皮質脊髄路は、主軸索を脊髄へ伸ばす一方、主軸索から上丘や橋核に向かって側枝を伸ばすことで複数の神経核に投射し、複雑な神経回路を形成する。本研究では、神経回路形成機構の理解のために、側枝形成の分子機構を明らかにすることを目的とする。橋核では側枝形成を促進する拡散性因子が産生されていることが強く示唆されていることから、本研究では、橋核が産生する因子の同定と、それらに対する受容体分子の同定を目指す。マイクロアレイ解析や <i>in situ hybridization</i> 法を行い、また文献検索や公開データベースを活用し、橋核が産生する因子の候補群と、皮質脊髄路に存在すると考えられる受容体分子の候補群を得た。これら候補因子に対してマウス胚を用いたノックダウン実験を網羅的に行い、側枝形成に関わる分子機構の解明を目指す。</p>
<b>関連キーワード</b>	<p>脳の発達、皮質脊髄路、神経回路形成、側枝形成</p>

### 研究の背景および目的

皮質脊髄路は大脳皮質からの主要な出力路である。皮質脊髄路は大脳皮質第Ⅴ層の神経細胞から伸長し、脊髄へと投射する。一方、皮質脊髄路の主軸索からは、上丘や橋核などの神経核に向かう側枝が形成される。このような側枝を形成することによって、皮質脊髄路は複数の神経回路を形成し、それらを協調的に制御することが可能となる。したがって、側枝の形成機構を明らかにすることは、脳の高次機能について解明していく上で極めて重要である。しかし、側枝の形成がどのような機構で誘導されるかについてはほとんど分かっていない。そこで、本研究では、側枝形成の分子機構を明らかにすることを目的とする。

側枝形成の機構については、過去に次のような研究がなされている。橋核と大脳皮質の外植体を共培養すると、大脳皮質より伸び出してきた軸索から、橋核の方向に向かって側枝が伸長することが分かっている。また、橋核神経細胞はもともと下菱脳唇部で発生し、橋核予定領域へと移動するが、この移動が阻害されると橋核神経細胞は異所

的にクラスターを形成する。このとき、皮質脊髄路からは、これら異所性の橋核細胞クラスターに向かって側枝が伸びていく。これらの研究結果は、橋核からは側枝の形成を促し、側枝を誘引する何らかの拡散性因子が産生・放出されていることを強く示唆している。

したがって本研究では、橋核において産生される側枝誘導因子の同定を行うことによって、側枝形成機構の分子実体を探ることを目指す。マイクロアレイ解析や *in situ hybridization* 法などを活用して、橋核から産生される側枝形成誘導因子の探索を行い、候補因子の絞り込みを行う。また、皮質脊髄路の神経細胞には、橋核からの因子と結合する受容体分子が発現している必要があることから、そのような因子の探索も同時に行う。橋核からの因子とそれに対する受容体分子の候補をそれぞれ絞り込み、候補分子群の過剰発現や機能欠損実験を行うことで、側枝形成誘導に関わる因子を同定し、側枝形成の分子機構を明らかにすることを旨とする。

### 研究の内容および成果

1. 橋核で産生される、側枝形成誘導因子の探索  
橋核で産生される側枝形成誘導因子は、側枝が形成される発生段階で、橋核において高いレベルで発現している可能性が高いと考えられる。そこで、マウス胚を用い、橋核とそれ以外の脳の領域（上丘、小脳、嗅球）で発現している遺伝子のマイクロアレイ解析を行い、橋核で特に強く発現している遺伝子の探索を行った。また、橋核で発現

する遺伝子のうち、側枝形成が起こる段階（マウス胎生 17.5 日から生後 1 日）にかけて強く発現している遺伝子の探索を行った。この 2 つの方針に基づいて、マウスの 28,868 個の遺伝子の中から候補遺伝子の絞り込みを行った。さらに、側枝形成誘導因子はシグナル分子として橋核神経細胞の細胞外に存在していると考えられるので、細胞外に分泌あるいは局在する性質のあるタンパク質

をコードする 75 遺伝子（分泌タンパク質を 24 種類、膜タンパク質を 27 種類、機能未知のタンパク質を 24 種類）を候補因子として見出した。続いて RT-PCR 法および in situ hybridization 法により候補因子の発現解析を行い、75 遺伝子のなかから、実際に橋核で発現が認められる遺伝子 6 種を絞りこんだ。まずこれら 6 候補について、マウス胚を用いた子宮内エレクトロポレーション法により、橋核神経細胞での過剰発現実験および shRNA によるノックダウン実験を行い、皮質脊髄路形成および側枝形成に対する影響を調べた。現在のところ、顕著な影響は観察されていないが、これら 6 種以外の候補とも併せて引き続き解析を行っていく。

## 2. 橋核で産生される側枝形成誘導因子に応答するための、皮質脊髄路で発現している受容体分子の探索

皮質脊髄路の軸索には、橋核が産生する側枝形成誘導因子に応答するための仕組みが備わっている必要があるが、その仕組みは橋核からの因子に反応する受容体分子によって担われていると考えられる。そこで、皮質脊髄路の神経細胞に強く発現する受容体分子の探索を行った。その際に、我々が独自に行ったマイクロアレイデータベースを用いるとともに、皮質脊髄路の神経細胞において発現している遺伝子に関する公共マイクロアレ

イデータベース（22,690 遺伝子の発現プロファイルを提供）を活用した。これらデータベースの中から、受容体分子や細胞外シグナル伝達に関わる遺伝子をまずピックアップした。次に、我々独自のマイクロアレイデータベースおよび文献情報を基に、橋核因子の候補を見出した。橋核形成に必要な遺伝子（Pax6 など）のノックアウトマウスにおいて発現が低下している遺伝子の中にも橋核因子が含まれていると考えられるので、それらもまた橋核因子の候補とした。そして、皮質脊髄路の神経細胞で発現している受容体分子群の中から、橋核因子候補をリガンドあるいは結合因子とするものを探索した。

現在、そのうちの 100 遺伝子を解析すべき対象として絞り込み、これら遺伝子に対する shRNA ライブラリーを入手し、子宮内エレクトロポレーション法によりマウス胚の大脳皮質に導入して、遺伝子の機能解析を網羅的に行っているところである。このように、側枝形成誘導に関わるシグナルの担い手と受け手の両面からの探索によって、側枝形成の分子機構の解明を進めている。

なお、本研究の共同研究者である猪口徳一は、皮質脊髄路側枝形成における微小管の動態制御機構に関する研究を行っている。本研究で得られる成果と併せて、側枝形成時に機能する分子メカニズムが明らかになると期待される。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

尾身実、渡邊裕二、仲村春和：Involvement of En-2 in tectal lamina formation in chick embryos、第 45 回日本発生生物学会、2012 年 5 月

尾身実、渡邊裕二、仲村春和：En2 はニワトリ胚視蓋の層形成に関与する、第 72 回日本解剖学会中部支部学術集会、2012 年 10 月

### 資金・研究助成への申請・獲得状況」

尾身実、科研費補 基盤研究(C)、「脳の虚血耐性に係わるパンコルチンの作用機序の解明」平成 25～27 年度、申請中

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」  
**K<sup>+</sup>チャンネルにおけるイオン選択性の理論的解析**

研究代表者： 炭竈 享司 (医学部・特命助教)

<b>概 要</b>	イオンチャンネルの重要な機能の一つに選択性がある。それにより K <sup>+</sup> チャンネルは静止膜電位を形成し、細胞のシグナル伝達に関わっている。最近、選択性の喪失が高血圧の原因となることも分かって来ており、その機構の解明は医学とも深い関わりを持つようになって来ている。従来の測定では K <sup>+</sup> チャンネルの選択性は高いと考えられて来ていたが、近年の研究はそれほど高くないことを示しており、選択性の原理の解明には「そもそも選択性とは何か？」という根源的な問への回答が必要である。本研究では、まず、近年の研究の条件でのイオン透過の様子をコンピュータシミュレーションにより調べ、それと従来の測定を繋ぐ理論を構築した。その結果、K <sup>+</sup> チャンネルはイオン種をそれほど選択出来なくても、その内に複数のイオン結合部位を持つことで、深い静止膜電位を形成することが可能であることを解明した。
<b>関連キーワード</b>	イオンチャンネル、K <sup>+</sup> チャンネル、選択性、分子動力学、高血圧

### 研究の背景および目的

イオンチャンネルは、神経細胞において活動電位を発生させ、シグナル伝達を行う膜タンパク質である。イオンチャンネルはある種のイオンだけを透過させることで、その機能を発揮する。例えば、K<sup>+</sup>チャンネルは、Na<sup>+</sup>に比べK<sup>+</sup>を約1000倍の高い比により選択的に透過させると考えられており、これをイオン選択性と言う。この選択性により、K<sup>+</sup>チャンネルは細胞の静止膜電位を形成している。静止膜電位の喪失、すなわち K<sup>+</sup>チャンネルにおける選択性の喪失は、2次性高血圧症中の原発性アルドステロン症の原因となっていることが最近分かって来ており、選択性の機構の解明は基礎医学のみならず臨床医学とも直結して来ている。

選択性の原理に関して、最も広く受け入れられている説明はいわゆる snug-fit モデルであり、現在の生物学の教科書はこのモデルに基づいて説明している。これは、K<sup>+</sup>チャンネルのイオンの通り道の中で最も狭くなっている部分（選択性フィルター）に、K<sup>+</sup>は上手く結合出来るが Na<sup>+</sup>は出来ない、という説明である。1998年のMacKinnonらによるK<sup>+</sup>チャンネルのX線結晶構造解析では、水溶液中で好む8配位構造を取ってK<sup>+</sup>が選択性フィルターに結合する様子が観測されており、そこではNa<sup>+</sup>が好む6配位構造を取れないことが分かった。したがって、snug-fit説に確定したかのように思われている。

しかし、近年、様々な手法により snug-fit モデルを覆すデータが得られて来ている。1) X線結晶構造解析により選択性フィルター内にNa<sup>+</sup>が入っている様子が観測され、水溶液中で好む6配位構造を取り得る。2) punch through 法という電気生理学的測定から、Na<sup>+</sup>もかなりの割合 (1/6 から 1/30)

で K<sup>+</sup>チャンネルを通過している、つまり元来選択性はそれほど高くないという間接的証拠が得られている。3) コンピュータシミュレーションによる理論的研究も、選択性フィルター内にNa<sup>+</sup>が入り得ることを示し、その結果は上述したNa<sup>+</sup>の入ったX線結晶構造を支持する。

このように選択性に関する研究は混迷しているが、その機構の解明には選択性の定義、あるいは測定の仕方から考え直す必要がある。前述した1000倍という高い選択性は、K<sup>+</sup>とNa<sup>+</sup>の逆転電位（細胞外からNa<sup>+</sup>が流入し始める電位。細胞においては静止膜電位にほぼ一致する）の測定によって選択性が定義されているが、これは K<sup>+</sup>チャンネルが生体内におけるようにイオンを「選択」することによる定義ではない。一方、punch through 法による実験は「選択」によって定義している。つまり、選択性の高低はその定義の問題であり、測定された数値が何を意味するのかを考え直す必要がある。

そこで本研究では、分子動力学法によるコンピュータシミュレーションを用いて、K<sup>+</sup>チャンネルが実際にイオンを「選択」している様子を観測することを目的とした。分子動力学法によるシミュレーションは、極めて高い時間・空間分解能を持つ顕微鏡による観察と言って良い。したがって、イオンが選別されている様子を原子レベルで見ることが出来るため、選択性の研究に最適な手法の一つである。さらに、逆転電位と punch through 法による測定、つまり選択性の定義が変わった時に、その高低に差が生じるのは何故か？という間に答えることも本研究の目的とした。

### 研究の内容および成果

K<sup>+</sup>チャンネルにおけるイオン透過の軌跡を分子動力学法を用いたコンピュータシミュレーション

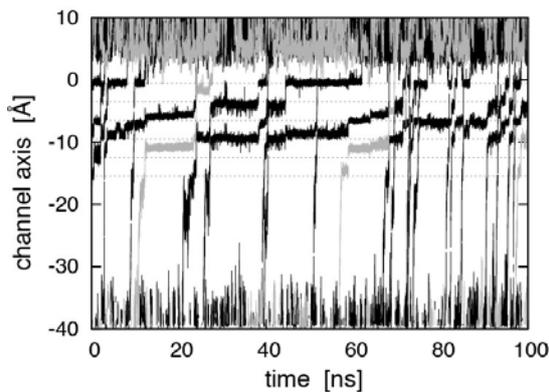


図1. イオンの K<sup>+</sup>チャンネル (Kv1.2) を通る軌跡。縦軸を K<sup>+</sup>チャンネルを通る軸、横軸を時間としてプロットした。紙面上が細胞外であり、下が細胞内である。K<sup>+</sup>は黒で、Na<sup>+</sup>は灰色で示した。K<sup>+</sup>チャンネルの入口は-30 Å にあり、-15 Å から 0 Å の領域が選択性フィルターである。選択性フィルター内でのK<sup>+</sup>の結合サイトは点線で示した。この軌跡は、実際の計算時間 (0.8 μs) の一部である。

によって計算し、図1に示した。この計算は punch through 法による実験に対応したものとなっている。すなわち、細胞内溶液が K<sup>+</sup>と Na<sup>+</sup>の混合溶液となっており、そこからそれぞれのイオンが細胞外溶液に透過する、まさに K<sup>+</sup>チャンネルによってイオンが「選択」されている様子を観測している。

図1からは、K<sup>+</sup>に混じって、Na<sup>+</sup>もたびたび透過していることが分かる。K<sup>+</sup>は選択性フィルター内ではその結合部位 (点線) に主に滞在しつつ透過して行くが、Na<sup>+</sup>は K<sup>+</sup>の結合部位の中間 (点線の間) に滞在していることが分かる。この Na<sup>+</sup>の結合構造は、近年解かれた Na<sup>+</sup>の入った X線結晶構造と同じである。

本研究によれば、透過した Na<sup>+</sup>の割合は 1/4.7 であり、punch through 法による実験結果と近い値であった。つまり、K<sup>+</sup>チャンネルはそれほどイオンを「選択」していないことになる。すると、K<sup>+</sup>チャンネルはイオンをそれほど選択出来ないにも関わらず、如何にして静止膜電位を保持しているのか、つまり

逆転電位を高く保っているのか? という疑問が浮かぶ。この謎を解明するには、これら2つの方法の測定の違いは何か? を明らかにする必要がある。

これまで述べて来たように、punch through 法による測定の意味は分かりやすい。細胞内溶液からそれぞれのイオンが K<sup>+</sup>チャンネルに「選択」され、細胞外に輸送される割合はいくらか? である。これは、それぞれのイオンの K<sup>+</sup>チャンネルへの入りやすさ、いわゆる速度定数 ( $k_K, k_{Na}$ ) の比を測定したものである。換言すれば、punch through 法は、細胞内から細胞外溶液の一方向のイオンの流れの中で、どちらのイオン種がより通り易いかを測定している。一方、逆転電位の測定では、細胞内に K<sup>+</sup>溶液を、細胞外に Na<sup>+</sup>溶液を配し、Na<sup>+</sup>が細胞外から流入し始める電位はいくらかを調べている。つまり、双方向からの異種イオンの流入のせめぎ合いを測定したものである。

ところで、K<sup>+</sup>チャンネルにはイオンの結合部位が複数あり、図1に見られるように、その中の2つをイオンが占有しつつ透過する。つまり、結合部位の数を  $n$  とした時、あるイオンが実際に反対側の溶液まで輸送されるには  $n + 1$  回の「連続した」イオンの輸送が起きる必要がある。そうでなければ、イオンは反対側からのイオンの流束に押し返され、元来た溶液に戻されるだけである。これを考慮に入れ逆転電位 ( $E_{rev}$ ) を求める式を作ると、次のようになる。

$$E_{rev} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{k_{Na}}{k_K} \right)^{n+1}$$

ここで  $R, T, z, F$  はそれぞれ気体定数、絶対温度、イオンの価数、ファラデー定数である。この式を用いて計算された逆転電位は 117 mV となり、実測値 (115 mV) に極めて近い。

このように本研究は、K<sup>+</sup>チャンネル自身はイオンをそれほど「選択」していないことを明らかにした。新たな理論は、K<sup>+</sup>チャンネルは、それにも関わらず、複数のイオンをその中に含有することで、細胞外からの Na<sup>+</sup>の流入を押し止め、それにより静止膜電位を形成していることを解明した。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

“The Open Gate Structure of the Membrane-Embedded KcsA Potassium Channel Viewed From the Cytoplasmic Side” Ayumi Sumino, Takashi Sumikama, Masayuki Iwamoto, Takehisa Dewa, and Shigetoshi Oiki, *Sci. Rep.* **3**, 1063 (2013).

“Dependency of Ion Permeation Pattern on K<sup>+</sup> Concentration through the Kv1.2 Channel”

Takashi Sumikama, Shinji Saito, and Shigetoshi Oiki, *Biophys. J.* **104**, 123a (2013).

### 「特記事項」

なし

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費助成事業 若手研究 B 平成 25-26 年  
「カリウムチャンネルにおけるイオン選択性機構の解明」  
代表 申請中 500 万円

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」

## 薬剤処理による間葉系幹細胞からの ステロイドホルモン産生細胞の創出

研究代表者：河邊 真也（医学部・特命助教）

<b>概要</b>	ステロイドホルモン産生異常症は、ステロイドホルモン産生器官である生殖腺や副腎の機能不全により発症し、性分化異常や死に繋がる重篤な症状を示す。治療法としては従来、ホルモン補充療法が用いられてきたが、継続的に投与する必要性に加えて、副作用が存在することから、これに代わる治療法の開発が熱望されている。本研究は、ステロイド産生細胞分化のマスター転写因子 LRH-1 に着目し、薬剤処理等により内因性 LRH-1 の発現を誘導し、遺伝子導入に依らずに幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導を可能にする技術確立を目標とし、LRH-1 誘導剤の探索および LRH-1 遺伝子の遠位エンハンサー領域の同定を行った。Mithramycin A および PMA 処理により内因性 LRH-1 の発現レベルが増強された。また、転写共役因子 PGC-1 $\alpha$ に応答するエンハンサー領域を同定した。今後は、LRH-1 のプロモーター/エンハンサー領域を薬剤処理等で刺激し、幹細胞分化誘導技術の開発に繋げる。
<b>関連キーワード</b>	LRH-1、SF-1、ステロイドホルモン産生、幹細胞、分化誘導

### 研究の背景および目的

哺乳類の主要なステロイドホルモン産生器官は生殖腺および副腎であり、これら器官の機能不全によるステロイドホルモン産生異常症は、性分化異常や、死に繋がる重篤な症状を示す。このステロイド産生異常症には、従来、ホルモン補充療法が用いられてきたが、継続的に投与を続ける必要性に加えて副作用が存在することから、これに代わる治療法の開発が熱望されている。これまでに我々は、ステロイド産生細胞分化のマスター転写因子である Steroidogenic factor-1 (SF-1) または Liver receptor homolog-1 (LRH-1) を幹細胞へ安定導入することで、ステロイド産生細胞への分化に成功している。しかし、これは幹細胞へ遺伝

子導入を行うことから、細胞の癌化のリスクが残る。転写因子 LRH-1 は、肝臓、膵臓、卵巣において非常に多く発現している。私どもはこれまでに、LRH-1 の卵巣特異的な転写開始点 (exon 2o) とプロモーター領域を同定し、転写因子 SF-1 と Sp-family により卵巣特異的に LRH-1 の転写が調節されていることを明らかにしてきた。本研究では、薬剤処理等により内因性 LRH-1 の発現を誘導し、遺伝子導入に依らずに幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導を可能にする技術確立を目標とし、卵巣型 LRH-1 の①誘導剤探索、②遠位エンハンサー領域の同定を目的とした。

### 研究の内容および成果

#### ①内因性 LRH-1 の誘導剤探索

将来、幹細胞において内因性の LRH-1 を薬剤誘導させるための基礎研究として、卵巣顆粒膜細胞由来の KGN 細胞を用いて研究を実施した。プロテインキナーゼ C を活性化させるホルボールエステルである PMA は、MEK-ERK 経路を介して転写因子 LRH-1 を活性化させることが報告されている。前年度までの研究により、私どもは、顆粒膜細胞において LRH-1 が自らのプロモーター領域を正に制御するポジティブフィードバック機構が存在することを見出している。そこで、PMA を用いて、LRH-1 の活性化を介した LRH-1 遺伝子の発現増強を試みた。その結果、PMA により LRH-1 は、25-100 nM の範囲で濃度依存的に mRNA レベルで発現増強されることを見出した。また、抗癌剤の一種である Mithramycin A を細胞へ低濃度処理することによっても、LRH-1 遺伝子の発現が増強された。今後は、

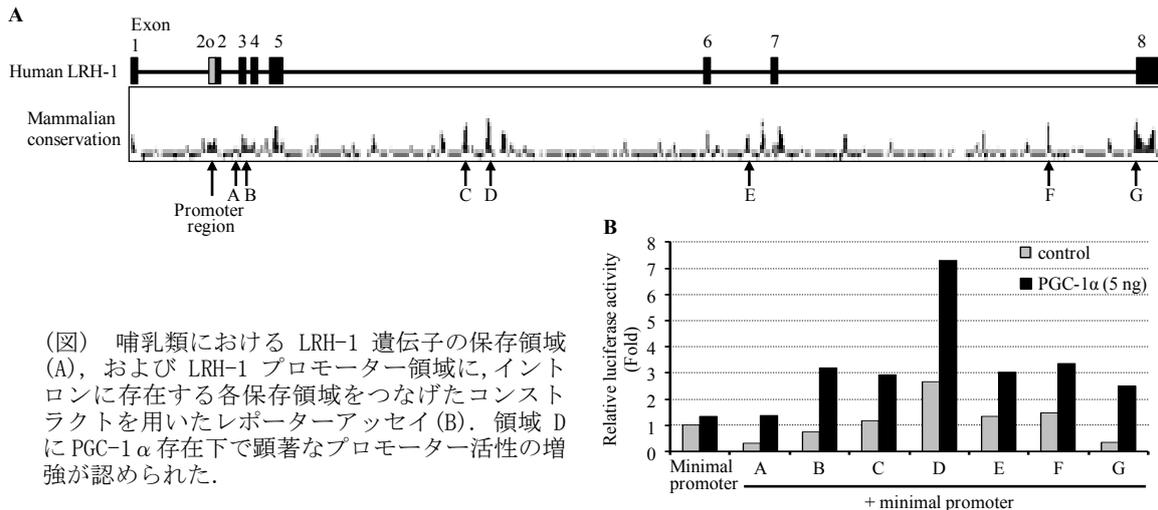
幹細胞を用いて、LRH-1 誘導剤の条件検討を行うと共に、その機序を明らかにする予定である。

#### ②LRH-1 の遠位エンハンサー領域の同定

従来型 LRH-1 のプロモーター領域は exon 1 上流に、そして卵巣型 LRH-1 のプロモーター領域は exon 2o 上流に存在する。卵巣顆粒膜細胞においては、核内受容体の転写共役因子 PGC-1 $\alpha$  を過剰発現させると LRH-1 の発現が増強されるが、その機序は不明である。そこで、PGC-1 $\alpha$  への応答性を指標として、PGC-1 $\alpha$  の制御下にある遠位エンハンサー領域の同定を試みた。ヒト LRH-1 遺伝子は、ゲノム DNA 上に約 150kb にわたり 8 つのエキソンにより構成されているが、エキソン以外にも哺乳類間で高度に保存されている領域が存在する (図 A)。他の生物間で高度に保存されており、核内受容体の結合配列が存在するイントロン領域として領域 A-G を選別した。LRH-1 の卵巣型プロモーターと領域

A-Gをつなげ、KGN細胞においてレポーターアッセイを行った。その結果、PGC-1 $\alpha$ 存在下でプロモーター活性を顕著に増強する領域として領域D(約1.4 kb)を同定した(図B)。また、LRH-1の卵巣型プロモーター活性は、転写因子SF-1とPGC-1 $\alpha$ により相乗的に増強されることを見出した。これらの結果は、LRH-1遺伝子は、SF-1とPGC-1 $\alpha$ によりプロモーター/エンハンサー領域を介して、協調

的な作用により卵巣顆粒膜細胞特異的に転写調節されていることを強く示唆している。今後は、エンハンサー領域D内に存在する転写因子結合配列を同定し、PGC-1 $\alpha$ と協調的に働く転写因子を明らかにする予定である。また、これらの知見を基にして、LRH-1のプロモーター/エンハンサー領域を薬剤処理等で刺激し、幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導技術の開発に繋げる。



(図) 哺乳類における LRH-1 遺伝子の保存領域 (A), および LRH-1 プロモーター領域に、イントロンに存在する各保存領域をつなげたコンストラクトを用いたレポーターアッセイ (B)。領域 D に PGC-1 $\alpha$  存在下で顕著なプロモーター活性の増強が認められた。

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

- Ju, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Yazawa, T., Matsumura, T., **Kawabe, S.**, Kanno, M., Umezawa, A., Kangawa, K., Miyamoto, K.: Nuclear receptor 5A (NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology* 153, 5522-5534 (2012)
- Yazawa, T., **Kawabe, S.**, Kanno, M., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Shimada, M., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Androgen/Androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 369, 42-51 (2013)
- Kawabe, S.**, Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M., Miyamoto, K.: A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 154, 1648-1660 (2013)

- Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., **Kawabe, S.**, Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 370, 1-10 (2013)
- 水谷哲也, 今道力敬, **河邊真也**, 矢澤隆志, 宮本 薫: 卵巣における遺伝子発現とその調節メカニズム. 日本生殖内分泌学会雑誌. 17, 11-16 (2012)

#### 「特記事項」

第37回日本比較内分泌学会若手研究者最優秀発表賞受賞・**河邊真也**「卵巣顆粒膜細胞における転写因子 Sp ファミリーおよび SF-1 による LRH-1 の転写制御」

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 若手研究 (B)・平成 23 年度～平成 24 年度・代表・採択・「転写因子 LRH-1 による黄体ホルモン産生の分子機構解明」
- 若手研究 (B)・代表・申請中「エピジェネティクスを利用したステロイドホルモン産生細胞分化誘導技術の開発」

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」  
**ステロイドホルモン産生細胞における FDXR 遺伝子の  
 エピジェネティクス制御**

研究代表者： 今道 力敬（医学部・特命助教）

概 要	
転写因子 SF-1 は、性腺や副腎においてステロイドホルモン合成遺伝子の発現を制御すると共に性腺や副腎の発生・分化に必須となる転写因子である。我々は、SF-1 新規標的遺伝子の網羅的な探索を行い、その候補遺伝子として FDXR を見出した。FDXR は、ミトコンドリア型シトクロム P450 酵素群に電子を伝達するフラビンタンパク質であり、ステロイドホルモン合成をはじめ、胆汁酸合成、ビタミン D 代謝など、多様な合成・代謝機構において機能する。FDXR は特に性腺および副腎で高発現しているが、その転写制御機構に関しては不明であった。そこで本研究では、ステロイドホルモン産生細胞における FDXR の転写制御機構の解明を試みた。その結果、ステロイドホルモン産生細胞において FDXR の転写は、イントロンに存在する SF-1 結合領域により活性化されることが明らかとなった。	
関連キーワード	FDXR、SF-1、分化、ヒストン修飾

### 研究の背景および目的

ステロイドホルモンは、シトクロム P450 酵素 (P450) および水酸化ステロイド脱水素酵素によりコレステロールから合成される。副腎、卵巣、精巣においては、ステロイドホルモン合成遺伝子の多くが転写因子 steroidogenic factor-1 (SF-1) により転写制御されている。我々は、遺伝子導入により幹細胞からステロイドホルモン産生細胞へと分化誘導する系を確立している。この分化誘導系をモデルとして、SF-1 によって転写制御される新たな標的因子の網羅的な探索を行ってきた。ChIP-on-chip 法およびマイクロアレイ法を併用した網羅的解析の結果、複数の SF-1 新規標的遺伝子を見出した。本研究では、そのうち ferredoxin reductase (FDXR) に注目した。

FDXR は、ミトコンドリアに存在するフラビンタンパク質であり、鉄硫黄タンパク質 ferredoxin と協調することで、ミトコンドリア型 P450 に対して、酵素活性に必要となる電子を伝達する。細胞質や小胞体といったマイクロソーム画分においては、cytochrome P450 oxidoreductase (POR) がマイクロソーム型 P450 に電子を伝達する。POR は、骨変形、副腎不全、尿道下裂や停留精巣などの生殖腺

病変といった病態を引き起こす先天性疾患の責任遺伝子として知られている (チトクロム P450 オキシドレダクターゼ異常症)。この先天性疾患は POR のコーディング領域の変異およびプロモーター変異により引き起こされることが明らかとなっている。一方、ミトコンドリア型 P450 の酵素活性に必須である FDXR に関しては、今のところ疾患との関連性が明らかとなっていない。

FDXR はステロイドホルモン合成のみならず、胆汁酸合成、ヘム合成、ビタミン D 代謝などに多様な合成・代謝経路において機能することが知られている。FDXR は各組織にユビキタスに発現しているが、特に副腎、卵巣、精巣といったステロイドホルモン産生組織に高発現している。しかしながら、FDXR の組織特異的な転写制御機構に関してはこれまでのところ不明であった。

本研究では、SF-1 が転写活性化因子として FDXR 遺伝子の発現を直接制御するのか、また SF-1 によって FDXR 遺伝子近傍ゲノム領域のクロマチン構造変換が引き起こされるのか明らかにすることで、組織特異的な FDXR 遺伝子の転写制御メカニズムの解明を試みた。

### 研究の内容および成果

#### (1) 幹細胞誘導系を用いた SF-1 結合領域の同定

我々は以前より、ヒト間葉幹細胞への SF-1 導入により、ステロイドホルモン産生細胞を創出することに成功している。SF-1 導入前後のヒト間葉幹細胞における FDXR 遺伝子発現変化を解析したところ、SF-1 導入に伴う遺伝子発現の著しい上昇が認められた。また、この幹細胞誘導系を用いて SF-1 結合領域をクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) によ

り解析したところ、FDXR 遺伝子イントロン 2 に相当する領域に SF-1 の結合が認められた。この領域には、推定上の SF-1 結合配列が存在したため、EMSA 解析を行った結果、SF-1 の結合が確認された。続いて、HeLa 細胞および SF-1 発現ベクターを用いた luciferase assay による解析を行ったところ、SF-1 結合領域に転写活性が認められた。これらの結果により、イントロン領域に存在する SF-1 結合領域

はエンハンサー活性を有することが示唆された。

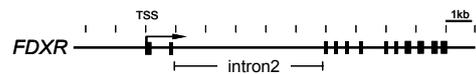
**(2) 卵巣顆粒膜細胞腫由来 KGN 細胞および副腎腫由来 H295R 細胞を用いた解析**

内因性に SF-1 を発現している H295R 細胞および KGN 細胞を用いて luciferase assay を行ったところ、両細胞株において FDXR 遺伝子イントロン 2 に存在する SF-1 結合領域に高い活性が認められた。次に、H295R 細胞の内在性 SF-1 を安定的にノックダウンした細胞を樹立し、FDXR の発現変化について解析した。その結果、FDXR 遺伝子およびタンパク質の発現はともに低下していた。さらに、アデノウイルスにより SF-1 を KGN 細胞に過剰発現させたところ、FDXR 遺伝子およびタンパク質の発現は共に上昇した。これらの結果により、FDXR の発現は SF-1 によって直接促進されることが示唆された。

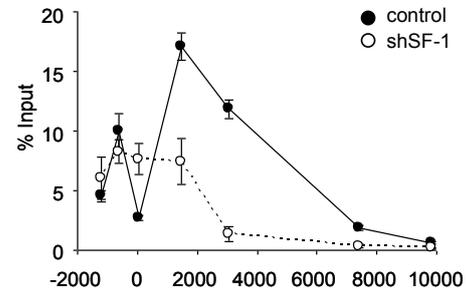
**(3) SF-1 ノックダウンによる FDXR 遺伝子領域のクロマチン構造の変化**

SF-1 ノックダウンに伴う FDXR 遺伝子近傍ゲノム領域のクロマチン構造の変化を、抗ヒストン抗体を用いた ChIP 法を用いて解析した。実験には、shRNA により内在性 SF-1 を安定的にノックダウンした H295R 細胞を用いた。またヒストン修飾の ChIP 解析には、活性化エンハンサーのマーカーであるヒストン h3 のリジン 27 番目アセチル化 (H3K27Ac) に対する抗体およびヒストン h3 のリジン 4 番目メチル化 (H3K4Me2) に対する抗体を用いた。ChIP 解析の結果、SF-1 ノックダウンに伴い、FDXR 遺伝子イントロン 2 の領域を中心として H3K27Ac および H3K4Me2 シグナルの低下が認められた (図 1)。

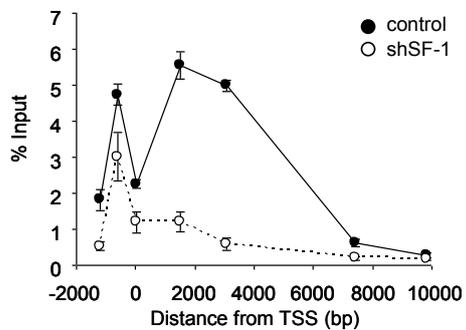
以上の結果により、ステロイドホルモン産生細胞においては FDXR 遺伝子イントロン 2 に存在する SF-1 結合領域がエンハンサーとして機能し、FDXR 遺伝子の転写を促進することが明らかとなった。



**(A) H3K27Ac**



**(B) H3K4Me2**



**図 1. SF-1 ノックダウンによる FDXR 遺伝子近傍ゲノム領域のヒストン修飾の変化。**

FDXR 遺伝子の転写開始点 (TSS) 前後のゲノム領域に対して (A) ヒストン H3K27Ac に対する抗体および (B) ヒストン H3K4Me2 に対する抗体を用いた ChIP 解析を行った。図 1 の上段は、FDXR 遺伝子のエクソン・イントロン構造を示す。ChIP 解析の結果、イントロン 2 領域を中心として、SF-1 ノックダウン (shSF-1) に伴う H3K27Ac および H3K4Me2 シグナルの低下が認められた。

**本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況**

**「主な発表論文等」**

Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Matsumura T, Kawabe S, Kanno M, Yazawa T and Miyamoto K. Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. Mol. Cell. Endocrinol. 2013 Feb.  
 Ju Y, Mizutani T, Imamichi Y, Yazawa T, Matsumura T, Kawabe S, Kanno M, Umezawa A, Kangawa K, Miyamoto K. Nuclear receptor 5A(NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1(ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. Endocrinology. 2012 Nov. 153(11):5522-5534.  
 他、共著 2 報

**「特記事項」**

国際学会発表 2 件  
Imamichi Y, et al. Transcriptional regulation of ferredoxin reductase in steroidogenic cells. Endo 2012. Houston, USA. June, 2012.  
Imamichi Y, et al. Transcriptional regulation of human FDXR gene by the transcription factor SF-1. 15th ICHSHC. Kanazawa, Japan. Nov, 2012.

**「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」**

科学研究費補助金 若手研究 (B)  
 研究代表者：今道力敬  
 卵巣発育および黄体形成における SF-1 新規標的遺伝子の機能解析

## 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」 細胞内ムスカリン受容体の動態制御メカニズムの解明 およびストレスの影響

研究代表者： 宇和田 淳介（医学部・助教）

<b>概 要</b>	
	ムスカリン M1 受容体の細胞表面と細胞内との局在制御メカニズムは、細胞外からのアセチルコリンを受容する機能的 M1 受容体の量的制御とともに、近年明らかになりつつある機能的細胞内 M1 受容体の制御にも関わる。またこれはストレスによる影響を受ける動的な機構であり、病態との関連も示唆されている。本研究では、ムスカリン M1 受容体が細胞表面から恒常的に細胞内に移行することを明らかにした。これは他のムスカリン受容体サブタイプでは観察されず、特異的な制御機構の存在が示唆された。またこの細胞内移行が C 末端細胞内領域を介したものであることも突き止めた。今後は、この C 末端ドメインと細胞内移行を繋ぐメカニズムを明らかにすることにより、ストレスによって M1 受容体の局在量の変化が起こる原因が明らかになると期待される。
<b>関連キーワード</b>	ムスカリン受容体、G タンパク質共役型受容体、アセチルコリン、受容体輸送

### 研究の背景および目的

ムスカリン受容体は、アセチルコリンを神経伝達物質とする G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である。M1~M5 の 5 つのサブタイプが知られており、このうち M1 受容体は脳皮質や海馬といった中枢神経系に多くの発現が見られ、学習・記憶といった高次脳機能に関わることが知られている。

GPCR は、基本的に合成された後に細胞膜に輸送され、細胞表面で細胞外からのシグナルを受け取ることによって機能を発揮する。その為、機能的な GPCR の量は、その合成量と、細胞膜への輸送量によってコントロールされていると言える。興味深いことに、神経細胞におけるムスカリン受容体の局在を調べた研究によると、M2、M3 サブタイプはそのほとんどが細胞表面に局在が見られるが、M1 サブタイプは細胞表面とともに細胞内にも一定量存在することが報告されている。

我々の研究室において開発された組織片結合実験法による薬理学的な解析によってラットのムスカリン受容体の量を検討したところ、脳皮質・海馬といった中枢神経系組織において 50%近い量の M1 受容体が細胞内に局在することが明らかになった。これは他のムスカリン受容体サブタイプでは見られず、また他の末梢組織においてはこの細胞内 M1 受容体は確認されなかった。このよう

に、M1 受容体は他のムスカリン受容体サブタイプとは異なる制御機構を有し細胞表面と細胞内の量がコントロールされていると考えられるが、そのメカニズムは明らかになっていない。更に、この細胞内 M1 受容体の量は、ラットに対し拘束ストレスを与えることによって減少することが分っており、病態との関連も予想されている。

以上のような細胞内に局在する M1 受容体は、単なる細胞表面における受容体量を制御する為の予備的な存在に留まらず、それ自体が機能性を有することも明らかになってきている(Uwada et al., 2011, *J Neurochem*)。我々の研究によって明らかになってきた細胞内 M1 受容体の機能は細胞表面の M1 受容体とは異なるシグナリング経路に依存するものであり、神経細胞に於いては細胞表面と細胞内の M1 受容体を使い分けられることによって記憶や学習といった脳高次機能が制御されている可能性が示唆されている(現在投稿中)。その為、ストレス等による細胞内 M1 受容体量の変化は、神経細胞のアセチルコリンに対する応答性の変化、ひいては学習・記憶などにも影響を与える可能性が示唆されている。そこで本研究では、M1 受容体が細胞内に局在する分子機構を明らかにするとともに、ストレス等によって減少する原因に迫ることを目的として行われた。

### 研究の内容および成果

M1 受容体の発現プラスミドをマウス神経芽細胞腫の N1E-115 細胞に導入すると、免疫染色により細胞膜とともに細胞内に M1 受容体が蓄積した様子を確認できる。別のムスカリン受容体サブタイプである M2、M3、M4 では同様の細胞内への

蓄積は起こらない。細胞内小器官のマーカーとの局在の比較によって M1 受容体が細胞内のどこに蓄積しているかを調べたところ、トランスゴルジネットワークのマーカー分子である TGN38 と高い共局在性を示した。このことから M1 受容体は

他のサブタイプにはない、何らかのメカニズムによって細胞内トランスゴルジネットワークに蓄積していると予想される。

受容体が細胞内に局在する機構としては、細胞膜上へと輸送する過程での特定の細胞小器官への蓄積と、細胞膜上に輸送された後に細胞内への移行する機構が考えられる。細胞内の M1 受容体が一度細胞膜に輸送された後のものなのかどうかを明らかにする為に、細胞外側に位置する N 末端領域にエピトープタグを融合させた M1 受容体を細胞に発現させ、細胞表面の M1 受容体をエピトープタグに対する抗体でラベルした後の動態を免疫染色によって調べた。すると、抗体ラベルして 37°C で培養した 30 分後には多くの M1 受容体が細胞膜から細胞内へ移行している様子が観察された (図 A)。この細胞内移行はアセチルコリンなどのリガンド刺激に依存しないため、M1 受容体が恒常的に細胞内に取り込まれていることを示している。同じような細胞内移行は他のムスカリン受容体サブタイプでは起こらなかった。

M1 受容体がどのようなメカニズムで細胞内に移行しているかを、各種阻害剤処理や関連タンパク質のドミナントネガティブ変異体との共発現により調べたところ、Dynamain および Clathrin 依存的にこの恒常的細胞内移行が制御されていることが分かった。この機構は GPCR をアゴニストで刺激した時に起こる細胞内移行、脱感作と同様である。しかしながら、この GPCR 脱感作は  $\beta$ -arrestin によって選択的に行われるため、そのドミナントネガティブ変異体との共発現によって抑制されるが、M1 受容体の恒常的細胞内移行は、その変異体との共発現によって阻害されなかった。その為、M1 受容体の恒常的細胞内移行は、通常の

GPCR 脱感作機構とは異なる機構によって選択的に行われていることが示唆された。

次に M1 受容体の細胞内移行に重要な領域の絞り込みをおこなった。その結果、M1 受容体の C 末端細胞内領域を M3 受容体のそれと交換することで、細胞内移行が消失することが分かった。逆に M3 受容体の C 末端を M1 受容体に交換すると恒常的に細胞内移行するようになった。つまり M1 受容体の C 末端領域に恒常的細胞内移行に必須の領域があることが明らかになった。更に重要な部位を詳細に解析するために C 末端の点変異体を順次作製していったところ、442 番目のトリプトファンと 445 番目のイソロイシンが必須であることが明らかになった (図 B)。おそらく何らかの因子がこれらのアミノ酸を認識して結合し、M1 受容体の恒常的細胞内移行を制御していると考えられる。更に、これらアミノ酸を変異させた M1 受容体は、他のムスカリン受容体サブタイプと同様に、細胞内には局在せず、ほぼ全て細胞表面に存在するようになることから、恒常的細胞内移行が M1 受容体の細胞内局在性に必須であることが示唆された。

以上のように、本研究はムスカリン M1 受容体が細胞表面から恒常的に細胞内に移行することを示し、それが C 末端細胞内領域を介したものであることを初めて明らかにした。今後は、この C 末端ドメインと細胞内移行を繋ぐメカニズムを明らかにし、その制御機構が動物個体に対するストレスに対して、どのような影響を受けるのかを明らかにすることによってストレスによる細胞内 M1 受容体の減少の原因が明らかになると期待される。

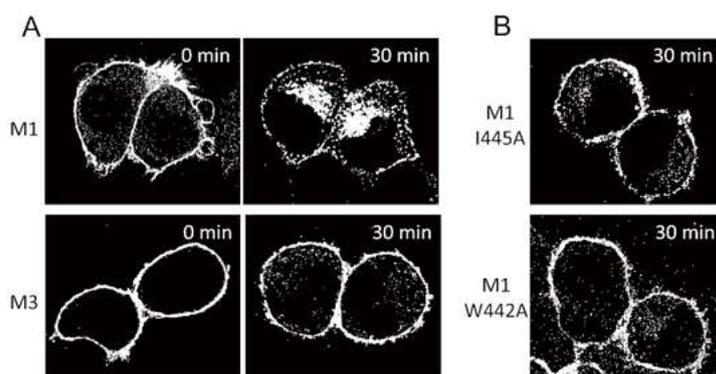


図 A: M1、M3 受容体の細胞外領域に位置する N 末端に Myc タグを融合したものを N1E-115 細胞に発現させ、4°C で Myc 抗体による標識を行い、37°C で 30 分培養した後に、免疫染色を行った。

図 B: M1 受容体の C 末端変異体について同様の観察を行った結果。

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

上記内容に基づいた論文を投稿準備中

局在性ムスカリン M1 受容体の機能制御に関する研究」申請中

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・学術研究助成基金助成金・若手研究(B)・平成 25-26 年「神経細胞における細胞内

## 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」 網膜におけるミトコンドリア軸索輸送 *in vivo* イメージング

研究代表者： 瀧原 祐史（医学部・助教）

共同研究者： 稲谷 大（医学部・教授）、江藤 圭（生理学研究所）、井上俊洋（熊本大学・講師）、岩尾圭一郎（熊本大学）、高村佳弘（医学部・准教授）、鍋倉淳一（生理学研究所・教授）、谷原秀信（熊本大学・教授）

概 要
本研究目的は緑内障モデル、加齢マウス網膜におけるミトコンドリア軸索輸送変化を <i>in vivo</i> で観察することである。方法として、2光子顕微鏡を用いて、網膜神経節細胞(RGC)のミトコンドリア軸索輸送を撮影した。緑内障モデルとしてレーザー誘発高眼圧症モデルを用いた。その結果、 <i>in vivo</i> の、マウス網膜において、ミトコンドリアは軸索内に活発に輸送されていた。緑内障モデルで、レーザー後3日目にRGC密度の有意な減少はなかったが、14日目では有意に減少した。対照群のミトコンドリア輸送数、軸索輸送されるミトコンドリア長に比して、レーザー後3日目の輸送数、ミトコンドリア長は減少した。12ヶ月齢の加齢マウスでは、4ヶ月齢マウスに比して、ミトコンドリア輸送数は減少しなかったが、ミトコンドリア長は短縮した。
関連キーワード
緑内障、 <i>in vivo</i> イメージング、軸索輸送、ミトコンドリア、中枢神経系

### 研究の背景および目的

#### 研究の背景

現在の緑内障診療の問題点は緑内障の進行の個人差が大きく、進行予測が困難であることである。緑内障性視神経症の本質は眼圧ストレスによる篩状板でのRGC軸索の絞扼が軸索輸送障害を生じRGC細胞死を引き起こすことである。そこで我々は軸索輸送ライブイメージングにより各患者のRGC軸索障害を細胞死前に検出できる可能性に着目した。しかし、これまでの緑内障軸索輸送研究は固定標本の静的な評価のみであった。まず我々は、軸索障害による、生きたRGC軸索内の脳由来神経栄養因子の輸送低下とその後の細胞死を *in vitro* イメージングで示した(Takihara et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52 :3039-3045)。

次に我々は、*in vivo* におけるRGC軸索輸送イメージングを実現するため、軸索輸送される最大の細胞小器官であり、緑内障性視神経症への関与が報告されている、ミトコンドリアに注目した。これまで、多くの研究でミトコンドリア軸索輸送は神経細胞の生存に不可欠であることが示されてきた。しかし、それらの研究の多くは *in vitro* 神

経細胞か、*in vivo* ショウジョウバエ神経細胞を用いた研究であった。ほ乳類では唯一、神経細胞ミトコンドリア特異的にCFPを発現するミトマウスの末梢神経 *in vivo* イメージングが報告された(Nat Methods 2007)。つまり、これまでほ乳類中枢神経系におけるミトコンドリア軸索輸送 *in vivo* イメージングに成功した例はなかった。これは中枢神経研究で主に用いられる大脳では、神経細胞軸索が頭蓋骨に向かって垂直に投射するため、呼吸、心拍を有する *in vivo* において、 $\mu\text{m}$  単位のずれが許されない軸索輸送 *in vivo* イメージングが困難であるためと考えられる。ほ乳類中枢神経系のミトコンドリア軸索輸送 *in vivo* イメージングが困難であることは、ほ乳類中枢神経系における、神経変性疾患研究、加齢研究の発展を妨げていた。

#### 研究の目的

本研究目的は、緑内障モデルマウスと加齢マウスにおける、RGCのミトコンドリア軸索輸送変化を *in vivo* イメージングで評価し、ミトコンドリア軸索輸送と緑内障、加齢の関係を明らかにすることである。

### 研究の内容および成果

#### 研究結果

全身麻酔下、ミトマウスに2光子顕微鏡を用いることにより、*in vivo* で共通の方向へ伸長する、個々のRGC軸索を、網膜各層とともにイメージングできた。次にRGC軸索を *in vivo* イメージングした結果、血流が保たれていた生理的条件下で、

RGC軸索内ミトコンドリアの、高頻度な順行性、逆行性輸送を検出した(図1)。

4ヶ月齢のミトマウスにおいて、レーザー後2日間、眼圧が30mmHg台後半まで上昇、術1から2週間後ではほぼ正常眼圧に戻るレーザー誘発高眼圧症モデルを作成した。高眼圧による軸索障害を評価

した結果、コントロール群と比べて、レーザー後3日目では軸索本数の有意な減少はなかったが、レーザー14日後では29.7%へ有意に減少していた。高眼圧による細胞死を評価した結果、コントロール群と比べて、レーザー後3日目ではBrn3b陽性細胞の有意な減少はなかったが、レーザー14日後では33.4%へ有意に減少していた。この緑内障モデルにおいて、*in vivo*イメージングしたところ、生理的条件下、活動的にミトコンドリアが輸送されている軸索がある一方、軸索輸送が低下している軸索を認めた。軸索輸送されるミトコンドリア数を解析した結果、軸索1mmあたり、コントロール群では102±6個であったが、レーザー後3日目では65±7個と有意に減少していた。軸索内を輸送されるミトコンドリアの長さを解析した結果、コントロール群のミトコンドリア長2.23±0.08μmに比べて、レーザー後3日目では1.81±0.06μmへ有意に短縮していた。

12ヶ月齢の加齢マウスにおいても、生理的条件下でのミトコンドリア軸索輸送 *in vivo* イメージングに成功した。ミトコンドリア輸送数を解析した結果、12ヶ月齢マウスでは1mmあたり、125±8個と、4ヶ月齢マウスに比して増加していた。緑内障モデル同様、12ヶ月齢マウスでは、軸索内を輸送されるミトコンドリアの長さが、4ヶ月齢マウスに比して1.57±0.04μmへ短縮していた。

#### 考察

緑内障モデルマウスでは、加齢マウスと異なり、ミトコンドリア輸送数が低下していたことから、緑内障では、軸索障害に対し、細胞全体でミト

コンドリアにより供給できるATP量が低下していると考えられる。緑内障モデル、加齢マウスにおける軸索内を輸送されるミトコンドリア長の減少から、両者において、ミトコンドリア1個が運べるATP量が低下していると考えられる。

#### 結論

RGC *in vivo* イメージングにより、マウスにおける、活発なミトコンドリア軸索輸送を観察できた。本 *in vivo* イメージングにより、緑内障モデルマウスにおけるRGC細胞死前の軸索輸送障害と加齢マウスにおける軸索輸送障害を検出した。ミトコンドリア輸送数は緑内障においては減少するが、加齢によっては減少しない。緑内障と加齢に共通して、軸索内を輸送されるミトコンドリア長は短縮する。本研究により、RGCミトコンドリア軸索輸送の *in vivo* イメージングが緑内障早期発見につながる可能性が示唆された。

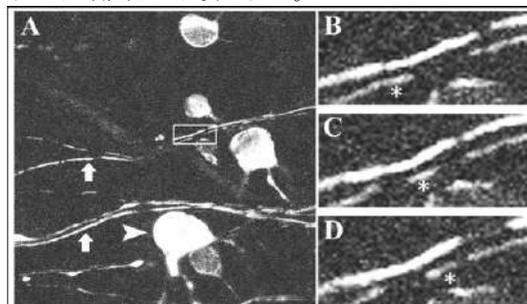


図1. マウス網膜ミトコンドリア軸索輸送 *in vivo* イメージング  
A. 個々のRGC軸索(矢印)、RGC細胞体(矢頭)を識別できる。  
B-D. Aの口部分。ミトコンドリア軸索輸送(\*)を確認できる。

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「発表論文」

- 1) Awai-Kasaoka N, Inoue T, Takahara Y, Kawaguchi A, Inatani M, Ogata-Iwao M, Tanihara H. Impact of phacoemulsification on failure of trabeculectomy with mitomycin C. *J Cataract Refract Surg*. 38:419-424, 2012.
- 2) Inoue T, Inatani M, Takahara Y, Awai-Kasaoka N, Ogata-Iwao M, Tanihara H. Prognostic risk factors for failure of trabeculectomy with mitomycin C after vitrectomy. *Jpn J Ophthalmol*. 56:464-469, 2012.
- 3) Iwao K, Inatani M, Seto T, Takahara Y, Ogata-Iwao M, Okinami S, Tanihara H. Long-term outcomes and prognostic factors for trabeculectomy with mitomycin C in eyes with uveitic glaucoma: A retrospective cohort study. *J Glaucoma*. in press, 2012.
- 4) Goto A, Inatani M, Inoue T, Awai-Kasaoka N, Takahara Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. Frequency and risk factors for neovascular glaucoma after vitrectomy in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *J*

*Glaucoma*. in press, 2012.

#### 「学会発表」

- 1) 瀧原祐史、稲谷 大、江藤 圭、井上俊洋、岩尾圭一郎、高村佳弘、鍋倉淳一、谷原秀信。ライブイメージで観察した緑内障眼におけるミトコンドリア軸索輸送の変化。第117回日本眼科学会総会、東京都、2013.
- 2) Takahara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Iwao K, Takamura Y, Nabekura J, Tanihara H. *In vivo* imaging of mitochondrial axonal transport in the diseased and aged mammalian CNS, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Seattle, USA, 2013.

#### 「特記事項」

なし

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費助成事業・若手研究B・平成25年度-平成27年度・新規ライブイメージングを駆使した、緑内障進行を予測する軸索輸送パラメータの同定・代表・申請中

## 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」 母乳育児継続に向けた支援についての考察 —出産後1か月の母親 における母乳育児に対する感情とその関連要因—

研究代表者：嶋 雅代（医学部・助教）

共同研究者：上澤 悦子（医学部・教授）

<b>概 要</b>	母乳育児は、母児の生涯にわたる多くのメリットがあることから、母児の健康行動として世界的に推奨されている。しかし、日本では多くの女性が母乳育児を希望しており、実際に積極的な母乳育児支援を行う施設が多い一方で、母乳だけで1か月以上育児を継続する母親は全体の半数にも満たない現状があり、より効果的な母乳育児支援が必要とされている。母乳育児支援について、近年諸外国では母乳育児に関する決定に強い影響を及ぼす母親の意思や感情に注目し、母親の感情や意思決定を支援する重要性を示している。一方日本では、母乳育児に対する感情や意思について分析したり、母親たちの感情に配慮した母乳育児支援を検討するには至っていない。そのため、本研究の目的は、福井県内で出産した産後1か月の母親を対象に、母乳育児に対する「感情」の構造と関連要因を明らかにし、母乳育児継続に向けた母乳育児支援のあり方についての検討を行うこととした。
<b>関連キーワード</b>	母乳育児、継続、意思、感情

### 研究の背景および目的

#### I. 学術的背景

母乳育児は、母子の様々な疾病リスクの減少が報告されていることから、産後の一時的な母子関係への効果にとどまらず、生涯にわたって母児に健康をもたらす行動として世界中で広く勧められている。母乳育児について WHO/UNICEF は、生後6か月間の完全母乳育児を勧告し、保健医療従事者の役割や責任を示している(UNICEF, 2005)。わが国でもこうした母乳育児推進の動きを受け、厚生労働省は産後1か月の母乳育児率の増加を母子保健の主要な取り組みの目標としており(厚生労働省, 2007)、多くの産科施設では積極的に母乳育児支援を行っている。しかし、2005年の厚生労働省による調査では、妊娠中には96.0%の女性が母乳育児を希望しているが、出産後の母乳栄養率は、産後1か月で42.4%、3ヶ月は38.0%であり、母乳育児を継続する母親は全体の半数にも満たない。

母乳育児支援について、近年諸外国では Theory of planned behavior(TPB)や Reasons model といった健康モデルを用い、母乳育児に関する決定には母親の意思が直接影響し、その意思には感情が最も強く影響することを明らかにしており、母親の感情や意思決定を支援する重要性を示している(Rempel, 1999)。

一方、日本ではその多くが母乳育児率や母乳継続期間の向上に主眼が置かれており、「母乳育児をしたい、もしくはしたくない」という母親の意思に注目されることはなかった。また、母親たちの母乳育児に対する感情や母乳育児に関する意思について分析した報告はなく、母親たちの感情に配慮した母乳育児支援を検討するには至っていない。

#### II. 本研究に至った経緯

こうした現状をふまえ、研究代表者による先行研究では、産後1か月の母親たちを対象に、「母乳

育児をしたい、もしくはしたくない」という母親の「母乳育児の意思」について分析を行った。その結果、母親たちには、「母乳育児を通して児のかわいさを実感する」、「児への愛情が深まる」等の「母乳育児の肯定する感情」と、「母乳育児にこだわると育児が楽しめない」、「自分にとって困難なことを続けたくない」等の「母乳育児を負担に思う感情」の相対する感情が同時に存在していた。さらに、「母乳で育った赤ちゃんは感染症になりにくい」等、医療者や世間一般で言われている根拠や、「母乳だと自分が横になったままあげられる」、「赤ちゃんがミルクを飲めるとほかの人に預けることができる」等、自分の身体や行動に関連する理由よりも、母親の感情に関連する理由が「母乳育児の意思」に強い影響を与えていることを明らかにした。また、「母乳育児の意思」について、初産婦と経産婦とでは「母乳育児の意思」に関連する要因が異なることが明らかとなった。

これらのことから、母親自身が「母乳育児をしたい、続けたい」という意思を持つことが母乳育児継続に最も重要なことであり、母乳育児支援は「母乳育児の意思」に重要な影響を及ぼす「感情」に焦点を当てること、加えて、これまでの母乳育児に関する体験や母子の背景要因についても切り離して考えるべきではない。

しかし、母乳育児の感情について、母乳育児を肯定する感情と負担に思う感情があるということはおわかったが、それぞれがどのような要素で構成されており、またどのような要因が関連しているのかについては不明である。そのため、より効果的な母乳育児支援について検討するには、母親一人一人の母乳育児の感情に焦点を当てて、その内容や関連要因を明らかにするための定量的な分析が必要である。

### III. 研究目的

福井県内で出産した産後1ヵ月の母親を対象に、母乳育児に対する「感情」について内容および関連要因を明らかにし、母乳育児継続に向けた母乳育児支援のあり方について検討を行う。

### IV. 予想される結果と意義

これまでの日本において、「感情」そのものが母乳育児継続の成り行きに影響を及ぼしているという報告はなく、また、母乳育児中であっても母乳育児を負担に思う感情があることを定量的に明らかにした研究もない。そのため、母乳育児の感情についてその内容と関連要因が明らかになることによって、現代の母親たちの感情に配慮した、効果的な母乳育児支援のあり方を示すことができる。

また、本研究は福井県内の母親たちを対象に行うものである。とりわけ福井県は、合計特出生率が高いことや、3世代同居世帯が多く、母乳育児のサポートを得やすい状況であること、保育所の入所率が高く、出産後であっても女性の就業率が高いこと、夫婦共働きでの収入があるため、比較的経済的に余裕がある家庭が多い自治体である。母乳育児継続について検討した先行研究によると、これらは母乳育児継続に影響を及ぼす重要な関連要因であることが示されている。つまり、福井県において調査を行うことによって、これらが実際に母乳育児継続にどのような影響を及ぼすのかより明らかになり、現代の母親たちの現状を反映させることができると考える。

## 研究の内容および成果

### I. 概念枠組みと仮説

本研究における概念枠組みは、Meichenbaumら(1993)のReasons modelを基盤として、文献的考察と研究代表者による先行研究より作成した(図1)。

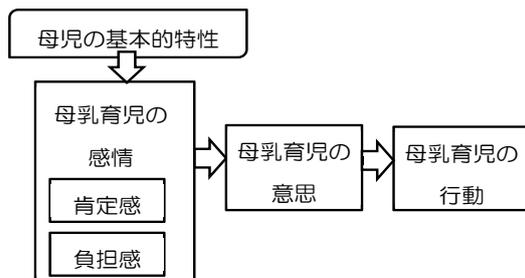


図1 本研究における概念枠組み

この枠組みで示す変数の関係は下記のような仮説となる。

- 「母乳育児の感情」は、「肯定感」と「負担感」から構成されており、その内容は母親の属性や母親の授乳に関するトラブルやサポートなど、関連する要因によって違いがある。
- 「母乳育児の感情」すなわち「肯定感」と「負担感」それぞれが「母乳育児の意思」に影響を及ぼす。
- 「母乳育児の行動」は「母乳育児の意思」によって予測される。

### II. 研究方法

#### 1. 研究対象

福井県内の病産院で出産した、産後約1ヵ月の母親2000名。

#### 2. 調査方法

##### 1) データ収集期間

2013年3月1日から9月31日。

##### 2) データ収集場所

福井県内の出産を扱う病産院8施設(他2施設に申請中)。

#### 3. 調査内容

- 母乳育児の「肯定感」と「負担感」に影響を及ぼす場面、感情、気持ちについての母親の個人的な体験や認識。
- 母乳育児の意思(現在および将来、「どのくらい強く」母乳育児を行いたいと思っているか)。
- 母乳育児の行動(母乳と人工乳の状況)。
- 母親の基本的特性(母親の属性、授乳に関連するトラブル、周囲の母乳育児サポート)。

#### 4. 分析方法

- 「母乳育児の感情」について、テキストマイニングによる内容分析と関連要因についての多変量解析。
- 「母乳育児の感情」と「母乳育児の意思」との関連、および「母乳育児の意思」と「母乳育児の行動」関連についての多変量解析。
- 1)と2)の結果から、現代の母親たちに必要とする母乳育児支援を検討する。

#### 5. 倫理的配慮

本研究は福井大学医学部研究倫理委員会において承認を得ている(倫審24第118号)。

### III. 研究の進捗状況

作成した質問紙票を研究協力施設で配布中。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文」

H25年度に論文発表予定

### 「特記事項」

学会発表：第14回日本母性看護学会学術集会「産後1か月の母親における母乳育児の意思の構造—Reasons modelに基づいて—」口頭発表

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費助成事業・挑戦的萌芽研究・平成25～27年度・母親の「母乳育児の意思」に基づいた母乳育児継続に向けた包括的支援プログラムの開発・代表・申請中

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」  
**ナノファイバー基材と極限微生物の相互作用の解析と  
 新規固相培養法への展開**

研究代表者： 藤田 聡（工学研究科・准教授）

共同研究者： 里村 武範（工学研究科・准教授）

概 要
本研究では、極限環境微生物の育種に適した固相培養法の開発を目指し、材料の選択の幅が広く、形態や形状の制御が容易なエレクトロスピンニング法により作製したナノファイバーを用いて、新規培養基材についての諸検討を行った。ナノファイバー材料を微生物培養基材に使用するという取り組みはこれまでほとんどなされてこなかったため、まずは種々の高分子材料への一般細菌および極限環境微生物の接着特性を、クリスタルバイオレット染色および走査型電子顕微鏡観察により解析した。次に各材料の表面化学特性を、水接触角測定およびFT-IR測定により解析した。その結果、高分子材料に応じ、また菌によって、接着特性が異なることを見出した。この結果は、新規固相培養法に向けた足場材料の開発に繋がると期待される。今後は、菌表面に存在する糖・ペプチドと材料の相互作用の解析が課題となる。
関連キーワード
ナノファイバー、微生物、培養基材、分子間相互作用、超好熱菌

### 研究の背景および目的

極限環境微生物とは、100℃を超える高温、pHが3以下あるいは10以上、有機溶媒中など、通常の微生物が生きられない特殊な環境を好む微生物である。これらの微生物は、耐熱性酵素や特殊な代謝サイクルなど、一般的な微生物とは異なる生化学システムを備えているため、生物学的にも興味深い研究対象であることもさることながら、100℃を超える高熱でも活性をもつ酵素や0℃以下の低温でも活性を失わない酵素、有機溶媒中や還元雰囲気下でも作用するタンパク質など、環境浄化や産業利用などの応用にも大いに期待されている。しかしながら、その高効率な培養法はなく、時間がかかり、また培養効率も低い。

そこで本研究では、極限環境微生物の育種に適した培養基材を新たに創製し、これらを容易に培養できる技術の開発を目指す。極限環境微生物を培養できる基材を開発することで、これまで培養手段がなく知られていなかった未知の極限環境微生物を育種できる。またこれらの微生物を単離することで、従来、酵素を利用できなかった高温や低pHなどの条件下や、有機溶媒中で化学反応を触

媒する新規酵素を取得し、環境材料や産業への利用が期待される。また、ファイバーの径や形状などの諸条件と微生物の接着・生育とどのような関係にあるか基礎的な知見を集めることで、材料基材からの微生物機能制御という新たな研究分野の創出にもつながると期待される。

本研究では、エレクトロスピンニング法により作製したナノファイバーに着目した。エレクトロスピンニング法はさまざまな化学的組成を有する高分子材料に適用できるため、極限環境でも安定的に使用できる材料も用いられる。また、不織布、マット、シングルファイバーなど種々の形態や、ファイバー径、表面モルフォロジーもコントロールできるため、微生物の付着やコロニー形成培養に適した物理的特性を設計することも可能である。しかし、エレクトロスピンニング材料を微生物培養基材に使用するという取り組みはこれまでほとんどなされてこなかった。そこで、まずは種々の高分子材料への細菌および極限環境微生物の接着に関する基礎的な知見を得ることを目的とする。

### 研究の内容および成果

#### (1) 高分子材料への一般細菌の接着

すでに超好熱菌が酸素プラズマ処理を施したポリウレタンファイバー上に接着することは昨年度の本研究助成申請課題において見出したが、これが一般的に微生物で見られる現象かどうかはよくわかっていない。そこで、代表的なグラム陰性および陽性菌の大腸菌(*E. coli*)と枯草菌(*B. subtilis*)を用い、種々のポリマー材料(PU: ポリウレタン、

PS: ポリスチレン、PLLA:ポリ-L-乳酸、PCL: ε-ポリカプロラクトン)で作成されたフィルム表面への接着特性をクリスタルバイオレット染色(図1および図2)およびSEM観察にて評価した(図3)。たしかにポリウレタンファイバー上では、大腸菌の接着は良好で、部分的にバイオフィルム状の凝集体として存在することがわかった。一方、枯草菌上ではほとんど接着は見られず、微生物種

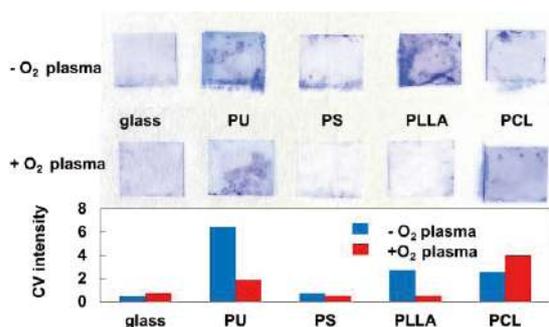


図1 各種高分子材料上での大腸菌の接着(クリスタルバイオレット染色)。

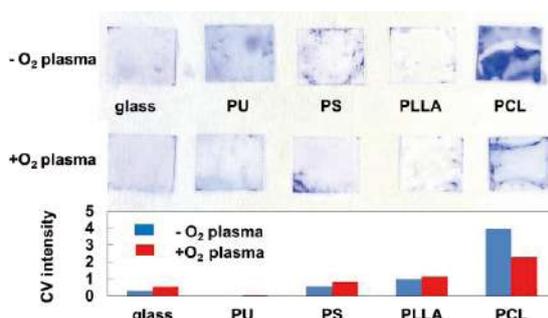


図2 各種高分子材料上での枯草菌の接着(クリスタルバイオレット染色)。

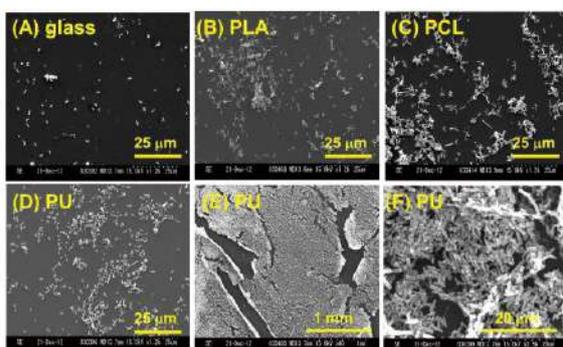


図3 基材に接着した大腸菌のSEM像。(A-D)各種基材上での接着。(E,F)ポリアウレタン基材上でのバイオフィーム形成。

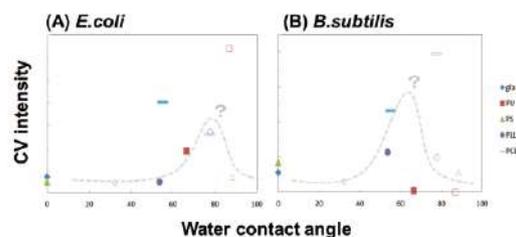


図4 基材表面の水接触角と菌量(クリスタルバイオレット染色)の関係。

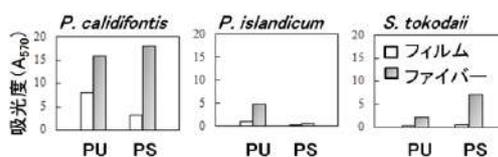


図5 PUおよびPS基材上への超好熱菌の接着特性。

によって、また材料表面によって菌の接着および増殖が異なることがわかった。

また各材料について酸素プラズマ処理の有無による影響を比較したところ、大腸菌は酸素プラズマ処理をほどこさないPUおよびPLLA表面に比較的よく接着したが、枯草菌は顕著な差は見られなかった。

### (2) 材料表面の化学的特性の影響

細菌付着に適した化学的特性(表面濡れ性、官能基、タンパク質吸着等)を明らかにするために、材料表面について、水接触角およびFTIR-ATR測定をおこなった。また細菌の表面ゼータ電位についても測定をおこなった。

材料表面の水接触角と接着した菌量の関係をプロットしたところ、親水性の高い表面( $<20^\circ$ )や疎水性の高い表面( $>90^\circ$ )では菌量は少なかった(図4)。一方、菌表面のゼータ電位と接着特性や、

材料表面の官能基の影響について明瞭な関係性は見出されなかった。

### (3) 超好熱菌の接着に関する検討

PUおよびPS表面への3種類の超好熱菌(*P. islandicum*, *P. calidifontis*, *S. tokodaii*)の接着を一般細菌と同様の手法にて評価した。その際、PUおよびPSをフィルムおよびナノファイバーシートに加工して比較もおこなった。

その結果、3種の超好熱菌も、材料ごとに接着特性が異なった。ナノファイバー化することで菌の接着は向上した。

以上の結果を踏まえ、今後、タンパク質の吸着と表面化学的特徴についてさらに詳細に解析を進め、ナノファイバー化することで培養基材としての応用展開を推し進める。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「対外発表」

木村 友香, 里村 武範, 末 信一郎, 藤田 聡, 「種々のポリマー表面に対する微生物の接着特性」, 第1回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会, 金沢, 2012.12.25.

Fujita S, Kimura Y, Satomura T, Shin-ichiro Suye, Adhesion of bacteria onto various polymer surfaces. (in preparation)

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」

## 水/澱粉/高分子の相転移を利用した 環境調和型ハイブリッド材料の創出

研究代表者： 植松 英之（工学研究科・講師）

共同研究者： 田上 秀一（工学研究科・教授）

概 要
澱粉/水の糊化、合成高分子の成形加工性を利用した押出発泡成形を検討し、発泡成形性の制御の指針を得るために、押出過程で同時に起こる発泡現象を流れの観点から理解することを目的とした。180℃の金型から押出される際の減圧効果により水が気化することで押出物の内部に独立気泡が形成することが確認された。また澱粉/水の量、伸長粘度の異なる合成高分子が発泡成形に及ぼす影響を検討した結果、金型から押出された流体が肥大化（スウェル）することで押出物のサイズが増加し気泡が成長することが示唆され、澱粉を主成分とする材料の発泡成形性を制御するための指針が得られた。
関連キーワード
澱粉、糊化、押出発泡、流動特性、発泡制御

### 研究の背景および目的

グリーンイノベーションにより環境低負荷に対するニーズが高まり、脱石油由来材料の開発が求められている。成形されるプラスチック製品の原料を合成高分子から天然高分子へ代替することが命題であるが、天然高分子である澱粉、木材などのセルロースは、合成高分子と比較すると流動性に乏しいため成形性が悪く、さらには合成高分子の物性を損ねることが知られている。そのため、天然高分子と合成高分子のハイブリッド材料の物性あるいは品質に関しては多くの研究がなされているが、天然高分子が主成分となる材料開発がなされていないのが現状である。したがって、加工性の視点から天然高分子を主成分とするハイブリッド材料の設計に関する研究が必要不可欠である。

$\beta$  グルコースで構成されるセルロースは分子鎖内の水素結合が強く、リグニンやヘミセルロースから構成されるフィブリル構造が強固なため、流動性が非常に乏しい。一方、 $\alpha$  グルコースで構成される澱粉も同様に分子間に働く水素

結合により流動性を示しにくい材料であるが、水分、せん断変形、温度を与えることで水素結合が切断され流体として振舞う現象（糊化）が知られている。このことから、糊化を合成高分子の成形加工へ応用することで主成分を天然高分子とする材料の成形加工ができる可能性がある。また、合成高分子の成形温度は 200℃程度であることから、合成高分子の成形条件では糊化した澱粉/水に含まれる水が気化することで発泡体が成形できる可能性がある。

そこで本研究では、合成高分子の押出成形性、澱粉/水の糊化、水の気化を利用した押出発泡体の成形に着目し、主成分を天然高分子とする発泡体の作製及び発泡体の形状と発泡構造を制御することを目的としている。特に今回は、発泡成形性（発泡体のサイズ、発泡セルサイズ、セルの数密度）を制御するための材料設計指針を確立するために、流れの観点から押出及び発泡現象を理解することを目的とした。

### 研究の内容および成果

#### 実験

天然高分子として、デンプン 55wt%とセルロース 30wt%及び水 15wt%から構成されるペレット NP を用いた。合成高分子として、汎用ポリプロピレン PP を用いた。また、PP とせん断粘度はほぼ等しく、伸長粘度（溶融張力）が大きい発泡用ポリプロピレン FPP を用いた。押出成形には同方向回転型二軸押出機を用い、スクリュウ回転数 200rpm、供給量 25g/min、混練温度 180℃とし、NP は PP、FPP に 0～80wt%の割合でブレンドして押出成形を

行った。作製した押出物の直径  $d_e$  や、断面の気泡径  $d_c$  を計測した。また押出物の密度を算出し押出前の密度  $\rho_0$  と発泡後の密度  $\rho_f$  の比を発泡倍率  $f_r$  とし、式(1)によって気泡の数密度  $N_f$  を評価した。

$$N_f = 6(f_r - 1) / (\pi d_c^3) \quad (1)$$

#### 結果

NP を PP へ添加し押出することで、押出物は発泡したのちに固化し、発泡体として得られた。図

1にPPの押出物と、PPにNPを添加した場合の押出物の外観(a)と断面(b)を示す。発泡することで直径が増加し、独立した発泡セルが形成されていることが確認できた。また、NPの増加と共に発泡体の直径 $d_e$ 、気泡径 $d_c$ は増加し、NPの添加量が60wt%以上ではそれぞれ減少した。同様に、発泡倍率 $f_r$ 、気泡の数密度 $N_f$ もNPが60wt%以上で減少した。このことから、NPが主成分となることで発泡剤となる水が押出機内部で気化しやすくなり、発泡成形性が低下すると考えられる。

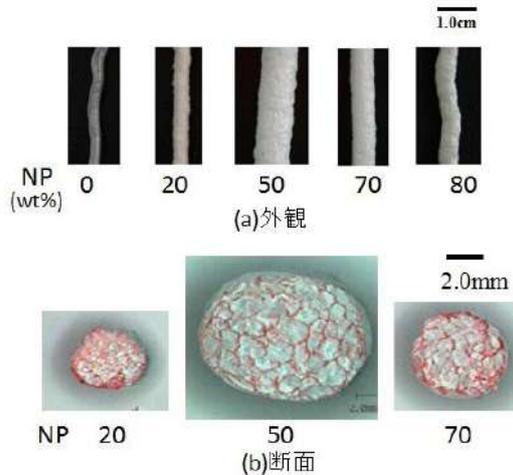


図1. PP、PP/NPの外観及び断面

FPPにNPを40wt%添加した場合、PPと比較すると、 $d_e$ は約2倍増加したが、 $f_r$ は約0.7倍となり、 $N_f$ が0.5倍と低下した(図2(a))。FPPはPPと比較し溶解張力が非常に大きいことから、金型から押出された直後の押出物の直径が増加する現象(スウェル)が大きいことが確認できている。このことから、PP、FPPがマトリクスとなる場合、 $d_e$ 、 $d_c$ はマトリクス成分の流動特性と対応していることがわかる。また押出物がスウェルすることで流動方向へ縮み気泡壁が厚くなり $f_r$ が低下したと考えられる。FPPに対して70wt%のNPを添加した結果を図2(b)に示す。PPをFPPに置き換えることで、 $d_e$ が増加し $f_r$ は減少した。このことは、NPマトリクス中のFPPがスウェル増加に寄与していることを意味する。さらに、 $d_c$ が減少したことから、FPPの存在により気泡成長は抑制された

と考えられる。

気泡成長過程において流体の流動特性が重要視されているが、押出過程での気泡生成は流体の押出特性に依存することが示唆された。また流体の流動特性の観点から発泡体のサイズを制御することは、発泡壁を制御することになるため、力学特性や断熱性能の制御へ繋がると考えられる。

今後の展開

流動特性を変えずにPPとNPの相溶性を改善させることで発泡体の成形性制御できる可能性がある。また澱粉を構成するアミロース、アミロペクチンの割合を変えることで、主成分をNPとする材料設計指針を確立する。

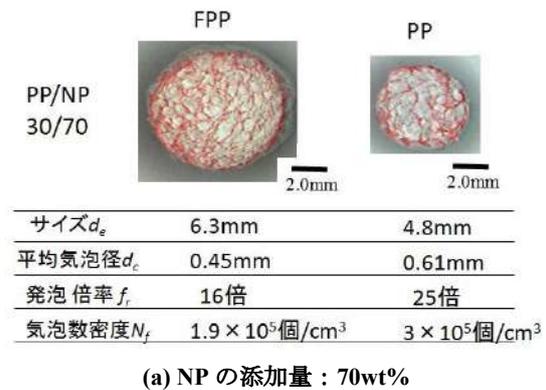
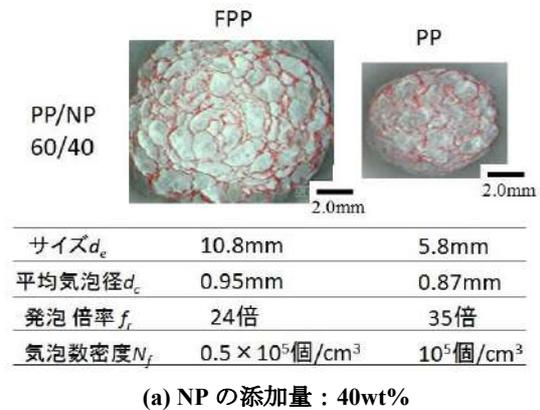


図2. FPP/NP、PP/NPの発泡成形性

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Polymer Engineering & Science や International Polymer Processing へ投稿予定

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

研究成果最適展開支援プログラムへ申請検討中

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」

**高耐久性金属複合化導電繊維の創出****—超臨界二酸化炭素を用いた金属複合化デポジションシステムの構築とその応用—**

研究代表者： 廣垣 和正（工学研究科・准教授）

<b>概要</b>	繊維への新規な金属複合化法として金属デポジションシステムの構築を検討した。ナイロン6繊維に超臨界二酸化炭素を媒体として有機金属錯体を注入し、その過程で錯体に熱や水素を作用させ還元分解し、繊維内部および表面に金属粒子を堆積させて複合化した。布帛は金属の複合化により、体積抵抗率が未処理布の $>10^{15} \Omega \cdot \text{cm}$ に比べて $5.4 \Omega \cdot \text{cm}$ と低下した。繊維表面近傍には、約200 nmの均一な厚みの金属粒子堆積層が形成され、金属元素の偏析が確認された。繊維表面から内部にかけて金属元素に加えナイロン6由来の窒素元素が存在することから、金属堆積層が繊維に複合化されていることが確認された。金属を複合化した繊維は、JIS L 0849 II型試験機による1000回の摩擦前後で $10^0 \Omega \cdot \text{cm}$ オーダーから $10^1 \Omega \cdot \text{cm}$ オーダーと低い抵抗率を保ち、摩擦に対して耐久性が高く、繊維表面が摩耗しても導電性の低下を抑制できた。
<b>関連キーワード</b>	超臨界二酸化炭素, 有機金属錯体, ナイロン6繊維, 導電性繊維, 金属複合化

**研究の背景および目的**

高度情報化社会を迎えるにあたり、柔軟で軽量の導電材料が求められており、そのひとつとして導電性繊維が注目を集めている。一般的な導電性繊維には、めっきのように表面に導電材を被覆したものがあがるが、摩擦や屈曲に弱く耐久性に難点がある。このような背景から、本研究では汎用繊維であるナイロン6繊維を対象に後加工により高い耐久性を備えながらも高い導電性を付与する技術の構築を目指した。

導電性繊維を調整する手法として、超臨界二酸化炭素(scCO<sub>2</sub>)を媒体とした金属複合化デポジションシステムを構築する。scCO<sub>2</sub>に有機金属錯体を溶解し繊維に注入する。この過程で系に錯体の分解・還元温度まで熱を加え、錯体の分解・還元により有効な水素を導入する。錯体は繊維に注入されながら分解し、繊維の内部および表面で錯体から遊離した金属が凝集して析出する。これにより、繊維内部に複合化された金属層から成長して一体となった金属皮膜を繊維表面に形成する。繊維表面を金属皮膜が覆うため高い導電性が得られる一方

で、皮膜は繊維内部にも複合化されているためアンカー効果により摩擦や屈曲に対する耐久性が得られる。摩耗などにより表面の皮膜が一部欠損しても繊維内に複合化された金属層による導通が得られるため導電性の低下を抑制できる。このシステムの確立と各機構の解明を研究目的とし、高い導電性を備えながらも、屈曲や摩擦に耐久性があり、軽量で柔軟性に富む導電性繊維の創出を目的とした。

本研究により高い導電性を備えながらも耐久性があり、軽量で柔軟性に富む、従来にない導電性繊維が創出されれば、これらの繊維は種々の電子機器の配線材料や電磁波シールド材料としての使用に堪え、高度情報化社会の到来を材料面からアシストできる。また、金属複合化デポジションシステムは繊維以外にも高分子フィルムや成形品に適用できるため、従来にない耐久性を備えたフレキシブル基盤や導電性の樹脂製機械部品の新規製造法にも展開が期待できる。

**研究の内容および成果**

昨年度は、ナイロン6繊維へscCO<sub>2</sub>を媒体に有機Pd錯体を注入した後、錯体に水素を作用させ還元分解し、錯体から金属Pdを析出させて導電性を付与した。繊維の導電性は、表面の金属量に依存することを見出した。2種のPd錯体を混合して用いることで、単独の錯体を用いた場合に見られない繊維に複合化された層状構造を表面近傍に形成し、布帛で体積抵抗率が未処理の $>10^{15} \Omega \cdot \text{cm}$ （測定不能）から $10^2 \Omega \cdot \text{cm}$ まで低下できた。本年度は、繊維の金属複合化構造をより詳細に調べ、層状構造

の形成機構を考察した。また、繊維への金属複合化率を高め、より高い導電性の付与を試みると共に、金属複合化繊維の摩擦に対する耐久性を評価した。

繊維基材には、汎用のナイロン6布帛を用いた。有機金属錯体には、パラジウム(II)アセチルアセトナート(Pd(acac)<sub>2</sub>)とパラジウム(II)アセト(Pd(oac)<sub>2</sub>)の重量比1:1の混合物を用いた。繊維への錯体の注入は、scCO<sub>2</sub>を媒体に過剰量の錯体を用いて、浴比1:250、120°C、25 MPa、15時間の

条件で行った。注入後に過剰量の水素と 120°C、0.5 MPa の条件で3時間接触させることで錯体を還元分解した。

図 1 に示すように金属を複合化した繊維の体積抵抗率は繊維表面の金属 Pd 濃度の増加に伴い低下し、9.9atomic%で 407  $\Omega \cdot \text{cm}$  を示した。図 2 より、金属を複合化した繊維の表面像および断面像から、繊維表面に nm オーダーの大きさの粒子が堆積した厚み約 200 nm の層状構造が観察された。Pd 元素のマッピング像では、繊維表面近傍に Pd 元素が高濃度に分布した。繊維表面の錯体の還元率は 65.6% で金属 Pd の濃度は 9.9atomic% であり、繊維表面から内部にかけて金属 Pd に加えナイロン繊維由来の窒素が観察された。繊維表面の層状構造は繊維に注入された錯体と錯体が分解して析出した Pd 金属粒子の堆積層である。繊維に錯体を注入した後、水素に接触させなくても、繊維表面の錯体の還元率は 51.8% であった。繊維に錯体を注入する際に錯体が熱分解し、繊維内に析出した金属 Pd の触媒作用により錯体の分解が促進され、繊維表面近傍で錯体の注入と注入された錯体の分解が繰り返し進められる。その結果、繊維表面の層状構造は形成され、繊維表面に金属 Pd が偏析し、繊維の導電性を高めたと考えた。

繊維への錯体の注入・還元分解を繰り返すことで、繊維表面への金属複合化率を高め 5.4  $\Omega \cdot \text{cm}$

まで抵抗率を低下できた。図 3 より、銅めっき繊維の体積抵抗率は、摩擦前の  $10^2 \Omega \cdot \text{cm}$  オーダーから JIS L 0849 II 型試験機による 1000 回の摩擦後  $10^{11} \Omega \cdot \text{cm}$  オーダーまで高くなったのに対し、金属複合化繊維は摩擦前後で  $10^0 \Omega \cdot \text{cm}$  オーダーから  $10^1 \Omega \cdot \text{cm}$  オーダーと低い抵抗率を保った。金属複合化繊維は摩擦に対して耐久性が高く、繊維表面が摩耗しても導電性の低下を抑制できた。

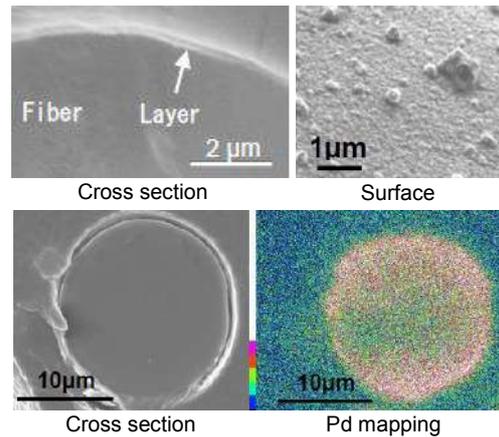


Fig. 2 SEM micrographs and mapping image of Pd concentration in cross section of fiber composited with mixed complexes.

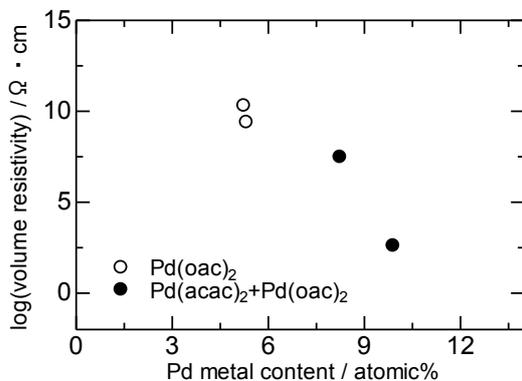


Fig. 1 Relationship between volume resistivity and metalized Pd content on surface of metal-composited fabric.

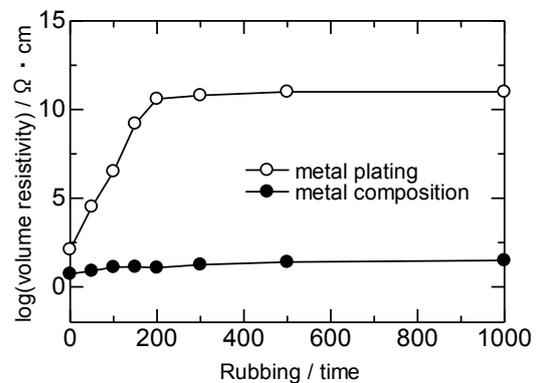


Fig. 3 Change in volume resistivity with increasing rubbing times of metal-composited fabric and copper metal plated fabric.

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

論文：廣垣和正，超臨界二酸化炭素を用いた金属複合化導電性繊維の創出，*繊維学会誌（繊維と工業）*，**68**，304-306（2012）. H25年度1件を予定。  
発表：国際学会 K. Hirogaki, et al., “Preparation of Electro-conductive Fiber by Metal Composition Using Supercritical Carbon Dioxide Fluid”, *IFATCC2013*, May 10 (2013).  
国内学会 H24年度3件. H25年度2件を予定。

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 科学研究費補助金若手(B)，廣垣和正(代表)，“超臨界二酸化炭素を用いた金属複合化繊維の創出”，H23～H26年度，採択額4,550,000円。
2. (一社)繊維学会，繊維科学・技術研究助成，廣垣和正(代表)，“超臨界二酸化炭素を用いた高耐久性金属複合化導電繊維の創出”，H23～H24年度，助成額500,000円。
3. 共同研究：契約調整中1社(H25年4月契約予定)。検討中1社。

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」

## 腐食損傷を受けた構造物に対する 非破壊的残存板厚算定を目的とした基礎的研究

研究代表者： 鈴木 啓悟（工学研究科・講師）

<b>概 要</b>	<p>鋼コンクリート埋込部の目視点検困難な部位に対する腐食損傷が問題となっている。腐食損傷は、はく離が生じた後、鋼材が減肉するため、まずははく離判定を行うことが大事である。本研究は基礎的な研究として有限要素法シミュレーションをベースとしたはく離判定を行う超音波探傷手法の検討をした。入射する波は、コンクリート中を伝播させることを鑑み、大振幅、長波長のサイン波とした。解析の結果、透過波は表面波成分への分離と、減衰の影響が大きく、判定に用いることは困難であることが判明した。その一方ではく離面から反射される反射波と、鋼材面にあってコンクリート中を伝播する境界波は、はく離の有無に対して有意な差が生じた。この結果から、まず反射波の振幅を評価し、次に境界波の振幅を評価することによって、はく離判定が可能であることが示唆された。</p>
<b>関連キーワード</b>	腐食損傷、非破壊検査、超音波探傷試験、数値シミュレーション、有限要素法

### 研究の背景および目的

鋼構造物の損傷の内、腐食損傷に伴う鋼材の減肉は、構造が有すべき機能や耐荷力を損なわせ、その結果供用の安全性を脅かすため、新設構造物の設計に際しては腐食損傷を生じる材料の選定や、構造設計を避けるべきである。しかしながら、既存構造物には既に腐食損傷が多く発生し、特に2007年に木曾川大橋で生じたトラス斜材破断事故は特に憂慮すべき事例(写真-1)である。鋼コンクリート埋込部等の目視点検が困難な部位において、事故や供用停止に至ったケースが報告されており、腐食損傷発生の有無を的確に把握するための点検手法を構築する必要がある。



写真-1  
トラス破断事故



写真-2  
滞水しやすい部位

このような腐食損傷を把握するための手法として期待されるのは、構造物の耐荷力を損なわない非破壊検査である。特に超音波探傷法は、材料の内部まで波を入射できるため、目視点検困難な部位の腐食損傷に対して有効な非破壊検査手法と考えられる。

部は風通しが悪く滞水しやすい(写真-2)。このような箇所において、本来完全な付着が保持されている鋼材とコンクリートの間に隙間が存在すれば、そこに雨水が入り込み、腐食の原因となり得る。そのため、まずは点検手法として鋼材とコンクリートの付着合成の保持を明らかにすべきである。

鋼コンクリート埋込部の腐食減肉メカニズムは研究代表者らによって現在解明途上にあるが、推測としては斜材を伝って雨水が埋込部に到達することで、さらに多くの該当鋼材はH型鋼材であるがゆえ、両方のフランジに囲まれたウェブの埋込

本研究は、有限要素法シミュレーションを用いて、コンクリートに埋め込まれた鋼材の腐食損傷に伴う鋼コンクリートのはく離の有無を把握する超音波探傷手法を検討し、残存板厚算定の基礎となる探傷手法を構築する。

### 研究の内容および成果

まずコンクリート中の波動伝播特性を把握するために、コンクリート床版だけをモデル化し、垂直探触子を模擬して、透過波の減衰レベルを確認した。図-1が波動伝播の様子を示している。変位動の大きさを色で示しているが、これから見てとれるように、表面波の成分が大きく生じている。図-2に入射点から鉛直下方方向を座標にとった距離と、入射位置での波動振幅を100%としたときの、

透過波の振幅を示した。入射直後に90%以上の減衰が見られ、以降はゆるやかな減衰傾向を示している。これは入射時に表面波成分と透過波成分に分かれるときに、表面波成分に90%程度分離した結果であると考えられる。すなわち、透過波の確実な捕捉とその利用は減衰の影響で困難さが伴う。

次に実構造に即したモデルを構築するため、2007年に起きた木曾川大橋の腐食損傷を想定し、

トラス斜材がコンクリート床版に埋め込まれた部位をモデル化した。床版に 60° の角度で鋼材が埋め込まれている。

鋼材面に対し垂直に超音波があたるようにするため、図-3 に示すようにコンクリート床版の表面に 60° の斜角探触子を設置し、コンクリート床版を波動伝播させて腐食面を探傷することを想定した。また計算負荷低減のため、モデルは 2 次元とし、要素は平面ひずみ条件を定義した 4 節点 2D ソリッド要素を適用した。要素サイズは波長の 1/20 程度として、2mm としている。入射する超音波は床版コンクリートの粗骨材の影響を低減するために、大振幅、長波長とし、振幅  $1.0 \times 10^{-8} \text{m}$ 、周波数 100kHz とした。

モデルのパターンは(1)健全状態、(2)表面から 2cm のはく離状態、(3)表面から 40mm のはく離状態の 3 パターンとした。入射位置はモデル(3)のはく離面中心にあたるように、鋼材から 40mm の位置とした。

解析の結果、全モデルパターンに共通して、波の入射と同時に表面波成分が大きく生じることが判明した。床版内部に伝播していく波は、鋼材に達してそのまま鋼材を通過して床版下面へ向かう透過波、鋼材に沿って床版下面へ向かう境界波、鋼材で反射された後に床版上面の入射位置へ戻る反射波が見られた。

モデル(1)では、はく離を生じていないため、反射波が比較的小さく、入射波に対して反射波が 8.7%程度であった。これに対して、モデル(2)、モデル(3)ではそれぞれ 11.7%、12.3%と、相対的に大きい結果となった。はく離に伴ってコンクリートと鋼材の間に境界面が生じたため、波が鋼材へ射しなかったためと考えられる。

透過波は先に示したように、距離減衰の影響が大きく、透過波の振幅は入射波比 1%程度となり、判定手法に用いることは難しいことと判断できる。一方で、境界波ではモデル(2)で入射波比 8.1%、モデル(3)で 5.3%と有意な差が見られた。以上をもとに提案した判定手法を図-4 にまとめる。以上の結果をもとに、境界面波を床版下面で取得する受信用探触子と、入射波、反射波用の床版上面に設置する探触子を用いれば、はく離判定の可能であると示唆された。

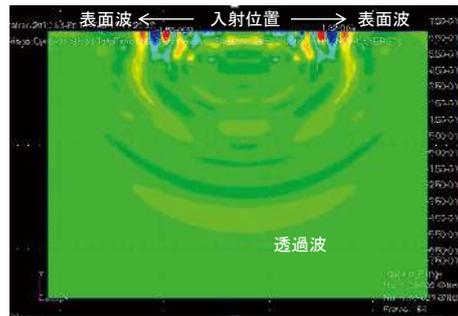


図-1 コンクリートへの入射

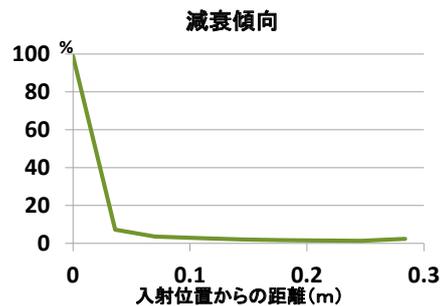


図-2

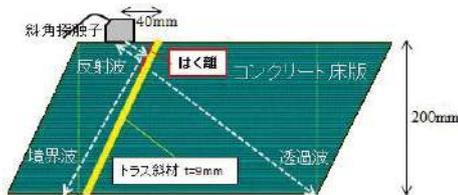


図-3 解析モデルと波の伝播経路

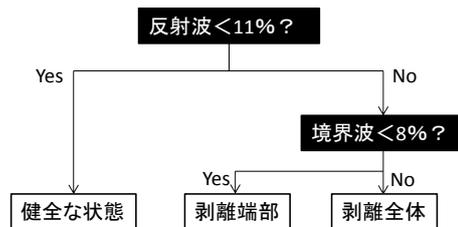


図-4 判定手法

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

現段階で発表論文はありませんが、この解析結果をベースとして、実験を行った上で実証し、QNDE(Quantitative Nondestructive Evaluation)における投稿、発表を実施する予定である。実験は、後述する科学研究費若手 B(応募中)及び、国土交通省「政策課題解決型技術開発公募」(応募中)の研究において実施する予定である。

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 科学研究費若手 B(申請中) H25年度～27年度  
「鋼コンクリート埋込部の腐食損傷に対する非破壊検査手法の確立」
2. 国土交通省政策課題解決型技術開発公募(申請中) H25年度～26年度  
「状態可視化点検および構造応答発電センシングによる診断技術の高度化」

## 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」 長連合ニューロンの個性獲得と軸索投射の分子機構の解析

研究代表者： 岡 雄一郎（子どものこころの発達研究センター・特命講師）

共同研究者： 佐藤 真（医学部・教授）、

猪口 徳一（子どものこころの発達研究センター・特命助教）

概 要
<p>脳内の複雑な神経回路は、各ニューロンがその個性に対応した適切な接続相手を選択してシナプスを形成することで構築されている。大脳皮質の連合ニューロンが個性を獲得し、その個性に応じた軸索投射をする機構はまだ明らかになっていない。本研究では、マウスの長連合線維を構成する長連合ニューロンに特異的なプロモータを利用して、このニューロン群を選択的に可視化し、長連合ニューロンの個性獲得と軸索投射の特異性決定の分子機構を明らかにする。昨年度のマイクロアレイ解析で得た長連合ニューロン特異的な遺伝子の候補に関し、<i>in situ</i> hybridization と tracing を用いて絞り込みを行い、6つの遺伝子が長連合ニューロンで発現することを見出した。これらの遺伝子のプロモータを用いたEGFP発現ベクターをマウス胎児の大脳皮質に導入し、EGFP陽性の長連合ニューロンを認めた。</p>
連キーワード
<p>大脳皮質長連合線維、軸索投射、神経回路形成、子宮内電気穿孔法、自閉症</p>

### 研究の背景および目的

脳内の複雑な神経回路は、各ニューロンがその個性に対応した適切な接続相手を選択してシナプスを形成することで構築されている。大脳皮質の出力ニューロンはその軸索投射先によって、視床や脊髄など皮質下に軸索を伸ばす投射ニューロン、左右の半球をつなぐ交連ニューロン、同側の異なる領野を結ぶ連合ニューロンの3つに分類される。これらは大脳皮質6層構造の中で特定の層を占め、マウスでは連合ニューロンは2/3層、5層、6b層に、交連ニューロンは2/3層と5層に、投射ニューロンのうち橋、脊髄などに投射するものは5層に、視床に投射するものは6層に主に分布する。5層の投射ニューロンは *Fezf2* という転写因子によって、2/3層の交連ニューロンは *Satb2* という転写因子によってそれぞれ運命が決定され、個性を獲得する。例えば、*Fezf2* のノックアウトマウスでは5層のニューロンで *Satb2* の発現が亢進し、軸索を反対側の半球に伸ばすようになる (Chen et al., 2005)。反対に、*Satb2* のノックアウトマウスでは2/3層のニューロンで *Fezf2* の下流因子である *Ctip2* の発現が増加し、軸索を皮質下に投射するようになる (Britanova et al., 2008)。しかし、連合ニューロンの個性獲得、軸索投射先決定を制御する分子機構についてはほとんど明らかになっていない。現在のところ連合ニューロンに特異的な分子マーカーが知られておらず、これを同定する

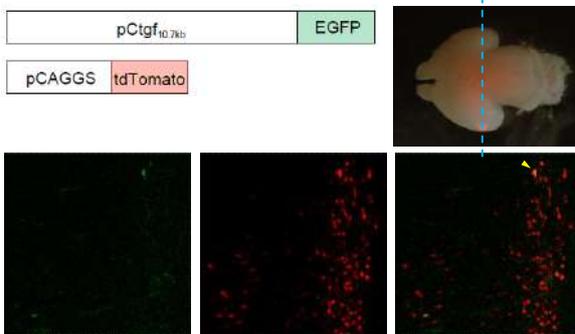
ことが連合ニューロンの研究を行う上で重要なツールとなる。研究代表者はこれまで、連合ニューロンの中でも特に異なる頭葉間を接続する長連合ニューロンを選択的に標識するため、1次体性感覚野 (S1) から1次運動野 (M1) へ投射する長連合ニューロン特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを行い、複数の候補遺伝子を得ている。これらの中には、長連合ニューロンの分布の特徴と合致する層特異的あるいはまばらな発現パターンを示すものが含まれており、前者は各層の長連合ニューロンの、後者は長連合ニューロン一般のマーカーとなる可能性を持っている。本研究では、まず、前者の層特異的な発現を示した候補遺伝子に関して、長連合ニューロンでの発現を確認し、長連合ニューロンの分子マーカーのセットを確立する。さらにこれらの遺伝子のプロモータを利用して蛍光レポータータンパク質を発現させ、長連合ニューロン及びその軸索を可視化する系を構築する。この実験系は、ニューロンの個性獲得とそれに対応した特異的軸索投射という、脳内の精緻な回路形成の分子機構を研究するための有用なツールとなる。近年、長連合線維の異常は統合失調症などの精神疾患や自閉症などの発達障害と関連があることが指摘されており、本研究の発展が将来的に、長連合線維の異常を示す疾患の病態解明につながることを期待される。

### 研究の内容および成果

昨年度に行った、長連合ニューロンと交連ニューロンを比較したマイクロアレイ解析により得られた長連合ニューロン特異的な遺伝子の候補に関して、特異的プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションとM1からの逆行性トレーサーによ

る長連合ニューロン標識を組み合わせた二重染色によって、S1の長連合ニューロンに発現している遺伝子の絞り込みを行った。その結果、6種類の遺伝子に関して長連合ニューロンにおける発現が確認できた。ただし、遺伝子ごとにオーバーラップ

の程度が異なっており、長連合ニューロンの中には遺伝子発現の異なるサブタイプがあることが示唆された。これらの遺伝子に関して、そのプロモータ領域を用いて長連合ニューロンを可視化するために、これらの遺伝子の遺伝子座が含まれる BAC クローンを入手し、10-20kb 程度の遺伝子上流配列の下流に蛍光レポーターあるいは DNA 組み換え酵素 Cre の遺伝子を導入したコンストラクトを作製している。現在、これらを、順次、electroporation によって胎生期大脳皮質に導入し、長連合ニューロンが標識されるか検討している。予備的なデータとして、6b 層に特異的に発現している *ctgf* 遺伝子のプロモータ(10.7kb)の下流に EGFP 遺伝子をつないだコンストラクトを用いて、6b 層のニューロンが産生される胎生 11 日目に大脳皮質に導入したところ、EGFP 陽性のニューロ



(図) *ctgf* 遺伝子プロモータを用いた長連合ニューロンでの EGFP 発現。10.7kb の *ctgf* プロモータの下流に EGFP をつないだコンストラクトと pCAGGS-tdTomato ベクター (左上) を胎生 11 日目で大脳皮質に導入し、胎生 18 日目に右上の点線部で冠状断を作製して tdTomato と EGFP の蛍光を観察した (下) と、tdTomato 陽性細胞のうち少数に EGFP 陽性細胞を認めた。

ンが観察されている (図)。

また、上記のアプローチと並行して、既知の大脳皮質の各層特異的な遺伝子や、遺伝子発現データベースである Allen Brain Atlas および A Transcriptomic Atlas of Mouse Neocortical Layers から層特異的な遺伝子を選び出し、その中から長連合ニューロンに発現しているものを探索した。同様に *in situ* ハイブリダイゼーションと t トレーシングの二重染色でスクリーニングした結果、2/3 層及び 5 層で強く発現している *plexinD1* 遺伝子が長連合ニューロンに発現していることが明らかになった。*plexinD1* のプロモータを用いたコンストラクトを大脳皮質に導入したところ、長連合ニューロンおよびその軸索が標識された。

また、長連合ニューロンの性質を解析する端緒として、長連合ニューロンがどのような神経伝達物質を持っているか解析した。小胞性グルタミン酸トランスポーター *vglut* 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションとトレーシングの二重染色により、*vglut1* 遺伝子が長連合ニューロンに発現していることが明らかになった。従って、長連合ニューロンはグルタミン酸作動性ニューロンであることが確かめられた。

現在は *ctgf* と *plxnd1* を含む長連合ニューロン特異的遺伝子プロモータのコンストラクトを用いて長連合ニューロンの軸索伸長の様子の解析を始めており、異なる層を起点とする長連合線維の回路構造の解明が期待できる。この系は、軸索誘導分子のノックダウン実験などにより回路形成を制御する分子機構を解析する際の有用なツールとなる。将来的には、長連合線維異常に関連する疾患の理解につながると期待される。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

Xie MJ, Yagi H, Kuroda K, Wang CC, Komada M, Zhao H, Sakakibara A, Miyata T, Nagata K, Oka Y, Iguchi T, Sato M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cereb. Cortex* (2012) May 22. [Epub ahead of print]

Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep*. 2013;3:1224

### 「特記事項」

本研究課題は、以下の学会で発表を行った。

岡雄一郎 他、マウス大脳皮質長連合ニューロン特異的遺伝子の同定 (第 35 回日本神経科学大会、平成 24 年 9 月、名古屋国際会議場、ポスター発表)

Oka Y, et al. Identification of long association neuron-specific genes in the mouse cerebral cortex.

(Symposium on sensory systems & neural circuits、平成 25 年 2 月、東京大学、ポスター発表)

岡雄一郎 他、マウス大脳皮質長連合ニューロン軸索の可視化の試み (第 118 回日本解剖学会総会・全国学術総会、平成 25 年 3 月、かがわ国際会議場、ポスター発表)

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金・若手研究(B)・平成 24-25 年度・特異的プロモータを用いた大脳皮質長連合線維の解析・代表・採択・3400 千円

科学研究費補助金・新学術領域研究・平成 25-26 年度・サブプレート依存的な領野間回路構築機構の解明・代表・申請中・9000 千円

福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」  
**細胞外シャペロンによる蛋白質品質管理機構の解明**

研究代表者： 小澤 大作 (テニユアトラック推進本部・助教)

共同研究者： 内木 宏延 (医学部・教授)、長谷川 一浩 (医学部・助教)、  
 大越 忠和 (医学部・助教)

概 要
<p>蛋白質の秩序を安定した状態に保つことは、生命活動を行う上で最も重要な事項の一つである。そのため、生物は蛋白質の恒常性を維持する様々な調節機構を備えている。細胞内における蛋白質の品質管理機構については、分子レベルでその詳細が明らかにされつつあるが、細胞外における蛋白質品質管理機構については、不明な点が数多く存在する。本研究は、細胞外シャペロンによる蛋白質品質管理機構の詳細に迫り、細胞外で蛋白質の異常凝集が起きるアミロイドーシスなどの疾患の治療・予防法開発に向けた端緒を掴むことを目的とする。具体的には、(1) 新規細胞外シャペロンの探索を行う。(2) 細胞外シャペロンによる蛋白質凝集抑制機構を解明する。これらの結果から、細胞外シャペロンネットワークによる細胞外蛋白質品質管理機構の包括的解明を目指す。</p>
関連キーワード
<p>シャペロン、蛋白質品質管理、アミロイド、アミロイドーシス、アルツハイマー病</p>

### 研究の背景および目的

近年、主に国外で細胞外における蛋白質品質管理機構の研究が進められており、細胞外シャペロンがその一翼を担うことが示されつつある。代表的な細胞外シャペロンとして $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2M$ ) やハプトグロビン、クラステリンが知られており、これらの蛋白質はすべて炎症に応じて血中濃度が上昇する急性期蛋白質である。細胞外シャペロンはアミロイド線維などの蛋白質の凝集を抑制するが、細胞外シャペロンがどのような機構で異常蛋白質を認識し蛋白質品質管理を行っているかは不明である。

透析アミロイドーシス患者の $\beta_2$ -ミクログロブリン ( $\beta_2m$ ) アミロイド線維沈着部位では、線維と共に $\alpha_2M$  が共存していることが示されており、血液透析患者の血清中では $\alpha_2M$  と $\beta_2m$  の複合体形成が報告されている。申請者はこれまで、 $\alpha_2M$  の $\beta_2m$  アミロイド線維形成に及ぼす影響を検討すると共に、 $\alpha_2M$  と $\beta_2m$  の複合体形成に着目し、 $\alpha_2M$  が $\beta_2m$  とどのように相互作用し複合体を形成するのか理解することで、細胞外シャペロンの異常蛋白質認識及び凝集抑制機構に迫った (Ozawa, D. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2011))。その結果、(a)  $\alpha_2M$  は 0.5 mM ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下、pH 7.5 における $\beta_2m$  線維形成反応を、濃度依存的かつ substoichiometric に抑制すること、(b) SDS 非存在下よりも SDS 存在下で $\alpha_2M$  と $\beta_2m$  の親和性が高まること、(c) 興味深いことに $\alpha_2M$  は SDS 存在下では一部がテトラマーからダイマーに解離し、疎水性領域をより露出すること、(d)  $\beta_2m$  は $\alpha_2M$  ダイマーにより強く結合すること、(e) 別の生理的条件でも、同様に $\alpha_2M$  のダイマー化や $\beta_2m$  との結合、

線維形成抑制が起こることを明らかにした。以上より、蛋白質が変性し凝集しやすい環境下では、 $\alpha_2M$  は自ら変性蛋白質と相互作用するために有利な構造に変化することで変性蛋白質との親和性を高め、 $\beta_2m$  などの蛋白質の凝集抑制を行っているのではないかと考えられる。しかしながら、 $\alpha_2M$  以外の細胞外シャペロンがどのような機構で異常蛋白質を認識し、凝集を抑制するのかは分かっていない。

加えて、最近大腸菌を使った研究から、細胞質内のみならず細胞外に近接する内膜と外膜に挟まれた細胞表層空間ペリプラズム領域においても、蛋白質の品質管理が行われていることが報告された (Quan, S. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2011))。ストレスにตอบสนองして大量発現される Spy と呼ばれる蛋白質は ATP 非依存的かつ substoichiometric にシャペロン活性を示し、蛋白質の凝集抑制だけでなく、変性蛋白質のリフォールディングも行うことが示された。大腸菌の Spy に相当する蛋白質をヒトの生体内で考えた際に一つの可能性として思い浮かぶのが、炎症に応じて放出され血中濃度が上昇する $\alpha_2M$  などの細胞外シャペロンである (Powers, E. T. and Balch, W. E., *Nature* (2011))。細胞外シャペロンもまた ATP を必要とせず、substoichiometric に蛋白質凝集を抑制する。しかしながら、細胞外シャペロンが Spy のように変性蛋白質のリフォールディングを行うのかは明らかにされていない。細胞外シャペロンによる細胞外の蛋白質品質管理機構の統一的理解は、アミロイド科学のみならず蛋白質科学の観点からも非常に重要である。

### 研究の内容および成果

$\alpha 2M$  やクラスチリン等以外でアミロイド線維と共存する急性期蛋白質もまたシャペロン活性を持つ可能性がある。本年度ではまず初めに、モノクローマター搭載型マイクロプレートリーダーを用いた high-throughput 系により、アミロイド線維形成を抑制する新規細胞外シャペロンを探索した。その結果、血清アミロイド P 成分や C 反応性蛋白質が、アルツハイマー病に関連するアミロイド $\beta$ の自発的線維形成を濃度依存的に抑制することを明らかにした(図1)。これらの蛋白質は、II型糖尿病に関連するアミリンのアミロイド線維形成もまた抑制することが分かった。さらに、血清アミロイド P 成分は、 $\beta 2-m$  アミロイド線維の形成を遅延させることを明らかにした。以上のことから、血清アミロイド P 成分と C 反応性蛋白質は、新たな細胞外シャペロン候補であることが示唆される。

これまでの細胞外シャペロン研究では、細胞外シャペロンが熱ショック蛋白質のように、変性した蛋白質の構造を巻き戻すリフォールディング能を保持するかについては詳細に検討されていない。従って、あらかじめ塩酸グアニジンで変性させたルシフェラーゼに細胞外シャペロンを添加し、酵素活性測定から細胞外シャペロンのリフォールディング活性を評価した。その結果、塩酸グアニジンで変性させたルシフェラーゼに $\alpha 2M$  を添加するとルシフェラーゼの活性が回復することが明らかになった(図2)。つまり、 $\alpha 2M$  のリフォールディング能が示された。この結果は、細胞外蛋白質品質管理機構の新たな一面を示唆する。

細胞内の分子シャペロンは、変性蛋白質の疎水性領域を認識することで変性蛋白質と相互作用し、蛋白質品質管理を行うと考えられている。これまでの研究から、 $\alpha 2M$  は自ら疎水性領域を露出し、その結果、変性蛋白質の疎水性領域との間に疎水性相互作用を生み出し結合することで、蛋白質凝集を抑制することが示唆された。しかしながら、細胞外シャペロンの異常蛋白質認識機構の詳細な知見については得られていない。分子レベルでその詳細を明らかにするために、核磁気共鳴法を用いて、変性蛋白質の細胞外シャペロン結合領域の

同定を目指し、研究を進めている。現在、 $\alpha 2M$  の各種ドメインごとの発現系の構築および精製法の確立を行っており、数種のドメインは最終精製段階まで済んでいる。 $\alpha 2M$  は非常に巨大な高分子であるため、 $\alpha 2M$  と $\beta 2-m$  が複合体を形成すると核磁気共鳴測定の解析が困難であった。一方、 $\alpha 2M$  の各種ドメインと $\beta 2-m$  を反応させることで、シャペロン機能を持つドメインの同定、さらには核磁気共鳴測定により変性蛋白質の細胞外シャペロン結合領域を明らかにすることができると考えられる。

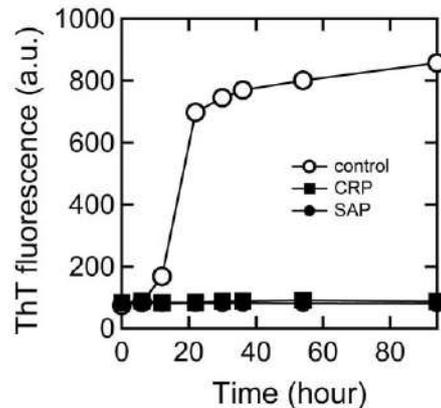


図1. アミロイド $\beta$ 線維形成抑制

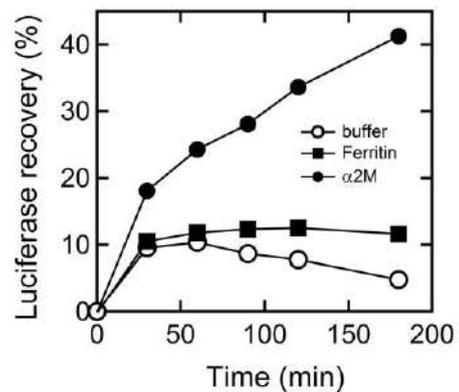


図2. リフォールディング活性測定

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

国際学会: Ozawa D, Hasegawa K, Ookoshi T, Naiki H. Molecular Mechanisms of  $\beta 2$ -Microglobulin Amyloid Fibril Formation. XIII<sup>th</sup> International Symposium on Amyloidosis. Groningen, May 6-10, 2012.

「特記事項」

特になし。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費助成事業・若手研究(B)・平成 24-25 年度・細胞外シャペロンによる蛋白質品質管理機構の解明・研究代表者・採択・3,400 千円  
日本学術振興会・科学研究費助成事業・基盤研究(B)・平成 22-24 年度・ヒトアミロイドーシス発症の分子機構-試験管内モデルと動物モデルの統合による解明-・研究分担者・採択・14,700 千円

## 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」 糸状菌における二次代謝産物遺伝子群の不活性化機構の解明

研究代表者：本田信治（テニユアトラック推進本部・助教）

概 要
全ゲノム解析の結果、糸状菌を含む微生物にはこれまでに同定された化合物をはるかに凌駕する数の二次代謝産物合成遺伝子群が存在することが明らかとなった。実際に、この“眠った遺伝子”を様々な環境刺激や遺伝子工学的手法などを駆使して活性化させる試みがなされているが、その多くは失敗に終わっている。その原因として、これらの遺伝子群の不活性化（ヘテロクロマチン）維持の分子機構がまったく謎であることが挙げられる。本研究はエピジェネティクス研究に携わっている申請者の新たなアプローチにより、この基礎的な分子機構の解明を目指すことが第一の目的である。そして、この解析結果を元に不活性化解除のための有効な対処方法を提案し、効率よく新規生理活性物質の発見を目指す。
関連キーワード
二次代謝産物、糸状菌、アカパンカビ、エピジェネティクス、不活性化

### 研究の背景および目的

糸状菌を含む微生物の二次代謝産物は、ペニシリンなどの抗生物質や、感染症や癌などの治療薬として利用され、多くの人命を救ってきた。今後も微生物の二次代謝産物は、薬剤耐性を獲得した細菌や、治療が困難な難病に対する新たな治療薬として期待されている。一方、近年の全ゲノム解析の結果、微生物には想像以上に二次代謝合成遺伝子群が存在していることがわかった。しかし、多くの研究者が新規生理活性物質の精製を目指し、これらの遺伝子群の活性化を試みているが、その多くは失敗に終わっている。

本研究代表者は「これらの二次代謝合成遺伝子群がエピジェネティクス制御により堅固に発現が不活性化されているのではないかと考え、この分子機構を解明すれば、効率よく二次代謝合成遺伝子群の発現を制御でき、新規生理活性物質の発見に繋がると考えた。本研究代表者は今まで糸状菌のアカパンカビ (*Neurospora crassa*) を用いて、トランスポゾンなどの宿主には有害な利己的な遺伝子を不活性化させるエピジェネティクス制御機構（ヘテロクロマチン）の研究を行ってきた。

エピジェネティクスとは「DNA 配列の変化を伴わず、後天的な修飾により遺伝子発現が制御・維持される仕組み」である。この後天的な修飾の一つに、ヒストンへの修飾がある。ヒストンはDNAを収納する蛋白質で、このN末端領域（ヒストンテール）に、メチル化、アセチル化、リン酸化などの修飾が集積する。そして、これらの修飾の組み合わせが暗号として読まれ、様々なクロマチンの機

能を導くことが知られている。これまでの申請者の研究により、ヘテロクロマチンがヒストンH3の9番目のリジン残基のメチル化（H3K9メチル化）

(Lewis<sup>#</sup>, Adhvaryu<sup>#</sup>, Honda<sup>#</sup> et al. *PLoS genet.* 2010)、ヒストン低アセチル化 (Honda et al, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012)、そしてDNAメチル化 (Honda & Selker, *Mol. Cell. Biol.* 2008) の3重のシステムにより堅固に不活性化されていることが分かってきた。

最近、アカパンカビと同じ糸状菌に属する *A. nidulans* において一部の遺伝子群がH3K9メチル化依存のヘテロクロマチンにより不活性化されることが発見された (Reyes-Dominguez et al, *Mol. Microbiol.* 2010)。しかし大多数の二次代謝産物合成遺伝子群は不活性化されたままであり、他のエピジェネティクス修飾（例、H3K27メチル化、H4K20メチル化など）により制御されている可能性が考えられる。実際エピジェネティクス修飾に関与すると考えられている遺伝子の欠損によって、不活性化されていた一部の二次代謝産物合成遺伝子群が直接もしくは間接的に解除され、新規生理活性物質の発見に繋がった (Bok et al, *Nat. Chem. Biol.* 2010)。しかし、この分子機構はまったく謎のままである。申請者はこれらの背景を踏まえ、アカパンカビのエピジェネティクス解析、特にヘテロクロマチンによる遺伝子不活性化の研究経験を生かし、糸状菌に共通する二次代謝産物合成遺伝子群のエピジェネティクス制御による不活性化機構の解明を目指す。

## 研究の内容および成果

糸状菌における二次代謝産物合成遺伝子群の不活性化機構を解明するため、エピジェネティクス解析が最も進んでいるアカパンカビ (*Neurospora crassa*) を本研究のモデル生物に選んだ。アカパンカビには二次代謝産物合成遺伝子群が存在しないと考えられていたが、最近開発された SECONDARY METABOLITE UNIQUE REGIONS FINDER (SMURF) プログラム (Khaldi N, et al, Fungal Genet Biol. 2010) により、アカパンカビの全ゲノム上に 12 の二次代謝産物合成遺伝子群が存在することを確認した。本研究代表者は、現在進行中のアカパンカビ大型プロジェクトの一つである、現時点で解析可能なクロマチン上のすべての化学修飾など (DNA メチル化、ヒストン修飾、ヒストンポジショニング) の局在分布を全ゲノムレベルで調べるプロジェクトに参加している。そこで、この未公開データを用いて、上記の二次代謝産物合成遺伝子群に共通するエピジェネティクスな分子機構が存在するかを調べた。その結果、12 の遺伝子群の内、半分の 6 つの遺伝子群にヒストン H3 の 27 番目のリジン残基にメチル基が 3 つ付いた修飾 (H3K27me3) の局在を確認した。また、残りの 6 つの遺伝子群に関しては特異的に局在する修飾等は発見できなかった。H3K27 メチル化は、哺乳類において遺伝子の不活性化に関わっていることが知られている。実際アカパンカビにおいて、すべての H3K27 メチル化を担うヒストンメチル化酵素 SET-7 遺伝子を欠損させることにより、H3K27 メチル化領域に局在する一部の遺伝子の不活性化が解除される (オレゴン大学 Selker 教授による未公開データ)。しかし、この

H3K27 メチル化を担う SET-7 遺伝子は糸状菌において、アカパンカビと一部の近縁種のように保存され、二次代謝産物合成遺伝子群を多数もつアオカビ (*Penicillium*) や、麹菌が属するアスペルギルス (*Aspergillus*) には保存されていないことが分かった (※これらの菌からペニシリンとスタチンなど多くの生理活性物質が発見されている)。また実際に、アスペルギルス属の *A. nidulans* において、H3K27 メチル化の検出ができなかった (Selker 教授による未公開データ)。これらのことから、アカパンカビは独自の二次代謝産物合成遺伝子群の不活性化機構を進化させてきたことが考えられる。今後は、アオカビ属とアスペルギルス属において同様な方法で解析を行い、糸状菌に共通する二次代謝産物合成遺伝子群の不活性化機構の発見を試みる予定である。また、糸状菌のみに保存された特異的なエピジェネティクス制御によって、二次代謝産物合成遺伝子群が不活性化されている可能性も否定できない。この可能性を対処するために、順遺伝学手法を行う予定である。詳しい方法として、ヘテロクロマチンを形成する二次代謝産物合成遺伝子群に薬剤耐性遺伝子を挿入し、この遺伝子が不活性化している株を作成する。次に紫外線照射によるランダムな遺伝子変異により、不活性化が解除され薬剤耐性を有する株を単離し、次世代シーケンズで変異がある遺伝子を迅速に同定する。このように、逆遺伝学・順遺伝学手法の両方のアプローチにより原因遺伝子を同定し、この解析結果を元に効率よく遺伝子不活性化を解除する技術を開発し、他の糸状菌への応用を目指す。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

なし

[助成組織] 武田科学振興財団

[助成制度] ライフサイエンス研究奨励

[期 間] H24

[研究課題] 糸状菌における二次代謝産物合成遺伝子群の不活性化機構の解明

[代表/分担] 代表

[採 否] 不採択

### 「特記事項」

なし

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

[助成組織] 科研費

[助成制度] 新学術領域研究公募研究

[期 間] H25~26

[研究課題] 糸状菌における二次代謝産物合成遺伝子群の不活性化機構の解明とその応用

[代表/分担] 代表

[採 否] 申請中

[申請金額] 600 万円

[助成組織] アステラス病態代謝研究会

[助成制度] 研究助成

[期 間] H24~25

[研究課題] 二次代謝産物合成遺伝子群の不活性化機構の解明

[代表/分担] 代表

[採 否] 不採択

福井大学研究育成経費「東日本大震災からの復興に関連する調査・研究の支援」  
**東日本大震災被災者を対象とした受診行動促進支援法の創出研究**

研究代表者： 山村 修（医学部・講師）

共同研究者： 森田浩史（医学部・助教），前田文江（医学部・技師）

<b>概要</b>	災害関連死を防止する具体的な対策を創出するため、被災地で2つの事業を行った。災害医療支援活動検証事業では、互理郡災害医療支援検証会議を開催し、医療支援活動に従事した互理郡並びに福井県の医療・行政関係者 44 名により、東日本大震災発災 2 カ月間の医療支援の問題点を協議した。その結果、在宅被災者への迅速な支援が災害関連死の減少につながる可能性が示唆された。受診行動促進型検診の創出事業では、互理郡内 9 か所の仮設住宅団地において被災者を対象とした無料エコー検診を実施し、医療機関への受診が必要と判断された 34 名について、紹介状を発行した。問診票に基づく調査では、震災後に 10 分以上の歩行回数が減少した受診者が 64.0%に達した。震災後に通院回数が減少した受診者は JR 常磐線が途絶している山元町に多く、特に周辺家屋の少ない山間部の仮設住宅地に多かった。被災地におけるエコー検診は、被災者の受療行動を促す可能性がある。
<b>関連キーワード</b>	東日本大震災、宮城県互理郡、災害医療支援、在宅被災者、エコー検診

**研究の背景および目的**

巨大災害の被災地では、長期にわたる避難生活により、死にいたる重篤な疾病を発症する被災者が相次いでいる。これらは「災害関連死」あるいは「災害関連疾患」と言われ、災害医療支援によって予防できる可能性が高いことから、「防ぎ得る死（preventable death）」とも呼ばれている。背景には被災者の生活環境の悪化と受診行動の低下があり、発災直後から被災者の健康維持を促す対策が求められている。研究チームは 2007 年 3 月の能登半島沖地震以降、地震被災地における下肢静脈エコー検診に従事しており、深部静脈血栓症（deep vein thrombus：以下 DVT）の有無が生活不活発状態の目安となる可能性を、他の研究者とともに指摘してきた。東日本大震災においても、発災初期より宮城県や岩手県の被災地でエコー検診に従事し、市町ごとや避難所の立地条件ごとの DVT の検出率の差異を指摘してきた。また、研究チー

ムは発災 8 日後より宮城県互理郡に入り、避難所における医療支援活動にも従事した。本研究では過去のエコー検診の結果や被災地での医療支援活動の経験を踏まえ、今後の関連死を防止する具体的な対策を創出するため、以下に示す 2 つの事業を実施した。

1) 災害医療支援活動検証事業

発災早期（約 2 ヶ月間）における災害関連死の背景を検討するため、宮城県互理郡において被災地の医療・行政機関と被災地外の医療・行政機関が協議する場を設定し、受診行動低下の背景と、今後の巨大災害発生時の対応を検討した。

2) 受診行動促進型検診の創出事業

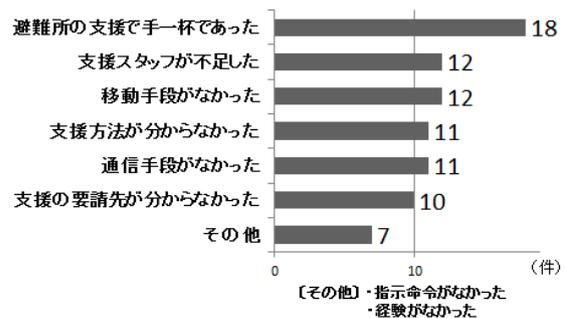
仮設住宅設置後の被災者の生活状況や受診状況を検討するため、被災地の仮設住宅団地において、エコー検診を実施し、被災者の受診行動を促進する新たな支援法の創出を試みた。

**研究の内容および成果**

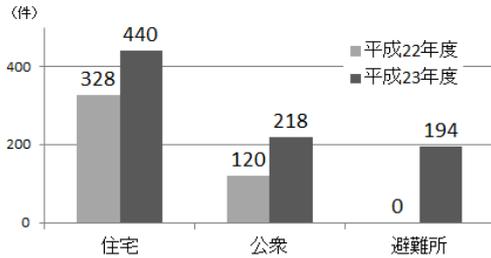
1) 災害医療支援活動検証事業

平成 25 年 2 月 2 日に宮城県互理郡山元町において「互理郡災害医療支援検証会議」を開催した。互理郡から 31 名、福井県から 13 名の医療・行政関係者が集まり、主に東日本大震災発災後 2 カ月間の医療支援の問題点を協議した。アンケートと協議内容からは、通信情報網と移動手段の喪失（交通寸断とガソリン不足）、在宅被災者支援の遅れ等が受診行動低下の背景として挙がり、迅速な支援体制の整備が今後の課題であることが確認された（図 1）。特に発災 2 ヶ月間は避難所以外の救急搬送も大幅に増えており（図 2）、その多くが在宅被災者と考えられた。また避難所からの搬送例よりも住宅からの搬送例がより重症であった。

（図1）発災1週以内に在宅被災者の医療支援を実施する上で障害となったことは何か？（複数回答可）



(図2) 亶理郡における救急車両の出動先の変化



平成22年度並びに23年度の3月11日より16週間分の搬送件数を比較  
(亶理地区行政事務組合消防本部資料より)

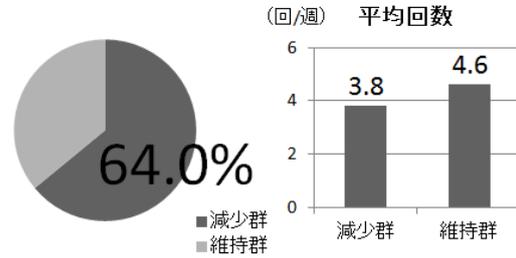
この結果から、在宅被災者への迅速な支援が災害関連死の減少につながる可能性が示唆された。

2) 受療行動促進型検診の創出事業

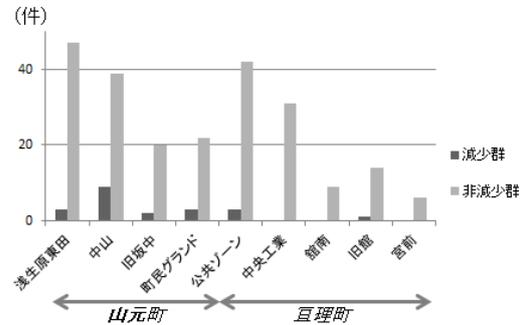
平成24年9月15日と16日に、亶理郡亶理町と山元町の9か所の仮設住宅団地において、356名(男性78名、女性278名、年齢70.±10.1歳)の被災者にエコー検診(無料)を実施した。その結果、下肢静脈エコーで82名(23.1%)、腹部エコーで134名(68.3%)、心エコーで88名(34.9%)の有所見者を検出した。主な所見では、DVTは15例、婦人科腫瘍を含む腹部腫瘍は8例、胆石は14例、心拍出量低下者(EF<55%)は2例であった。受診者のうち追加検査と治療が必要と判断された34名について、紹介状を発行した。

問診票に基づく調査では、震災後に10分以上の歩行回数が減少した受診者が64.0%に達した(図3)。震災後に通院回数が減少した受診者は鉄道(JR常磐線)が途絶している山元町に多く、特に周辺家屋の少ない山間部の仮設住宅地(中山地区)が多かった(図4)。このような地区には今後も検診の介入が有効と考えられた。

(図3) 震災後の10分以上の歩行回数の変化



(図4) 震災による通院回数の変化



3) 研究の成果

本研究により、発災初期の関連死防止には在宅被災者支援が有効となる可能性が示された。また仮設住宅開設後は、被災者の活動性は低下しやすく、地理的条件により受診行動が低下している可能性が示唆された。なお、仮設住宅地におけるエコー検診は、被災者の受療行動向上に寄与する可能性がある。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- 1) 山村 修, 鈴木友輔, 川野貴久, 森田浩史, 寺澤秀一. 平野部の津波被災地における脳心血管イベントの発生動向. 血栓と循環 20, p63-66, 2012.
- 2) 山村 修. 救急搬送記録から見た災害医療支援における神経内科医の役割. 神経治療学 29, p213-220, 2012

「特記事項」

- 1) 平成25年2月に、本研究チームによる亶理郡でのエコー検診活動を知った福島県南相馬市の医療機関より、被災者を対象としたエコー検診の実施要請があった。
- 2) 平成25年3月に亶理郡災害医療支援検証会議報告書を亶理郡亶理町、山元町、福井県、あわら市、坂井市、福井県及び郡市医師会に提出し、地域防災計画や災害マニュアルの改訂等における参

考資料として、利用を促した。

- 3) 平成25年3月に朝日新聞、中日新聞の地方版で亶理郡災害医療支援検証会議報告書が紹介され、NHK地方ニュースでも紹介された。4月以降に福井テレビにおいても報道予定となっている。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

助成組織・助成制度・種目・期間・研究課題・代表/分担・採否・採択金額など

- 1) 科学研究費補助金 基盤研究(C)(一般)平成24年~28年度, 代表, 採択, 5,000千円. 津波被災地をフィールドとした下肢静脈エコー所見と止血機能検査の研究.
- 2) 国立大学協会 震災復興・日本再生支援事業平成25年度, 代表, 申請中. 東日本大震災被災者を対象としたエコー検診による受療行動促進事業.

福井大学研究育成経費「東日本大震災からの復興に関連する調査・研究の支援」

東北塩害農地における除塩事業の事前・事後評価

研究代表者： 福原 輝幸（工学研究科・教授）

共同研究者： 寺崎 寛章（工学研究科・特別研究員）

<b>概 要</b>	東北塩害農地における除塩事業の事前・事後評価 本研究では宮城県名取市の塩害水田土壌を対象に、塩移動モニタリング実験を行うとともに、二次元塩移動数値解析モデルを構築し、除塩シミュレーションを行った。本研究により得られた主な結果は次のとおりである。①表層付近における塩濃度は体積含水率と負の相関関係にあり、晴天日が続く場合に塩濃度は著しく上昇するが、降雨冠水後に塩分は下方へ移動する。②塩移動数値解析モデルを構築し、除塩シミュレーションを行った結果、暗渠部分に近い土壌の塩濃度低下は著しいものの、暗渠から離れるに従い塩濃度は低下し難い。③灌水回数の増加に伴い残塩率は低下するものの、その低下率は鈍化する。
<b>関連キーワード</b>	東日本大震災、塩害、除塩シミュレーション、塩移動モニタリング

研究の背景および目的

【研究背景】

東日本大震災被害の中でも津波による農地の塩害(過剰な塩化ナトリウムに起因する作物の生育障害)は深刻であり、特に宮城県の冠水面積は1.5万haにも及び(表1参照)、早期の農業基盤整備および土壌環境改善が望まれている。

現在、除塩(縦浸透法(リーチング)、表層排土法等)が行われているものの、除塩は事業者の経験に委ねられており、その方法や効果に関して不明な点が多い。例えば、①リーチングにおける灌水時間や排土法における削除土量に関する科学的根拠は乏しい、②除塩効果は圃場の作土層の地表から約30cmまでの塩濃度でのみ評価しており、塩分の鉛直分布(動態)を正確には把握しきれていない、③除塩対象区画が広範囲に亘るため、長期間の土壌中の塩分動態を追跡調査できていない、④津波により塩性化した地下水の水質および水位の変化は不明である、などの課題を残している。

【研究目的】

本研究では、小塚原南農業復興組合(代表:遠藤清氏)および亙理農業改良普及センター(代表:相澤和浩氏)の塩害水田土壌(宮城県名取市小塚原汐入)を対象に、土壌塩濃度鉛直プロファイルデータに加えて、土壌温度および土壌水分データ、気象データ(降雨等)、塩性地下水の影響および排水状況等を調べるとともに、現在行われているリーチングによる除塩工事の効率化を図るために、二次元塩移動数値解析モデルを構築し、除塩シミュレーションに基づいて塩移動の基礎的知見を得ることを目的とする(図1を参照)。

表1. 津波による田畑の冠水面積(ha)

県名	耕地面積 (平成22年)	冠水面積	冠水面積率 (%)	冠水面積内訳	
				田	畑
青森県	156,800	79	0.1	76	3
岩手県	153,900	1,838	1.2	1,172	666
宮城県	136,300	15,002	11	12,685	2,317
福島県	149,900	5,923	4	5,588	335
茨城県	175,200	531	0.3	525	6
千葉県	128,800	227	0.2	105	122
合計	900,900	23,600	2.6	20,151	3,449

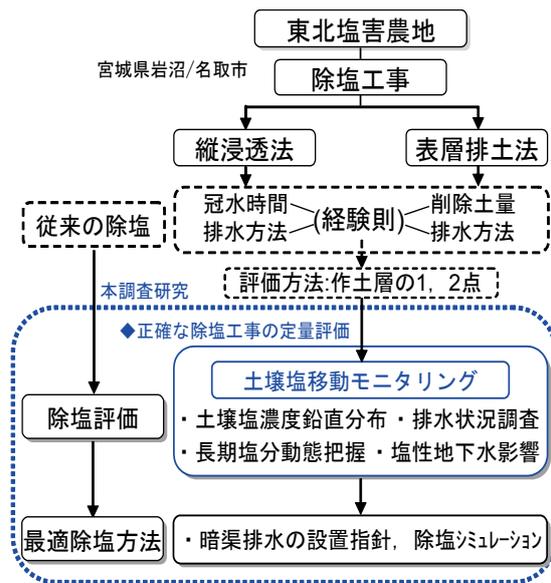


図1. 除塩シミュレーションフロー

## 研究の内容および成果

## 【研究内容】

本研究では塩害が深刻な宮城県名取市の塩害水田土壌(38° 10'45.32"N, 140° 56'10.64"E)を対象に、塩移動モニタリング実験を行った。

実験では圃場に水分センサー、塩分センサーおよび熱電対を深度別に埋設し、土壌鉛直プロファイルデータを長期に亘って取得する(図2を参照)。同時に、気象ステーションを設置し、気温、相対湿度、全天日射量および降雨量を自動計測する。また、農家と協力して定期的に土壌サンプリングおよび周辺の排水状況調査を行うとともに、測定機器の管理を行った。

長期土壌モニタリングでは、除塩工事の情報をもとに、塩濃度の低下や水分量の鉛直プロファイルの経時変化を適宜測定し、除塩効果を定量的に評価した。

最後にそれらの実験データを基に除塩前後の土壌塩移動解析を行い、二次元塩移動数値解析モデルを構築し、除塩シミュレーションを行った。

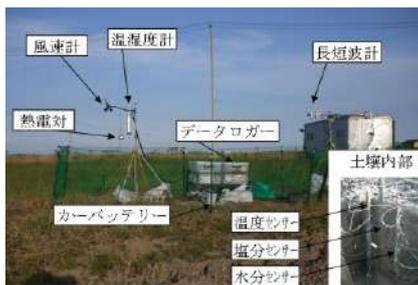


図2 塩移動モニタリング実験装置

## 【研究結果】

本研究で得られた結果の一部を以下に列挙する。

- 図3は夏季における表層塩濃度の経時変化を示す。表層付近における塩濃度は体積含水率と負の相関関係にあり、晴天日が続く場合に塩濃度は著しく上昇するが、降雨後には減少する。なお、一旦冠水した後の表層塩濃度は低い値で推移する。
- 図4は除塩シミュレーションの結果の一例を示す。計算実行の前には室内実験より拡散係数や分散係数などの塩移動パラメーターを測定した。除塩シミュレーションを行った結果、中心の暗渠に近い土壌の塩濃度低下は著しいものの、暗渠から離れるに従い塩濃度の低下は鈍化した。
- 図5は残塩率と灌水回数の関係を示す。灌水回数の増加に伴い残塩率は低下するものの、3~4回以上の灌水は除塩に対して効果は小さいことが分かった。

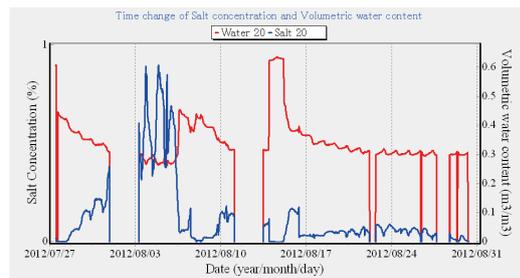


図3 夏季における表層塩濃度経時変化

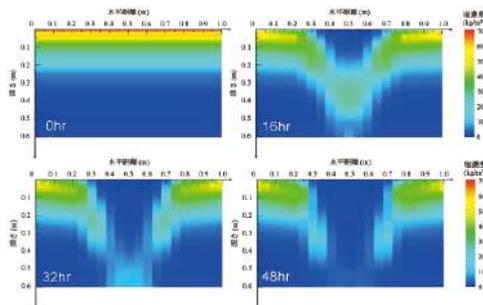


図4 除塩シミュレーション

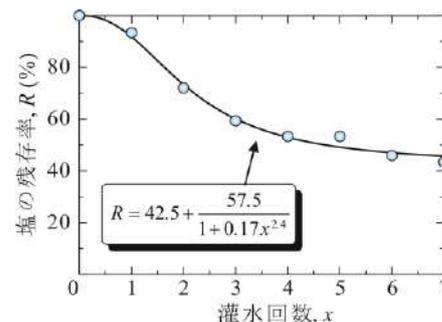


図5 残塩率と灌水回数の関係

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

## 「主な発表論文等」

- 7th Asia-Pacific Conference on Unsaturated Soils, Sydney Australia 投稿予定
- 土木学会第68回年次学術講演会後援概要集 投稿予定
- 平成25年度土木学会関西支部年次学術講演会 投稿予定

- 平成2013年 第57巻水工学論文集 投稿予定

## 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 新技術開発財団「東日本大震災復興支援特定研究助成2013」 応募予定
- 高橋産業経済研究財団 応募予定

福井大学研究育成経費「東日本大震災からの復興に関連する調査・研究の支援」

## 福島県高線量地域の屋内被爆量低減に関する研究

研究代表者： 玉川 洋一（工学研究科・教授）  
 共同研究者： 小川 泉（工学研究科・准教授）

<b>概 要</b>	3.11 福島第1原子力発電所事故により大気中に放出された放射性物質の影響により福島県の関連地域の住民の方は不自由な生活を余儀なくされている。家屋内の生活による被曝量を低減するための遮蔽方法や生活パターンを明らかにするため、福島県およびJAEAの協力を得て、福島県伊達市の民家3軒の屋内外の空間線量を除染前後で詳しく調べた。除染により屋内の空間線量が大きく低下したことが確認された。住宅全体として約40%の線量の低下が見られたが、特に住宅2階部分における空間線量の低下は、除染により55%減少した。また、この傾向はコンピュータシミュレーションによっても導出され、家屋内空間線量の低下には家屋周辺の土地の形状変更やブロック塀の設置等が有効であることが示唆された。
<b>関連キーワード</b>	福島県、放射線、除染、空間線量、現地調査、シミュレーション

### 研究の背景および目的

3.11 福島第1原子力発電所事故によって大気中に放出された放射性物質により、周辺の地域が汚染され、住民は避難を余儀なくされている。事故から1年が経過し、一部では除染活動が進められて住民が戻りつつある地域もあるが、高線量地域は未だ手が付けられていない。本研究では、主に比較的高い線量の地域の現状と対策を調査し、これらの地域における現状を詳細に把握し、住民が戻ることが出来るように復旧するための除染方

法や住居およびその周辺での遮蔽方法について研究し、福島県の該当地区の復旧に役立てる知見を得ることを目的とする。

また、これから社会で活躍するこの分野の学生等にも、この現状を把握させて解決方法を模索させることは教育上大変有用であると考えられるため、研究代表者らの所属する研究室の希望学生には現地調査等に積極的に参加してもらうことも第2の実施目的とする。

### 研究の内容および成果

#### 1. 現地調査（除染前）

福井大学附属国際原子力工学研究所所属教員や日本原子力研究開発機構(JAEA)職員の協力により、福島県内で積極的に除染を行っている地域である福島県伊達市との協力関係を構築でき、伊達市内の住宅3軒の放射線量を調査することとした。調査に当たっては、予め伊達市の担当者と打ち合わせを行い、家屋内および屋外の各部分および外構・庭・畑・裏山等の地形に合わせて代表的なポイントを選び出し、平成24年10月にそのポイントにおいて、睡眠時、座位、立位を想定して10cm、50cm、100cmの3つの



図1. 側溝部分を測定する様子

測定位置を設定してNaIシンチレーションサーベイメーターを用いて空間線量を計測し、さらに屋外の高線量場

となっている雨樋付近と側溝部分の計測を行った（図1）。同時に屋内外の放射線エネルギースペクトルを測定し、汚染源核種がセシウム137とセシウム134であることを確認した（図2）。また、屋外の代表的な点の表土をサンプリングして持ち帰りγ線スペクトルメーターを用いて残留放射性核種と絶対放射線量を精査した。

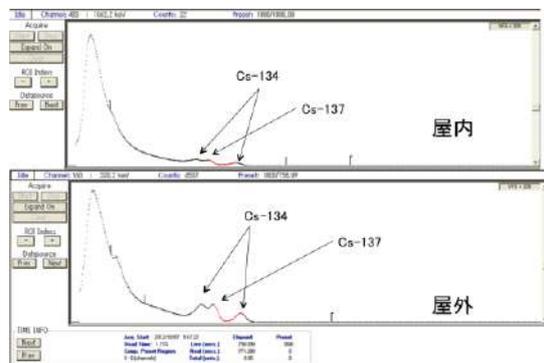


図2. 屋内外の放射線エネルギースペクトル

その結果、屋内の空間線量は測定位置の高さとともに大きな値を示すこと（特に2階部分の空間線量が高い傾向がある）、窓付近に比べて部屋中央において線量が小さくなる傾向があることを確認した（図3）。

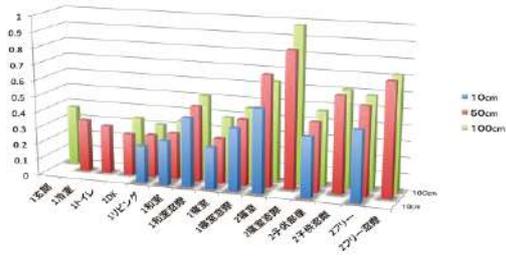


図3. 屋内空間線量の例（1軒目：除染前）  
（縦軸は $\mu\text{Sv/h}$ ）

## 2. 被曝線量シミュレーション(GEANT4)

現地調査から得たデータを基に、モデル的な家屋の配置を作成し、シミュレーションによる屋内被曝量を計算した結果、住宅周辺表土からのガンマ線の寄与については、住居一階基礎部分（コンクリート）による遮蔽効果が大きな役割をしていることを確認した。同時に、住宅周辺の地形によって影響が異なり、特に2階部分の空間線量に影響を与えていることが明らかとなった。特に、周辺土地の表面状態（凹凸の大きさ）が1階部分の空間線量に影響を与えていることが確認され、コンクリートブロック塀等の設置が遮蔽に大きく寄与していることを確認した。

## 3. 現地調査II（除染後）

除染は、住宅の周囲数m（宅地内）の表土数cmをはぎ取り汚染されていない土に入れ替えることで進められているが、汚染土の最終的な処分方法が決められていないため、各住宅から出される汚染土壌は専用の袋に詰められて集落内に設けられている仮置き場に一時保管される（図4）。

現地調査ではこのような複数の仮置き場の状態を調査し、伊達市の担当者から、仮置き場設置のために住民の理解を得るための説明の難しさを聞き取り、仮置き場内の空間線量が土壌保管袋から数m離れた地点で、土壌の自己遮蔽能力から他の場所とほとんど差のない値になることを確認した。



図4. 仮置き場の様子

このような除染後の調査を、平成25年2月に除染前の調査対象と同一の3つの住宅において実施した。除染後の家屋内空間線量の調査結果を図5に示す。これは図3に示したものと同じ家屋のものだが、まず、グラフ右側の領域に示している2階部分の空間線量が大きく減少していることがわかる

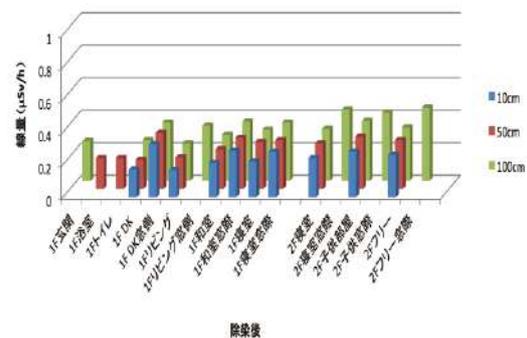


図5. 屋内空間線量の例（1軒目：除染後）  
（縦軸は $\mu\text{Sv/h}$ ）

調査した3軒の平均値として、家屋周辺の除染により1階部分は28.7%、2階部分は55.5%、全体として38.7%減となり除染の効果が確認された。

## 4. まとめ

伊達市とJAEAの協力により、福島県伊達市の民家3軒の除染前後の家屋内空間線量調査を実施し、除染作業により家屋内空間線量が低下していることを確認し、シミュレーションによる予測が裏付けられた。今後さらに遮蔽効果の検討を行う。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表等」

1. 「福島県高線量地域での屋内被曝量低減に関する研究」日本物理学会北陸支部会(2012. 12. 1)

2. 「国内大学等の福島への取り組み」放射線健康リスク管理福島国際学術会議(2013. 2. 25)

3. 「福島県高線量地域での屋内被曝量調査」日本原子力学会春の年会(2013. 3. 27)



---

**福井大学**  
**生命科学複合研究教育センター**  
**平成24年度研究費助成事業**

---

生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業  
「学内共同研究等」

## in vitro および in vivo イメージングを用いて聴覚神経回路における 聴覚情報の統合の仕組みを探る

研究代表者：伊藤 哲史（医学部・助教）、池田 弘（工学研究科・教授）

<b>概 要</b>	音情報は多数の神経核によって特徴が抽出される。抽出された情報が収束する下丘で音情報が統合されると考えられるが、その統合がどの細胞で行われるか不明であった。下丘局所回路での情報処理様式を調べるため3つの実験を行った。第1に、組み換えウイルスを用いたニューロン標識によって、下丘大型抑制性ニューロンに対する入力を可視化し、大型抑制性ニューロンの存在部位によって入力の種類が異なることを明らかにした。第2に、生体マウスに音刺激をあたえることで下丘表層の多数の神経活動を可視化することに成功した。第3に、c-fos 遺伝子の発現を利用することで、大型抑制性ニューロンの活動を効率よく引き起こす音刺激についての知見を得ることに成功した。これらのイメージング技術を組み合わせて下丘での情報処理、情報統合の仕組みを可視化することが可能であると考えられる。
<b>関連キーワード</b>	聴覚、c-fos、カルシウムイメージング、神経回路

### 研究の背景および目的

自然環境は周波数成分や時間変化に富んだ複雑な音に満ちている。聴覚系の一番明瞭な機能地図が周波数地図（トノトピー：同一最適周波数を持つ細胞が縞状に並ぶ）であることから従来の聴覚研究で用いられてきた純音は時間構造が定常であるが、そのような音は生物学的意義に乏しい。コミュニケーション音は音圧や周波数が複雑に時間変化するし、獲物/捕食者の立てる足音は音空間で時間に伴い移動することからわかるように、ダイナミックに変動する音こそが生物学的に重要である。このため音の時間変化について検出する神経回路が聴覚系に存在する。たとえば一部のニューロンは純音には殆ど応答せず、上昇する周波数変調音(FM)に応答する一方、同じスペクトルの下降FM音には応答しない。下丘は下位の聴覚神経核で並列処理された聴覚情報が初めて収束する場所であり、FM音などの複雑音に特異的に応答する細胞が出現する。ではこのような複雑音に選好性を持つ細胞は形態学的に同定可能であろうか？

前年度までの研究で、下丘のニューロンの約10%を占める大型抑制性細胞 (Ito et al., 2009) がさ

まざまな聴覚系神経核からの情報を統合することが形態学的に明らかとなった。さらに、予備実験の結果から、下丘の多くの神経細胞が特定の周波数の音に対応した入力を受けるのに対し、大型抑制性細胞はさまざまな周波数からの音を統合するのに適した形態を有することも明らかとなった。このことから大型抑制性細胞は様々な聴覚情報を統合する、つまり複雑音への選好性を持ちうる形態を有していると考えられる。

大型抑制性細胞が下丘や下丘下の多数の興奮性ニューロンの活動を統合して複雑な音への応答を作り出す、という仮説を検証するためには、多数の大型抑制性細胞と興奮性細胞が作る神経ネットワークの構築を調べ、それが生体内でどのように応答するか調べる必要がある。

本研究は、申請者が得意とする局所神経回路の分析に加え、下丘の興奮性と抑制性細胞集団の活動を機能イメージング技法によって調べる。これによって大型抑制性細胞の聴覚情報処理における役割が解明することを目的とする。

### 研究の内容および成果

下丘の局所神経回路の構築とその機能を解明するため、以下に挙げる3種類の実験を行った。

#### 1: 組み換えウイルスを用いた下丘大型抑制性細胞への興奮性入力の解析

Sindbis palGFP ウイルスを下丘や、下丘に注射す

る3種類の下位神経核に注入したところ、標識終末の一部が大型抑制性細胞細胞体に接触するさまが観察された。下丘全体を共焦点レーザー顕微鏡でスキャンし、この接触を受けた大型抑制性ニューロンのマッピングを行った。同側下丘のニュー

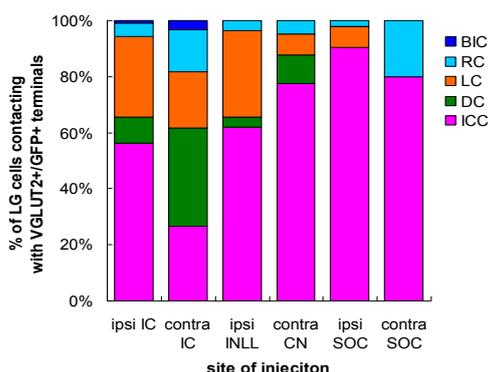


図1: トレーサー注入部位ごとに GFP 陽性興奮性終末の接触を受ける大型抑制性ニューロンの分布は異なる。下丘は下丘のすべての領域の大型抑制性ニューロンに inputs するのに対し、対側下丘のニューロンは下丘皮質の大型抑制性ニューロンに主に inputs する。また、下位神経核の線維は下丘中心核の大型抑制性ニューロンに inputs するなど、大型抑制性ニューロンへの主な inputs はそのニューロンの存在部位によって異なることが示唆された (図 1)。

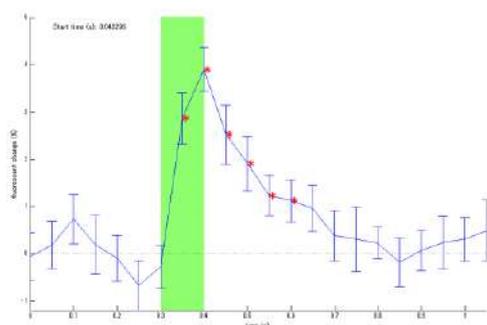


図2: ノイズ音刺激 (灰色) によって引き起こされた下丘表層ニューロンの蛍光強度変化。回の試行を平均した。\*印は有意な応答を示す。

## 2: 生体マウス下丘のカルシウムイメージング

昨年度、生体マウス下丘におけるカルシウムイメージングで問題となる、呼吸や心拍などのアーティファクトの除去方法を解決したので、今年度は解析ソフトウェアを構築して、音刺激に対する多数の下丘表層細胞の活動を解析した。図 2 のよ

うに音刺激による蛍光強度変化を観察することが可能であった。データが大量に発生するため、これを解析する方法の開発が今後の課題となる。

## 3: c-fos 分子発現を利用した大型抑制性ニューロンの刺激選好性についての研究

ラットを防音箱に入れ、80 分間 9 kHz 純音、8-10 kHz 帯域雑音、8-10 kHz ランダム周波数変調音 (以下ランダム FM 音) の何れかの刺激を 65 dB SPL の音圧で提示した。対照群として 80 分間無刺激の動物も用意した。刺激提示後、動物を灌流固定し、定法にて薄切、VGLUT2, GAD67, c-fos に対する蛍光免疫染色を行うことで、刺激に対して強く応答したと考えられる c-fos 陽性細胞のうち、VGLUT2 陽性終末に取り囲まれる大型抑制性ニューロンと取り囲まれない小型抑制性ニューロンの割合を調べた。下丘の周波数選択性の高い領域である中心核で、ランダム FM 音は他の音刺激に比べ有意に多くの大型抑制性ニューロンの活動を引き起こした (図 3)。この結果は大型抑制性ニューロンが幅広い周波数からの inputs を統合して活動することを示唆している。

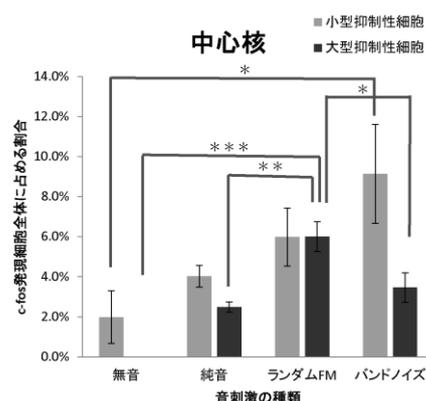


図3: 下丘中心核で c-fos を発現した細胞のうち、小型抑制性ニューロン (薄灰色) と大型抑制性ニューロン (濃灰色) の比率は音刺激の種類ごとに違いを示し、大型抑制性ニューロンの割合はランダム FM 音刺激時に最大となった (\*: 0.01 < P < 0.05, \*\*: 0.001 < P < 0.01, \*\*\*: P < 0.001, Tukey's multiple comparison test)

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

Ito T and Oliver DL. The basic circuit of the IC: Tectothalamic neurons with different patterns of synaptic organization send different messages to the thalamus. *Front Neural Circuits* 6: 48, (2012).

廣瀬潤一 「Ca2+イメージングによる生体マウスの下丘表層細胞の音刺激に対する活動」、2012 年 日本生体医学学会北陸支部大会

松田航太郎 平成 24 年度工学部卒業論文

### 「特記事項」

なし

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費 基盤 (C) 「かたちから探る聴覚情報統合のしくみ」代表 申請中

科学研究費 新学術領域 (公募) 「聴覚情報取捨選択機構に関わる論理ゲート回路の解明」代表 申請中

科学研究費 新学術領域 (公募) 「音オブジェクト弁別認知に関わる脳幹神経回路の解明」代表 申請中

生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業  
「学内共同研究等」

## 色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の機能と構造解析及び応用開発

研究代表者： 里村 武範（工学研究科・准教授）

共同研究者： 末 信一郎（工学研究科・教授）

概 要
<p>生体内に存在する D-アミノ酸を簡便、高感度に定量できるセンサー用素子の探索と開発を目的として研究を行った。D-アミノ酸は近年、ヒトにおいて様々な病気の診断用マーカーとして期待されている。そこで、安価で高感度に物質の濃度を測定可能な酵素を素子としたバイオセンサーに注目が集まっている。しかしながら現在までに見出されている D-アミノ酸定量用のバイオセンサー用素子は安定性が非常に低いため、センサーへの実用化はおろか素子の詳細な機能解析も進んでいない。そこで、バイオセンサー用素子の現在における課題となっている短寿命という要素を克服するため安定性が高い好熱菌由来酵素からセンサー用素子を探索し機能解析を行い新規バイオセンサー用素子として利用可能であるかの評価を行った。その結果、好熱性細菌 <i>Rhodothermus marinas</i> のゲノム配列より色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素をコードする遺伝子を見出すことに成功し、機能解析にも成功した。</p>
関連キーワード
D-アミノ酸、色素依存性脱水素酵素、超好熱菌、バイオセンサー

### 研究の背景および目的

色素依存性脱水素酵素は、糖・有機酸・アミノ酸など各種生体成分から電子を取り出し、これを人工の酸化還元色素に渡す。この反応を利用すれば、人工色素をメディエーターとして、酵素反応と電極を直接結びつけることが可能となるため、物質の濃度を電気化学的信号として簡便に検出するバイオセンサー用素子や生体物質を起電力とするバイオ電池用素子として利用できる。しかしながら、従来から研究されてきた常温生物由来の酵素は総じて不安定であり、機能性素子としての応用例はほとんど無い。我々の研究グループでは、超好熱性アーキア *Pyrobaculum islandicum* に D-プロリン (D-Pro) を最も良好な基質とする色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素 (DProDH) を見出し、これが非常に高い安定性を持つことやセンサー用素子として高い有用性を持つことを明らかにしている。D-アミノ酸を基質とする色素依存性脱水素酵素の中で、センサー用素子として利用可能な酵素は申請者が見出した本酵素以外報告例がない。

D-アミノ酸は、植物、下等動物、哺乳類などの様々な生物の生体内に存在し重要な生理機能を果

たしていることが明らかとなっている。そのなかでも遊離の D-Ser と D-Asp は、高等動物生体内において高濃度で確認されている。D-Ser は N-メチル-D-アスパラギン酸受容体のコ-アゴニストとして神経伝達に関与しており D-Ser 濃度と統合失調症病態との関連性が注目されている。また、D-Asp は精巣内のテストステロン生産亢進に関与しており D-Asp 濃度と無精子症との関連性に注目が集まっている。このように D-アミノ酸は非常に有用な診断用マーカーとして期待されている。高度に安定な色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素 (DADH) を素子とする酵素機能電極が構築できれば、これまでセンサー用素子としての不安定性から実現できなかった安価で簡便に定量可能な D-アミノ酸定量用デバイスの開発が可能になる。本研究では、現在までに我々が見出している耐熱性 DProDH とは異なる新規な耐熱性 D-アミノ酸脱水素酵素を検索と機能解析を行うことにより新規な D-アミノ酸定量用素子の開発につなげることを目的とした。

### 研究の内容および成果

申請者は、以前から多くの超好熱菌、高度好熱菌を培養し安定性の高い色素依存性 D-アミノ酸

脱水素酵素活性を探索してきた。しかしながら、現在までに上述の*P. islandicum*由来DProDH以外に高安定性DADHの発見には至っていない。そこで、培養菌体から酵素活性を探索するだけでなく好熱菌ゲノム情報からD-アミノ酸代謝オペロン構造の類似性やDADHと一次構造の相同性を探索したところ、高度好熱菌*Rhodothermus marinus*ゲノムよりDADHホモログ遺伝子を見出すことに成功した。本遺伝子は既存のDADHとは一次構造上15%程度しか相同性を示さないが、*R. marinus*ゲノム上でプロリンラセマーゼとクラスターを形成している。プロリンラセマーゼはプロリンの異性化を触媒する酵素でありD-アミノ酸の代謝に関連する酵素である。このことから、プロリンラセマーゼ遺伝子とクラスターを形成する本遺伝子はD-アミノ酸を代謝する新規色素依存性D-アミノ酸脱水素酵素である可能性が高いことが明らかになった。そこで、*R. marinus*由来DADHホモログ遺伝子について大腸菌によるタンパク質発現系を構築し、発現した組換えタンパク質の機能同定を行った。その結果、D-Pheを最も良好な基質とする既知のDADHには無い基質特異性を有する新規酵素であることが判明した。しかも、本酵素は申請者が既に見出した*P. islandicum*由来DProDHとは14%しか相同性を示さず同じバクテリアである*E. coli*由来DADHとも16%と低い相同性しか認められない。本酵素は、今までに報告されているDADHとは異なる新規酵素である可能性が示唆された。そこで、本酵素の精製を行い詳細な機能解析を進めた。本酵素は、非イオン性界面活性剤であるTritonX-100存在下で、Q-セファロース強陰イオン交換クロマトグラフィー、

ゲル濾過クロマトグラフィーの2段階の精製法によって精製することに成功した。精製酵素について酵素化学的な性質を解析したところ、本酵素はD-Pheを最も良好な基質としたが、それ以外にもD-Pro、D-Leu、D-Valなどにも反応性を示し、基質特異性が広いことが明らかとなった。さらに、D-アミノ酸定量用バイオセンサーへの応用利用に向けた課題である酵素の安定性について検討したところ、70℃、10分間の熱処理においても失活せず、非常に高い安定性を有していることが判明した。このことから*R. marinus*由来色素依存性D-Phe脱水素酵素はバイオセンサー用素子として優れた性質を有する酵素であることが明らかとなった。現在までに、D-アミノ酸定量用素子として利用可能な酵素は、我々の研究グループで見出した*P. islandicum*由来DProDH以外見出されておらず、本酵素は2例目となる。現在、*P. islandicum*、*R. marinus*由来のDADHを素子としたD-アミノ酸定量用バイオセンサーを構築している。しかしながら、これら酵素は広い基質特異性を有するため特定のD-アミノ酸を定量できないという課題が残されている。本課題を解決するため、これら酵素をコードする遺伝子にランダムに変異を与えることによって高基質特異性DADH変異株の作成を進めている。さらに、現在、マレーシアマラヤ大学との共同研究によるバイオインフォマティクス解析により、本酵素の基質結合アミノ酸残基の特定を進めており、基質との結合に関与するアミノ酸が同定でき次第、ピンポイントに変異を与えることによって高基質特異性DADH変異株の探索を進めていく予定である。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および 競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

「好熱菌由来色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の機能解析とその応用」 里村武範  
生研センタープロジェクト「D-アミノ酸に着目した食品機能開発」公開シンポジウム 招待講演  
九州大学箱崎キャンパス 平成25年3月1日  
「ゲノム情報を元にした耐熱性色素依存性脱水素酵素の探索と機能解析」  
石倉優、里村武範、櫻庭春彦、大島敏久、末信一朗  
平成24年度日本生物工学会大会 神戸国際会議場

### 「耐熱性色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の探索と機能解析」

石倉優、里村武範、櫻庭春彦、大島敏久、末信一朗  
日本農芸化学会2013年度大会 東北大学  
平成25年度3月25日

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費補助事業・若手研究(B)・3年間・代表・採択

生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業  
「学内共同研究等」

## 大規模な細胞解析を想定した高速コロニーカウンター開発・製品化

研究代表者： 安田 仲宏（附属国際原子力工学研究所・教授）  
共同研究者： 泉 佳伸（附属国際原子力工学研究所・教授）、松尾 陽一郎（附属国際原子力工学研究所・特命助教）、沖 昌也（工学研究科・准教授）

<b>概 要</b>	<p>大量の細胞培養皿の連続高速撮像を実現し、コロニー計数を細胞培養皿あたり1秒程度で行う装置を製品化することを目的とした研究を推進した。</p> <p>細胞の生存率を測定する手法として、培養により細胞が形成するコロニーをカウントし、増殖能を調べる方法がある。これまでの手法では、大量の細胞培養皿の測定は想定されておらず、放射線の細胞影響計測など稀な事象を迅速に測定できる技術が存在しない。</p> <p>これを解決するため、ベルトコンベアとラインセンサの導入により、細胞培養皿の搬送中に顕微鏡画像を取得する装置の開発、および画像解析による測定を行うソフトウェア開発を行った。現在、装置の有効性と汎用性を検証しており、この後に装置とソフトウェアを融合させて高速コロニーカウンターとして来夏頃に製品化の予定をしている。</p>
<b>関連キーワード</b>	細胞、計数、コロニーカウンター、自動化、大量処理

生命科学複合研究教育センター  
研究費助成事業

### 研究の背景および目的

細胞の生存率を測定する手法として、培養により細胞が形成するコロニーをカウントし、増殖能を調べる方法がある。これまでの手法では、大量の細胞培養皿の測定は想定されておらず、放射線による細胞影響計測など稀にしか起こらない事象を測定できる技術が存在しない。

本研究では、ベルトコンベアとラインセンサの導入により、細胞培養皿の搬送中に画像を取得、画像解析による計数を瞬時に行うことで、コロニー計数の迅速化と高精度化を目指した。

ヒトリソースが実験研究で利用できるようになりつつある現状、再生医療などで工学分野と生物医学分野の融合が進みつつある現状に鑑み、申請

者らは、細胞の解析を高速・自動で大量にこなすことにより「低線量領域における放射線影響」のシグナルを検出できる「細胞解析工場」を提案したいと考えている。これは、照射後あるいは暴露環境にある細胞を自動的に播種・継代・培養などし、最終的に細胞の終状態（アポトーシス頻度や突然変異、それに続く細胞の生死（増殖能）など照射後の細胞が辿る末路）の分岐比を精密に決定する手法提案で、当該分野に革新的進展をもたらす可能性を有する。また、本手法は、毒性試験など医学・薬学・生物学のスクリーニングにも応用可能であり、将来、福井大学の武器として発展させられるものと考えている。

### 研究の内容および成果

**【装置開発】**

ベルトコンベアとラインセンサの導入により、細胞培養皿の搬送中に顕微鏡分解能で画像を取得する手法の最適化を行った。ラインセンサにより顕微鏡分解能で撮像可能であることは、以前に製品化した「株式会社セイコープレジジョン社製広領域高速取得顕微鏡 HSP-1000（関連特許4件）」で実証している。ここで得られたノウハウは、測定対象およびカメラが撮像分解能の範囲で位置安定性を保っていることであり、動作の高速性を維持しつつ、画像に「ブレ」が出ないようにする必要があった。当初の案（図1）では、線光源が照らす部分を同じ側からラインセンサカメラにより画像化するものであった。

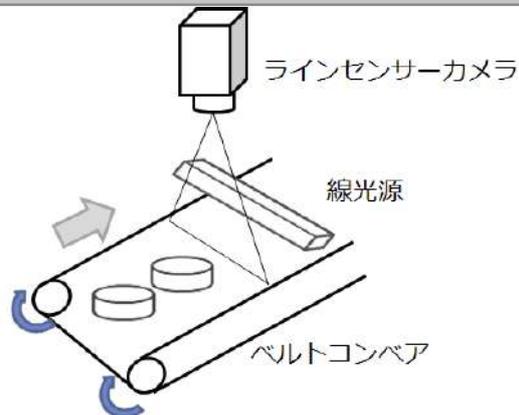


図1 装置概念図。

装置に求める仕様を以下のように定めた。

- 1) 測定対象物 : 最大φ70mm
- 2) 移動ピッチ : 14μmピッチ
- 3) カメラ素子 : 5000画素 7μm素子
- 4) 視野 : 70mm
- 5) 視野分解能 : 14μm/画素
- 6) 移動速度 : 35mm/秒
- 7) サイクルタイム : 2秒/個

これは、例えばφ70mm シャーレ（細胞培養皿）の場合、得られる画像サイズが5000×5000ピクセルに相当し、それが2秒で画像化されることを意味する（φ35mm シャーレの場合、サイズは1/4。1秒で画像になる）。ちなみに、2012年時点での一般的な市販パソコンディスプレイの最大ピクセル数は、2560×1600（WQXGA）であるため、画面に表示しきれないほどの拡大率（顕微鏡倍率で10x程度）になる。また、1ピクセルが7μmの素子を使用しているため、必要に応じ20x相当とすることも可能である。

しかしながら、この撮像系では駆動部分とカメラ・光源の取り付け位置の関係で、画像がブレてしまい装置に要求した画像分解能と速度が得られなかった。このため、図2に示すように、光学系とカメラをベルトコンベア下部に固定し、上部から光源で照らす構造とした。

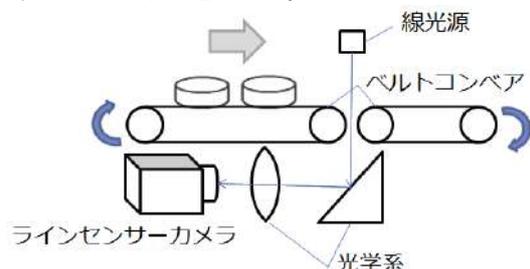


図2 改良した装置概念図。

透過照明としたことも撮像速度の点で有利に働き（高速に動作させようとする対象物をより明るく証明する必要がある）、上記の仕様を満たす装置が完成した。

上記の装置で撮像されたφ70mm シャーレ上のCHO細胞のコロニー画像を図3に示す。

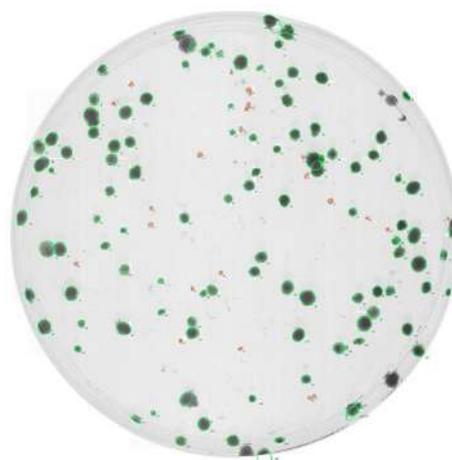


図3 φ70mm シャーレ上のCHO細胞のコロニー画像。

#### 【解析ソフトウェア開発】

以前に開発・製品化した、放射線飛跡の自動検出アルゴリズム（関連特許3件）を細胞培養皿画像からのコロニー抽出に活用した。図3では、得られた画像の濃淡から対象を楕円として抽出し、個々のコロニーが抽出できている様子も示している。特徴量として、コロニーの位置、大きさ、濃淡、円形度などの情報を抽出しエクセル形式などでデータを書き出すことができる。

今後の課題としては、

- ・シャーレの壁に成長したコロニーは、基本的にコロニー画像として不完全なため計数できない。これを回避するためのシャーレ改良の必要。
- ・ユーザーにより扱う細胞や染色など諸条件が異なるため、製品化のためには汎用性を検証する必要がある。
- ・検証の後、撮像と解析を連動させて、撮像とともに結果が得られるようなシステムとする必要があるため、多様な種類の細胞・染色法で試行を繰り返しており、来夏頃に製品化の予定である。

また、今後、生物・医療の分野で活躍される研究者や地元企業（例えば、東洋紡バイオロジクス（株）など）と連携し、「低線量放射線領域における放射線影響」のシグナルを検出する「細胞解析工場」実現につなげていきたい。

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

なし（特許検討中のため）

#### 「特記事項」

平成25年3月11日 福井新聞3面「低線量被ばく細胞を自動分析可能に 福井大・安田教授が装置開発」

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費助成事業・基盤研究C（一般）・H25～H27・低線量放射線領域での細胞影響解析の全自動化を目指した高速コロニーカウンタの開発・代表・申請中

生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業  
「学内共同研究等」

## 細胞外マトリクスのナノファイバー構造に着目した 3次元組織ビルドアップ

研究代表者： 藤田 聡（工学研究科・准教授）

<b>概 要</b>	<p>生体中の組織構造を効率的に修復させるには、従来型の均質な材料とは異なった、配向性の高い足場材料が有用である。そこで、細胞周辺の微小環境を構成する細胞外マトリクス(ECM)がナノメートルサイズの繊維で構成されていることに着目し、ナノファイバーの足場材料への検討をおこなった。エレクトロスピンニング法を用いて、ランダムなファイバーと配向性を有したナノファイバー基材を作製し、この上でのマウス筋芽細胞(C2C12)を培養したところ、細胞は足場に沿って自発的に伸展・配向した。次に、レーザー加工機で加工した基材上に、エレクトロスピンニング法を用いて配向性を有したファイバー層を作製し、これらを積層することで、三次元培養を可能とした足場基材を構築した。その結果、一定の方向に配向した組織が3次元的な広がりをもって構築された。</p>
<b>関連キーワード</b>	ナノファイバー, 再生医療, 細胞外マトリクス, 三次元組織構築, 生体材料

### 研究の背景および目的

生体組織中では、異方性を有した ECM の幾何構造のもとで細胞の形状が変化し、細胞形状が細胞機能に影響を与えることが知られている。これまで、生体修復材料にはハイドロゲル等の均質な高分子材料が用いられてきた。しかし、筋繊維に見られるように、生体組織では、細胞同士が規則的に配列した異方性の高い構造を有し、複雑な組織を構成している。したがって、生体中の組織構造を効率的に修復させるには、従来型の均質な材料とは異なった、異方性の高い足場材料が有用であると考えられる。

なかでも、細胞同士の微小環境を構築する細胞外マトリクス(ECM)がナノメートルサイズの繊維で構成されていることから、ナノファイバーに期待が集まっている。これまでもナノファイバー基材上での細胞機能の向上について報告例がある

ものの、それらではシートやマット状の薄い不織布が用いられている。そのため、立体的な組織構造を模倣するためには厚みのある構造体を用いる必要がある。このようにして作製された三次元的な材料が細胞増殖・分化の良好な足場として強く望まれている。

そこでまず、エレクトロスピンニング法を用いて作製したナノファイバーを用いて、マウス筋芽細胞(C2C12)の伸展および増殖に与える影響を評価した。

次に、レーザー加工機で加工した基材上に、エレクトロスピンニング法を用いて配向性を有したファイバー層を作製し、これらを積層することで、三次元培養を可能とした足場基材を構築した。本報告では、細胞の生存率及び形状を評価した結果について述べる。

### 研究の内容および成果

#### (1) 配向性基材上での筋芽細胞の培養

ガラス基板にあらかじめ ポリウレタン(PU)をスピンコートし、ここにエレクトロスピンニング法を用いて、ファイバーを紡糸した。配向性を有したファイバーはコレクタを高速で回転(1,500 rpm)させることにより作製した。

作製した基板を酸素プラズマ処理したのち、C2C12細胞を播種、培養した。播種後48h, 72h後の細胞数を計測し、倍加時間を算出した。また播種48h後に免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

その結果、ファイバーがある場合、細胞が細長く伸長している様子が見られた(図1)。ファイバーがあることによって、細胞の接着できる領域に広がりをもたらされ、細胞が伸長しやすくなったものと考えられる。また、ディッシュ上で培養した場合よりもファイバー上で培養を行った場合、増殖が早い傾向が得られた。しかし、配向性の異なるファイバーにおいては、増殖速度に有意差は見られなかった(図2)。

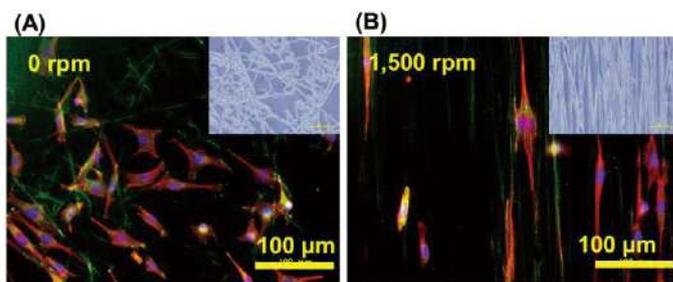


図1 無配向ナノファイバー(A)および配向ナノファイバー(B)上で培養した細胞の形態。赤:F-Actin, 緑:ファイバー, 青:核。

(2) 三次元足場基材上での培養

レーザー加工機を用いて、PMMA 板を加工し、細胞培養用の基材を作製した。治具上の棒に引っかけて、足場基材を固定した。

作製した PMMA 基材上に PCL 溶液を用い、エレクトロスピンニング法により、ファイバーを担持した足場基材を作製した。配向性を有するファイバーを作製するため、コレクタを高速 (900 rpm) で回転させた。作製したナノファイバー基材に酸素プラズマ処理を施した後、マウス由来筋芽細胞 C2C12 を播種した。播種 2 時間後、細胞が接着したファイバー足場基材を治具にセットし培養を行った。培養 48 時間後、ファイバー足場基材 2 層を直交する方向に積層し、培養を行った。培養後、免疫染色し観察を行った。

その結果を図 3 に示す。これらの画像は同一視野で高さの異なる点をそれぞれ撮影したものである。それぞれファイバー方向に細胞が伸長し、生

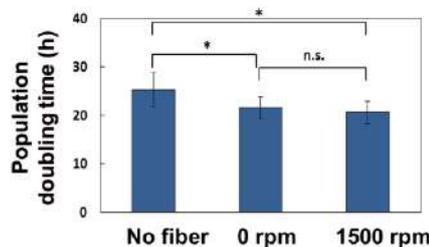


図2 ナノファイバー上で培養した細胞の倍加時間。

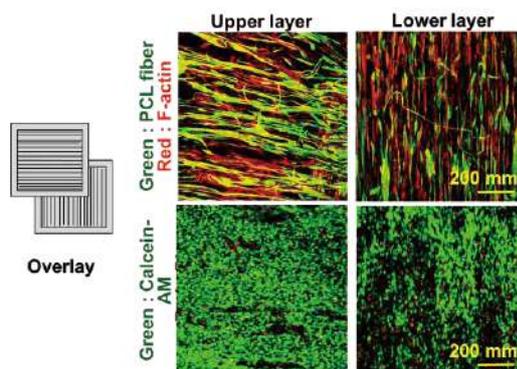


図3 積層ファイバー基材を用いた厚みのある培養。

存している細胞が多い様子が見てとれる。

本結果から、厚みのある配向性を有する基材の作製に成功し、自発的に細胞が配向形状をとったことから、今後はこの基材を用いて細胞分化等のさらなる検討を行う。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な学会発表」

- 荻原 裕佑,末 信一郎,藤田 聡,シングルナノファイバーを用いた細胞浸潤の解析,第 1 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会,金沢,2012.12.
- 久野 大地,吉村 英晃,坂元 博昭,末 信一郎,藤田 聡,筋芽細胞の増殖に対するナノファイバーの配向性の影響の解析 第 1 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会,金沢,2012.12.
- 吉村 英晃,坂元 博昭,末 信一郎,藤田 聡,エレクトロスピンニング法で作製したナノファイバーの積層による三次元培養法の構築,第 1 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会,金沢,2012.12.
- 吉村 英晃,坂元 博昭,末 信一郎,藤田 聡,三次元培養を可能とした積層技術の開発,第 6 1 回高分子学会北陸支部研究発表会,福井,2012.11.
- 荻原 裕佑,末 信一郎,藤田 聡,シングルナノファイバー上での癌細胞の浸潤現象の解析,平成 24 年度繊維学会秋季研究発表会,福井,2012.9.

- 吉村 英晃,鈴木 智也,末 信一郎,藤田 聡,配向性を有したナノファイバー上での筋芽細胞の増殖および分化,平成 24 年度繊維学会秋季研究発表会,2012.9.
- S.Fujita,H.Yoshimura,H.Shimizu,S.Suye,Cell behavior on nanofiber scaffold with different geometry,3rd TERMIS World Congress 2012,Viena,2012.9.
- Y.Ogihara,S.Suye,S.Fujita,Invasion of a cancer cell on a single nanofiber embedded in collagen gel,2012 International Symposium on Chemical-Environmental-Biomedical Technology,Tainan,2012.9.
- 吉村 英晃,鈴木 智也,坂元 博昭,末 信一郎,藤田 聡,ナノファイバー上で培養した筋芽細胞の分化挙動の解析,第 43 回繊維学会夏季セミナー,奈良,2012.8. (優秀ポスター賞受賞)
- 藤田 聡,吉村 英晃,清水 遥絵,末 信一郎,幾何構造の異なるナノファイバー基材上で培養した間葉系幹細胞の挙動,第 23 回プラスチック成形加工学会年次大会,東京,2012.6.

生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業  
「学内共同研究等」

## ヒ素誘導性細胞死における、ヒ素結合タンパク質 Id3 の役割

研究代表者： 黒岡 尚徳 (医学部・准教授)

概 要	
	ヒ素は代表的環境汚染物質であり、細胞毒性や発がん性を有する一方で、急性前骨髄性白血病の治療薬としても用いられている。3価のヒ素は、近接した2～3つのシステイン残基に強い親和性を示すが、PML-RAR $\alpha$ 融合タンパク質と結合して分解を誘導することが最近判明し、ヒ素とタンパク質の結合の重要性の認識が高まっている。代表者はこれまで、細胞の分化抑制と増殖促進作用を示す転写調節因子 Id の細胞内局在制御の解析を行ってきたが、新たに Id3 タンパク質が、ヒ素 (3 価) 処理に伴い細胞質へ集積することを見出した。この効果はヒ素の結合で生じると考えられ、本研究では、ヒ素が誘導する細胞死における Id3 の役割を解析した。その結果、Id3 はヒ素誘導性細胞死を増強することが明らかになったが、細胞質への集積やヒ素の結合と、細胞死の関連は認められなかった。
関連キーワード	ヒ素、Id3、NES、システイン、細胞死

### 研究の背景および目的

有毒微量元素ヒ素は、代表的な環境汚染物質であり、大量に摂取すると急性あるいは慢性中毒を引き起こし、少量では細胞増殖を亢進させ、疫学的に皮膚、肺、膀胱、肝臓等で発がん性が認められる。一方で、ヒ素化合物亜ヒ酸は、急性前骨髄性白血病の治療薬としても用いられている。このように、ヒ素は生体内で様々な作用を発揮するが、その機序や分子標的に関しては不明な点が多い。ヒ素は、化学形態 (無機と有機、3 価と 5 価) の違いによって毒性に差が認められ、毒性が強い 3 価のヒ素はチオール基 (SH 基) に結合しやすく、近接した 2～3 つのシステイン残基に強い親和性を示す。これまで、タンパク質リン酸化/脱リン酸化酵素、酸化還元反応を司るレドックス酵素、細胞骨格系タンパク質とヒ素の結合が報告されているが、酵素活性の阻害以外にその影響は不明であった。しかし最近、亜ヒ酸が急性前骨髄性白血病の原因遺伝子産物である PML-RAR $\alpha$ 融合タンパク質に結合して分解を誘導し、骨髄細胞を分化させることが判明し、ヒ素とタンパク質の結合の重要性に対する認識が高まっている。

Id は、bHLH 型転写因子の機能を阻害し、細胞の分化抑制及び増殖促進作用を示す転写調節因子である。腫瘍化した細胞や組織の多くで Id の発現亢進が報告されており、発癌との関連が指摘されているもの (Fong et al, Trends Mol Med, 2004)、

その分子機構に関してはよくわかっていない。

Id 活性制御の解析は、これまで主に転写レベルで行われてきたが、代表者は Id タンパク質の細胞内局在制御について精力的に解析し、Id1 及び Id2 タンパク質が nucleocytoplasmic shuttling 活性を有し、それぞれ異なる核排出配列 (nuclear export signal; NES) により制御されていることを明らかにしてきた (Kurooka and Yokota, J Biol Chem, 2005, Makita, Kurooka et al., FEBS Lett, 2006)。一方で Id3 は、Id1 と類似の NES 配列を持つにもかかわらず、nucleocytoplasmic shuttling 活性を示さないが、様々な刺激を与えて細胞内局在を観察したところ、ヒ素 (3 価) 処理に伴い細胞質へ集積することが明らかになった。また、Id1 と類似の NES 配列を変異させると細胞質への集積がみられなくなることから、通常遮蔽されている NES 配列が、ヒ素処理により露出することが推測された。さらに、ヒ素による Id3 タンパク質の細胞質への集積の機序について検討した結果、N 末端領域の 3 つのシステイン残基とヒ素の結合が重要であることが判明した。本研究では、ヒ素応答において Id3 がどのような役割を果たすのか調べ、ヒ素との結合や、ヒ素による Id3 細胞内局在変動の意義を明らかにすることを目指す。本研究ではまず、ヒ素によって誘導される細胞死における Id3 の役割について解析を行った。

### 研究の内容および成果

#### (1) Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強

ヒ素結合タンパク質 Id3 が、ヒ素によって誘導される細胞死においてどのような役割を果たすのか調べるため、レトロウィルスを用いて GFP-Id3 及びコントロールの GFP を安定に発現する NIH

3T3 細胞株を樹立した。これらの細胞株を比較的低濃度 (5~10  $\mu$ M) のヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム) を含む培地で 48 時間培養すると、GFP 発現細胞株ではごくわずかしき細胞死が認められなかったのに対し、GFP-Id3 発現細胞株では、5  $\mu$ M のヒ素

処理で約 30 %、10  $\mu\text{M}$  のヒ素処理では約 80 % の割合で細胞死が認められた (図 1)。このことから Id3 は、ヒ素によって誘導される細胞死を増強することが明らかになった。

**(2) Id3 によるヒ素誘導性細胞死増強の機序**

Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強が、どのような機序で生じるのか明らかにするために、細胞死関連分子の発現をウェスタンブロットで検討した。その結果、GFP-Id3 発現細胞株ではアポトーシスの代表的マーカーとして知られる PARP の発現がヒ素処理に伴い有意に低下することが判明し (図 2 上段)、この細胞死がアポトーシスであることが示唆された。また従来の報告通り、アポトーシス促進作用を持つ Bax の発現が、コントロールの GFP 発現細胞株に比べて約 1.3~1.6 倍上昇していることが示されたが (図 2 中段)、この上昇が Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強に、どの程度寄与しているのかは現段階では不明である。さらに、ヒ素処理で変動することがわかっているシグナル経路のうち、ERK と p38MAP キナーゼの活性化について検討したが、それぞれの細胞株で顕著な差は認められなかった。JNK キナーゼの活性化については現在検討中であり、それ以外のシグナル経路に関しても、今後、解析を行う予定である。

**(3) Id3 の細胞内局在及びヒ素との結合と、Id3 によるヒ素誘導性細胞死増強の関係**

ヒ素による細胞質への集積がみられなくなる Id3N 末端システイン変異体、及び、ヒ素と結合しなくなるシステイン残基全ての変異体を作成し、レトロウイルスを用いて、それぞれ GFP-Id3 融合タンパク質を恒常的に発現する NIH3T3 細胞株を樹立した。これらの細胞株を 5~10  $\mu\text{M}$  のヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム) を含む培地で 48 時間培養したところ、野生型の GFP-Id3 と同程度に、ヒ素によって誘導される細胞死が亢進することが判明した。このことは、Id3 の細胞内局在やヒ素との結合は Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強とは直接関係がないことを示すものである。ヒ素の作用として他に活性酸素の発生があり、活性酸素は細胞死を誘導することから、今後は Id3 と活性酸素の関係を中心に解析を行う予定である。

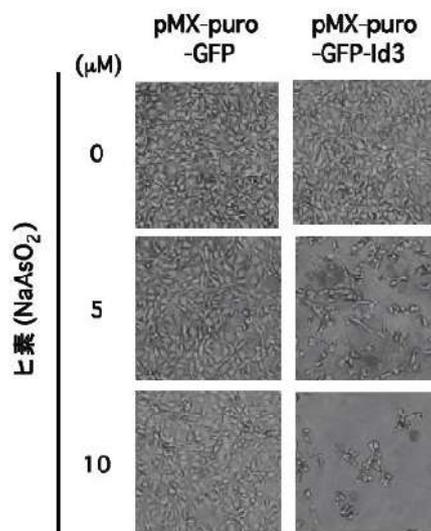


図 1. Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強

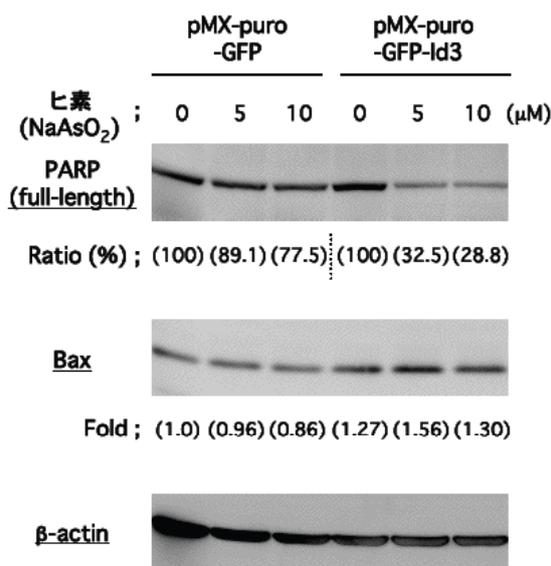


図 2. Id3 による細胞死関連分子の発現変動

**本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況**

「主な論文・学会発表」

[論文]

Hisanori Kurooka, Manabu Sugai, Kentaro Mori, and Yoshifumi Yokota

The metalloloid arsenite induces nuclear export of Id3 possibly via binding to the N-terminal cysteine residues.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.

[学会発表]

Hisanori Kurooka and Yoshifumi Yokota

Roles of BMP signaling in serum-induced Id2 expression and inhibition of myoblast differentiation.

第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12, 福岡

「特記事項」

特になし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科研費補助金・基盤 (C)・H25~27・「ヒ素結合性転写因子によるヒ素細胞応答分子機構の解明」・代表・申請中

生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業  
「学内共同研究等」

## C型肝炎ウイルス非構造蛋白質のチロシンリン酸化とそのウイルス宿主間相互作用における重要性

研究代表者： 竹内 健司 (医学部・学内講師)

共同研究者： 千原 一泰 (医学部・准教授)、 定 清直 (医学部・教授)

<b>概 要</b>	<p>C型慢性肝炎の合併症としてクリオグロブリン血症やB細胞リンパ腫があるが、これらの発症機構はわかっていない。本研究では、起因ウイルスであるC型肝炎ウイルス(HCV)の非構造蛋白質NS5AがB細胞に及ぼす影響を探った。その結果、NS5AはB細胞においてSrcファミリーキナーゼFynと会合しその酵素活性を亢進させていることが示された。両者の会合はNS5Aのチロシンリン酸化を介して起こっているように思われた。この会合のウイルス学的意義は未解明だが、B細胞のシグナル伝達に介入することによって宿主のHCVに対する獲得免疫応答を修飾し、感染宿主内での持続感染を可能にしていることなどが考えられる。C型肝炎に合併するB細胞性疾患はこのような介入の結果起こる副反応としてとらえることができるかもしれない。</p>
<b>関連キーワード</b>	C型肝炎ウイルス、B細胞、シグナル伝達、チロシンリン酸化、チロシンキナーゼ

### 研究の背景および目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は専らヒトの肝細胞を増殖の場とし、ウイルスキャリアに慢性肝炎・肝硬変・肝細胞癌を引き起こすが、合併症として混合型クリオグロブリン血症やB細胞リンパ腫を引き起こすことも知られている。これら合併症の発症機構は不明だが、HCVはB細胞にも侵入し、ウイルス増殖までには至らないものの、細胞内でウイルスゲノムの複製が起こることがわかっており、このことがHCVのB細胞に対する病原性の前提になっていると考えられる。

HCVはエンベロープ陽性のRNAウイルスでそのゲノムはわずか10種類ほどの蛋白質をコードする。ゲノムRNAの5'側にはウイルス粒子の構成成分である構造蛋白質が、3'側にはウイルス粒子構成成分とはならない非構造蛋白質がコードされている。非構造蛋白質にはプロテアーゼやRNAポリメラーゼなどがあり、これらがウイルス蛋白質の成熟やウイルスゲノムの複製を担う。非構造蛋白質NS5Aは酵素活性を持たないが様々な宿主蛋白質と相互作用することが知られており、その相互作用を介してウイルス増殖に関わっていると考えられている。このとき、NS5Aが感染細胞の生理機能に影響を及ぼす可能性がある。そこで、本研究ではNS5Aを安定発現するB細胞株を樹立し、その性状を解析することにした。

B細胞表面のB細胞レセプターが抗原刺激によって活性化されると、応答したB細胞の分化・増殖・細胞死などが起こる。抗原刺激の細胞内シグナル伝達は蛋白質のチロシンリン酸化などを介し

て進行するが、一般的に、蛋白質のチロシンリン酸化は、これを担うチロシンキナーゼを含め、様々なシグナル伝達因子の活性を緻密に制御する手段となっている。

例えば、Src、Fyn、LynなどのSrcファミリーキナーゼ(SFK)がB細胞の抗原刺激で活性化するが、これらSFKが活性化するには酵素活性ドメインであるSrcホモロジー(SH)1ドメイン中にある活性化ループのチロシン残基がリン酸化される必要がある。一方、SH1ドメインではなくC末端ドメインにあるチロシン残基がリン酸化されると、SFK中にあるSH2ドメインがこのリン酸化チロシンに結合、この分子内結合がSH1活性化ループのSFK立体構造中への埋没を引き起こし、SFKの活性化が阻害される。しかし、SFK中にあるSH3ドメインのガイドによりSH2ドメインが他のチロシンリン酸化蛋白質と結合すると、SH2ドメインから解放されたC末端リン酸化チロシンの脱リン酸化や分子表面に露出した活性化ループのチロシンリン酸化が可能となる。なお、SFKなどの蛋白質のSH2ドメインはリン酸化チロシン残基のみを認識しているのではなく、リン酸化チロシン近傍のアミノ酸配列も特異的に認識している。このため、個々の蛋白質のSH2ドメインはそれぞれ異なるリガンド特異性を示す。

本研究では、先ず、HCVのNS5Aがチロシンリン酸化蛋白質であるという仮説を立ててこれを確認、次に、チロシンリン酸化NS5Aに結合するSH2ドメインの検索を試みた。

## 研究の内容および成果

結果 (1) NS5A のチロシンリン酸化：一般に、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルはチロシンキナーゼとチロシンフォスファターゼ両者の活性のバランスによって平衡状態を保っている。このため、細胞をチロシンフォスファターゼの非特異的阻害剤である過バナジル酸 (Pervanadate : PV) で処理すると、様々な蛋白質の速やかなチロシンリン酸化が観察できる。NS5A を安定発現する BJAB 細胞 (ヒト B 細胞由来) を PV で処理したところ、リン酸化チロシン特異抗体を用いたウェスタンブロット法により、NS5A のチロシンリン酸化が認められた。

結果 (2) NS5A と結合する SH2 ドメインの検索：Lyn、Fyn、Syk などの宿主蛋白質に由来する SH2 ドメインと GST の融合蛋白質を調製し、これらを釣り針に PV 処理した B 細胞内で発現していた NS5A のプルダウンアッセイを行った。Lyn や Syk などの SH2 には NS5A 結合能が認められなかったのに対し、Fyn の SH2 は NS5A と強く結合した。この結合は NS5A 発現 B 細胞の PV 処理によって強まるものであった。また、Fyn の SH3 にも NS5A 結合能が認められた。

結果 (3) NS5A による Fyn の活性化：抗原刺激により B 細胞内の Fyn は速やかに活性化するが、刺激がない場合、その活性は低く抑えられている。ところが、NS5A 発現 B 細胞では Fyn の活性化ループ上にあるチロシン残基のリン酸化レベルが構成的に亢進していた (図 1A)。実際、試験管内チロシンキナーゼアッセイをしたところ、NS5A 発現 B 細胞から調製した Fyn の比活性が上昇しているのを確認できた (図 1B)。さらに、NS5A 発現 B 細胞の B 細胞レセプターを抗 IgM 抗体で刺激したところ、刺激に応じた Fyn 活性化ループのチロシンリン酸化が観察された (図 1A)。従って、NS5A の発現は抗原刺激に対する B 細胞の応答能そのものを損なうわけではないと思われた。

結果 (4) チロシンリン酸化部位の同定：本研究では HCV Con1 株に由来する NS5A を用いたが、これには合計 10 個のチロシン残基がある。このうち他の株でも保存されているチロシン残基は 8 つで、この 8 つのうちいずれか一つをフェニルアラニンに置換した変異蛋白質の cDNA を作成し、

Cos-7 細胞で発現、細胞を PV 処理したのち溶解し、変異蛋白質のチロシンリン酸化レベルをウェスタンブロット法によって検討した。その結果、334 番のチロシン残基が主なリン酸化部位であることが示唆された。

考察：以上、B 細胞で発現した HCV の NS5A 蛋白質はチロシンリン酸化を介して Fyn と会合し、Fyn の酵素活性を亢進させていることが示された。そのウイルス学的意義はまだ解明できていないが、B 細胞内で起こるシグナル伝達に HCV が介入することによって HCV に対する宿主の獲得免疫応答を修飾し、感染宿主内でのウイルス持続感染を可能にしていることなどが考えられる。HCV による B 細胞性疾患の発症はこのような介入の結果起こる副反応としてとらえることができるかもしれない。

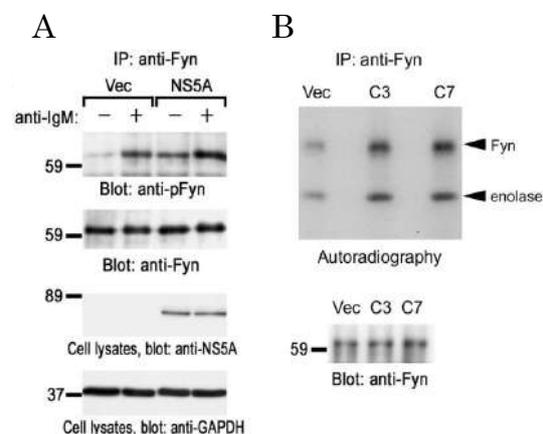


図 1. A : B 細胞における Fyn 活性化ループチロシン残基のリン酸化に及ぼす HCV NS5A 蛋白質発現の効果 (部位特異的リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット法による)。B : 試験管内チロシンキナーゼアッセイ。C3、C7 は NS5A 発現 B 細胞クローン 2 つでの結果を示す。「vec」はコントロール細胞。「矢尻 Fyn」は自己リン酸化反応のレベルを、「矢尻 enolase」は反応液中に加えた基質のチロシンリン酸化レベルを示す。

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Horiguchi T, Sun X, Deng L, Shoji I, Hotta H, Sada K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46634.

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費補助金 (基盤 C(一般)) 「C 型肝炎ウイルスによる B 細胞蛋白質チロシンリン酸化への影響」 (分担)、H22-24 年度 (採択)  
 科研費補助金 (基盤 C(一般)) 「RNA ウイルスの感染におけるウイルス蛋白質チロシンリン酸化」 (代表)、H25-27 年度 (申請中)

生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業  
「学内共同研究等」

## 生殖腺体細胞における遺伝子発現の性差とその機能の解明

研究代表者： 矢澤 隆志 (医学部・学内講師)

<b>概 要</b>	哺乳類における性（男女・雌雄）は、胎児期に性染色体によって生殖腺が精巣になるか卵巣になるかによって決定され、生後は各生殖腺から産生される性特異的なホルモンにより性分化が起きる。この過程を制御しているのは、生殖腺体細胞であり、その性差を調べることは性決定や性分化の解明に大きく寄与すると考えられる。本研究では、精巣の体細胞で強く発現しているものの、卵巣では、ほとんど発現が見られない HMGCS2 と CYP26B1 遺伝子の転写調節機構に関する解析を行った。そして、HMGCS2 は性によって異なるエピジェネティックな制御によって精巣のライディッヒ細胞に発現することが分かった。一方、CYP26B1 は、イントロン部分に、セルトリ細胞での発現を司るエンハンサー領域が存在することが分かった。
<b>関連キーワード</b>	生殖腺体細胞、HMGCS2、CYP26B1、転写、性差

### 研究の背景および目的

哺乳類における性（男女・雌雄）は、胎児期に性染色体によって生殖腺が精巣になるか卵巣になるかによって決定される。生後、精巣と卵巣から産生される性ステロイドを含む性特異的なホルモンにより、からだ全体の性分化が起こる。これら性の決定から分化に至る一連の過程を制御しているのは生殖腺の特定の体細胞群（精巣のライディッヒ細胞とセルトリ細胞、卵巣の莖膜細胞と顆粒膜細胞）である。よって、これらの細胞の性差を調べることは、性の決定や分化を解明することに大きく寄与できる。

上記の生殖腺体細胞は、発生学的に中胚葉に由来し、副腎皮質と起源を共にする。これは、生殖腺と副腎皮質がステロイドホルモンを産生するという共通の機能を有することからも明らかである。このステロイドホルモン産生機能に深く関与しているのが、オーファン核内受容体の SF-1 である。SF-1 は、上記の生殖腺の体細胞に発現し、ステロイド合成酵素やミューラー管退縮ホルモン(AMH)などの性決定や分化に関わる遺伝子の転写を司る転写因子である。私は、ES 細胞や間葉系幹細胞に SF-1 を導入し、培地

に cAMP を添加することによりライディッヒ細胞や副腎皮質の細胞を分化誘導することに成功している。現在、この細胞を用いて、ステロイドホルモン産生細胞の発生・分化の詳細な解析を行うことが可能となった(Yazawa et al. *Endocrinology*, 2006, 2008, 2009; *Mol Endo.* 2010)。また、この系では、雌雄の生殖腺体細胞が分化誘導できることから、生殖腺体細胞の性差を調べるためにも非常に有用な系となると考えられる。

私は、幹細胞由来の生殖腺体細胞を解析することにより、性差を持って生殖腺に発現する遺伝子群を同定してきた。本研究では、この中から、精巣の体細胞で強い発現が観察された HMGCS2 と CYP26B1 遺伝子に着目して研究を行う。また、生殖腺体細胞の研究をさらに進めるために、幹細胞に加えて、新たな生殖腺体細胞の分化誘導系の開発を試みる。本研究の遂行により、生殖腺体細胞の分化のメカニズムが解明されると共に、特に精巣に強く発現する遺伝子に着目することから精子形成における新たな知見が得られることが期待される。

### 研究の内容および成果

本年度は、精巣と卵巣で発現レベルの差がある HMGCS2 と CYP26B1 の発現調節機構について主

に解析を行った。そして、エピジェネティックな発現調節とエンハンサー領域による発現調節が、

これらの遺伝子発現に性差をもたらしている可能性が強く示唆された

**(1) HMGCS2の発現制御機構**

HMGCS2は、精巣で強い発現が見られ、ライディヒ細胞に局在している。その遺伝子の5'上流域を組み込んだレポーターベクターを作製し、ライディヒ細胞由来の細胞株にトランスフェクションを行ったところ非常に強いプロモーター活性が検出された。過剰発現を含む様々なアッセイの結果から、このプロモーター活性は、核内受容体のPPARαが、この領域内に含まれる配列に結合して、転写を活性化することからであることが分かった(図1)。しかしながら、PPARαの発現は、精巣と卵巣では大きな差が見られないことから、エピジェネティックな制御により発現量の差が規定されていることが予想された。

そこで、プロモーター領域のDNAのメチル化について調べたところ卵巣由来の細胞では、この領域が高度にメチル化されていることが分かった。一方、ライディヒ細胞では、この領域は、ほとんどメチル化を受けていなかった。よって、プロモーター領域のメチル化というエピジェネティックな調節が、HMGCS2の雌雄の生殖腺における発現量の違いを決めていることが強く示唆された。

**(2) CYP26B1の転写調節機構**

CYP26B1は、精巣で強く発現しており、主にセルトリ細胞に局在している。遺伝子の転写開始点付近とその5'上流域3Kbを組み込んだレポーターベクターを作製してセルトリ細胞やライディヒ細胞由来でCYP26B1遺伝子を発現する細胞株にトランスフェクションを行ったところ、全くプロモーター活性を検出できなかった。また、その活性は、ベクターのみで検出される活性と全く差がなかったことから、従来言われているCYP26B1遺伝子の転写開始点と生殖腺における転写開始点異なるため、その5'領域はプロモーターとし

て働かない可能性が強く示唆された。

そこで、セルトリ細胞株を用いて、5'-RACEを行ったところ、実際の転写開始点は、従来、他の組織で同定されていた場所と全く異なることが分かった。この領域付近を、レポーターベクターに組み込んでアッセイを行ったところ比較的強いプロモーター活性が検出された。しかしながら、この領域には雌雄による発現を規定する配列は存在しなかった。そこで、CYP26B1遺伝子内で塩基配列が種を超えて保存されている領域を同定し、レポーターアッセイを行ったところ遺伝子のイントロン部分に、性特異的な発現を司るエンハンサー領域があることが示唆された。ゲルシフトアッセイ等の結果から、この領域にはセルトリ細胞にのみ発現する転写因子が結合することが分かった。

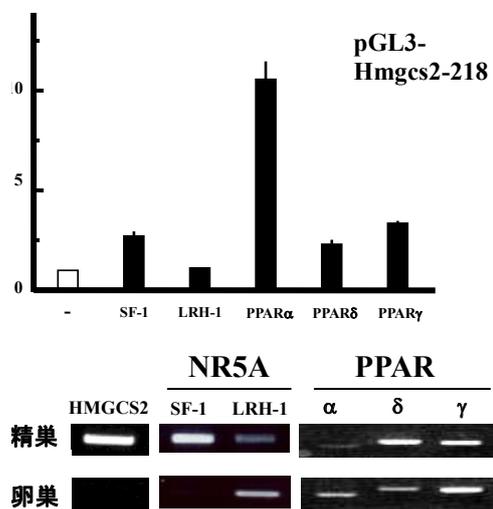


図1. 核内レセプターによるHMGCS2プロモーターの活性化と生殖腺における発現

**本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況**

「主な発表論文等」

1. **Yazawa, T.** et al. Androgen/Androgen Receptor Pathway Regulates Expression of the Genes for Cyclooxygenase-2 and Amphiregulin in Periovarian Granulosa Cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 369, pp42-51, 2013.
2. **Yazawa, T.** et al. Differentiation of pluripotent stem cells into steroidogenic cells: role of SF-1 regulator. *Stem cells and cancer stem cells* Vol. 8, pp169-177, 2012.
3. **矢澤隆志**ら：ES細胞からの副腎ステロイドホ

ルモン産生細胞の分化誘導. *ACTH Related Peptides* Vol. 23, pp20-22, 2012.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

助成組織・助成制度・種目・期間・研究課題・代表/分担・採否・採択金額など

1. 科学研究費・基盤研究(C)・平成23～25年・幹細胞からのセルトリ細胞の作製と分化機構の解明・代表・採択・400万円
2. テルモ科学技術振興財団・一般研究助成・平成24年・幹細胞を用いた副腎・性腺のステロイド産生細胞再生の試み・代表・採択・100万円

生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業  
「学内共同研究等」

## 皮質脊髄路軸索側枝形成における微小管制御機構の解析

研究代表者： 猪口 徳一（子どものこころの発達研究センター・特命助教）  
共同研究者： 佐藤 真（医学部・教授）、岡 雄一郎（子どものこころの発達研究センター・特命講師）、尾身 実（医学部・特命助教）

<b>概 要</b>	<p>大脳からの主要な出力路である皮質脊髄路は、大脳皮質第5層に起始細胞を持ち、その主軸索から上丘や橋核などに軸索側枝を伸ばす。軸索側枝は神経活動の協調性を担う重要な機構といわれているが、その形成を制御する分子実態については多くが不明である。我々は現在までに、側枝形成が始まる時期にその標的脳領域で発現の高い側枝誘導因子の候補分子を得ているが、側枝形成領域軸索内では微小管を中心とした細胞骨格の再編成が起きていることから、候補分子が細胞骨格制御を介して側枝形成に関与すると考えた。そこで、微小管伸長端結合因子である EB3-EGFP を発現するベクターを作成し、共焦点顕微鏡で高速タイムラプス撮影することで微小管の動態をリアルタイムに観察する系を立ち上げた。また、脳で発現しており、微小管切断活性を持つ spastin について解析したところ、培養細胞で、微小管の形成を阻害することが示された。今後、候補因子による微小管の切断や伸長を評価し、微小管制御因子との関係を調べ、軸索側枝形成の制御機構を生体内で明らかにしていきたい。</p>
<b>関連キーワード</b>	大脳皮質、皮質脊髄路、軸索側枝、細胞骨格

### 研究の背景および目的

大脳からの主要な出力路である皮質脊髄路(錐体路)は、大脳皮質第5層の神経細胞から伸長し、内包を通り、脊髄へと投射する。その主軸索からは、上丘、橋核、下オリブ核などの複数の神経核に「軸索側枝」を伸ばす。「軸索側枝」は高度な脳の働きに必要な神経活動の協調性を担う重要な機構であり、その形態学的・解剖学的な理解が進んでいる。しかし、過去の報告より、側枝伸長の標的である神経核より何らかの誘導因子が出ていることが示唆されているが、実際の脳内で側枝形成が誘導される分子実態については多くが不明である。本研究の目的は、「軸索側枝の形成や退縮・再編成の制御機構を細胞骨格に着目し、分子レベルで明らかにする」ことである。我々は、現在までに、皮質脊髄路軸索に作用する側枝誘導因子を探

索する目的で、側枝形成が誘導される脳領域の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイを用いて解析した。そして、側枝形成開始時期の側枝標的脳領域で発現の高い候補分子を同定している。本研究では、軸索内での細胞骨格の動態変化と細胞骨格制御分子の解析手法を確立し、候補分子による軸索側枝形成時の細胞骨格の制御機構を明らかにすることで、脳神経の協調的な働きを担う側枝形成現象の分子実体の解明を目指す。側枝形成は通常の脳発生のみでなく、傷害を受けた脳領域への代償機構においても重要な役割を担っており、側枝形成の分子基盤が明らかになれば、物理的傷害や梗塞などによって失われた神経機能の回復の手段に応用できると期待される。

### 研究の内容および成果

#### 1. EB3-EGFP を用いた微小管の動態観察法

神経細胞において、軸索がダイナミックに変動するとき（枝分かれや回路のつなぎ替え）には、その軸索内の微小管も、切断や伸長など大きく変動することが報告されており、微小管の安定制御や切断活性を持つ分子の関与が示唆されている。

我々はこれまでの研究成果として、皮質脊髄路起始細胞が生まれる胎生12日の大脳皮質脳室帯に子宮内電気穿孔法で遺伝子を導入することで、皮質脊髄路神経細胞での遺伝子操作を可能とした。さらに、染色体組み込み型の遺伝子発現誘導手法を組み合わせることで、軸索側枝形成期や、成体脳内など、長期にわたって任意の時期に遺伝子操

作を行うことが可能となった(Iguchi T, et al. (2012) *PLoS ONE*)。そこで、これらの手法を利用して、我々が見出した側枝誘導候補因子が微小管の安定性や切断に与える影響を調べるため、今回新たに、微小管の伸長や切断をリアルタイムに観察可能な微小管プラス端結合蛋白質 EB3 に EGFP を融合した発現ベクターを作成した。このベクターを子宮内電気穿孔法で皮質脊髄路の起始細胞である大脳皮質5層の細胞に導入し、初代細胞培養を行い、共焦点顕微鏡で高速タイムラプス撮影することで微小管伸長端の動態をリアルタイムに観察することに成功した(図1)。この手法を用いることで、候補因子を作用させたときの微小管の切

断 (EB3-EGFP でラベルされた微小管プラス端の増減) や伸長 (EB3-EGFP の移動速度の変化) を評価することが出来る。

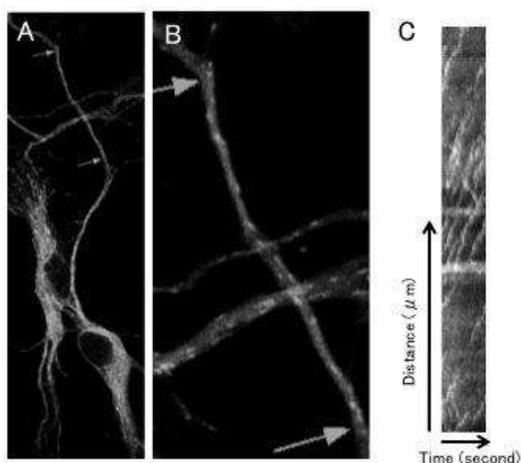


図1: EB3-EGFPのタイムラプス観察による微小管伸長速度の測定

- A) EB3-EGFPを発現させた大脳皮質5層神経細胞
- B) A)拡大図、微小管プラス端に結合したEB3-EGFPの蛍光粒子
- C) B)の矢印間領域のタイムラプス画像から作成したキモグラフ

## 2. 微小管制御因子のクローニングと機能解析

培養神経細胞の側枝形成領域 (枝分かれ部分) を電子顕微鏡で見ると、軸索側枝が出芽した後、側枝内には短い微小管が数本進入した様子が観察される。これは、主軸索内部の微小管の切断によって伸長端であるプラス末端が出来、側枝内へと微小管が進入していったと考えられる。我々は、実際の脳内において軸索外側からの刺激が微小管の切断や安定性を変化させることで軸索の枝分かれを制御している可能性が高いと考え、微小管制御因子の中で、神経細胞で発現しており、微小管の切断への関与が知られている *spastin* をクローニングした。Cos7 細胞に発現させて、微小管への影

響を調べたところ、*spastin* は顕著に微小管の構築を阻害することが分かった。今後、大脳皮質 5 層神経細胞で過剰発現、若しくはノックダウンを行い上述の EB3-EGFP 等を利用して側枝形成への関与を調べる予定である。また、候補因子による微小管の切断や伸長を同様に評価することで、候補因子と微小管制御因子の相関関係を調べ、軸索側枝の形成や退縮・再編成の制御機構を生体内で明らかにしていく。

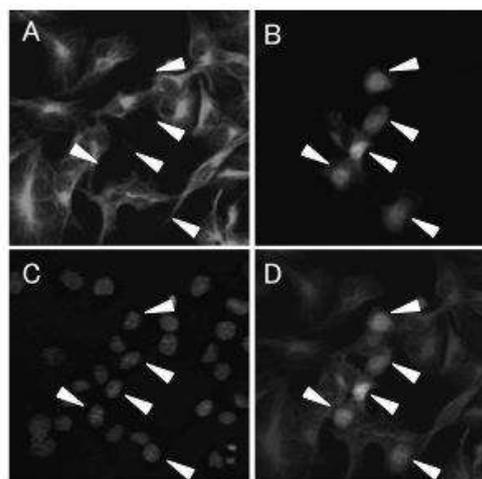


図2: 微小管切断分子 (*spastin*) の発現による微小管の消失

- A) 微小管の免疫染色像。 B) *spastin* 発現細胞
- C) 核 (Hoechst)。 D) Merge 画像

現在、本研究とは別に共同研究者の尾身が側枝形成因子に対する受容体候補分子を選定し、受容体候補遺伝子を大脳皮質 5 層神経細胞で阻害した時の側枝形成への影響を解析しており、本研究とのシナジー効果を得られるように研究を進展させていきたい。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

1. Komada M\*, **Iguchi T\***, Takeda T, Ishibashi M, Sato M. Smoothed controls cyclinD2 expression and regulates the generation of intermediate progenitors in the developing cortex. (submitted) \*first two authors equally contributed.
2. **Iguchi T**, Oka Y, Kuroda K, Wang CC, Xie MJ, Yagi H, Sato M. Analyses on the potential candidates of collateral branch inducing factor that are specifically expressed in the targets of axon collaterals from the corticospinal projection. JSN-APSN 2012, (2012) Sept.
3. 猪口 徳一、岡本 昌之、佐藤 真「DBZ 共同研究に関する現在のデータ」第 14 回 ORIGIN 神経科学研究会、2012 年 9 月

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

文部科学省 科学研究費補助金 若手研究(B)、平成 24~25 年度 「皮質脊髓路と橋核での誘導型遺伝子発現制御技術を利用した軸索側枝形成機構の解明」代表、採択、2,600 千円

生命科学複合研究教育センター平成24年度研究費助成事業  
「学内共同研究等」

## 蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた生体分子の放射線による 損傷量評価手法に関する研究

研究代表者：松尾 陽一郎（附属国際原子力工学研究所・特命助教）

共同研究者：泉 佳伸（附属国際原子力工学研究所・教授）、安田 仲宏（附属国際原子力工学研究所・教授）

概 要	<p>放射線による生体影響の要因は、DNA を中心とした生体分子の損傷が主であると考えられている。放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法は、放射線による生体影響研究のために重要である。放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、本申請課題では数十塩基程度のオリゴヌクレオチドを蛍光修飾したサンプルを用い、放射線による損傷量を蛍光イメージアナライザー、蛍光顕微鏡などにて読みとり、評価する手法を開発する。</p>
関連キーワード	放射線、生体影響、DNA、線量評価

### 研究の背景および目的

放射線防護・放射線安全の観点から、個人線量計による被ばく量の管理は重要である。TLD 素子やガラスバッジ等が実用化されているが、これら既存の個人線量計のメカニズムは、物理・化学的作用を応用したものである。一方で、放射線影響の要因は細胞核中の DNA の切断や酸化損傷が主である。放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、プラスミド DNA を対象と

したゲル電気泳動やコメットアッセイがあるが、解析に要する時間が長く、また感度の点で課題がある。これらの課題を解決するために、放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、数十塩基程度のオリゴヌクレオチドを蛍光修飾したサンプルを用い、放射線による損傷量を蛍光イメージアナライザーや蛍光顕微鏡などで読みとり評価する手法を開発する。

### 研究の内容および成果

#### 研究の内容

5' 末端を蛍光修飾分子 (6-FAM: 6-Carboxyfluorescein) で、3' 末端をクエンチャー物質 (TAMRA: Carboxytetramethyl-rhodamine) で修飾したオリゴヌクレオチドを緩衝液に溶解したものをサンプルとする。オリゴヌクレオチドに切断が生じていない状態では、オリゴヌクレオチドと蛍光修飾分子とクエンチャー物質は同一鎖上にあり、蛍光修飾分子に与えられた光エネルギーが分子内励起移動によりクエンチャー物質へ移動し、熱エネルギーとして放出されると考えられる。従って、励起光を照射しても蛍光は抑制される。しかしながら、オリゴヌクレオチドに切断などの損傷が生じれば、クエンチャー物質による抑制効果が抑えられて蛍光が発せられると考えられる (Fig.1)。このことから、放射線照射によるオリゴ

ヌクレオチドの切断量は、励起光を照射した場合の蛍光量を介して評価できると考えられる。本課題では、蛍光修飾ヌクレオチドに対し、粒子線及びガンマ線を照射し、蛍光修飾ヌクレオチドの切断に伴って生じる蛍光量を測定した。異なる線種によるヌクレオチドの損傷の頻度を評価することへの適用性について検討した。

実験で用いたオリゴヌクレオチドは、27mer の両端に 6-FAM と TAMRA を修飾したものである。配列は次のとおりである。

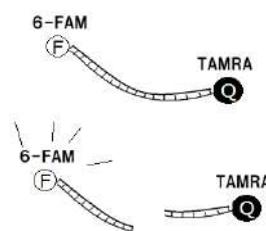
[6-FAM]TCA-TCCTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCT[TAMRA]。

サンプルは TE 緩衝液に溶解し、濃度は 100 μM である。サンプルに放射線医学総合研究所 HIMAC を用い、ヘリウム粒子線 (150MeV, LET :

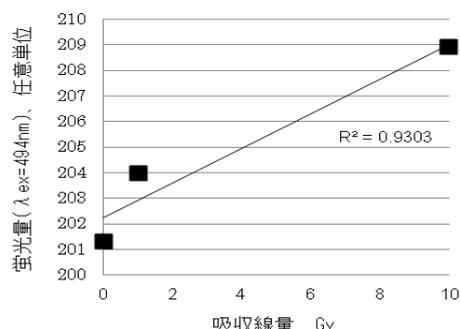
約 2.2 keV/ $\mu$ m) をバイナリーフィルター無しの場合で照射した。吸収線量は 0.01 Gy-10.0 Gy である。比較のために、大阪大学産業科学研究所のコバルト 60 照射施設の  $^{60}\text{Co}$  線源を用い、1Gy、10.0Gy のガンマ線を照射した(線量率: 0.16、1.6 Gy/min)。照射したサンプルについて、6-FAM の至適励起波長 494nm の励起光を照射した場合の、最大蛍光波長 516nm の蛍光量(以下、蛍光量)を蛍光分光光度計(F-4500、日立ハイテック)にて計測した。計測では 1cm 角の石英セルを用いた。計測条件としては、励起・蛍光側スリット幅:10nm、スキャンスピード 2400nm/min、ホトマル電圧 400V である。

**研究成果**

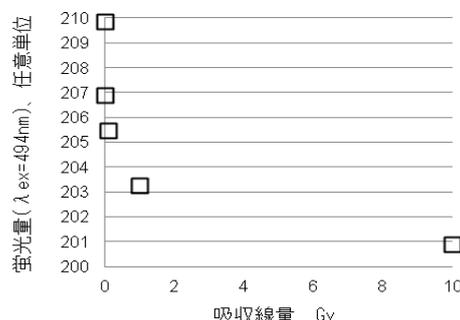
Fig.2 にガンマ線を照射した場合の蛍光量のグラフを示す(n=1)。Fig.2 から、吸収線量の増加に伴って蛍光量が増加していることが分かる。これは吸収線量の増加に伴い、クエンチャーによる抑制効果を失ったオリゴヌクレオチドが増加したことを示すものであり、オリゴヌクレオチドの切断に起因すると考えられる。Fig.3 にヘリウム粒子線を照射した場合の蛍光量のグラフを示す。Fig.3 に示すデータは、5 サンプルの測定結果の平均である(n=5)。ガンマ線の結果とは異なり、ヘリウム粒子線の吸収線量の増加に伴って蛍光量が減少していることが示唆された。蛍光物質 6-FAM のみをサンプルとして同様の実験を行った結果についても、同様の傾向が確認された。この要因として、ヘリウム粒子線による 6-FAM の放射線分解、もしくはサンプルの取り扱いに起因する酸化分解が生じている可能性が考えられる。蛍光物質及びクエンチャー物質の放射線分解についての粒子線及びガンマ線照射の場合のデータを蓄積し、本手法の適用性について検討を行う必要がある。今後、今回用いたヘリウム粒子線より軽い粒子である陽子線、重い炭素粒子線などを照射した場合の蛍光量を評価する予定である。また、粒子線及びガンマ線照射の場合のポリアクリルアミドゲル電気泳動等により、ヌクレオチドの切断量を評価し、蛍光量との関係を精査する計画である。



**Fig.1** 蛍光修飾オリゴの概念図。(上) クエンチャー物質の抑制が効いた状態、(下)切断が生じ、クエンチャー物質による抑制が抑えられ蛍光が観測できる状態。



**Fig.2** ガンマ線照射の場合の 6-FAM の蛍光量



**Fig.3** ヘリウム粒子線照射の場合の 6-FAM の蛍光量 (λex=494nm、λem=516nm)

**本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況**

**「成果発表」**

ISORD-7 (7th International Symposium on Radiation Safety and Detection Technology), 2013.7.15-2013/7/18, Sanya, China (予定).

**「特記事項」**

本研究は、放射線医学総合研究所「重粒子線がん治療装置等共同利用研究」の一環として行なわれた。

**「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」**

日本学術振興会・種目:若手研究 B・期間:平成 25 年度~27 年度・研究課題:蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた放射線による生体分子損傷量の新規評価手法の開発 課題代表者として申請した。



---

**福井大学**  
**トランスレーショナルリサーチ**  
**推進センター**  
**平成24年度公募採択型研究費**

---

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「重点プロジェクト研究」

## 抗アポトーシス分子を標的とした癌治療法の開発

研究代表者： 吉田 明（医学部・准教授）

共同研究者： 五井 孝憲（医学部・講師）

<b>概 要</b>	Survivin は抗アポトーシス作用を有する分子であるが、がん細胞に特異的に発現していることより、がん治療の標的として大きな注目を集めている。 YM155 は Survivin 遺伝子のプロモーター活性を阻害する低分子化合物であり、現在、抗がん薬として臨床治験が進行している。我々は、ヒト由来の白血病細胞株を対象として YM155 の細胞増殖抑制能および、その殺細胞作用のメカニズムについて検討をおこなった。白血病細胞株に対する YM155 の増殖抑制作用を検討したところ、その IC <sub>50</sub> は 1nM 以下であり強力な抑制作用が認められた。YM155 は Survivin の発現を抑制したが、もうひとつの重要な抗アポトーシス蛋白である Mcl-1 蛋白の発現も強力に抑制した。YM155 は複数の蛋白の発現を抑制して作用を発揮する可能性が示唆された。
<b>関連キーワード</b>	YM155, Survivin, Mcl-1, 分子標的療法、アポトーシス

### 研究の背景および目的

Survivin は IAPファミリータンパク質の1つである。これまでにIAPファミリータンパク質としてXIAP, cIAP1, cIAP2, ML-IAP/Livin, NAIP, ILP2, apollon そしてSurvivinの 8 つの分子が同定されている。何れの分子においても共通して baculovirus IAP repeat (BIR) ドメインが認められる。XIAP, cIAP1においては、このドメインがアポトーシスの実行に重要なカスパーゼと直接的に結合して、その作用を阻害することが知られている。Survivinは1997年にAltieriらによって見いだされた分子であるが BIR ドメインを有しており、IAP ファミリーの中では最も小さな 142個のアミノ酸からなるタンパク質である。Survivinは CD34 陽性の骨髄由来の幹細胞、胸腺細胞、胎盤などを除いては正常組織での発現は認められない。一方、多くのがん細胞で高率に発現していることが知られている。さらにはSurvivinの発現量が、がんの悪性度や予後と相関することが報告されている。また、既存の抗がん薬の耐性メカニズムに関与している可能性が示されており、がん治療のターゲットとして近年、注目を集めている。

骨髄異形成症候群 Myelodysplastic syndromes (MDS) は老年者に多い難治性の白血

病の類縁疾患であり、現時点では、本疾患を根本的な治癒に導く有効な薬物療法は未だに存在しない。MDS には、白血病に早期に移行しやすいhigh risk 群としてrefractory anemia with excess of blasts-1 (RAEB-1)やRAEB-2 が知られている。我々は、MDS の患者の骨髄血液サンプルより分離したCD34 陽性細胞を用いて Survivin遺伝子の発現の解析を実施してきた。その結果、CD34 陽性細胞で、特にハイリスクのMDS の症例において非常に強い発現亢進が認められることを見いだした。こういった症例ではSurvivinは治療のための分子標的となりうると考えられる。

【目的】YM155は HeLa-S3 細胞にトランスフェクションしたSurvivin遺伝子のプロモーター/ルシフェラーゼ系を用いたレポーターアッセイによるスクリーニングにより見いだされた低分子化合物であり、Survivinのプロモーター活性を阻害する。YM155は現在、米国で固型腫瘍や悪性黒色種を対象とした臨床治験が進行中である。今回、我々は、ヒト由来の白血病細胞株を対象としてYM155の細胞増殖抑制能および、その殺細胞作用のメカニズムについて検討をおこなった。

## 研究の内容および成果

1) ヒト白血病細胞株に対する YM155 の増殖抑制効果。HL-60 と U937 を用いて YM155 を所定の濃度で加えて 72 時間培養して細胞増殖抑制効果を検討したところ両者の細胞共に IC50 は 1nM 以下であった。

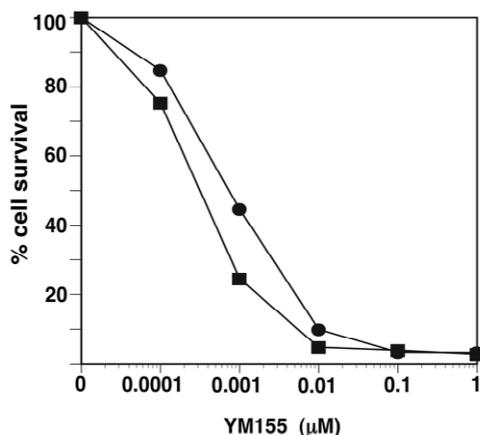
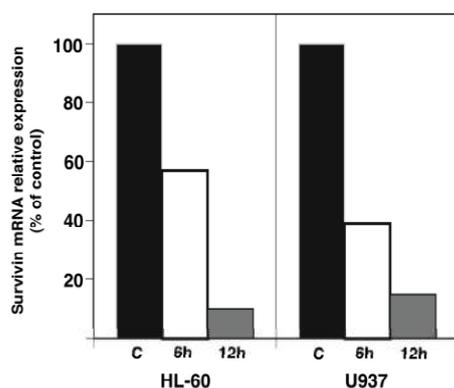


図 1. YM155 による白血病細胞増殖抑制効果。

2) ヒト白血病細胞株においての YM155 による Survivin mRNA 抑制効果。YM155 を 1μM の濃度で HL-60 および U937 に加えて所定の時間培養し、細胞を回収した後に RNA を抽出した。Taqman 法による RT-PCR を実施して Survivin 遺伝子の発現の変化を検討したところ図 2 に示すように両方の細胞で、Survivin 遺伝子の発現量が時間依存的に抑制された。

図 2. YM155 による Survivin mRNA 発現抑制。



3) ヒト白血病細胞株においての YM155 による Survivin および Mcl-1 蛋白の発現抑制効果。

YM155 を 1μM の濃度で HL-60 および U937 に加えて所定の時間培養し、細胞を回収した後に抗 survivin 抗体および抗 Mcl-1 抗体を用いてウエスタンブロットを実施した。図 3 に示すように YM155 は survivin 蛋白および Mcl-1 蛋白の両者の発現を強く抑制した。

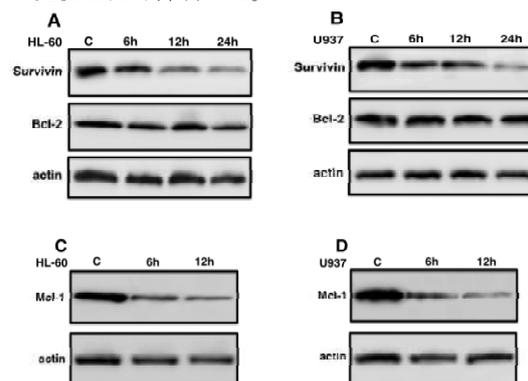


図 3. YM155 による Survivin および Mcl-1 蛋白の発現抑制効果。

4) YM155 による白血病細胞のアポトーシスは Caspase-8 阻害剤により抑制される。

Caspase-8 阻害剤 Z-IETD-FMK をあらかじめ培養液に添加し、その後 YM155 を細胞浮遊液に加え、経時的に誘導されるアポトーシス細胞に関して Annexin-V assay により定量して検討したところ Caspase-8 阻害剤 Z-IETD-FMK は YM155 によるアポトーシスを阻害することがわかった。

本助成による主な発表論文等、特記事項および  
競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

上記のデータは下記の論文に掲載予定。

1) Weiying Feng, Akira Yoshida, Takanori Ueda: YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013 *in press*

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「学内共同研究等」  
**小児同胞例を用いた発達障害における脳内神経ネットワーク障害の  
 解明：非線形解析による脳生理学的検討**

研究代表者：川谷 正男（医学部・講師）、高橋 哲也（医学部・講師）  
 共同研究者：上野 幹二（医学部・助教）

<b>概 要</b>	<p>広汎性発達障害（PDD）は幼児期に発症し、意思伝達、社会性や固執・常同性の障害を有する先天的な神経発達障害である。PDDの神経基盤の一つに“脳内神経ネットワーク異常”が指摘されており、多様な脳生理学的異常によって特徴付けられる。一方、近年注目されている脳波の非線形解析は、脳波の複雑性を定量化することで脳内神経ネットワーク異常の抽出を可能にし、様々な精神疾患における有用性が報告されている。</p> <p>本研究では、小児同胞例を対象に脳波の非線形解析を用いて脳機能異常を評価し、さらに臨床的背景や生化学的背景を踏まえて統合的に検討することで、PDDにおける脳内神経ネットワーク障害の神経基盤を明らかにする。</p>
<b>関連キーワード</b>	広汎性発達障害、脳内神経ネットワーク異常、脳波、非線形解析、マルチスケールエントロピー解析

**研究の背景および目的**

広汎性発達障害（PDD）は幼児期に発症する遺伝負因の強い神経発達障害であり、社会性の発達の障害、コミュニケーション障害、想像力の障害とそれに基づく行動の障害の3大特徴によって定義される神経発達障害である。しかし疾患の原因や病態のメカニズムは未だに不明な点が多く、その診断は臨床的視察に委ねられているのが現状である。

PDDの神経基盤に“脳内神経ネットワーク異常”が指摘されており<sup>1</sup>、多様な脳生理学的異常によって特徴付けられる。一方、近年注目されている脳波の非線形解析は、脳内神経ネットワーク異常の抽出において重要な役割を果たしてきた。申請者らは、従来の非線形解析法が有した多くの問題点を克服した、新しい非線形解析法である“マルチスケールエントロピー（MSE）”の脳波解析への適用を進めており、加齢<sup>2</sup>やアルツハイマー型認知症<sup>3</sup>、統合失調症<sup>4</sup>、気分障害<sup>5</sup>での有用性を確認している。MSE解析は、脳波に含まれる複雑性を多時間軸で解析するため、幅広い脳内神経ネットワークの抽出を可能にする。従ってPDDの神経基盤にある“脳内神経ネットワーク障害”を、MSE解析を用いて検討する試みは、極めて合理的であると考

えられる。

本研究の目的は、遺伝的要因の強い幼児PDDの同胞例を対象に、脳波のMSE解析を用いて脳機能異常を評価し、さらに臨床的背景や生化学的背景を踏まえて統合的に検討することで、PDDにおける脳内神経ネットワーク障害の神経基盤を明らかにする。この試みは発症の早期診断や治療効果判定に大きく貢献し、発症予防と早期介入を講じる上で重要な糸口となりうると考えられる。

1. Takahashi. Complexity of spontaneous brain activity in mental disorders. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry (in press).
2. Takahashi T et al. Age-related variation in EEG complexity to photic stimulation: a multiscale entropy analysis. Clin Neurophysiol (2009).
3. Mizuno et al. Assessment of EEG dynamical complexity in Alzheimer's disease using multiscale entropy. Clin Neurophysiol (2010).
4. Takahashi et al. Antipsychotics reverse abnormal EEG complexity in drug-naive schizophrenia: A multiscale entropy analysis. NeuroImage (2010)
5. Okazaki et al. Effects of electroconvulsive therapy on neural complexity in patients with depression: report of three cases. (submitted).

**研究の内容および成果**

**[研究の内容]**

**対象:** PDDを含めた発達障害の同胞小児10組20名、および年齢・性別を一致させた健常小児20名

**脳波の非線形解析：マルチスケールエントロピー解析**  
 脳内神経ネットワークは、脳内の多部位間の相互作用によって複雑に制御されているため、その出

力である脳波活動は非線形的変動を包含する。従って脳波解析への非線形理論の応用は、脳内神経ネットワークのメカニズムの解明において重要な役割を果たす。マルチスケールエントロピー（MSE）解析は、従来の非線形解析法が有した多くの問題点を克服した、新しい脳波の非線形解析法である。

**MSE 解析：**安静閉眼時脳波 20 秒に対して MSE 解析を行う。解析は数学解析ソフトである Mathematica 上で作成されたオリジナルプログラムにより算出。

**臨床的背景：**生育・発達歴、認知・発達検査（田中ビネーあるいは WISC-III, IV）、併存症、および発達障害の病状を反映する各種尺度（広汎性発達障害日本自閉症協会評定尺度、ADHD 評価スケール、日常生活困難尺度）をそれぞれ評価する。

**生化学的検査：**①酸化ストレスマーカー（尿中 8-OHdG, 尿中 ACR(ELISA 法)、尿中 BOM(ELISA 法)、尿中 NOx (吸光度法)、呼気中 CO (電極法))、②神経伝達物質（尿中カテコラミン、唾液中セロトニン (LC/MS 法))、③生態リズムマーカー（唾液中メラトニン (LC/MS 法))、④心理ストレスマーカー（唾液中コルチゾル (LC/MS 法)、アミラーゼ (ELISA 法))

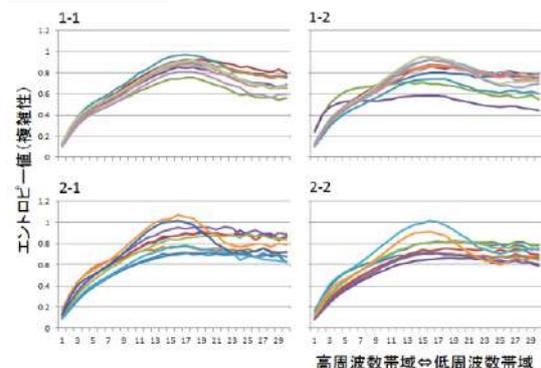
**統合的検討：**PDD における脳内神経ネットワーク異常の病態メカニズムを、上記の脳生理解析に加えて臨床的背景や生化学的マーカーを含めて多面的に検討し、これらのバイオマーカーとしての可能性を検証する。

**[成果]**

現在、対象を増やしている段階であり、これまでに注意欠陥・多動性障害の同胞例 2 組（4 名）の解析を終えている（表 1）。1-1、1-2 および 2-1、2-2 はそれぞれ同胞を表す。

症例	性別	年齢	臨床診断	知能検査	ADHD-RS		
					不注意	多動衝動性	合計
1-1	M	11歳0か月	ADHD(混合型) PDD	VIQ 104, FIQ101, FIQ103	12	7	19
1-2	M	7歳8か月	ADHD(混合型)	VIQ 100, FIQ106, FIQ103	17	15	32
2-1	M	11歳7か月	ADHD(不注意優性型)	IQ 65(田中ビネー)	19	7	26
2-2	M	10歳0か月	ADHD(混合型)	IQ 98(田中ビネー)	16	17	33

**MSE 解析結果**



縦軸はエントロピー値（脳波の複雑性）を、横軸は周波数をそれぞれ表す。各線は、電極を示す。

図に示すように、同胞内においては比較的類似した脳波の複雑性プロフィールを示すことが示唆された。

今後は対象を増やし、臨床的背景や生理学的指標を含めて検討することで、脳内神経ネットワーク異常の視点から PDD における神経基盤を言及する。

**本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況**

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」  
 平成 25 年度 基盤研究 (C) (採択)  
 (研究代表者) 高橋哲也  
 (研究分担者) 川谷正男、上野幹二、岡崎玲子  
 「自閉性障害の神経ネットワーク異常に関する研究：非線形解析による脳形態生理学的検討」

トランスレーショナルリサーチ  
 推進センター公募採択型研究費

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「学内共同研究等」  
**小児気管支喘息患者の局所的炎症マーカーの開発**

研究代表者：大嶋勇成（医学部・教授）

共同研究者：村井宏生（医学部・助教）、安富素子（医学部・助教）、河北亜希子（医学部・大学院生）、林仁幸子（医学部・大学院生）、岡崎新太郎（医学部・大学院生）  
 浜田敏彦（医学部附属病院・技師長）、橋本儀一（医学部附属病院・主任技師）

<b>概 要</b>	多様な病型からなる小児気管支喘息の病態を把握し、適切な治療法を選択するために、気道炎症の局在とその炎症の性状を評価するためのバイオマーカー開発を目的としてパイロットスタディーを行った。気道炎症の指標として呼気中一酸化窒素濃度（FeNO）、血清中および唾液中サーファクタントプロテイン D（SP-D）を測定し、モストグラフにより測定した中枢・末梢気道抵抗との相関性を検討した。FeNOは吸入ステロイド治療中の安定期の喘息患者や、喘息大発作で全身ステロイド投与を受けた患者では正常値を示し、FeNOで評価する上では、ステロイドによる影響を考慮する必要がありと考えられた。SP-Dは喘息発作で全身ステロイド投与後でも高値を示し、特に唾液中SP-D濃度は血清中濃度の代用として非侵襲的に反復測定でき、気道炎症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。一方、モストグラフによる気道抵抗の評価は誤差が大きく、小児ではその測定方法を検討する必要があると考えられた。
<b>関連キーワード</b>	小児気管支喘息、呼気中NO、SP-D、

**研究の背景および目的**

小児気管支喘息は多様な病型からなる症候群と考えられている。小児気管支喘息の基本病態は慢性的気道炎症と考えられているため、本邦も含め欧米の主要な小児気管支喘息ガイドラインにおいては、その発作頻度より喘息の重症度を決定し、吸入ステロイドやロイコトリエン受容体拮抗薬を主体とした長期治療薬による抗炎症治療が推奨されている。しかし、現在使用されている吸入ステロイド薬は、その薬剤径などにより到達・集積しやすい場所が違ってもかかわらず、気道の炎症部位を確認する有効な手段がないため盲目的に使用せざるを得ない。また、吸入ステロイドやロイコトリエン拮抗薬は、その薬理作用より好酸球性気道炎症の抑制効果は期待されるものの、好中球性の気道炎症など他の炎症細胞の関与する気道炎症に対しては治療効果が落ちると考えられ、気道炎症の局在性とその性状の多様性により治療薬剤への反応性も異なると推測される。

近年、インパルスオシレーション法により中枢と末梢の気道抵抗を非侵襲的に測定することが成人喘息患者を対象に行われており、薬剤の気道内到達部位を考慮した吸入ステロイド剤の選択が議論されている。しかし、気道抵抗は直接気道炎症部位を反映するわけではなく、気道炎症部位の局

在を特定することは未だ困難である。

一方、気道炎症の評価法については、呼気中一酸化窒素測定（以下 FeNO）が好酸球性気道炎症を反映するものとして、その臨床応用が検討されている。しかし、FeNOを測定するには一定流速で数十秒にわたり息を呼出せねばならず、昨年度の我々の研究からも、低年齢の小児ではその手技の難しさから測定が困難であることが多いことが判明している。年長児の小児喘息患者ではアトピー型が大半をしめるが、年少児の小児気管支喘息患者では、必ずしも気道粘膜への好酸球浸潤が増加していないものもあり、好酸球以外の炎症細胞が主体となる気道炎症を評価するためのバイオマーカーの開発が望まれている。

本研究では新たな気道炎症のバイオマーカーとして報告された SP-D に着目し、年少児でも低侵襲性に測定する方法として、唾液中濃度を測定する方法の妥当性を検証するとともに、従来の FeNO、モストグラフなどの臨床パラメータと比較することでその実用可能性を検討することを目的とした。本研究により気道の炎症部位とその性状を非侵襲的に評価できれば、より選択性の強い薬剤を選択することができ、少ない投与量や副作用で、より効果的な治療を行うことが期待される。

**研究の内容および成果**

1) 呼気中 NO (FeNO) の測定  
 FeNO の測定は、Aerocrine 社の NINOX MINO を用いて測定した。パイロットスタディーとして

本研究への参加に同意が得られた 3 歳から 13 歳までの 7 名を対象に FeNO を測定した。今回測定対象とし得た気管支喘息患者 5 名のうち、4 名は長期

管理薬として吸入ステロイドを使用して比較的コントロール良好な状態となっており、1名は喘息急性発作（大発作）のため全身ステロイドを投与されていた後での測定となった。FeNO 測定可能であった全例が、成人のカットオフ値として用いられる 20ppb 以下を示していた。

喘息児で全例が成人の正常範囲であったのは、ステロイド薬により好酸球性の炎症成分が抑制されていたためと考えられる。従って FeNO は好酸球性炎症が主体となっている喘息コントロール状態の評価には有用かもしれないが、好酸球以外による炎症成分の関与が有る場合には、その炎症状態を反映しきれないと考えられる。また、喘息の病型判断に用いるには、ステロイドによる影響を除くため治療介入前の値を用いることが重要だと考えられた。

### 2) 血清 SP-D の測定

本研究への参加に同意が得られて、血清が採取できた 3 名の血清中 SP-D を Human SP-D ELISA duo set (R&D systems, MO) にて測定した。3 名の内訳はアトピー素因を有しない健常児 1 名、気管支喘息の大発作で全身ステロイド投与後も喘鳴が認められた児 1 名。吸入ステロイド投与によりコントロール良好な児 1 名であった。

血清 SP-D は、コントロール良好な喘息児では健常児と同程度であったが、大発作時の児血清では高値を示していた。

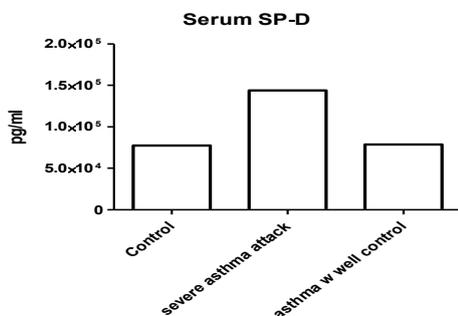


図 1 喘息発作、非発作時の血清 SP-D

血清中 SP-D の半減期は 13~28 時間と報告されており、半減期が数秒以内の呼気中 NO と比較すると測定前比較的長時間の炎症状態を反映する可

能性が考えられる。そのため、血清中 SP-D は喘息発作に伴い上昇し、全身ステロイド投与により速やかに正常化する FeNO と異なり、気道炎症を検出しやすいと考えられる。

### 3) 唾液中 SP-D の測定

年少児でも反復して採取しやすい検体を測定に用いることが可能か否かを検討するため、同意が得られた患者 6 名から SCS (Salimetrics Childrens Swab, Funaoshi, Japan) を用いて唾液を採取した。唾液中 SP-D は human SP-D ELISA kit で測定した。その結果、健常児と喘息非発作児間には血清と同様、差は認められなかった。しかし、喘息発作児群は全身ステロイド投与中にもかかわらず唾液中 SP-D は高値を示した。

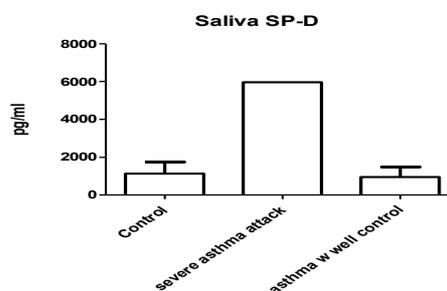


図 2 喘息発作の有無による唾液中 SP-D

唾液中 SP-D は血清中 SP-D と関連し、その代用となる可能性が示唆され、FeNO 測定とその評価が困難である低年齢、ステロイド使用中の症例においても有用な気道炎症マーカーとなりうる可能性が考えられた。

### 4) 唾液中 SP-D と気道抵抗の相関性

SP-D は II 型肺胞上皮細胞より分泌されるために末梢気道の炎症をより反映すると予測される。モストグラフを用いて中枢、末梢気道の気道抵抗を測定し、末梢気道狭窄程度との相関を検討した。しかし、モストグラフ上末梢気道の指標である R5-R20 の測定間誤差が大きく、その相関性を解析するには至らなかった。今後、対象患者数を増やし、モストグラフの測定方法を最適化する方法を確立することが必要と考えられた。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

原著論文

- IL-17A/F modulates fibrocyte functions in cooperation with CD40-mediated signaling. Inflammation. (2013 in press)
- IL-33 enhanced the proliferation and constitutive production of IL-13 and IL-5 by fibrocytes. (submitted)

### 「特記事項」

平成 24 年度北陸喘息研究会奨励賞受賞 (村井)

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 森永奉仕会研究奨励金・申請中
- 若手研究 (B) H25-26 年度ステロイド抵抗性喘息における気道上皮細胞のオーフォファジーの重要性 村井 (研究代表者) 採択

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「学内共同研究等」  
**HPV 感染の概念を取り入れた新しいコルポスコピー**  
**(子宮腔部拡大鏡診) の開発**

研究代表者：黒川 哲司 (医学部・講師)

共同研究者：品川 明子 (医学部・助教)

概 要	コルポスコピー (子宮腔部拡大鏡診) は、子宮頸癌の拡がりを見直接顕微鏡でみる検査法であり、子宮頸癌において細胞診とともに重要な診断法として確立されおり臨床の現場で頻用されている。そのコルポスコピーの診断法は、熟練を要し正診率が低いのが最大の問題である。今回、申請者らは、「in vivo 蛍光イメージング」を導入し「HPV 感染細胞の可視化」を行い「誰が行っても正診率に差が出ない新規コルポスコピー」を開発することを研究目的にする。このシステムの開発は、診断能の向上ばかりでなく、より詳細な発癌メカニズムの解明につながり将来の疾患の撲滅に大きく寄与すると思われる。
関連キーワード	子宮頸癌 コルポスコピー HPV 蛍光イメージング

トランスレーショナルリサーチ推進センター公募採択型研究費

**研究の背景および目的**

子宮頸癌は、罹患率・死亡率ともに女性特有の癌の中で二番目に多い癌である。そして、特に20-30代の罹患率では第1位で、さらに増加傾向でもある。そこで、子宮頸癌は早急に対策を必要とする癌として取り扱われている。そして、子宮頸癌の多くは、基礎研究の成果からヒトパピローマウイルス (HPV) というウイルス感染が原因であることが明らかとなっており、ワクチンによる HPV の感染予防や HPV 感染の有無を判定に取り入れた子宮頸癌検診が近年広く受け入れられ公費で助成されるまでに至った。しかし、診断と治療は従来どおりで、特に、診断のために必ず施行されるコルポスコピーに至っては1925年以来大きく改善されていない。コルポスコピーは、子宮頸部病変の程度と広がりを把握し、また最強病変から生検を行うための検査である。そして、その問題点は、所見の取り方に熟練を要し、生検する場所の決定が難しいということである。その結果、正診率は

60-70%と低いのが現状で、「誰が行っても正診率に差が出ない新規コルポスコピーの開発」が期待されている。

そこで、「in vivo イメージング (動物を生かしたまま生体内の細胞や分子を可視化し、それを画像化する事)」を利用し「HPV 感染細胞を可視化」することで、コルポスコピーの問題点を解決できると考えている。使用薬剤は RI でなく蛍光プローブを使用した「in vivo 蛍光イメージング」が適していると考えられる。その理由は、PET 検査では、RI を利用する為、被爆とその予防のために使用できる場所に制限があるが、被爆のない「in vivo 蛍光イメージング」では、手術室でも、外来でも安全に使用可能であり日常頻用されるコルポスコピーの特徴に合致している。そこで本研究の目的は、「in vivo 蛍光 イメージング法を用いて HPV 感染細胞を可視化した新規コルポスコピー」の開発である。

## 研究の内容および成果

**【研究内容】**HPV 感染細胞を標識する、標的膜蛋白として、Epidermal growth factor receptor (EGFR) を考えている。その理由は、過去の報告で、HPV 感染細胞での EGFR の過剰発現が確認されているからである。しかし、研究のほとんどが培養細胞によるもので、発現の局在についての検討も少ない。そこで、申請者は、①子宮頸癌患者検体から **HPV 感染細胞の EGFR 発現を確認**することと、②頸癌の培養細胞を用い、**HPV 感染細胞において EGFR の過剰発現が細胞膜に存在する事を確認**する事を本研究期間に行う事とした。

①に関しては、子宮頸癌患者の癌細胞に対しウイルスの DNA 検査を行い、HPV 感染の有無を確認する。そして、陽性症例と陰性症例で EGFR の発現の扁平上皮内の局在や発現量の相異を検討した。結果として、陽性例で EGFR が過剰発現を認めた。さ

らに、基底膜付近の細胞に強く発現する事も確認した。(図 1) 現在、さらに症例を増やし検討しているところである。

②に関しては、HPV 感染子宮頸癌細胞株である HeLa 細胞を用い、蛍光抗体法を使い、観察はレーザー顕微鏡で行っている。現段階では、まだ、感染細胞と非感染細胞で、EGFR の細胞内の局在や発現量の相違を検討している。

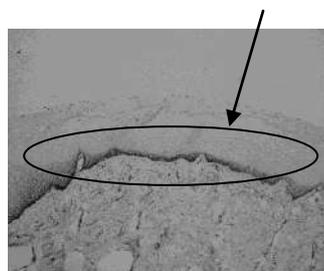


図 1 HPV 陽性細胞における EGFR 発現の局在

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 【発表】

2013 年 7 月 19 日から 21 日まで開催される 日本婦人科腫瘍学会で発表予定である。

### 【研究助成への申請】

平成 25 年度の科学研究費に申請中である。

### 【特記事項】

子宮癌の診断に関して、細胞診を使っている研究者と研究の発展についてのディスカッションを行っている。

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「学内共同研究等」

## 健康な成人女性に対するアロマセラピーを併用した ハンドマッサージの心理的・生理的効果

研究代表者：上原 佳子（医学部・准教授）、定 清直（医学部・教授）、  
安倍 博（医学部・教授）  
共同研究者：長谷川 智子（医学部・教授）、千原 一泰（医学部・准教授）、  
竹内 健司（医学部・学内講師）、礪波 利圭（医学部・助教）、  
針原 舞（大学院医学系研究科）

<b>概 要</b>	本研究は、乳がん患者への補完代替療法としてのアロママッサージ法の確立を目指し、乳がん好発年齢期にある 30～50 歳代の健康な成人女性を対象として、①アロマオイルを使用したハンドマッサージ、②アロマオイル抜きのオイルハンドマッサージ、③座位安静のみのコントロールの 3 つの条件における自律神経機能と気分の変化、唾液中コルチゾールを比較し、その効果を検証することを目的とした。今回、5 名の対象者の結果から、ハンドマッサージによるリラックス効果は精油によるリラックス効果より大きい、その時のみの一過性の効果であること、アロマハンドマッサージでは精油による嗅覚刺激によって、リラックス効果がハンドマッサージ終了後も持続していることが考えられた。
<b>関連キーワード</b>	アロマセラピー、ハンドマッサージ、リラックス、成人女性

### 研究の背景および目的

アロマセラピーは、植物の薬理成分を凝縮した精油（エッセンシャルオイル）を用いて、心身のトラブルを改善する自然療法の一つである。欧米では、アロマセラピーは有効な看護援助の一つ、また、看護の補完療法として普及している。例えば、がん患者の痛みや不安を軽減させ、生活の質の改善につながる可能性が示されており、緩和ケアにも用いられている。日本においても、がん患者の 44.6%が補完代替医療を利用しているとの報告があり、2008 年には厚生労働省より「がんの補完代替医療ガイドライン」が示され、緩和ケアとしてのアロマセラピーを行うよう勧めている。

現在、アロマセラピーの対象は、がん患者のみにとどまらず、高齢者や慢性疾患患者にも及んでいる。中でもアロママッサージには、マッサージ

効果に加えて、皮膚からの植物成分の吸収と呼吸器系を介する芳香効果があるとされている。今後、アロマセラピーは、統合的医療や全人的医療の観点からも発展していく可能性が高く、看護分野で必要性や有効性を明示していくことは重要であると考えられる。

本研究では健康な成人女性を対象として、アロマオイルを使用したハンドマッサージ時、アロマオイル抜きのオイルハンドマッサージ時、何もケアをしないコントロール時に分け、その前後での自律神経機能と気分の変化、唾液中コルチゾールを比較し、その効果検証することを目的とする。アロマハンドマッサージの有効性について科学的根拠のある結果が得られれば、患者にもそれらの効果が期待できると考える。

### 研究の内容および成果

#### <研究方法>

- 1) 対象者：研究に参加することに同意が得られた呼吸・循環器系疾患、耳鼻科系疾患、自律神経系疾患による通院中ではなく、閉経前の健康な 30 歳～50 歳代の成人女性。
- 2) 実験期間：平成 24 年 8 月～11 月
- 3) 実験方法：実験は 1 人につき 3 つの条件で 1 日につき一条件、また一週間のうち 3 日間で、条件の順をランダムに実施した。実験開始前にクレピレンテスト（15 分間）を実施し 10 分間の安

静をとった後、座位にて 3 つの条件を施行し、その後は 20 分間の安静とした。

マッサージは、軽擦法で前腕 2 分→手掌 2 分→手指 2 分→手背 2 分→前腕 2 分の順序で各上肢に 10 分間、両上肢で計 20 分間施行した。3 つの条件は以下の通りとした。①条件 1【アロマ】：アロマオイルでマッサージを 20 分実施。②条件 2【マッサージ】：キャリアオイルのみによるマッサージを 20 分実施。③条件 3【コントロール】：20 分間安楽な体位で安静。

実験中の体位はリラックスチェアーに座位で両上肢を肘置きに置き、リラックスできる体位とした。使用するアロママッサージオイルはリラックス効果のある予めブレンドされたオイルを使用し、アロマオイル抜きのマッサージにはアロマオイルの成分を除いた無臭のキャリアオイルを使用した。唾液採取は各条件の前と条件終了後 20 分の後に採取した。気分の質問紙はクレペリンテスト後、介入後、介入後安静後に記載を依頼した。

#### 4) 調査内容

・年齢、身長、体重、精油の嗜好、健康状態

##### 《生理的評価指標》

・自律神経活動：心拍数(回/分)、Low Frequency:LF ( 0.04-0.15Hz )、High Frequency:HF (0.15-0.40Hz) を抽出し、LF/HF を算出した。

・ストレス系指標：唾液中コルチゾール ( $\mu\text{g/dl}$ )

##### 《心理的評価指標》

・気分：日本語版 POMS 短縮版

5) 分析方法：分析対象が 5 名であったため、個々のデータを分析した。

### ＜結果&考察＞

#### 1. 生理的評価指標

心拍数では、全被験者が【コントロール】と比較して、介入時の【アロマ】と【マッサージ】の心拍数の値が低い傾向であり、LF/HF においても同様の結果が得られた。よって、【アロマ】と【マッサージ】の介入を行ったことで、リラックス効果が得られたのではないかと考える。また、介入後安静時においては、全被験者で【アロマ】は【マッサージ】よりも心拍数の変動が小さく、増加してもすぐに減少した。このことから【アロマ】の方が【マッサージ】よりもリラックス効果が持続することが考えられる。酒井ら(2010)の行った研究では、心拍数減少というリラックス効果においては、アロママッサージに精油とマッサージの相乗効果があることを報告しており、本研究でも同様の結果が得られたと考える。

唾液中コルチゾールでは、1 名が唾液検体量不足により分析が行えず、4 名の分析となった。介入前後において、【コントロール】では 2 名が変化せず、1 名が増加し、1 名が低下した。【マッサージ】では 3 名が低下し、1 名が変化がなかった。【アロマ】では 2 名が低下し、2 名が変化がなかった。

#### 2. 心理的評価指標

POMS について、ネガティブな気分を示す項目の‘緊張-不安’では、3 条件とも全被験者において、

実験を通して得点が下がる傾向にあったが、5 名中 1 名が【コントロール】において実験終了後に上がったことから、緊張や不安は時間の経過とともに軽減したことが考えられるが、【アロマ】や【マッサージ】を行うことで、より緊張や不安が軽減したと考える。このことは、今西ら(2007)の研究において、アロマセラピーマッサージが不安の減少に有効であると報告しており本研究においても同様の結果が得られたと考える。‘疲労’では、他の 2 条件と比較して、【アロマ】のほうが、介入後から実験終了後まで、全被験者において得点は下がり続けていたことから、【アロマ】による介入が最も疲労感を軽減し、その効果が持続したことが考えられる。点数が高いほど気分が好ましくない状態であることを示す TMD 得点について、【アロマ】では、全被験者において他の 2 条件と比較して介入後及び実験終了後で得点が上がることがなかったため、【アロマ】による介入が最もリラックス効果が大きく、さらに持続したことが考えられる。しかし、【マッサージ】では全被験者でクレペリン負荷後から介入後にかけて得点が下がったものの 5 名中 2 名は実験終了後に得点が上がったため、リラックス効果が持続するとは言えないと考える。

#### 3. まとめ

介入時において、ハンドマッサージによるリラックス効果は精油によるリラックス効果より大きい、その時のみの一過性の効果であることが考えられる。しかし、介入後安静時において、アロマハンドマッサージでは精油による嗅覚刺激によって、リラックス効果がハンドマッサージ終了後も持続していることが考えられる。また製油の成分が皮膚への刺激を通してリラックス効果を持続しているという可能性も否定できない。

本研究では、健康な成人女性に限定し、また分析対象者が少なかったことから、結果の一般化はできない。今後は対象者を増やしさらなる検証を行うとともに、成人女性以外の対象者や、健康障害のある対象者への効果の有無も検討する必要がある。

また精油の種類を 1 種類としたことから、被験者にとって精油の好みも異なることも考えられたため、複数の精油を用い被験者の好みを把握する必要があると考える。(引用文献省略)

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および 競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

本研究は、第 40 回日本看護研究学会にて発表予定である。

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「学内共同研究等」

## 癌の病理診断及び治療マーカーとなるマイクロRNAの検索（3）

研究代表者：伊藤 浩史（医学部・教授）

共同研究者：廣野 靖夫（医学部・助教）、伊藤 秀明（医学部・助教）

<b>概 要</b>	マイクロRNA (miRNA) は約22塩基の非常に小さい non-coding RNA で転写後翻訳レベルでの遺伝子発現制御を担っている。多くの腫瘍において miRNA の発現量の変化が報告されており、我々もこれまで、口腔癌および食道癌などの扁平上皮癌において複数の miRNA が分子病理診断に有用であることを報告した。今回我々は、前立腺癌における各 Gleason 分類で発現する miRNA について検討し、前立腺癌における miRNA の発現量は、個々の Gleason pattern (GP) ではなく、全体としての悪性度、つまり Gleason score (GS) によって変化していること、特に miRNA-182 の発現量は前立腺癌のリスクを反映しており、特に高リスクの癌に対して有用なマーカーとなり得ることを明らかにした。
<b>関連キーワード</b>	マイクロRNA、病理組織診断、前立腺癌、Gleason 分類、予後マーカー

近年、分子生物学的手法や遺伝子解析技術の進歩により、病理学の分野でも、腫瘍での様々な遺伝子変異や異常発現、染色体転座の結果生じる特異的融合遺伝子の検出などが広く行われており、様々な腫瘍の病理組織診断や治療法の選択、予後診断などに応用されつつある。白血病、リンパ腫、軟部腫瘍などでは、遺伝子診断により詳細な分類がなされ、それに沿った分子標的薬の開発が進み、EBMに基づいた治療法の選択が進んでいる。消化器の分野では食道癌（扁平上皮癌）や胃癌、大腸癌（腺癌）など患者数が多く、また泌尿器科の分野では前立腺癌の患者数が激増しているが、ともに病理組織からの遺伝子診断による細分類はまだ行われておらず、手術と放射線治療、化学療法が漠然とおこなわれているのが現状である。

マイクロRNA（以下 miRNA）は非常に小さい non-coding RNA で、相補的な標的 mRNA の翻訳制御を行っており、数百種類の miRNA の発現解析によって、腫瘍の診断（発生臓器、組織型、分化度など）が、cDNA マイクロアレイ（数万種類）による発現解析以上に正確にできることが報告されてい

る。我々のこれまでの研究から、通常の病理組織診断に用いられているホルマリン固定パラフィンブロックからマイクロダイセクション法とリアルタイム RT-PCR 法を用いて、簡便に miRNA を抽出、解析できることが明らかになった。本研究はこのような背景の下、通常の病理組織診断で用いられるホルマリン固定パラフィンブロックから miRNA を抽出、消化器癌・前立腺癌に特異的な miRNA 発現変化を検索し、消化器癌・前立腺癌の細分類および放射線、化学療法（分子標的薬）の治療効果の判定や予後判定が可能な miRNA マーカーを探求することを目的として行なった。

すでに昨年度までの科学研究費補助金や TR 研究助成により、口腔癌および食道癌などの主要な組織型である扁平上皮癌における miRNA 発現をマイクロアレイを用いて検討し、複数の miRNA がこれら扁平上皮癌の分子病理診断に有用であることを報告してきたが、今年度は、前立腺癌の診断、治療、予後マーカーとなる新たな miRNA の同定を目的に、前立腺癌における各 Gleason 分類で発現する miRNA について検討した。

昨年度までに、種々の臓器の扁平上皮癌細胞株および正常重層扁平上皮で miR-205 が最も高発現していること、他臓器の癌と同様に miR-21 は正常扁平上皮に比べ有意に扁平上皮癌で高発現していることを明らかにし、miR-205 および miR-21 が口腔癌、食道癌を含む扁平上皮癌の有力な病理診断マーカーとなりえることを明らかにした。また頭頸部扁平上皮癌では、HGF 刺激によって直接、間接

的にさまざまな遺伝子発現が変化し、その一部はマイクロ RNA の発現を調節することによって行われていることを明らかにし、マイクロ RNA を投与することで、HGF 下流遺伝子の機能が阻害され、頭頸部癌の進展を阻害できる可能性を示唆した。

本年度は上記成果を発展させ、前立腺癌における各 Gleason 分類で発現する miRNA について検討を行なった。方法としては Laser-captured

Microdissection (LMD)法を用いて、FFPE 標本より正常組織および癌組織を Gleason pattern 別に採取し、これまで前立腺癌で発現が変化していると報告されている miR-31, -34c, 96, -182, -183, -205, -221, -222 および internal control として RNU48 の発現量を real-time RT-PCR 法で定量し比較検討した。根治的前立腺摘除術の標本での検討では、miR-31, -34c, -205 は正常組織に比べ、癌組織で有意に低下していた (図1)。

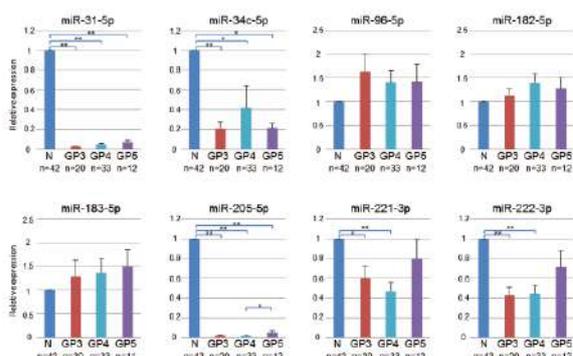


図1：前立腺癌手術標本における各種マイクロ RNA 発現 (Gleason pattern 別での検討)

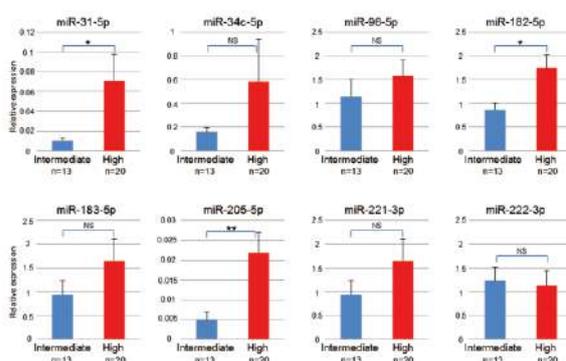


図2：前立腺癌手術標本における各種マイクロ RNA 発現 (High risk および Low risk 別での検討)

また同じ Gleason pattern (GP) を持つものの、リスクの異なる (異なる GS) 患者間における miRNA 発現量の変化が同じ Gleason grade4 であっても、miR-31, -182, -205 では high risk ほど発現量が有意に多かった (図2)。そこで前立腺生検の標本を用いて検証したところ、確かに miR-182 では、high risk ほど発現量が有意に高いことが明らかになった (図3)。

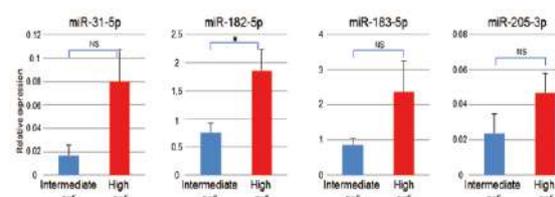


図3：前立腺癌生検標本におけるマイクロ RNA 発現の検証 (High risk および Low risk 別)

したがって、前立腺癌における miRNA の発現量は、個々の Gleason pattern (GP) ではなく、全体としての悪性度、つまり Gleason score (GS) によって変化していること、特に miRNA-182 の発現量は前立腺癌のリスクを反映しており、特に高リスクの癌に対して有用なマーカーとなり得ることを明らかにした。

今回の研究から、前立腺癌における miRNA の発現量は全体としての悪性度、つまり Gleason score (GS) によって変化しており、特に miRNA-182 の発現量は前立腺癌のリスクを的確に反映し、高リスクの癌に対して有用なマーカーとなり得ることを明らかにした。Gleason 分類に基づく miRNA 発現量を生検組織において評価することで、より正確な術前診断が可能となり、同じ GP4 を含む標本であっても miRNA-182 の発現量が高い時は GS7 (GP4+3 or 3+4) と診断されても High risk group である可能性を考えて、術前放射線療法や術前化学療法が検討されるべきであろう。



「主な発表論文等」

- 1) Susuki D, Kimura S, Naganuma S, Tsuchiyama K, Kitamura N, Fujieda S, Itoh H: Regulation of microRNA expression by hepatocyte growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 102: 2164-2171, 2011.
- 2) Tsuchiyama K, Ito H, Taga M, Naganuma S, Oshinoya Y, Nagano K, Yokoyama O, Itoh H. Expression of microRNAs associated with Gleason grading system in prostate cancer. *Prostate*, in press, 2012.

「特記事項」

今回の成果は第103回アメリカ癌学会 (Apr, 2012, Chicago)、第71回日本癌学会総会 (Sep, 2012, 札幌) および第34回日本分子生物学会年会 (Dec, 2012, 神戸) で発表した。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成23～25年度 科学研究費 基盤研究 (C) 「種々の癌細胞における細胞増殖因子刺激によるマイクロ RNA 発現調節」代表 4,000 千円 採択

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「学内共同研究等」  
**不妊治療に対する新たなバイオマーカーの開発**

研究代表者： 水谷 哲也（医学部・准教授）

共同研究者： 折坂 誠（医学部・講師）

<b>概 要</b>	<p>日本産科婦人科学会では、体外受精時に子宮に戻す卵子の数を原則一つとしており、良質の卵子を選択できる方法の開発が重要となってきた。しかし従来、体外受精時の卵子の質をモニターできる生化学的マーカーは存在しない。本研究では、新たな卵成熟因子 CNP のヒト卵巣における動態を高感度 RIA により明らかにするとともに、CNP の卵巣における遺伝子発現メカニズムを解析することで、良質な卵に関する新たな発育メカニズムを解析した。その結果、体外受精時に採取した卵胞液中の CNP が卵の成熟度を判別する指標になりうることを示唆された。さらに卵巣における CNP 発現調節メカニズムを解析したところ、CNP の転写は転写開始点上流-90 bp 付近の GC リッチな領域が転写活性に重要であることが示めされた。</p>
<b>関連キーワード</b>	不妊症, 卵胞液, CNP, 転写調節

**研究の背景および目的**

日本では現在、7組に1組のカップルが不妊と言われており、近年の晩婚化に伴いその割合はますます増加している。本研究は、不妊に関する新たな診断法を開発すると共に、妊娠時期の高齢化に伴ってリスクの高まる異常な受精・着床（不妊や流産）を減少させることを目標としている。

本研究では、卵胞液中に存在するペプチドに着目し、これが卵のクオリティーを評価する新たなバイオマーカーになりうるのではないかと考えている。近年ナトリウム利尿ペプチドファミリーに属する CNP が、良質な（受精能を獲得する可能性が高い）卵の発育に不可欠であることが示され（Zhang *et al.* Science 2010）、卵胞液中に存在するペプチドの重要性が示唆された。現在は卵の質を生化学的に判別して体外受精に用いることは不

可能だが、CNP を用いることで卵の質の選別およびその改善方法の確立につながることを期待される。妊娠の成立は年齢的な要素も大きいので、良質な卵の選択は加齢に伴う不妊・流産のリスク軽減につながり、妊娠成功率・出生率の向上も期待できる。

本研究では、この新たな卵成熟因子 CNP の卵巣における動態を高感度 RIA により明らかにするとともに、CNP の卵巣における遺伝子発現メカニズムを解析することで、良質な卵に関する新たな発育メカニズムを解明する。さらにこれら知見に基づき、CNP を用いた本邦オリジナルの新たな不妊症の診断法や治療法の確立を目指している。

**研究の内容および成果**

**① 妊患者における卵胞液中の CNP 濃度の測定**

CNP が卵の質をモニターできる生化学的マーカーとなり得るかを検討するために、インフォームドコンセントが得られた不妊患者より、体外受精時に卵胞液を採取し、高感度 RIA 法を用いて CNP 濃度を測定した。

体外受精に用いる卵を採取するには、患者にゴナドトロピンを投与して卵胞を発育させ、卵が受精可能な状態へと成熟させる。この時、ゴナドトロピン刺激を受け成熟した卵胞からは卵が採取できるが、未成熟な場合、卵子は卵胞壁に強く接着するために採卵できない。そこで採卵できた卵胞液と、採卵できなかった卵胞液の CNP 濃度を比較することで卵子の成熟度を判別できるか検討した。1人の患者から、1回の体外受精治療の際に採取した卵胞液中の CNP 濃度を測定したところ、採卵できた卵胞液の CNP 濃度は採卵できなかった卵胞液

の CNP 濃度よりも優位に低値を示した。このことから、卵胞液中の CNP 濃度を測定することで、卵子の成熟度を判別する指標になりうることを示唆された。

**②卵巣における CNP 遺伝子の発現調節メカニズム**

幼若ラットを用いて卵巣における CNP の発現様式を検討したところ、PMSG 処理によって顕著に発現が誘導された。さらに初代培養卵巣顆粒膜細胞を用いて検討した場合においても FSH 処理によって発現誘導されることが明らかとなった。次に卵巣顆粒膜細胞における CNP 発現調節メカニズムを明らかにするために、CNP 遺伝子の上流域約 3 kb を単離後、レポーターベクターを作製しその活性を検討した。その結果、転写開始点から-2,924 bp から-103 bp までを除いた結果、その活性の低下は認められなかったが、-103 bp から-52 bp までを除くことで顕著に転写活性の減少が見られた。こ

のことから-103 bp から-52 bp の間に CNP の発現に重要なエレメントが存在することが示唆された。また FSH のセカンドメッセンジャーである cAMP の反応性を検討したところ、転写開始点上流-3 kb 以内には、その反応領域が存在しないことが示唆さ

れた。次に、-103 bp から-52 bp における転写活性化領域を同定するために、変異を導入したレポーターベクターを作製し、その活性を検討した。その結果、-90 bp 付近の GC リッチな領域が転写活性に重要であることが示めされた(図)。

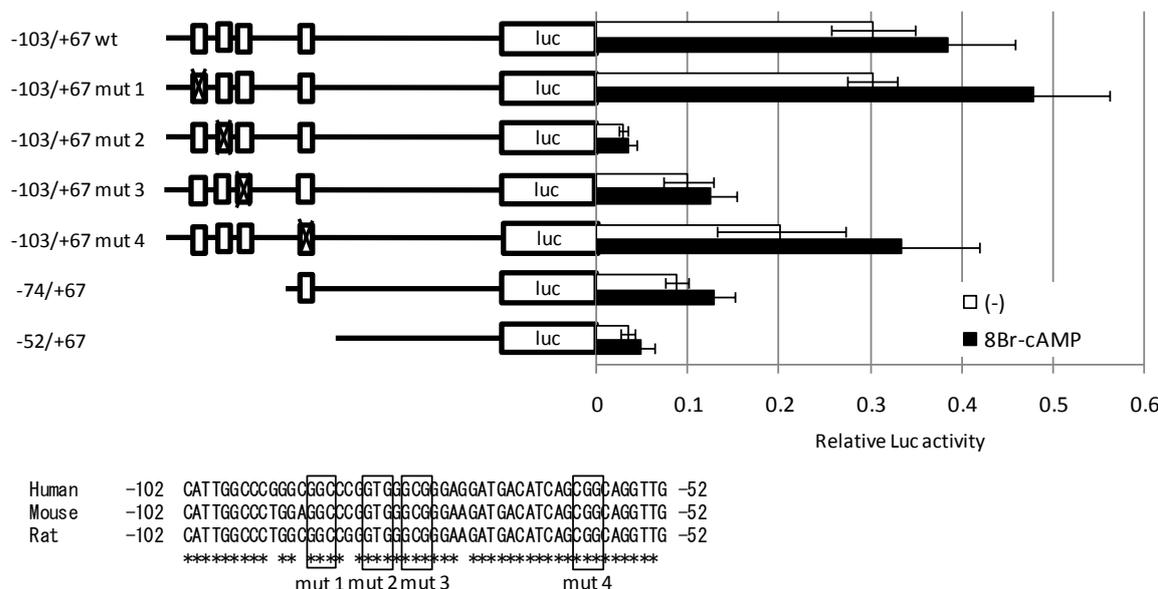


図 CNP上流域を用いたルシフェラーゼアッセイ

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., **Mizutani, T.**, Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M., Miyamoto, K.: A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* (in press)

Imamichi, Y., **Mizutani, T.\***, Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press)

Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., **Mizutani, T.**, Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Shimada, M., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press)

Ju, Y., **Mizutani, T.\***, Imamichi, Y., Yazawa, T., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Kangawa, K., Miyamoto, K.: Nuclear receptor 5A (NR5A) family regulates 5-aminolevulinic

acid synthase 1 (ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology* 153, 5522-34 (2012)

**水谷哲也**, 今道力敬, 河邊真也, 矢澤隆志, 宮本薫: 卵巣における遺伝子発現とその調節メカニズム. 日本生殖内分泌学会雑誌. 17, 11-16, 2012.

「特記事項」  
国際学会発表

**Mizutani, T.**, Ju, Y., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human 5-aminolevulinic synthase 1 (ALAS1) gene in steroidogenic cells. The Endocrine society's 94th Annual Meeting 2012. 6

**Mizutani, T.**, Ju, Y., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Osaki, T., Minamino, N., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Steroidogenic factor 1 (SF-1) and C/EBPβ cooperatively regulate human *HSD3B2* gene expression. 15th International Congress on Hormonal Steroid and Hormones & Cancer 2012. 11

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」  
基盤研究 (C)・新たなステロイド合成酵素の同定と高次クロマチン構造変換を介した転写調節機構の解明・代表・採択

トランスレーショナルリサーチ  
推進センター公募採択型研究費

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「学内共同研究等」  
**マウス神経障害性疼痛モデルに対する経皮的末梢神経電気刺激 (TENS) の効果**

研究代表者： 松尾 英明 (医学部附属病院・リハビリテーション部・理学療法士)  
 共同研究者： 内田 研造 (医学部・准教授)、中嶋 秀明 (医学部・助教)  
 渡邊 修司 (医学部・医員)、杉田 大輔 (医学部・医員)  
 嶋田 誠一郎 (医学部附属病院・リハビリテーション部・理学療法士))  
 馬場 久敏 (医学部・教授)

<b>概 要</b>	<p>本研究の目的はマウス神経障害性疼痛モデルを使用し、リハビリテーション領域で使用されている経皮的末梢神経電気刺激療法(TENS)の有効性を行動学的評価および脊髄グリア活性の組織学的評価から検討する事である。マウス神経障害性疼痛モデルを作成し、行動学的評価と TENS 治療を毎日 7 日間実施した。その後マウスを灌流固定し、免疫組織化学的評価を行った。TENS 治療群は、モデル群と比較し、機械的刺激および熱的刺激に対する疼痛閾値低下の改善を認めた。免疫組織化学的評価では、モデル群で脊髄後角における肥大化した多くの Iba1 陽性細胞、共染色される p-p38 陽性細胞が観察されたが、TENS 群ではこれらの減少傾向を認めた。TENS は、マウス神経障害性疼痛モデルの疼痛閾値の低下を改善し、脊髄後角のグリア活性の抑制に関与した可能性が示唆された。</p>
<b>関連キーワード</b>	<p>神経障害性疼痛、リハビリテーション、経皮的末梢神経電気刺激(TENS)、行動学的評価、脊髄グリア活性</p>

トランスレーショナルリサーチ推進センター公募採択型研究費

**研究の背景および目的**

神経障害性疼痛は、国際疼痛学会により“体性感覚神経系の病変や疾患によって生じている疼痛”と定義され、末梢神経あるいは中枢神経の機能障害や損傷により引き起こされる。臨床症状として、刺激が無くても生じる自発痛、痛み刺激に対して強い痛みが誘発される痛覚過敏、通常であれば痛みが起きないような刺激で痛みが起きるアロディニアがある。神経障害性疼痛の有病率については、2 万人以上を対象にしたフランスの大規模な調査では、人口の約 32%が 3 ヶ月以上持続する慢性疼痛に罹患し、そのうちの 22%(人口の約 7%)が神経障害性疼痛であると報告されている。神経障害性疼痛を有する患者では、43%の患者が 3 年以上の痛みを経験すると報告されている。このように神経障害性疼痛は長く続く強い痛みにより活動性が低下し、日常生活活動に著しく障害をきたし、QOL の低下を招く重要な疾患である。そのため、多くの神経障害性疼痛患者は、疼痛の緩和や ADL、QOL の改善を目的にリハビリテーションの治療対象となる。

これまでリハビリテーション領域で広く臨床応用されている疼痛の治療として、経皮的末梢神経電気刺激法(Transcutaneous electrical nerve stimulation ; TENS)がある。TENS は、Melzack らが提唱したゲートコントロールセオリーをもとに発展した電気刺激による鎮痛法であり、簡易かつ非侵襲的であるためリハビリテーション領域で広く応用されている。これまでリハビリテーシ

ョン領域では、神経障害性疼痛患者に対しても TENS が実施されてきた。これまでの TENS の有効性に関しては、神経障害性疼痛患者の 63%に有効であったが、その一方で 27%に効果が乏しかった事が報告されている。動物モデルを対象にした研究においても、1 日 1 回の TENS 介入が、疼痛閾値の低下を抑制することが報告されている。これまでの患者やモデル動物を対象にした報告から、神経障害性疼痛に対して TENS は有効である可能性が示唆されるが、その組織学的な証明を行った報告は少なく、その作用機序については明らかにされていない。

一方、神経障害性疼痛の発症や持続に microglia や astrocyte といった脊髄後角のグリア細胞が関与している事が報告されている。活性化したグリア細胞は肥大化し、細胞数の増加、細胞内シグナル伝達系である MAP キナーゼの活性化、炎症性サイトカインの放出を認める。脊髄グリア活性の阻害剤によりグリア活性を抑制させると行動学的な痛覚過敏が改善することも報告されている。これらのことから、グリア活性の抑制が神経障害性疼痛の抑制に重要と考えられるが、TENS が脊髄グリア活性に及ぼす影響は明らかにされていない。

そこで本研究では、マウス神経障害性疼痛モデルに対する TENS の効果を実験的評価、脊髄後角グリア細胞およびグリア細胞における MAP キナーゼ活性の免疫組織化学的評価から検討する事とした。

## 研究の内容および成果

### 【研究方法】

9週齢 ICR マウスを使用し、神経障害性疼痛モデルとして spared nerve injury(SNI)モデルを作成した。SNI モデルは、坐骨神経の分枝である脛骨神経と総腓骨神経を結紮、切断し、腓腹神経を温存するモデルであり、全て左側を神経障害側とした。マウスを SNI 群、SNI モデルに TENS を実施する TENS 群、Sham 手術を行う Sham 群の 3 群に群分けした。TENS は、電気刺激装置(OG 技研)を使用し、実施した。刺激部位は、左側の腰髄の支配領域である傍脊柱筋の直上の皮膚とし、刺激周波数 100Hz、刺激強度は筋収縮が生じない最大強度、刺激時間は 30 分間とし、麻酔下にて毎日実施した。Sham 群、SNI 群は麻酔のみ 30 分間行った。行動学的評価は、痛覚検査装置(Ugo Basile 社)を使用し、触刺激および熱刺激による評価を実施した。モデル作成前に行動学的評価を行い、モデル作成翌日から 7 日間毎日、行動学的評価、TENS の順に行い、8 日後に安楽死させ、灌流固定を行った。免疫組織化学的評価として、L4-5 髄節の脊髄を取り出し、20 $\mu$ m に薄切し、Microglia のマーカーである Iba1、OX42、Astrocyte のマーカーである GFAP、について免疫染色を実施した。さらに、OX42 および GFAP と MAP キナーゼとの二重染色を実施した。さらに L4-5 髄節の脊髄背側を採取し、MAP キナーゼの半定量化を Western blots 法を用いて行った。

### 【結果&考察】

#### 1. 行動学的評価

触刺激による評価では、SNI 群、TENS 群ともにモデル作成翌日に Sham 群と比較し、有意に疼痛閾値の低下を認めた。TENS 群は、徐々に疼痛閾値の低下が改善し、術後 3 日目に SNI 群と比較し有意差を認めた。(図 1)

熱刺激による評価では、SNI 群、TENS 群ともにモデル作成翌日に Sham 群と比較し、有意に疼痛閾値の低下を認めた。TENS 群は、SNI 群と比較し、徐々に疼痛閾値の低下の改善傾向を認めた。(図 2)

本研究においても、これまでの先行研究と同様に TENS により疼痛閾値の低下が改善したと推察された。

#### 2. 脊髄後角の Microglia の変化

SNI 群では、Sham 群と比較し、脊髄後角表層の Iba1 陽性細胞数は増加を認めた。強拡大像では、Iba1 陽性細胞の細胞体の肥大化を認めた。TENS 群では、SNI 群と比較し、Iba1 陽性細胞の減少傾向を認めた。

Microglia と MAP キナーゼとの二重染色では、OX42 と共染色される p-p38 陽性細胞は、SNI 群で比較し、TENS 群で減少傾向を認めた。Western blots による p-p38 の発現量は、SNI 群では、Sham 群と比較し、増加していたが、TENS 群は SNI 群と比較し、低下していた。

#### 3. 脊髄後角の Astrocyte の変化

Astrocyte の免疫組織化学的評価では、SNI 群は Sham 群と比較し、脊髄後角表層の GFAP 陽性細胞は増加を認めた。TENS 群では、SNI 群と比較し、GFAP 陽性細胞は減少傾向を示した。

Astrocyte と MAPK との二重染色では、GFAP と共染色される pERK 陽性細胞を SNI 群では認めしたが、TENS 群では、減少傾向を認めた。Western blots による pERK の発現量は、SNI 群、TENS 群では、Sham 群と比較し、増加していたが、TENS 群は SNI 群と比較し、低下傾向であった。

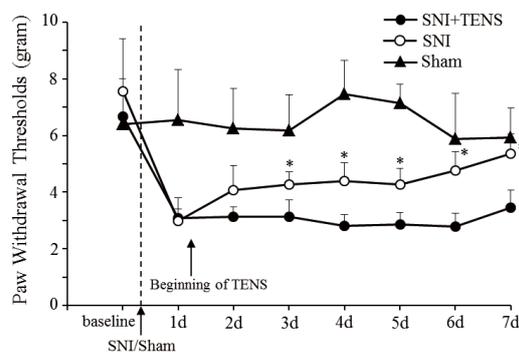


図 1. 触刺激による評価

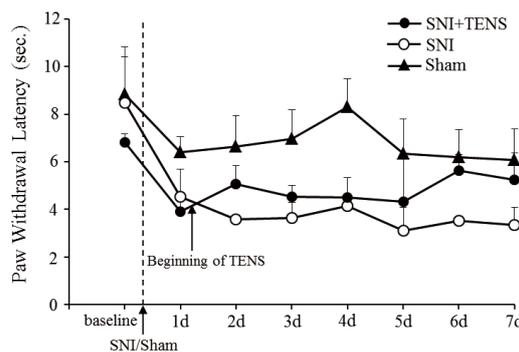


図 2. 熱刺激による評価

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

研究成果は、第 42 回日本脊椎脊髄病学会(2013

年 4 月開催予定)、第 48 回日本理学療法学会(2013 年 5 月開催予定)で発表予定である。

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「学内共同研究等」

## 胎仔期循環血液内の間葉系幹細胞を利用した 遺伝性・自己免疫性皮膚疾患の新規治療法の確立

研究代表者： 知野 剛直（医学部・医員）

共同研究者： 徳力 篤（医学部・助教）、清原 隆宏（医学部・准教授）

概 要	
	<p>申請者らは非放射線照射下の胎仔骨髄移植法にて、栄養障害型先天性表皮水疱症（EB）モデルマウスの生存率向上に世界で初めて成功した。その後、骨髄移植を受けたヒト EB 患者 6 例に皮膚症状の改善が得られ、さらに本治療法の臨床効果には高分化能を持つ platelet-derived growth factor receptor <math>\alpha</math> 陽性間葉系幹細胞（PDGFR <math>\alpha</math><sup>+</sup>MSCs）が関わっている事が報告された。本研究では、①マウス胎仔を用いて PDGFR <math>\alpha</math><sup>+</sup>MSCs を効率よく血液中から回収するシステムを構築、さらに②ヒト難治性皮膚疾患への治療応用の可能性を評価する事を目的とした。そこで、申請者は、まずマウス胎仔循環血液内 PDGFR <math>\alpha</math><sup>+</sup>DAMSCs をマウス胎仔から効率よく回収する方法の研究開発に取り組んでいる。</p>
関連キーワード	<p>間葉系幹細胞、遺伝性皮膚疾患、マウス胎仔、PDGFR<math>\alpha</math>、末梢血液</p>

### 研究の背景および目的

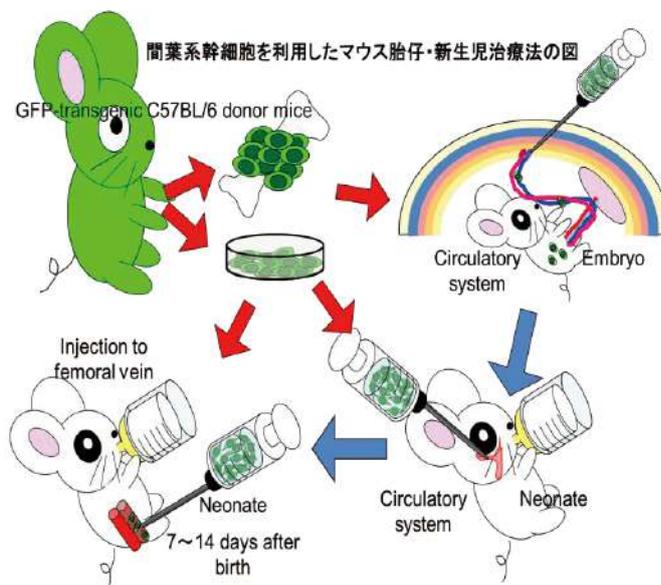
皮膚に重篤な障害をもたらす遺伝性皮膚疾患である栄養障害型表皮水疱症(EB)は、出生後すぐに皮膚に重度の障害をきたし、治療方法が確立されておらず、生活面への長期にわたる支障がある難病で、国の難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されている。この疾患を克服するため、EB 疾患モデルマウス(Heinonen S et al. J Cell Sci 1999)が作成されたが、ヒト応用につながる治療法の有力な発見・報告はなされていなかった。

申請者は、この EB モデルマウスを利用して、成人マウスから骨髄および間葉系幹細胞を採取し、マウス胎仔期の胎仔循環系にこの採取した成人マウス骨髄細胞を投与することで、皮膚症状改善と survival 改善が得られることを世界で初めて明らかにした(T Chino et al. AJP 2008)。その後の追試でも、骨髄細胞投与の有効性は他の論文報告で確認された。

アメリカシガン大学及びチリで行われた臨床治験では、ヒト EB 患者に対して、全身性放射線照射後、骨髄間葉系幹細胞移植を行なったところ、皮膚症状の著明な改善を得たと報告された(Wagner et al. N ENGL J Med 2010, Tolar et al. Stem Cells 2010)。骨髄幹細胞投与は、マウスおよびヒト EB 患者に効くのである。しかしながら、さらなる臨床応用を展開するには、投与前に行う全身性放射線照射により生じる致死性合併症（GVHD や感染症等）を克服することが、次の重要な課題であることも判明した。

本問題を解決するために、申請者らは、胎仔期の循環血中内のみに存在し、骨髄間葉系幹細胞よ

りも高い分化能力を持っている胎児期血液内間葉系幹細胞 (DAMSCs)PDGFR  $\alpha$ <sup>+</sup>cell(Xin-Lpang Yang et al. Developmental Dynamics 2011)を用いることを発案した。この細胞を遺伝性疾患と診断されたヒト胎児の循環血液中から回収し、遺伝子を正常復帰させ、適切な分化誘導を行い、出生前に患児に投与すればさらに治療効果を与えることが可能であると考えられる。また、自身の間葉系幹細胞を治療に使うことで GVHD の副作用や、胎児期に間葉系幹細胞を投与することで放射照射の



必要はなくなる。間葉系幹細胞には免疫反応を抑える作用(免疫寛容)も有しており、正常復帰させた遺伝子産物に対する拒絶もおさえられると考えられる。

本研究開発ではマウス胎仔循環血中内間葉系幹細胞(PDGFR $\alpha$ +DAMSCs)を高効率採取する技術

の開発を行い、さらに回収した高分化能を有するこの PDGFR $\alpha$ +DAMSCs を胎仔期に投与し治療することで、遺伝性・難治性皮膚疾患モデルマウスに対するさらなる治療効果の有無を検討する予定である。

## 研究の内容および成果

本研究は、①マウス胎仔期 E12.5-13.5 の血液内のみ存在する万能性が高い Dorsal Aorta Mesenchymal stem cells(DAMSCs) PDGFR $\alpha$ +MSCs(間葉系幹細胞)を効率よく血液中から回収するシステムを構築し、②回収した P $\alpha$ +DAMSCs を胎仔期循環系に投与することで皮膚発生初期段階の毛包周囲に効率よく生着させることが出来るのかを確認する。さらに③モデル疾患マウス胎仔期に、この効率よく回収した P $\alpha$ +DAMSCs 細胞を投与することでさらなる治療効果が得られるのかを明らかにしたいと考えている。

### 【研究方法】

1. マウス胎仔期の PDGFR $\alpha$ +MSCs および HSC の骨髄への遊走開始時期を正確に解析し、同時期の末梢血・肝臓・骨髄・胎盤等の諸臓器における分布の増減を把握する。
2. 上記で明らかにした遊走期に各種遊走因子・走化性物質[すでに報告されている骨髄幹細胞 P $\alpha$ +cell を migration させる蛋白質(PDGF-AA、PDGF-BB、b FGF、VEGF、IGF-1、BMB2、BMB4、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3、HGF、IL-3、SDF-1a)と骨髄幹細胞が骨髄にホーミングすることを阻害する試薬である AMD3100 など]を胎仔循環系内に投与し、細胞特異的な遊走シグナルの阻害、賦活により、効率的な PDGFR $\alpha$ +MSCs の遊走条件を把握する。
3. マウス胎仔末梢血から PDGFR $\alpha$ +MSCs を回収できる条件を導きだす。
4. 疾患モデルマウス循環系へ回収した細胞を導入し、治療効果と皮膚局所での分子生物学的動態

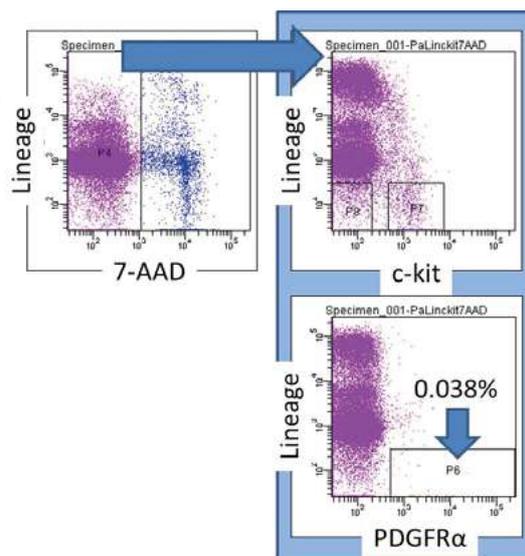


図1. adult mouse 骨髄内、PDGFR $\alpha$ +BMCs の FACS(Cant II)解析

生後6週の adult mouse 骨髄内 Lin $^-$ ・c-kit $^-$ ・PDGFR $\alpha$ +・7-AAD $^-$ ・BMCs は、0.038%であった。

今後、マウス胎仔でデータを集積する予定である。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

今後、データが蓄積しだい医学関連学会での発表および投稿を積極的に行う予定である。

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

研究活動スタート支援 (No. 24890077) 平成 24 年度～25 年度

課題：胎児末梢血内間葉系幹細胞を利用した新規胎児皮膚治療の臨床応用に向けた研究開発  
研究者代表 知野 剛直

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター「学内共同研究等」  
**2型糖尿病患者におけるタウ蛋白オリゴマーを介する  
 アルツハイマー病発症機序の解明**

研究代表者：濱野忠則（医学部・講師）

共同研究者：白藤法道（医学部・大学院生）、上野亜佐子（医学部・大学院生）、

鈴木仁弥（医学部・助教） 土田龍郎（医学部・講師）

<b>概 要</b>	<p>高齢化社会を迎え、アルツハイマー病(AD)患者数は急増している。2型糖尿病(T2DM)はADの重要な危険因子であり、T2DM患者では、AD発症のリスクが健常者の約2倍と言われている。ADの主要な病理所見・神経原線維変化は高度にリン酸化したタウ蛋白より形成される。我々は、3種類の野生型タウを発現する神経系細胞を用い、2型糖尿病治療薬であるPPAR<math>\gamma</math>アゴニスト：pioglitazoneによるタウ蛋白リン酸化抑制、およびオリゴマー形成抑制の機構を検討した。その結果pioglitazone投与により総タウ、およびリン酸化タウの減少が明らかに認められた。さらに、タウ蛋白リン酸化酵素であるGSK3<math>\beta</math>の不活性化も確認された。この効果はpioglitazoneによるAktのリン酸化亢進を介するものであることが明らかとなった。神経系細胞に対する細胞毒性は認めなかった。さらにCaspase3の不活性化によりCaspase切断タウを減少させ、タウの重合を抑制することが推察された。なお、PPAR<math>\gamma</math>アンタゴニストであるGW9662をpioglitazoneと同時に投与することにより、pioglitazoneによる総タウ、およびリン酸化タウの減少効果は打ち消された。また、fractionation studyにより、トリス不溶・サルコシル可溶性画分(SN2)でのタウを検討した結果、pioglitazone投与前には、dimer, tetramerをはじめとするoligomerタウが確認された。しかし、pioglitazone投与により、SN2でのoligomerタウの著しい減少効果が示された。</p> <p>なお、当院、および関連病院もの忘れ外来における初診AD患者380例中50例(13.2%)で、HbA1cが6.5%以上であった。また84例(22%)で、HbA1cが6.0%以上と、糖尿病患者の占める割合が高いことが判明し、T2DMがADの重要な危険因子であることが改めて実証された。</p>
<b>関連キーワード</b>	アルツハイマー病、2型糖尿病、タウ蛋白、オリゴマー、PPAR $\gamma$ アゴニスト

トランスレーショナルリサーチ推進センター公募採択型研究費

**研究の背景および目的**

高齢化社会を迎え、65歳以上の人口は福井県でも25.5%に達した。それに伴い、認知症患者数が急増しており、福井県内でも約2万5000人に達するものと推察される。認知症をきたす代表的疾患はアルツハイマー病(AD)である。2型糖尿病(T2DM)はADの重要な危険因子であり、T2DM患者では、AD発症のリスクが健常者の約2倍と言われている (Zhao and Townsend, 2009)。AD脳で認められる代表的病理所見は神経原線維変化(NFT)と老人斑である。NFTの構成要素は高度にリン酸化したタウ蛋白とユビキチンであり、老人斑の構成要素はアミロイド $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )である。T2DM患者死後脳や、T2DMマウス脳においてタウ蛋白のリン酸化や切断が顕著に認められた。切断されたタウ蛋白はリン酸化タウとともにオリゴマーを形成

し、in vitroで皮質神経細胞のアポトーシスを誘導する。さらに、インスリン受容体の機能障害によるPI3K、Akt経路の不活性化にともなうタウ蛋白リン酸化酵素(GSK3 $\beta$ )の活性化、ならびにadvanced glycation endproduct(AGE)の増加にともなう酸化ストレスの増加がT2DMによるAD発症の機序として推察されている。

今回我々は、3種類の野生型タウを発現する神経系細胞を用い、2型糖尿病治療薬であるPPAR $\gamma$ アゴニストであるpioglitazoneによるタウ蛋白リン酸化抑制、およびオリゴマー形成抑制の機構を解明することを主たる目的とする。さらに、臨床研究としての忘れ外来初診のAD患者中T2DMの割合を調査し、潜在的T2DMにつき疫学調査を加える。

**研究の内容および成果**

Tet-Off誘導系を導入し、野生型タウ(4R0N)を発現する神経系細胞を用い、PPAR $\gamma$  agonist (pioglitazone)の効果につき検討した。その結果pioglitazone投与により総タウの減少が認められた。さらにリン酸化タウの減少が明らかに認め

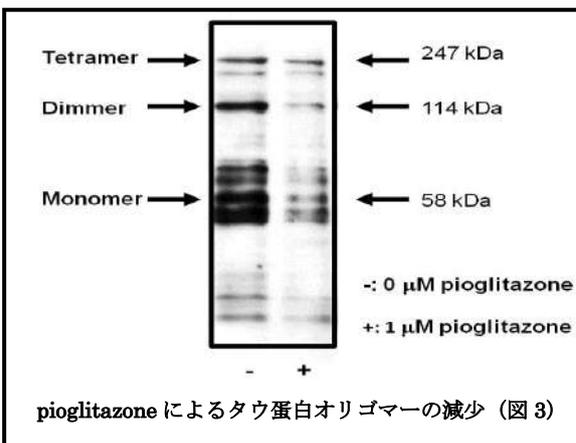
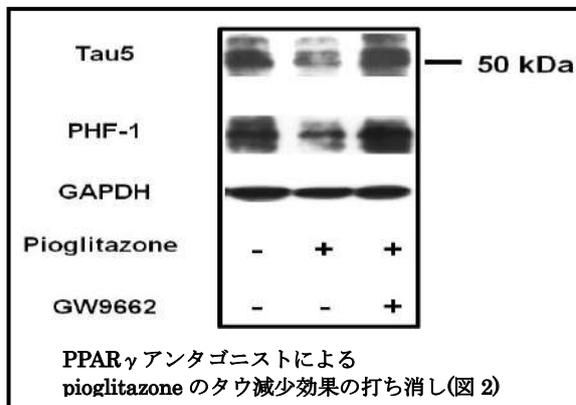
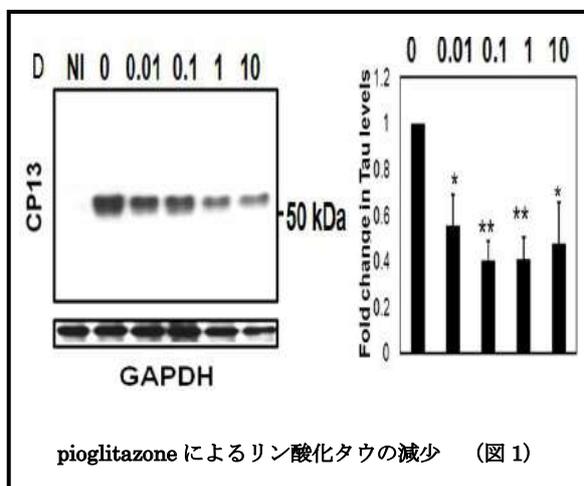
られた(図1)。また、免疫組織学的検討では、同様に特にリン酸化タウ(CP13)の減少が確認された。また、タウ蛋白リン酸化酵素であるGSK3 $\beta$ の不活性化も確認された。この効果はpioglitazone投与によるAktのリン酸化亢進を介するものであ

ることが明らかとなった。神経系細胞に対する細胞毒性は認められなかった。以上より、pioglitazoneはAktの活性化を介したGSK3 $\beta$ 不活性化をきたしタウのリン酸化を抑制することが示唆された。さらにCaspase3の不活性化によりCaspase切断タウを減少させ、タウの重合を抑制することが推察された。

なお、PPAR $\gamma$ アンタゴニストであるGW9662をpioglitazoneと同時に投与することにより、pioglitazoneによる総タウ、およびリン酸化タウ減少効果は打ち消された(図2)。

また、fractionation studyを行うことにより、トリス不溶、サルコシル可溶性画分(SN2)でのタウを検討した結果、pioglitazone投与前には、dimer, tetramerをはじめとするoligomerタウが確認された。しかし、pioglitazone投与により、SN2でのoligomerタウの減少が示された。

なお、当院、および関連病院もの忘れ外来における初診AD患者380例中50例(13.2%)で、HbA1cが6.5%以上であった。また84例(22%)で、HbA1cが6.0%以上と、糖尿病患者の占める割合が高いことが判明した。今後T2DM患者中の潜在的初期AD患者の割合を調査予定である。



トランスレーショナルリサーチ  
推進センター公募採択型研究費

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

- 1: **Hamano T**, Yen SH, Gendron T, Ko LW, Kuriyama M. Pitavastatin decreases tau levels via the inactivation of Rho/ROCK. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(10): 2306-20.
- 2: **Hamano T**, Mutoh T, Hirayama M, Uematsu H, Higuchi I, Koga H, Umehara F, Komai K, Kuriyama M. Winged scapula in patients with myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*. 2012; 22(8):755-8. (他1件)

#### 国際学会

1. **Hamano T**, Shirafuji N, Makino C, et al., Pioglitazone decreases phosphorylated and total tau protein. Alzheimer's Association 2012 International Conference (AAIC 2012) 2012年7月, Vancouver (他1件)

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

独立行政法人科学技術振興機構 産学官連携ネットワーク部平成24年第2回「研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)探索タイプ」課題番号: AS242Z03676Q 「タウ蛋白オリゴマーを介したアルツハイマー病の分子機序の解明」平成24年度~平成25年度 研究代表 採択 1,700千円

#### 科学研究費補助金 基盤C

「タウ蛋白オリゴマーが誘導するアルツハイマー病の分子機序の解明 臨床への応用」平成25年度から平成27年度 研究代表 採択 5,000千円



---

**福井大学**  
**産学官連携本部**  
**平成24年度実用化研究助成**  
**(FUNTECフォーラム**  
**福井大学研究シーズ**  
**紹介ポスター発表)**

---



福井大学大学院 工学研究科 情報・メディア工学専攻 森 幹男

背景

補聴器の問題点(装着者の意見)

- フィッティング(調整)が容易でない
- ハウリングが生じ易い
- 机上雑音や紙めくり音が気になる
- 受聴感が不自然
- めがねなどに比べ極めて高価

\*全国補聴器専門店認定協会補聴器供給システムの在り方研究会、「適正な補聴器普及のための供給システムに関する調査研究」3年次報告書(2004)より

「インプラント型補聴器」の提案

・H23~H24 A-STEP(FS)・H24~H26 科研費(挑戦的萌芽研究)

高齢化社会に向けて、利用者が必要者の10%に満たない補聴器に対して骨伝導の技術を導入することにより、歯科インプラント上の歯冠内に装着する外から見えない「インプラント型補聴器」を提案

当初：口腔内に装着する補聴器の音量調整やモード変更等の簡単なコントロールは口笛音で行う

ところが、口笛音をうまくコントロールできる人は3分の1

歯音、口唇開閉音(あるいは舌打ち音)によるモールス信号を骨導音で実現するアイデア

目的

骨導音を用いた歯音・口唇開閉音モールス装置の試作

- 補聴器コントロール機能の実現
- 障害者ためのユーザインタフェース

先行研究:歯音のみ

歯音だけでは短点と長点の区別を付けることができない

口唇開閉音(あるいは舌打ち音)を併用することによってこの問題点を解決する。実施期間内に特許申請を行う。

検討課題



装着イメージ

以下の検討が必要である。

1. 目立たないところに装着するピックアップマイクの検討
2. 本装置用無線通信技術の確立 — 人体通信
3. 歯音・口唇開閉音認識ソフトの開発

ピックアップマイクの検討

装着位置・・・乳様突起(耳介の後ろの骨の出っ張っている部分)ピックアップマイク・・・性能比較の結果、EDM-1を用いる

ピックアップマイクの性能比較結果

	S/N	歯音	吸着音	騒音耐性
GP-1	×	○	×	○
TC-300	○	○	○	△
EDM-1	○	○	○	○
STM-10	○	○	○	×

GUYATONE EDM-1



ピックアップマイク装着の様子



骨導音を用いる利点

歯音・口唇開閉音 あるいは舌打ち音 (他人に聞こえない程度に軽く行っても自分自身には聞こえることから) 骨導音を用いれば収録が可能である。

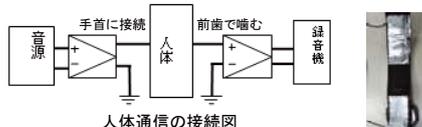
インプラント型補聴器コントロールだけでなく、声帯疾患のある方や頭部より下部の機能に障害を持つ重度な障害者のユーザインタフェースとしても利用できる。

睡眠時のいびき音や歯ぐしり音も検出できることから、無呼吸症候群などの診断にも応用可能で社会的にも大きなインパクトを与えようと考えられる。

人体通信

人体通信・・・人体を通信媒体として利用する通信  
ここでは、導体である人体に微弱な電流を流すことにより通信を行う。

日本語DRT用語対(sustention)10組\*を用いた8名に対する聴取実験で、人体通信を用いることによる音声劣化による聞き間違いが起こらないことを実験的に確かめた(腕に取り付けた電極と歯に取り付けた電極との間で実験)。  
\*着-菓子(ハンカチ)、旗-型(ハタカタ)、揺る-寝る(ホル-ホル)など



人体通信の接続図



腕時計を利用した電極

歯音・吸着音認識

歯音(歯のかみ合わせ音)と吸着音(舌打ち音)を組み合わせた命令コードによる補聴器等のコントロール手法を提案し、歯音と吸着音の検出方法について検討した結果、歯音と吸着音ではスペクトル上において500 Hz以下の領域に大きな相違があり、検出可能であることを示した<sup>[1][2]</sup>。

音声認識の問題点の解消

最近、スマートフォンでも音声認識が可能に

しかし、機械に向かって話しかけるのには抵抗を感じる

骨導音を用いた歯音・口唇開閉音モールス装置

研究成果

声帯疾患、頭部より下部の機能に障害を持つ重度障害者のユーザインタフェースとしても利用できる。

- [学会発表]  
 [1]重川直紀, 森 幹男, “骨導音による補聴器コントロールの検討,” 日本音響学会 2012年秋季研究発表会講演集1-4-3 (2012).  
 [2]重川直紀, 森 幹男, “骨導音によるユーザインタフェースの検討,” 日本音響学会 2013年春季研究発表会講演集 (2013).  
 [3]浜野弘毅, 萩原慎洋, 森 幹男, “骨導音と骨導音の時間分解能の比較,” 平成24年度電気関係学会北連大講演集 G-3 (2012).  
 [4]大西政寛, 萩原慎洋, 森 幹男, “歯を介した骨導音に関する基礎的検討,” 平成24年度電気関係学会北連大講演集 G-4 (2012).

# 超高感度バイオデバイスを目指した 導電性ナノファイバー電極の開発

工学研究科 坂元 博昭

概要



Mat (nonwoven fabric)  
直径: ナノサイズ  
比表面積  
多孔性

導電性

ナノファイバー電極材料

高出力・小型・軽量



医療計測



センサチップ

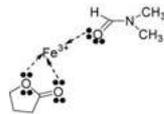
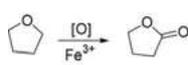


燃料電池

エレクトロスピニング法による導電性ナノファイバーの開発

材料

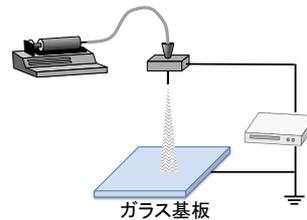
樹脂: ポリウレタン (分子量: 60,000)  
導体: FeCl<sub>3</sub>



Vasile, T et. al, Materials Chemistry and Physics, 123 (2010) 644-648



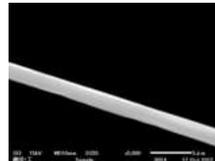
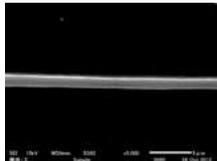
実験



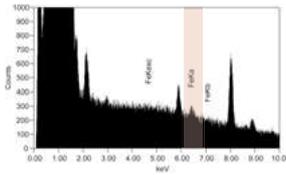
10% ポリウレタン  
FeCl<sub>3</sub>: 15%, 20%  
流速: 2 ml/h  
電圧: 20 kV

結果

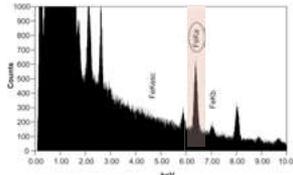
[SEM]



[EDX]



FeCl<sub>3</sub> 0%



FeCl<sub>3</sub> 20%

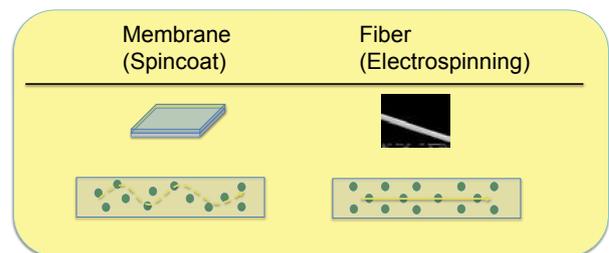
ファイバー直径

10%PU	10%PU+15%FeCl <sub>3</sub>	10%PU+20%FeCl <sub>3</sub>	
1.43(±0.20)	2.40 (±0.39)	2.96(±0.31)	(μ m)

[抵抗率]

	0% FeCl <sub>3</sub>	15% FeCl <sub>3</sub>	20% FeCl <sub>3</sub>
Resistivity [Ω・cm]	N.D	1.6 × 10 <sup>3</sup>	3.0 × 10 <sup>2</sup>

× 25 [Membrane] 7.7 × 10<sup>3</sup>



まとめ

- ・作製したファイバーはFeCl<sub>3</sub>を含有し、導電性を示した。
  - ・ファイバー形状により、導電特性が異なることを見出した。
- 今後は、
- ・作製したファイバー表面のナノスケール観察
  - ・電極材料としてセンサ応用

謝辞

本研究は、福井大学 産学連携本部『平成24年度実用化研究助成』の助成を受け、実施しました。

連絡先

福井大学大学院工学研究科  
ファイバー・アモニー・工学専攻 生命機能工学研究室  
〒910-8507 福井県福井市文京3-9-1  
E-mail: hi-saka@u-fukui.ac.jp  
Tel: 0776-27-9753



# 細胞培養の添加因子

工学研究科 寺田 聡、 谷口 正之(新潟大)、 築野食品工業株式会社

## 背景

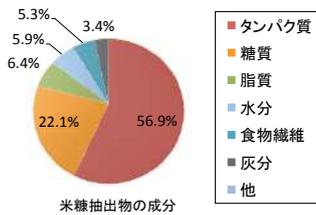
動物細胞培養により タンパク質医薬品を生産  
細胞治療/再生医療用細胞を調製

従来品 : ウシ胎児血清(FBS)や牛血清アルブミン(BSA)などを使用  
問題点 人獣共通感染症の可能性、供給量が少ない、ロット差

アニマルフリーな添加因子が必要

米糠抽出物 RB に着目

## 米糠抽出物 RB

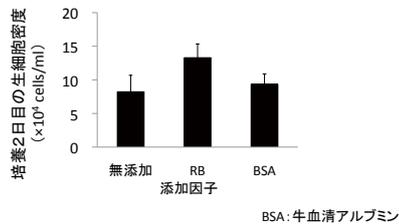
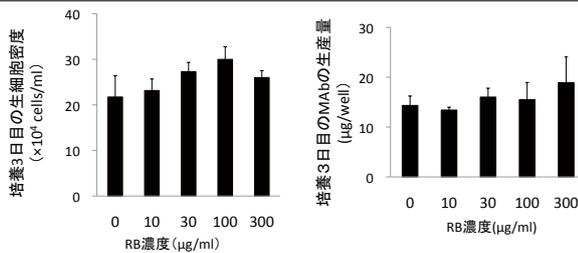


### 米糠抽出物 RB の特徴

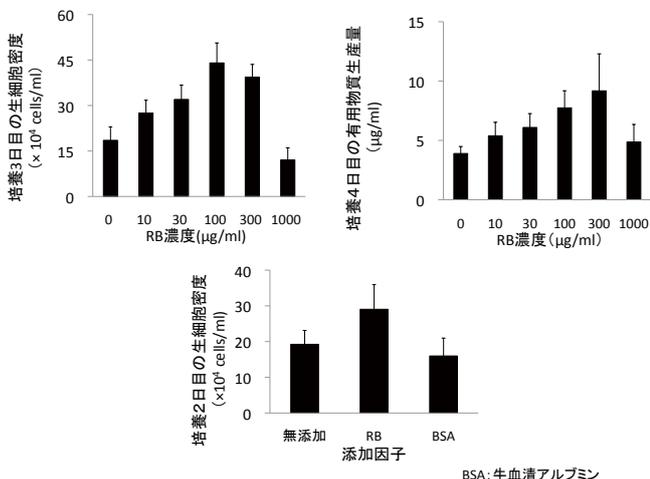
- タンパク質が約半分
- 米糠から得られ、廃物利用
- 国産で大量生産、安定供給

## 1. 株化細胞に対する増殖促進効果

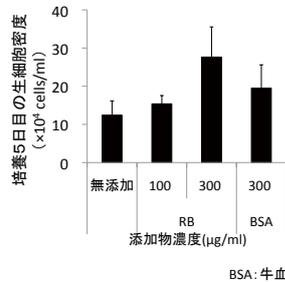
### マウスハイブリドーマ細胞 (モノクローナル抗体生産)



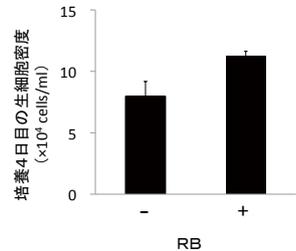
### チャイニーズハムスター卵巣細胞 (組み換えタンパク質、とくに抗体医薬品の工業生産に利用)



### ヒト肝細胞株HepG2細胞 (バイオ人工肝臓などに利用)



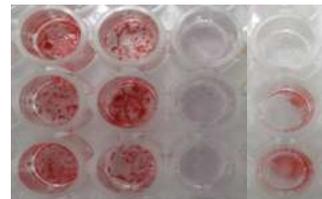
### HeLa細胞 (最も良く用いられる培養細胞株)



## 2. 間葉系幹細胞への適用

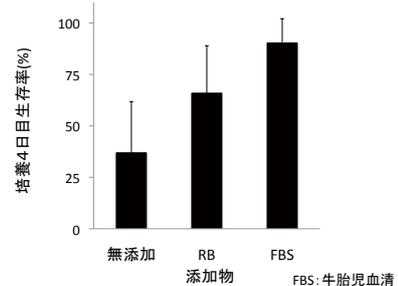
培地 血清含α-MEM 市販の無血清培地

RB - + - +



市販の無血清培地で2継代して増幅すると骨分化能を消失するが、RBの添加により、骨分化能が保持される。(骨分化した細胞は、アリザリン染色で赤く染まる)

## 3. 組織への適用～膵臓ランゲルハンス島



膵臓ランゲルハンス島(膵島)は、数千個の細胞からなる組織であり、インスリン分泌能を持つことから、糖尿病患者に移植される。膵島の体外培養では、血清が無いと死滅が進み、4日で1/3以下に低下する。RBを添加すると、血清には及ばないが、生存が改善される。

## まとめ

- 米糠抽出物RBを、細胞培養の添加因子として検討
- 4種類の株化細胞に対して、無血清培養を改善
- 間葉系幹細胞に対し、増幅培養段階で未分化能を維持
- 組織(細胞の集合体)である膵島に対しても有効



連絡先:  
〒910-8507 福井県 福井市 文京 3-9-1  
福井大学大学院工学研究科 寺田 聡  
Tel: 0776-27-8645  
E-Mail: terada@u-fukui.ac.jp

# 環化ポリマーを用いた高透過性・高選択性ガス分離膜の開発

福井大学大学院 工学研究科 材料開発工学専攻 森田一弘・橋本 保

我々は、環化重合により、剛直な環化主鎖とかさ高い側鎖を持つ新規ビニルエーテルポリマーの合成を行った。このような特異な構造により、これらのポリマーのガラス転移温度( $T_g$ )は200 °Cを超えるものも多く、高温まで使用できる耐熱性の高いプラスチックになることがわかった。一方、ポリマー分子の主鎖が剛直で側鎖にかさ高い置換基があると、ポリマー分子間に隙間が空きやすく、そのポリマー膜の気体透過性は高くなる(例)。

そこで、剛直な環化主鎖とかさ高い側鎖を持つ環化ポリマーも、その構造から、同様の特徴を示すと期待し、その気体透過性について検討した。

環化ポリマーは、非環化ポリマーと比べて、気体透過性は低くなるが、高い気体選択性を持つことがわかった。さらに、極性が高い側鎖を共重合により導入すると、二酸化炭素選択性が向上することがわかった。

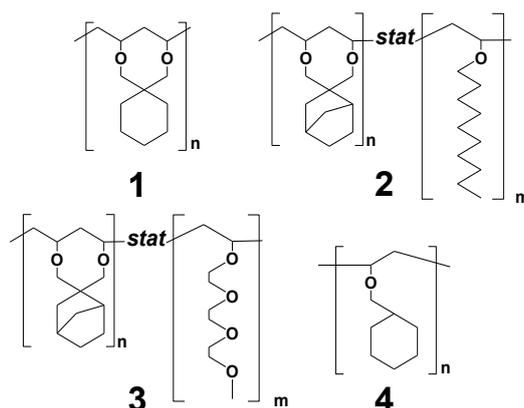
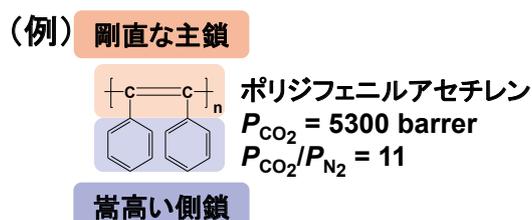
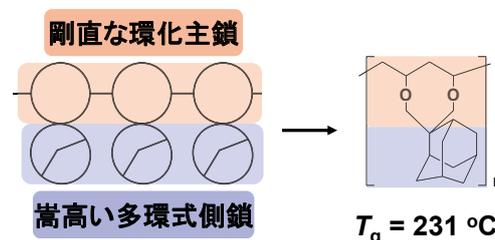


表1 新規環化ポリマーの気体透過性

Polymer	$P_{\text{N}_2}^{\text{a)}$ (barrer)	$P_{\text{O}_2}^{\text{a)}$ (barrer)	$P_{\text{CO}_2}^{\text{a)}$ (barrer)	$P_{\text{O}_2}/P_{\text{N}_2}$	$P_{\text{CO}_2}/P_{\text{N}_2}$
1	0.09	0.69	2.84	7.86	32.3
2	0.74	3.64	15.99	4.91	21.6
3	0.27	0.94	12.83	3.44	47.2
4	0.46	1.55	5.89	3.37	12.7
Poly(styrene)	0.79	2.66	10.51	3.39	13.4
Poly(ethylene):LDPE	0.97	2.93	12.64	3.01	13.0
Poly(ethylene):HDPE	0.15	0.40	0.36	2.72	2.46
Poly(vinyl chloride)	0.012	0.045	0.16	3.82	13.5

a) In the units of  $1 \times 10^{-10} \text{cc(stp) cm cm}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ cmHg}^{-1}$  (= 1 barrer ).



# マルチ同位体標識化合物を用いた高感度カテコールアミン自動分析法の確立

医学部統合生理学 成田和巳

## 背景

ピリリウム化合物は1級アミンと反応する性質をもっている。カテコールアミン、アミノ酸、ペプチド、タンパク質など生理活性物質にはアミノ基を含有するものが多く、ピリリウムによるラベリングが可能である。

新規ピリリウム化合物(PyII)に0から12個までの任意の偶数個の炭素原子安定同位体<sup>13</sup>Cを組み込み(特許出願中)、分子量が2ずつ異なる7種類のマルチ同位体ラベル試薬を作製した。

## 目的

PyIIマルチ同位体標識試薬を用い、質量分析器によるカテコールアミン、アミノ酸の高感度測定法を確立する。

## サンプル前処理

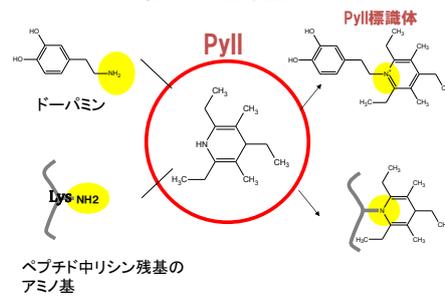
マルチ同位体標識試薬とサンプルを反応させた後、固相抽出により精製し、フィルター濾過を行った。

## 測定法

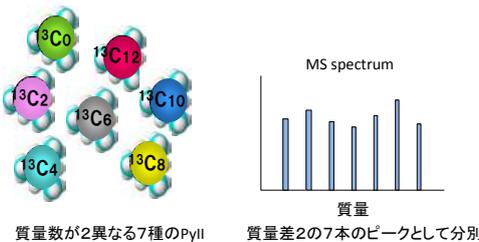
HPLC: NanoFrontier nanoLC(日立ハイテック)を用いて行った。トラップカラム(Monolith Trap、日立ハイテック)、分析カラム(MonoCap for FastFlow)にはODSカラムを、流速は200 nl/minで行った。移動相はギ酸/水/アセトニトリルが(A)0.1/98/2と(B)0.1/2/98を用い、グラジエントはA/B=98/2(0 min)-80/20(20 min)で行った。

質量分析: NanoFrontier eLD(日立ハイテック)を用いて行った。イオン化はESI(正イオン)、Spray Potentialは1600V、スキャン範囲はm/z 200-300で測定を行った。

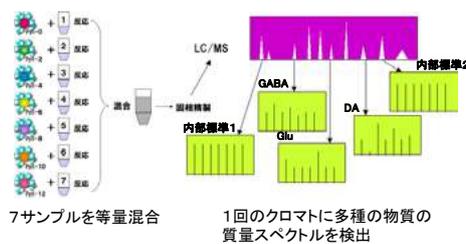
### 1 新規物質PyII試薬の役割 ～一級アミンを標識～



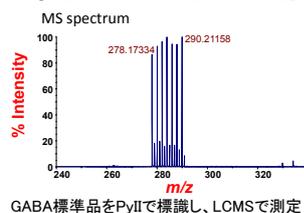
### 2 マルチ同位体試薬の質量分析器による測定



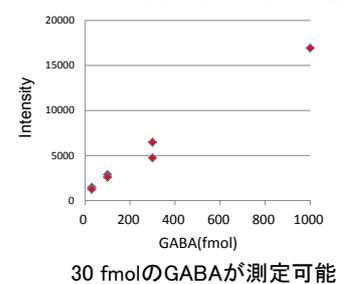
### 3 同位体標識試薬による多重分析 ～7サンプル/1分析～ 質量分析器による網羅的測定 ～多種の物質を同時測定～



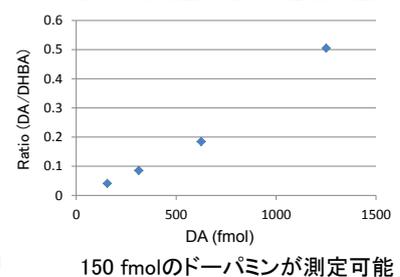
### 4 PyII試薬によるGABAの測定例



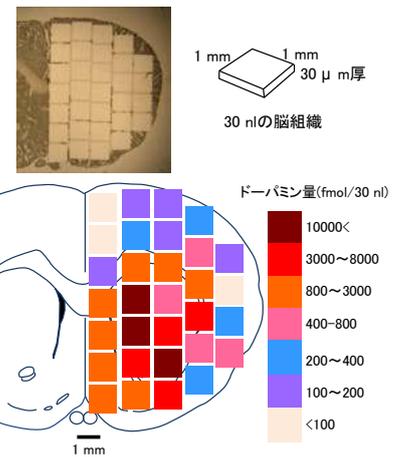
### 5 GABAの微量測定 ～従来の最高品と同等の感度を達成～



### 6 ドーパミンの微量測定 ～従来の最高品と同等の感度を達成～



### 7 ラット線条体レベルでのドーパミン地図



S/Nが従来の1千倍以上

#### PyIIの特徴

- ・安定な物質
- ・多重分析による測定の効率化
- ・質量分析による網羅的解析
- ・従来法の最高感度と同程度を達成
- ・S/Nは1千倍以上



# 福井大学助成研究成果集 2013

## —明日への挑戦—

発行日 平成25年6月28日

編集 福井大学研究推進委員会

研究推進委員会（平成24年度）

委員長	理事（副学長）研究・評価	眞弓	光文
委員	附属図書館長	田村	信介
〃	産学官連携本部長	米沢	晋
〃	附属国際原子力工学研究所長	竹田	敏一
〃	高エネルギー医学研究センター長	岡沢	秀彦
〃	遠赤外領域開発研究センター長	齊藤	輝雄
〃	子どものこころの発達研究センター長	佐藤	真
〃	総合情報基盤センター長	堀	俊和
〃	ライフサイエンス支援センター長	定	清直
〃	生命科学複合研究教育センター長	佐藤	真
〃	トランスレーショナルリサーチ推進センター長	宮本	薫
〃	UR Aオフィス所長	鷺田	弘
〃	教育地域科学部教授	三橋	美典
〃	医学部教授	横田	義史
〃	工学研究科教授	福井	一俊

発行 福井大学  
〒910-8507 福井市文京3丁目9-1  
(総合戦略部門研究推進課)  
TEL 0776-27-8880  
E-mail skkenkyo-k@ad.u-fukui.ac.jp

印刷 能登印刷株式会社

