

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月 10日

日本大学 総長 殿

氏 名 甲斐 素直



所属・資格 法学部・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|--------------------------|---|---------------------|
| 1 種目 | 奨励研究/一般研究(個人)/一般研究(共同) <input checked="" type="radio"/> 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 人格権および財産権の保護に関する総合的研究 | |
| 3 研究の目的 | 人格権及び財産権は、様々な法領域において法的保護の対象とされているが、その研究は法領域のうちにとまり、また国境に拘束されたものとなりがちで、そのグローバルな全体像は明らかではない。そこで、本研究は、日本とドイツとの法律学的対話を通じ、かつ法哲学、公法学、民事法学、刑事法学という各法分野の衆知を結集して、その現代における法的性格を明らかにすることを目的とする。 | |
| 4 研究の概要 | 日本大学及びベルリン自由大学の各分野における研究者が、統一テーマについて、まず各法領域に特化した形でインターネットを通じて意見を交換し、ベルリン自由大学において研究参加者全員が一堂に会して直接討論を行い、その成果を踏まえてさらにインターネットを通じた意見交換により研究を深化させ、最終的な成果を目指した。 | |
| 5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します） | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 甲斐 素直（研究全体の総括並びに公法部門総括及び研究） ・研究分担者（役割分担） <ul style="list-style-type: none"> 松島 雪江（法哲学部門の総括及び研究） 川又 伸彦（公法部門研究） 高畑 英一郎（公法部門研究） 設楽 裕文（刑事法部門の総括及び研究） 関 正晴（刑事法部門研究） 岡西 賢治（刑事法部門研究） 永田 誠（民事法部門の統括及び研究） 山田 卓生（民事法部門研究） 小田 司（民事法部門研究） 益井 公司（民事法部門研究） | |

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

部科校名：法学部

氏名：甲斐素直

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

一 共同研究開始に至る経緯

本件共同研究は、実質的には2006年に開始している。すなわち、ドイツ政府は、2005年4月より2006年3月までの1年間を「日本におけるドイツ年」と定め、日本国内において様々な企画を実施した（総件数は最終的には1500件余に達した。）。その一環として、日本大学法学部では、在東京ドイツ大使館より要請を受け、姉妹校であるベルリン自由大学との間で、東京において法律学に関するシンポジウムを開催することとした。

最終的に「法律学的対話における日本とドイツ」という統一テーマは決定されたものの、通常のシンポジウムと異なり、実質的には共同研究であった。すなわち、そのテーマに通暁しているものを探して報告者としたのではなく、現に両大学教員である者が、そのテーマに沿って新たな研究を行ったからである。具体的には、全法律分野を、法哲学、法史学、公法、私法、刑事法の5部門に分けることが決定され、これを受けて、個々の部門ごとに、具体的にはどのようなテーマを選定することが、もっとも日独両国の「法律学的対話」に有益であるかという検討作業から、日本大学＝ベルリン自由大学間の詳細な打ち合わせがはじまった。もとより日独いずれか一方だけで決定できる事項ではないので、これは必然的に共同作業の形態をとらざるを得ず、インターネットという連絡手段を通じた両国間の密接な連絡に支えられた準備作業は、それ自体が、日独双方にまたがった共同研究へと発展していったのである。

共同研究の連絡調整が膨大な作業となったため、シンポジウムそれ自体の開催に必要な事務的作業は、共同研究と切り離し、甲斐素直を総合責任者として、別途行われた。最終的に、ベルリン自由大学・日本大学共同シンポジウム「法律学的対話における日本とドイツ」は、2006年2月26日―28日に、日本大学経済学部講堂で行われ、延べ約350人の参加者を得て、成功裡に終わった。

その成果物の刊行作業がほぼ終了した2007年1月の時点で、早くもドイツ側から引き続いて共同研究を行いたい旨の申し入れがあった。すなわち、ドイツ＝ベルリン自由大学側の責任者であったクーニヒ教授は、ドイツ年シンポジウムという形で結実した共同研究は、従来、日独間で行われていた法律学分野における共同研究が、すべて特定分野における共同研究に止まっていたのに対し、総合的・横断的研究であったことから、ドイツでは大きな反響を呼んでいること、そこで、ベルリン自由大学としては、ぜひ第2回の共同研究を、同様に総合的・横断的成果を発揮したものとなるよう実施したい旨、申し入れてきた。これを受けて日本側でも関係教員が集まって検討した結果、受諾する旨の決定がくだされ、以後、ドイツ側とEメールを通じて、テーマその他について密接な打ち合わせが重ねられた。最終的にドイツ側の責任者であるフィリップ・クーニヒ教授が2007年10月に来日し、日本側関係教員と最終的な打ち合わせを行った。その結果、次の諸事項が決定された。

- ① 今回の共同研究の総合テーマは『法における人格権と所有権の保護―ドイツと日本との対話』とする。
- ② 一堂に関しての共同研究会の期日を2008年9月2日～4日とする。この間の日本側参加者のドイツにおける滞在費はベルリン自由大学側で負担する。
- ③ 日本側で法史学部門の参加者がいないことに伴い、全体で5部門という第1回研究の規模を縮小し、4部門で実施する。その分野別の責任者は次の通りとする。

| | ドイツ側 | 日本側 |
|-----|-----------|-----|
| 法哲学 | ロットロイトナー | 松島 |
| 公法 | クーニヒ | 甲斐 |
| 民事法 | アルムブリュスター | 永田 |
| 刑事法 | ゲッペルト | 設楽 |

部科校名：法学部

氏名：甲斐素直

研究の結果（つづき）

④ 各分野の共同研究参加者数は次の通りとする。

| ドイツ側 | 日本側 |
|----------|-----|
| 法哲学 2名 | 2名 |
| 公法 3名 | 3名 |
| 民事法 4名 | 4名 |
| 刑事法 2～3名 | 3名 |

このようにそれぞれの分野で共同研究者を同数とするのは、統一テーマの下に、さらに下位テーマを設定し、それについては日独のカウンターパートナーとなる研究者が1対1で密接にメールで連絡をしつつ、研究内容の細部を論ずるためである。

二 共同研究前半

この決定を受けて、日本側でも最終的に共同研究に参加する者が決定され、各分野ごとの責任者間の調整により、日独双方のカウンターパートナーが決定された。それに伴い、カウンターパートナー間でのメールによる討議が開始された。

他方、共同研究を円滑に進めるための資金を得るため、本件学術研究助成金の交付心申請が行われた。申請額が大幅に削減されたが、無事採択されたことにより、共同研究は一段と加速された。

2008年度に入った段階で、ドイツ側よりドイツ側の研究会予算の不足から、当初の計画ではドイツ側が負担することとされていた日本語論文のドイツ語化及びドイツ語論文の日本語化のいずれについても日本側で負担するよう要請があった。検討した結果、研究補助者の使用を断念し、かつ各人の個人研究費の一部を活用することなどにより対応可能であるとの見通しが立ったことから、これを受諾した。また、共同研究会の円滑な実施のため、論文の提出期限を早めることが求められ、若干の混乱が起こったが、最終的には無事に対応することができた。

三 共同研究会

2008年9月2日より4日まで、ドイツ国ベルリン市のベルリン自由大学キャンパスの一面に所在するハーナクハウスを会場に共同研究会が開催された。

研究会では、次の順序で研究成果の発表が行われた。

(一) 法哲学

- 1 人格権・所有権に関する日本の法=権利意識

松島雪江

- 2 規範的考察における「人格」という概念

マティアス・マールマン (Prof. Dr. Matthias Mahlmann)

- 3 土地所有について——附論「中国史の中の土地所有」

長尾龍一

- 4 人格に対する所有権？

フーバート・ロットロイトナー (Prof. Dr. Hubert Rottleuthner)

導入報告：ベルント・ラドヴィク (Prof. Dr. Bernd Ladwig)

(二) 公法学

- 1 財産権の保護と課税

マークス・ハインツェン (Prof. Dr. Markus Heintzen)

- 2 日本における財産権概念の特徴

甲斐素直

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：法学部

氏名：甲斐素直

研究の結果（つづき）

第一導入報告：シグリト・ボイセン（Dr. Sigrid Boysen）

3 憲法上の人格権保護

フィリップ・クーニヒ（Prof. Dr. Philip Kunig）

4 人格権の手続き的保障

川又伸彦

5 欧州における人格権保護

ハイケ・クリーガー（Prof. Dr. Heike Krieger）

6 日本における宗教上の自己決定権

高畑英一郎

第二導入報告：ベアテ・ルドルフ（Prof. Dr. Beate Rudolf）

(三) 刑事法学

1 盗撮行為に対する刑事規制とその限界

岡西賢治

2 刑法 201a 条、238 条を例とした刑法の人格権保護における法益および明確性

クラウス・ホフマン=ホランド（Prof. Dr. Klaus Hoffmann-Holland）：

3 証拠禁止と自白法則

関 正治

4 日本の被疑者取調べと自白

設楽裕文

5 人格権の刑事法における保護

ヨアヒム・クレッチマー（Priv.-Doz. Dr. Joachim Kretschmer）

導入報告：エリク・クラーツ（Dr. Erik Kraatz）

(四) 民事法学

1 担保のための所有権移転—経済的意義と解釈上の難しさ

コジマ・メラール（Prof. Dr. Cosima Möller）

2 日本の譲渡担保について—その法的構成を中心にして—

益井公司

3 絶対権としての所有権

クリスティアン・アルムビュルスター（Prof. Dr. Christian Armbrüster）

4 絶対権としての所有権

永田誠

第一導入報告：スザンネ・ヘンヒェン（Priv.-Doz. Dr. Susanne Hähnchen）

5 人格権の保護と所有権の自由との間の相互作用—著作権を例にとりつつ

マーティン・ホイプライン（Prof. Dr. Martin Häublein）

6 不法行為法における Privacy の保護

山田卓生

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：法学部

氏名：甲斐素直

研究の結果（つづき）

7 ドイツの民事訴訟における証拠禁止による人格権保護

ヘルムート・グローテ（Prof. Dr. Helmut Grothe）

8 証拠の獲得禁止及びその利用禁止による人格権の保護

小田司

第二導入報告： ルート・ヤナル（Dr. Ruth Janal）

共同研究会においては、共同研究に直接参加した双方のメンバーの他、ベルリン自由大学の教員や学生、同大学等で在外研究中の日本人研究者等多数が参加し、活発に討論が行われた。参加者一同に、大きな驚きを与えたのは、単に日独の同一法分野間での法律学的対話が行われただけでなく、このような各法分野を横断する形で討議を行った結果、それぞれの法分野での議論は、他の法分野にも少なからぬ関わりを持っていることが明らかになった点である。

四 共同研究会後の共同研究状況

共同研究会は、以上のように成功裏に終了したが、共同研究そのものは、その後も継続して行われた。すなわち、会場における討論の成果を、各自の論文に取り込み、より完成した論文とするための努力が各人のレベルにおいて行われたのである。それに当たっては、ドイツ側のカウンターパートナーとのインターネットを通じた積極的な意見交換が大きな役割を果たしたことはいうまでもない。

共同研究は、現時点においても継続的に実施されている。例えば、2009年4月4日にはクーニヒ教授が再び来日して、今後の協力関係についての協議を日本大学法学部長及び関係教員との間で行っている。

五 具体的例示

以上の通り、本件共同研究は共同研究会において研究成果の報告を行った者だけに限定しても日独併せて28名に達し、院生その他実質的に研究に参加した者を加えれば50名を超えるという大規模なものであったので、その具体的な研究成果を、本報告書において悉皆的に紹介することは紙幅的に不可能であり、それについては、将来に予定している研究成果物としての図書の刊行に待つ必要がある（目下、日独双方で計画されている。）。

ここでは、その成果を瞥見する手段として、日本側総括責任者であった甲斐素直と、ベルリン自由大学法学部長であったハインツェンとの間の共同研究の要旨を紹介する。

両者が問題にしたのは人権としての財産権である。

日本国憲法は次のように定める。

第29条 財産権は、これを侵してはならない。

2 財産権の内容は、公共の福祉に適合するやうに、法律でこれを定める。

3 私有財産は、正当な補償の下に、これを公共のために用ひることができる。

これに対し、ドイツ憲法(ボン基本法)は次のように定める。

第14条 所有権及び相続権は、これを保障する。その内容及び限界は、法律でこれを定める。

2 所有権には義務が伴う。その行使は、同時に公共の福祉に役立つものでなければならない。

3 公用収用は、公共の福祉のためにのみ許される。公用収用は、法律により、または、補償の方法及び程度を規律する法律の根拠に基づいてのみ、これを行うことが許される。その補償は、公共の利益及び関係者の利益を正当に衡量し手、これを定めるものとする。保障の額につき争いがある時は、通常裁判所で争う道が開かれている。

両者の文言は、日本国憲法が保障対象を「財産権」としているのに対し、ドイツ憲法は「所有権」としている点に顕著な違いを見せている。しかし、この点に関しては、ドイツ連邦憲法裁判所の判例により、ドイツ憲法にいう所有権とは、日本国憲法にいう財産権と同様の広義の概念と解することは確立し

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：法学部

氏名：甲斐素直

研究の結果（つづき）

ており、学説的にも異論はない。この点を除けば、日独二つの財産権保障規定は条文構成も含め、極めて類似している。この結果、従来、日独の憲法研究者はもちろん、民事法や刑事法の研究者の間でも、人権としての財産権概念は同一のものと考えてのが一般であった。

しかし、今回の共同研究で、その様な通念が誤りであったことが明らかになった。

すなわち、ハインツェンは、公法学部門の冒頭で行われた「財産権の保護と課税」と題する報告で、ドイツにおいては、財産権保障規定は、国家による課税権の限界をなすものとする理解が存在していること、しかしながらその具体的な限界がどこにあるのか、という点に関してはドイツ連邦憲法裁判所の判例も揺れ動いており、はっきりしていないということを明らかにした。

これに対し、日本においては、財産権保障規定が国家による課税立法の限界になるとは一般に認識されておらず、最高裁判所においてその点が争われたこともない、という顕著な対比が発生する。

その理由を明らかにしたのが、甲斐素直がハインツェン報告に対する形で行った「日本における財産権概念の特徴」という報告である。その中で甲斐素直は、日本では江戸時代には幕府の発した田畑永代売買禁止令等の法令により土地所有権は全面的に否定されており、土地売買が可能になったのは、明治政府が明治5年に発した太政官布告により地所の永代売買の禁を解いた以降であること、そして、土地所有権の具体的な内容は翌明治6年に開始された地租改正によってであることを明らかにした。

すなわち、文言的にはドイツ憲法における財産権保障規定とほとんど同一でありながら、日本におけるそれは、租税徴収の便宜を確保する手段として導入されたという歴史的背景から、課税権の限界となるという意識が生まれなかったのであり、それが今日における解釈までも規制しているのである。

報告及びそれに引き続いてなされた討論を通じて、研究参加者一同に明らかになったこの事実は、当然、民事法や刑事法の領域の解釈にも強い影響を与えるものであった。

こうした法的事実は、今回の共同研究のように、日独双方が同一テーマについて、密接に連絡をしながら法的対話を深めると言う手法を採用しない限り認識されることが困難であることは明らかであり、その点が明確になったという点に、今回の共同研究の最大の成果があると言える。

このように、日独の法律学的対話という手法を通じて行う共同研究には、顕著な成果があることが明らかになったことから、日本大学とベルリン自由大学法学部の間では、今後ともこの手法による共同研究を深めていく方針であり、先にも言及したとおり、クーンヒ教授の再来日等により、それは確実なものとして展開されつつある。

以上

| | |
|--------|----------------|
| * 課題番号 | 総 08-003 |
| | 継続 総 07-001 |

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年3月9日

日本大学 総長 殿

氏 名 飯田 隆



所属・資格 文理学部・教授

下記のとおり報告いたします。

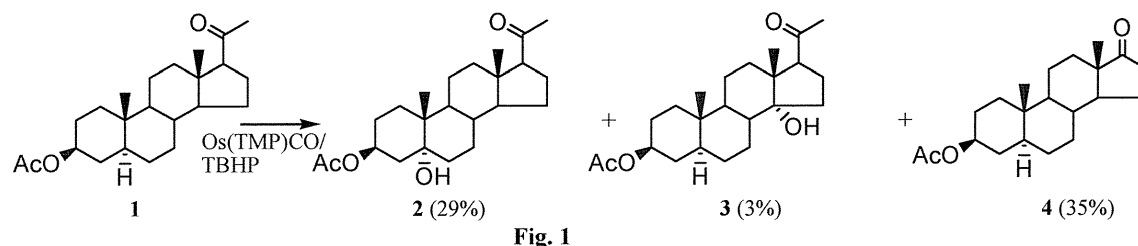
| | | |
|--------------------------|--|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 酵素機能をもつ新規金属ポルフィリン錯体触媒の創製と未利用有機天然資源への高度利用 | |
| 3 研究の目的 | <p>生体内における不活性基質の酸化還元反応系触媒としてその中心的役割を担っている酵素シトクロム P-450 の作用を化学的に発現することは、有機合成化学の見地から極めて重要な課題となっている。とりわけ、シトクロム P-450 のヘムと類似の作用機序を持つ金属ポルフィリン錯体触媒による酸化剤系は、不活性なメチレン、メチン炭素への“一段階遠隔含酸素官能基化”という特異的かつ強力なバイオミメティック（生体機能模倣）反応を引き起こすことが期待され、多くの研究者の注目を集めている。</p> <p>本研究では、ヘムが持つこの特異的酸化機能に着目し、その作用を化学的に発現させるバイオミメティックな金属ポルフィリン錯体触媒を分子設計・創製すると共に、それに至適な酸素ドナーを探索することにある。さらに、この金属ポルフィリン錯体触媒 / 酸素ドナー系が持つ高機能・高精密な酸化機能を巧みに利用し、従来型化学酸化剤では極めて化学合成が困難であった薬理・生物活性物質の短段階・高効率合成を企てる。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>生理活性物質の合成において、生体内で酵素の発現・制御する作用に類似した位置並びに立体選択的な官能基導入反応、つまりバイオミメティック反応は生理活性物質の高効率・短段階合成等に有効に利用されることが期待される。とりわけ、シトクロム P-450 類似の金属・ポルフィリン錯体触媒やジメチルジオキシラン等のジオキシラン誘導体を用いた酸化剤系は、不活性なメチレン、メチン炭素への一段階遠隔含酸素官能基化というきわめて特異的・選択的なバイオミメティックな化学反応を引き起こす。本研究は、1) これまでに開発されてきたバイオミメティックな試薬・触媒を基にして、更に反応の選択性を向上させた新規バイオミメティック酸化剤系の分子設計と創製を行ない、酸化剤系の違いが反応生成物に及ぼす影響についての検討、2) テルペノイドやステロイド等の未利用疎水性天然有機化合物を 1) で得たバイオミメティック酸化反応に付し、生物・薬理活性作用の増強、持続性を持たせたアナログや誘導体の短段階・高効率合成を企て新規医薬の創製に繋げる。</p> | |
| 5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します） | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 飯田 隆 ・研究分担者（役割分担） <ul style="list-style-type: none"> 若槻 康雄（新規金属ポルフィリン錯体触媒/酸素ドナー系酸化剤の分子設計と創製） 爲我井秀行（新規金属ポルフィリン錯体触媒/酸素ドナー系酸化剤の分子設計と創製） 柿山 玄太（新規金属ポルフィリン錯体触媒/酸素ドナー系酸化剤の分子設計と創製） 藤本 康雄（未利用有機天然資源の遠隔含酸素官能基化生成物の単離と構造決定） 秋久 俊博（未利用有機天然資源の遠隔含酸素官能基化生成物の単離と構造決定） 鈴鹿 敢（各種スペクトル法を用いる金属ポルフィリン触媒の微細構造と反応機構の解明） 齋藤 義雄（各種スペクトル法を用いる金属ポルフィリン触媒の微細構造と反応機構の解明） 安川 憲（酸化生成物のバイオアッセイと医薬品評価） 眞野 成康（酸化生成物のバイオアッセイと医薬品評価） | |

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

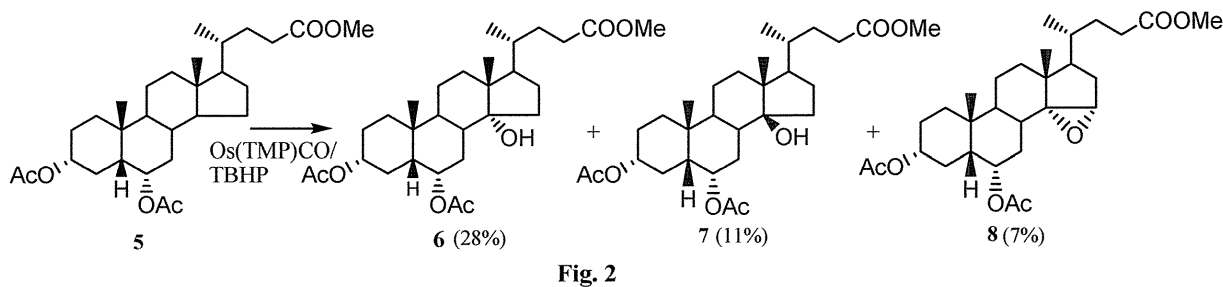
6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

今回、先ず始めに優れた酵素機能を有する新規酸化剤系の開発を目的として、金属ポルフィリン錯体触媒 / 酸素ドナー系の開発及び、ジオキシラン系酸化剤の *in situ* 発生を検討した。先ず金属ポルフィリン錯体触媒の開発では、触媒の分子設計・創製に当たり、ポルフィリン骨格における中心金属とメソ位置換基の違いが酸化反応特性に及ぼす影響を検討した。その結果、電子吸引性と電子供与性のメソ位置換基を比べた場合、その反応特性に殆ど差異が認められなかった。しかし、中心金属配位子の違いは、反応特性に顕著な影響を及ぼすことが判明した。さらに、酸素ドナーとして、ヨードソベンゼン (PhIO)、DCP *N*-oxide、TBHP の 3 種について検討した。それらの結果、Os(TMP)CO/TBHP 系が反応特異性、触媒回転数から最も至適であることを明らかにした。

さらに、化学・立体構造の異なる 5 種のステロイドを基質として Os(TMP)CO/TBHP 系による酸化反応に付した結果、本酸化剤系は従来の金属ポルフィリン錯体触媒 / 酸素ドナー系とは全く異なる反応特性をもつことが判明した。とりわけ、本酸化剤系は不活性メチン炭素やベンジル位の酸化だけでなく、5 α -及び 5 β -ステロイドの直接 5-ヒドロキシ化、3-及び 20-ケトステロイドの Baeyer-Villiger 反応をそれぞれ引き起こすという、きわめて興味ある結果が得られた (Fig. 1)。



引き続き、バイオミメティック酸化剤の未利用天然資源への高度利用を目的として、天然から豊富に得られる 5 種の 5 β -胆汁酸のメチルエステル-パーアセート誘導体を基質に用い、本触媒/酸素ドナー系による酸化反応を詳細かつ系統的に精査した。その結果、疎水性 5 β -胆汁酸は、位置選択的に C-5 及び C-14 位、あるいは C-15 及び C-16 位がきわめて効率よく含酸素官能基化され、親水性酸化物に変換されることを見出した。さらに、A/B 環あるいは C/D 環が反転した 5 α -あるいは 14 β -ヒドロキシ体が一段階で生成する、というきわめて興味ある結果が得られた (Fig. 2)。また、本触媒/酸素ドナー系の反応機構についても明らかにした。



次いで、ジオキシラン系 OXONE[®]と対応ケトンから各種ジオキシラン (DMDO, MTDO, ETDO, HDDO)を反応容器内で *in situ* 発生させ、コレステロールの含酸素官能基化の検討を行った。結果、ETDO が効率よくコレステロール側鎖 C-25 位を酸化することが明らかとなった。

上記 Os(TMP)CO / TBHP 系及び ETDO によるコレステロールの酸化生成物は共にコレステロール側鎖の C-25 位ヒドロキシ体を主生成物として与えた。特に、ジオキシラン系酸化剤である ETDO の *in situ* 発生法は操作が簡便でコスト的にも有利であった上に、コレステロール側鎖の C-25 位を位置選択的に高効率で酸化できることが判明した。この知見を利用して、ETDO の *in situ* 発生法を利用し、従来高価なステロイド原料から合成されていた、3 種の生体内オキシステロール (12-14)を安価なコレステロールを用いて短段階・好収率で導くことに成功した。オキシステロールは Liver X receptor (LXR)のリガンドとして、生体内でコレステロール代謝系において重要な働きをしていることが初めて明らかになり、LXR を介する各種疾患の病態解析や病態診断、さらにはこれら疾病の予防・治療法の開発を目的として、種々のオキシステロール標品の需要が著増している。このことを背景にこれまでにもオキシステロールの合成はいくつかのグループによって行われてきたものの、高価なステロイド原料を必要とする、複雑で多段階な合成経路を経るなど、非効率なものがほとんどであった。本研究により安価なコレステロールを用いた有用なオキシステロールの標品合成法を提示する事が可能となり、今後、当該分野の研究に有効に利用されることが大いに期待される。本成果は当初掲げたコレステロールからスクアラミンの全合成までには至らなかったものの、得られた 24-epoxycholesterol

研究の結果 (つづき)

(14) は短段階でスクアラミンへと導くことが出来るものと考えられる。従って、今後、この先のルートが達成されれば、充分計画が達成される見込みがあり、継続して検討していく予定である。

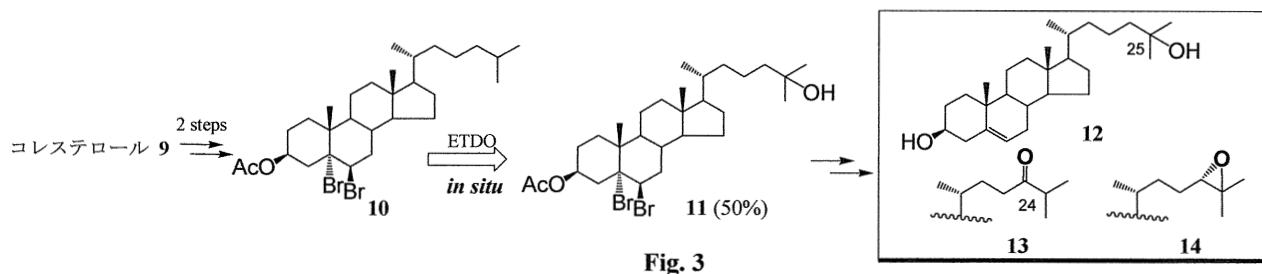


Fig. 3

最後に、未利用の植物資源をバイオメティック含酸素官能基化反応にて化学修飾することにより新規生物活性の付与または活性の増強をはかり、有効利用することを計画した。化学修飾の一つの方法として、今回はジメチルジオキシラン(DMDO)によるテルペン類の酸化反応について検討した。植物から比較的多量に得られるテルペノイドの中には、腫瘍細胞に対する細胞傷害性、一酸化窒素産生抑制、 α -グルコシダーゼ阻害作用などさまざま優れた生理活性を有する物質が存在する。しかしながら、生理活性が弱い等の理由で利用されていないものも多く存在するのが現状である。そこで、疎水性の未利用テルペノイド(ウルソール酸、オレアノール酸等)から新しい活性の発現を期待して、新規な酸化誘導体を合成し、酸化生成物をバイオアッセイし、医薬品としての評価を行うことを目的とした。ウルソール酸、オレアノール酸、カウレン酸、ルペオールの4種のテルペノイドを対象として、それぞれをDMDO反応に付し、酸化生成物の化学構造を明らかにすると共に、いくつかの生物活性試験を行った (Fig. 4)。

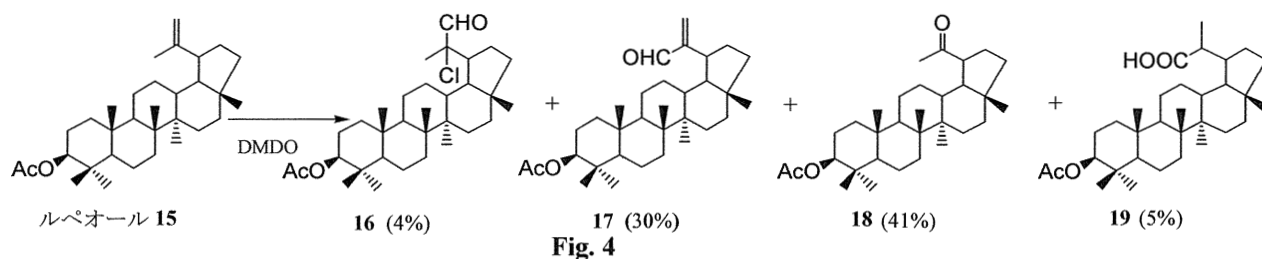


Fig. 4

ルペオール、オレアノール酸の酸化生成物は原料テルペノイドよりも α -グルコシダーゼ阻害活性の上昇が認められた。さらにルペオール酸化生成物 17、19 は数種の腫瘍細胞に対する細胞傷害性が認められた。

上記研究成果は以下の学術雑誌に報告した。

- 1) S. Ogawa, **G. Kakiyama**, A. Muto, A. Hosoda, K. Mitamura, S. Ikegawa, A. F. Hofmann, and **T. Iida** "A Facile Synthesis of C-24 and C-25 Oxysterols by *in situ* Generated Ethyl(trifluoromethyl)dioxirane", *Steroids*, **74** (1), 81-87 (2009). [Elsevier 社発行]
- 2) K. Hata, S. Ogawa, M. Makino, T. Mukaiyama, K. Hori, **T. Iida**, and **Y. Fujimoto**, "Lupane Triterpenes with a Carbonyl Group at C-20 Induce Cancer Cell Apoptosis", *J. Nat. Med.*, **62**, 332-335 (2008). [日本生薬学会発行]
- 3) S. Ogawa, K. Hosoi, **T. Iida**, **Y. Wakatsuki**, M. Makino, **Y. Fujimoto**, and A. F. Hofmann, "Osmiumporphyrin Catalysed Oxyfunctionalization and Isomerization of Natural (5 β)-Bile Acids with *tert*-Butyl Hydroperoxide", *Eur. J. Org. Chem.*, **2007** (21), 3555-3563. [欧州化学連合発行]
- 4) **T. Iida**, S. Ogawa, K. Hosoi, M. Makino, **Y. Fujimoto**, T. Goto, **N. Mano**, J. Goto, and A. F. Hofmann, "Regioselective Oxyfunctionalization of Unactivated Carbons in Steroids by a Model of Cytochrome P-450: Osmiumporphyrin Complex /*tert*-Butyl Hydroperoxide System", *J. Org. Chem.*, **72** (3), 823-830 (2007). [米国化学学会発行]
- 5) S. Ogawa, K. Hosoi, N. Ikeda, M. Makino, **Y. Fujimoto**, and **T. Iida**, "Oxyfunctionalization Products of Some Terpenoids with Dimethyldioxirane and Their Biological Activity", *Chem. Pharm. Bull.*, **55** (2), 247-250 (2007). [日本薬学会発行]
- 6) S. Ogawa, M. Makino, **Y. Fujimoto**, **T. Akihisa**, **K. Yasukawa**, and **T. Iida** "Oxyfunctionalization Products of Triterpenoids by *meso*-5,10,15,20-Tetramesitylporphyrinate Osmium(II) Carbonyl and *tert*-Butylhydroperoxide System and Their Biological Activity" (投稿中)

注：必要に応じて、このページをご使用ください

| | |
|--------|----------------------------|
| * 課題番号 | 総 08-004 継続 総 07-002 |
|--------|----------------------------|

平成 20 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 31 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 大塚 友美



所属・資格 文理学部・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|--------------------------|--|----------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <u>総合研究</u> | 注: 該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 多民族地域における社会経済開発と民族共生に関する研究 | |
| 3 研究の目的 | <p>1980 年代以降、急速な経済発展を遂げた中国では、その発展の急激さゆえに、発展の恩恵に浴した沿岸部と、発展から取り残された内陸部との社会経済的格差が拡大している。その結果、多くの少数民族を抱える内陸部は、新疆ウイグル自治区等に見られるように中央政府への反発、ひいては分離運動をも誘発しかねない要因を有している。他方、中央アジア地域に位置する国々も市場経済化やグローバル化などの情勢変化によって、中国と同じような問題に直面するようになってきた。</p> <p>本研究の目的は、①沿海部と内陸部の格差が拡大している中国、特に少数民族と漢民族との間の格差の拡大が懸念される新疆ウイグル自治区等を主たる研究対象として、②多民族地域における社会経済開発と民族共生の政治経済的メカニズムに関する学際的な比較分析を行い、③同地域の安定に寄与するとともに、我が国の同地域への国際貢献に資することにある。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>既述のように、急速な経済発展を遂げている中国は、国際社会に大きな影響力を及ぼす一方、その発展の急激さゆえに、その歪ともいえる地域間格差・民族間格差の拡大などの深刻な問題に直面している。その結果、多くの少数民族を抱える内陸部（例えば新疆ウイグル自治区等）の諸地域は、分離独立をも引き起こしかねない分裂要因を有しており、難しい対応を迫られている。</p> <p>本研究においては、中国の研究機関との共同研究を通して現地調査などを行い、多民族地域における社会経済開発と民族共生の政治経済的メカニズムに関する学際的な比較分析を行った。</p> | |
| 5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します） | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 大塚友美（研究の総括、多民族地域の経済発展と人口変動） ・研究分担者（役割分担） <ul style="list-style-type: none"> 青木一能（国際関係における少数民族問題） 水嶋一雄（地理環境の分析と農業） 葭田光三（少数民族の生態と文化） 守屋政平（情報化の進展の社会的影響） 信夫隆司（多民族地域と環境問題） 林 幸博（乾燥地帯農業の生産方式） 辻 忠弘（多民族地区の経済開発） 段 瑞聡（社会体制と民族自治政策） 日吉秀松（多民族宥和政策の分析） （旧氏名；劉松） 六辻彰二（少数民族問題の比較研究） | |

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

部科校名：文理学部

氏名：大塚 友美

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

1. 問題意識

本研究の目的は、中国新疆ウイグル自治区を中心とする地域を研究対象として、多民族地域における社会経済開発と民族共生の政治メカニズムに関して学際的な比較分析を行い、同地域の安定に寄与するとともにわが国の同地域への国際貢献に資することにある。

1980年代以降、急速な経済発展を遂げた中国は、今日では、国際社会に大きな影響力を及ぼすにいたっている。しかしながら、その発展は急激であったために、発展の恩恵に浴した沿岸部と、発展から取残された内陸部との社会経済的格差は拡大している。その結果、多くの少数民族を抱える内陸部は、新疆ウイグル自治区等に代表されるように、中央政府への反発、ひいては分離運動をも誘発しかねない亀裂要因を有している。他方、中央アジア地域に位置する国々も市場経済化やグローバル化といった諸情勢の変化にともなって、中国と同じような様々な問題に直面するようになってきた。

また、これらの地域は地政学的に重要であるだけでなく、天然資源が豊富にあることから、同地域の政情の不安定化は我が国を含むアジア諸国等に深刻な影響を与えかねない。同地域における多民族の融和と共生の社会・経済・政治的メカニズムの在り方の探索は、重要な意義を有している。

他方、学問的な観点からすると、こうした社会経済的格差の拡大は、中国や中央アジア諸国のみならず、国際社会においても共通して見られる21世紀世界の重要な研究対象であり、実践的に取り組むべき課題である。とくに、こうした格差問題は、少数民族問題を抱えている地域では複雑な様相を呈していることから重要な研究課題となる。それゆえ、社会経済開発と少数民族問題とを交錯させて検討し、国内・国際の両面での影響を考察し、その処方箋を作成することは重要である、といえる。一般的に、我が国では、研究が立ち後れてきたこの地域を対象とする研究は、重要な意義を有している。

さらに付言するなら、新疆ウイグル自治区のような旧社会主義国・地域では、少数民族問題の研究は政治的にも微妙であり、様々な制約があったため、外国人研究者が接近するのは困難であった。しかし、日本大学文理学部と石河子大学(新疆ウイグル自治区)との学术交流協定が2002年に締結されて以降、両大学間で共同研究プロジェクトが実施されており、人的交流や情報交換などの実績も十分に蓄積されているのみならず、2007年には文理学部の協力のもとに「中央アジア研究センター」が石河子大学内に開設されている。本研究はこうした実績の上に実施されるものであり、中央アジア地域のさらなる推進がここを拠点として具体化しつつある。こうした実績の蓄積により、一般的には、接近の難しかった同地域の深層部に関する、より詳細な研究成果が期待できる、といえる。

2. 研究経過

以上の問題式の下に、本研究（平成20年度）では、政治学・開発経済学・人口経済学・民族学・農学などの多角的な観点から、④社会経済開発と民族共生に関する調査研究を行うために、また⑤中国の研究機関や研究者と情報や研究の成果を交換するために、(1) 国際シンポジウム・ワークショップの開催、(2) 調査団の派遣、そして(3) 研究成果の発表を行った。

(1) 国際シンポジウム

平成20年度（2008年度）に開催した国際シンポジウムは、下に示した要領で日本大学において実施した。

【平成20年度国際シンポジウム】

参加大学：日本大学、北京大学、石河子大学

テーマ：中央アジアの多角的アプローチ

開催地：日本大学（文理学部）山中湖セミナーハウス

開催期間：平成20年9月6日～平成20年9月7日

参加者：日本側・中国側合計（35名）

部科校名：文理学部

氏名：大塚 友美

研究の結果（つづき）

なお、これ以前に開催した国際シンポジウムとワークショップには、下記のものがある。

- ① 「シルクロードと中央アジア文明」平成 19 年 9 月、石河子大学

(2) 調査団等の派遣

平成 20 年度（2008 年度）における調査団等は、下記の要領にて派遣した。

【平成 20 年度派遣調査団】

目的：少数民族の社会経済状況等の調査

派遣先：中国、広西チワン族自治区

派遣期間：平成 20 年 12 月 26 日～平成 20 年 12 月 30 日

調査団員：2 名（辻 忠博、日吉秀松(劉松)）

なお、これ以前に派遣した調査団等は、下記の通りである。

- ① 日中国際シンポジウム石河子派遣団、平成 19 年 9 月

(3) 研究発表

以上の研究課程において得られた研究成果や知見は、国際シンポジウムやワークショップなどの場で発表すると同時に、下記の刊行物として発表した。

- ① 『中央アジアの多角的アプローチ（日本大学・石河子大学・北京大学国際シンポジウム報告書）』日本大学文理学部国際研究戦略センター、平成 20 年 9 月。

ちなみに、本研究の分担者らが発表した、本研究の刊行物および本研究に関連する先行の刊行物には下記のものがある。

- ① 『日本大学・石河子大学共同研究 研究成果報告書』日本大学文理学部地域研究戦略センター編、平成 18 年 4 月。
- ② 『「内陸アジアの歴史と社会（内陸亜州的歴史と社会）」に関するプロシーディングス』北京大学、平成 18 年 8 月。
- ③ 『「多民族地域における社会文化変容の分析（中国・新疆ウイグル自治区の事例分析）」に関するプロシーディングス』日本大学文理学部、平成 19 年 3 月。
- ④ 『絲綢之路与亜州文明』石河子大学、平成 19 年 9 月。
- ⑤ 『シルクロードと中央アジア文明（日本大学・石河子大学・北京大学国際シンポジウム報告書）』日本大学文理学部地域研究戦略センター、平成 20 年 3 月。

3. 本研究からの知見

上記の記述から分かるように、本研究では、分析を進める過程において、報告書の刊行や国際シンポジウムの開催等の形をとって研究成果を随時発表してきた。そうした研究成果のいずれから、「多民族地域において社会経済開発を行なう際には、それが想定外の複雑多岐にわたる微妙な影響を及ぼす恐れがあることから、特に少数民族に対しては慎重な配慮が必要である」、という知見を読み取ることができる。このような状況が生ずるのは、中央政府の社会経済開発政策がたとえ良い結果を期待して策定されたものでも、現地に居住する少数民族にはそうは映らない公算が大きいからである。

部科校名：文理学部

氏名：大塚 友美

研究の結果（つづき）

ここでは、そうした知見のうち特徴的であると思われるものを若干を若干選び出して、概説する。

既述のように、急激な経済発展をもたらした歪み（地域間格差や民族間格差）を解消するためには、発展の波から取り残された地域の社会経済開発を推し進める必要がある。しかし、この政策がもたらす影響やそれに対する少数民族の対応には、政策立案者の想定を超えることが少なくない。

例えば、計量経済モデル（ハロッド=ドーマー生産関数 $\langle Y_t = Y_{t-1} + \frac{I_{t-1}}{v} \rangle$ ）を用いた成長モデル、ただし、 Y は域内生産額、 I は投資額、 v は資本係数、 t は年を示す）によって新疆ウイグル自治区の経済をコンピュータ内に再現すると、次のような事項を計量的に確かめることができる。

- ①同自治区の経済成長は、域外からの資本流入に支えられている。
- ②資本の流入に伴って、漢民族の同自治区への流入も増えている。
- ③域外からの資本の流入が減少すれば、同自治区の経済成長は低迷する。

上記の点（①～③）をより具体的に述べるのなら、

- ①域外資本への依存が同地域経済の域外経済への依存を高め、これが少数民族の反感を招く。
- ②社会経済開発計画の急速な推進は、それを担う人材の域外からの調達（漢民族の移住）という現象を引き起こすために、漢民族のプレゼンス（存在感）とそれへの反感が高まる。
- ③少数民族からの反感への配慮から、社会経済開発政策に遅れが生ずると格差はますます拡大し、その結果として生ずる少数民族の不満は反政府運動や独立運動を醸成しかねない。

ということである。このように選択の余地が極めて少なく、また、いずれの道を選択したとしても、選択をしたことの結果として「大きな苦痛を被る」のは明らかである状況を「悪魔の選択」という。今日における中国は、まさにそうした困難な事態に直面している、といえる。

上記のような問題は、情報化の推進においても見られる（この点は、既に報告書にて発表）。今日の高度情報化社会においては、インターネットは不可欠である。それゆえ、世界各国は高度情報通信ネットワークを整備している。中国もその例外ではない。しかし、ここに留意すべき点がある。コンピュータへの情報の入力、西欧では「ローマ字入力」、日本では「仮名漢字入力」で行なわれるが、中国では「ピンイン方式」（中国語のローマ字表記）によって行なわれる。この中国語情報処理が普及することによって、少数民族のなかには漢語化現象が生じている。これに対して、少数民族の“民族としてのアイデンティティー”を維持する上で、少数民族の言語は重要な役割を果たしてきた。すなわち、漢語化現象は少数民族独自の言語を消失させかねず、このことが微妙な影を投げかけている。

これまで述べてきた複雑な状況に、政治的要因が拍車をかける。少数民族の居住する内陸部は、反政府勢力の根強い政情が複雑かつ微妙な地域であると同時に、石油をはじめとする地下資源の豊富な地域でもある。その結果、少数民族の“資源ナショナリズム”なども、当然強まることになる。こうした要因とイスラム原理主義など結びつけば、政情はさらに不安定化することになる。

本研究においては、社会経済開発と民族共生との関係を理論と実証的の両面から分析することによって、一見すると好ましい社会経済開発が、かえって民族共生の障害ともなり得る、といった逆説を浮き彫りにした。こうした問題からの脱却を図るには、民主化をより一層推進すると同時に、少数民族との地道な対話を粘り強く継続し、少数民族側の理解を得ることが肝要である、といえよう。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 24 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 乾 友彦



所属・資格 経済学部・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|--------------------------|---|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <u>総合研究</u> | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | アジアにおける経済のグローバル化と経済成長 | |
| 3 研究の目的 | 日中韓の文化交流や観光による人の移動は経済の相互依存性を高めることだけではなく、先進国から開発途上国への技術移転を促進できるような制度や環境整備において大きな役割を果たしている。但し、文化のグローバル化の効果全体を経済的に分析することは難しい。そこで本研究では、アニメーションやゲームなどを含むソフトウェア産業を中心にアウトソーシングなどの国際分業体制と共通文化コード形成過程を分析する。 | |
| 4 研究の概要 | 文化や制度が経済成長に与える効果に関しては、経済学による定量的な分析が難しい研究分野であることはいうまでもない。アジア文化や制度と経済成長間の全体像を分析することは不可能である。従って、ソフトウェア産業を中心に、人的交流、アウトソーシングおよび模倣などがソフトウェア産業発展に及ぼした効果をなるべく定量的な分析を実施する。 | |
| 5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します） | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 乾 友彦 ・研究分担者（役割分担） 井尻直彦（波及効果分析）、権 赫旭（日本経済分析）、宮里尚三（日本経済分析） 村上直樹（ソフトウェア産業分析）、瀧田治雄（ソフトウェア産業分析）、木村政司（ソフトウェア産業分析） 深尾京司（日本経済分析）、戸堂康之（波及効果分析）、松浦寿幸（波及効果分析） David Greenaway（波及効果分析）、Richard Kneller（波及効果分析）、Jungsoo Park（波及効果分析） Alexander Hijzen（波及効果分析） | |

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

部科校名：経済学部

氏名：乾 友彦

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

20年度は、19年度に引き続いて技術移転を検討する際の前提となる日本・中国・韓国企業の生産性の比較研究を行った。経済学においては、技術水準、生産性の水準を比較する際に、全要素生産性（Total Factor Productivity, TFP）を代理指標として使用することが一般的であることは昨年度に記述したとおりである。なお、当年度の研究に関しても、乾が研究代表を務めている日本大学経済学部中国・アジア研究センターにおける研究プロジェクトや日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究（A）；課題「「グローバル・アウトソーシング」と経済システムのダイナミクス」）による研究プロジェクト等との有機的な関連を持たせた上で当該研究プロジェクトを遂行した。

昨年度同様、EU委員会による産業レベルでの経済成長、生産性等を計測するためのデータベースを構築するEUKLEMSによるICOP（International Comparison of Outputs and Productivity）プロジェクトと共同した経済産研究所における環太平洋諸国の生産性比較（ICPA）プロジェクトの推計した購買力平価（PPP）を使用することにより、日本、韓国、中国の企業に加えて、さらに台湾企業の実態の比較が可能となった。

また19年度末に続いて20年度においても、このデータに関する下記の3つの点に関する問題点について改善を加えた。データに関する修正点の第1点は、推計年を2004年までであったものを2005年までに延長したことである。これによる各国のより最近の状況が把握することができるようとなった。第2点に関しては昨年度に引き続き、中間投入価格に関して、国産品と輸入品の価格を明示的に区別したことである。第3点は韓国企業の資本ストックの推計は、19年度においては他国とは異なり、簿価ベースによって推計されていたが、これを他国同様、時価ベースの資本ストックを恒久棚卸法によって推計した。この結果、日本企業のTFPは中国、韓国の企業の実態を上回るが、機械系の産業を中心に台湾、韓国の企業の実態は急上昇しており、特に台湾企業の実態の平均的なTFPのレベルは、一般機械産業においては日本企業の平均を大きく上回っていることが判明した。20年度は当該データを使用して各企業の実態がどのように収束してきているのかおよび、後発企業が先進企業に追いつくキャッチアップの状況が、どのような要因に依存しているのかを実証的に検討した。その際、同一国内で相対的に生産性の高い「国内フロンティア企業群」、4カ国全体の中で先行組と位置付けられる「アジアフロンティア企業群」という2つを、個別企業の実態と位置付け分析を行った。その結果、韓国企業の場合、国内のフロンティアに追いつくスピードが他国の企業より速い。各企業はさらに、アジアのフロンティアを目標に生産性を高めている。海外のフロンティア企業に追いつこうという動きは、他国では観察できなかった。中国企業も国内のフロンティアにキャッチアップしつつあるが、企業が沿海地域に立地しているか否かで状況は大きく異なる。また、すべての国で、生産性がフロンティアを大きく下回っているほど、キャッチアップのスピードが速いという事実が確認できた。

ただし、依然TFPを決定する重要な要因となる産業別のデフレーターには依然推計上の問題があることから、この問題を解決して、データベースの今年度中の完成を図りたい。

乾・村上・井尻が中心となって、統計が未整備であるグローバル・アウトソーシングの実態を把握するために、中国の山東大学、東北財経大学との共同研究プロジェクトを企画し、山東省済南市および遼寧省大連市に位置するソフトウェア開発およびビジネス・プロセス・アウトソーシング先企業に対して訪問形式によるインタビュー調査の設計、実施計画を作成し、現在インタビュー調査を実施中である。現在も中国企業へのインタビュー調査の作業中であり、5月以降データを使用した本格的な研究を実施する予定である。

乾は、上記に加えて他の様々な関連プロジェクトを通じて、広い意味でのアウトソーシングであるグローバル化の実態に関する統計的な把握の状況（乾（2008）、「グローバル化の進展とデータ整備の問題点」『統計改革への提言—「専門知と経験知の共有化」を目指して—』（総合研究開発機構研究報告書））、サービス産業のグローバル化の状況（乾・横井（2008）、「サービス産業の国際化にむけて」『生産性白書（2008年版）（財）社会経済生産性本部』））についてサーベイ論文を執筆した。これらの研究を通じて、以下のような理由で企業間取引に関するデータの重要性について指摘した。

すなわち、現在、日本の親企業と海外子会社の取引を把握することができない。そのため、近年の部品貿易・サービス貿易の拡大の要因が、親企業とその現地法人の取引に基づくのか、海外の現地企業との取引であるのかを把握することが難しい。企業内取引によるアウトソーシングと、企業間取引によるアウトソーシングのどちらが生産性の向上に寄与するかを把握することができず、また、アウトソーシングの方法の選択に関して、その原因や帰結に関する分析を実施することができないのである。すなわち、アウトソーシングの貿易パターンで重要なのが、その貿易が企業内（つまり、親と子会社内）で行われているか、企業間で行われているかであり、それぞれのパターンによって、政策的なインプリケーションは全く異なる。

部科校名：経済学部

氏名：乾 友彦

研究の結果（つづき）

たとえば、日本では、技術集約的な部品などは、企業内の取引が主で、海外の企業間との取引は少ないとされている（技術が漏洩を避けるため）。

加えて、企業における製品とサービス部門のアウトソーシングの形態に関する情報も重要であり、例えば Amiti and Wei (2005)は、アメリカにおける全製造業のデータを用いて中間製品とサービス部門の海外アウトソースによる TFP と労働生産性に与える影響を実証的に研究し、いずれのアウトソースにおいても効果があるが、その効果はサービス部門のアウトソーシングの方が高いことを示している。今後、サービス部門のアウトソーシングの拡大が予想させるなかで、日本企業の国際競争力を分析する上でサービス部門のアウトソースのデータを整備していくことが望まれる（最近、このような観点からデータを収集し、分析した論文として Ito, Wakasugi and Tomiura(2008)および Tomiura, Ito and Wakasugi(2008)がある）。以上のようなデータの整備は、国際化の進展が製造業に比して遅れている日本の小売業、情報通信業等のサービス業の問題を考察する際にも有益な情報を提供するものと考えられる。

企業間の貿易の増加から、Transfer Pricing（トランスファー・プライシング）による利益の移転の重要性が高まってきている。トランスファー・プライシングにより、多国籍企業の為替レートへの対応は多様化しており、これは今後の金融政策を考えていく上で重要なファクターとなっている。また、企業がどの時点でどのように国際的に利益を配分していくかという行動を把握することは、税制政策とも密接に関連している。トランスファー・プライシングの状況を捉えることは、財政金融政策の効果を再考していく上で、重要な課題となっはいるが、国際企業間取引が把握できない以上その影響を推し測るのには限界がある。

また、乾は経済産業省による企業活動基本調査、工業調査等のマイクロデータを使用した一連の研究を通じて、日本経済のグローバル化が日本企業の生産性、雇用、退出行動にどのような影響を与えたかを明らかにした（乾・川上、宮川（2008）“Do Competitive Markets Stimulate Innovation? :An Empirical Analysis Based on Japanese Manufacturing” (RIETI Discussion Paper, 08-E-012), Inui, Matsuura and Edamura (2008, “Import Competition from Low-wage Country, Manufacturing Plant, Economic Geography,” 学会発表), Inui, Matsuura, Urata and Edamura (2009), “The Impacts of Import Expansion on Productivity in Japanese Manufacturing Industry” 学会発表)。また、Inui, Matsuura and Poncet (2008, “The Location of Japanese MNC Affiliates: Agglomeration, Spillovers and Firm Heterogeneity,” CEPII Working Paper 2008-24)では、日本企業のアウトソーシング先の決定要因を分析した。

上記に加え、日本企業のグローバル化における立地決定という視点から以下のような研究を行っている。東アジア地域に活発に直接投資を実施してきた日本企業は、現在では東アジアに広範な垂直的生産ネットワークを形成している。このとき企業は各生産段階の最適な立地先を選択し、各地で連携して生産している。企業は現地の低廉な労働力を活用する事によって総費用を削減しているが、地理的に離れた生産活動の連携には部品等の輸送コストがかかる。たとえば、東南アジアで日本の自動車産業はタイに集中的に直接投資により進出している。つまり、自動車メーカーだけではなく自動車部品メーカーも進出している。そして、タイ国内における垂直的生産関係（前方連関・後方連関）にある企業は、タイ国内においても輸送コスト（輸送費用・輸送時間）を支払っており、国内における立地選択はコスト削減に繋がるので重要である。これは同時に、投資誘致のために投資受入国にとって国内輸送インフラの整備が大切である事を意味する。また、必要な部品をすべて現地生産しているわけではなく、日本や他のアジア各国で生産された部品を輸入している。これは企業にとって、国内だけではなく国際的な垂直的生産関係を考慮して立地選択することの重要性を意味する。それゆえ、投資受入国は自国の国際貿易インフラを整備するだけでなく、近隣諸国の輸送インフラ整備にも影響をうける。たとえば、タイでヒアリングをした自動車メーカーによれば、東南アジア域内の部品調達率は約90%である。タイにとっては、タイ国内の輸送インフラと近隣諸国の輸送インフラを整備する意義がある。たとえば、インドシナ半島の陸上輸送網が整備されれば、時間の掛かる海路ではなく、陸路でラオスやカンボジアを経由してベトナムの港を国際貿易の窓口とし、輸送コストを削減することも可能となり、タイの立地の優位性も高まる。このためには自国内だけではなくインドシナ半島広域の輸送インフラの整備が必要である。事実、タイ政府機関のヒアリングによれば、タイはラオス、カンボジアに交通インフラ整備のために資金援助をしている。このように立地選択は国レベルを超えて東アジア地域の視野から分析することが重要である。そこで、Amiti(2003)を参考にし、東アジア域内における日本企業の立地決定要因を都市レベルで分析した。残念ながらアジアの各都市の経済データは完全に整備されておらず、ここでの分析では中国、タイ、ベトナムを分析対象としている。この分析結果を2009年5月の日本貿易学会全国大会で報告する予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年4月27日

日本大学 総長 殿

氏 名 高橋 淑郎

所属・資格 商学部・教授



下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------------------------|---|---------------------|
| 1 種 目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / ○総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 医療バランスト・スコアカード (Balanced Scorecard) の導入意図と利用方法と成果評価に関する国際比較 | |
| 3 研究の目的 | 医療領域でのバランスト・スコアカードの利用方法や導入意図を洗い出し、その背景を探り、利用方法ごとにその意図を踏まえて、その成果を測定し、評価する研究を行う。それによって、日本、カナダ、アメリカを中心に、医療での BSC の浸透の早いイタリア、非常に浸透が遅いフランスなどを比較検討することで、医療での BSC の戦略的経営実践の枠組みとしての機能を多角的に明確にすることを目的とする。さらに、研究者の国際的視点と病院の実務家で BSC に造詣の深い人材とがコラボレーションすることで、医療経営の現場の実務に役立つ研究を行うことであり、同時にわが国の厚生行政および地方自治体の医療政策にとって有益な報告となるとい点である。この研究によって、BSC の医療での利用の広がりが、専門職教育、病院経営、医療制度、医療政策にまで及ぶことまた、その成果を導入意図に鑑みて評価する仕組みを見出したい。 | |
| 4 研究の概要 | 本年度は、初年度の研究として、1. 北米の医療 BSC の文献とインターネットでの検索によって、どのような研究が行われ、また、何が問題となっているのかを整理・分析し、2003年の同種の研究と比較して行う。2. 国際比較のためのアンケート調査の日本版および世界共通版を作成する。3. 日本で、本研究の発展のための国際共同研究会の開催により研究水準を高め、社会へ情報を発信する。4. BSC に関する文献や資料で日本でまだ詳細な検討をされていないものを社会に公表しながら研究に取り込む。5. アメリカ、カナダ、イギリス、イタリアでのインタビューとアンケート調査の可能性の探求をおこなう。 | |
| 5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 高橋淑郎 (商学部教授) 研究総括、BSC理論 ・研究分担者 (役割分担) 大道 久 (医学部教授) 医療・医学的アプローチ 白神 誠 (薬学部教授) 薬学経済的、臨床薬学的、行政的アプローチ 青木武典 (商学部准教授) 統計解析と評価 劉 慕和 (商学部准教授) 管理会計的アプローチ 渡辺明良 (聖路加国際病院 経理財務課マネージャー) 病院経営の現場からのアプローチ 正木義博 (済生会熊本病院・事務長) 病院経営的アプローチ Adalsteinn D. Brown Assistant Deputy Minister Ontario Ministry of Health カナダおよびヨーロッパでの BSC の利用と成果分析および行政的アプローチによる分析 George H. Pink Assistant Professor University of North Carolina-Chapel hill・Associate Professor 日本、アメリカおよびヨーロッパの BSC の利用と成果の分析 | |

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

部科校名： 商学部

氏名：高橋淑郎

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

文献および実地調査により北米と日本でのBSCの利用範囲や利用方法あるいは導入意図を洗い出すことを、高橋淑郎、青木武典、劉慕和、George Pink、Adalsteinn Brown、大道 久らによって行った。ヨーロッパに関しては、Adalsteinn D. Brownがこれまでの国際共同研究の実績のもとに情報を収集した。特に、イタリア、フランスに強力なネットワークがあり、そこからの調査・情報収集をおこなった。高橋淑郎、George H. Pinkも世界での医療BSC調査（参加国から各1名という）共同研究に参加しているので、その共同研究と連携しながら、その成果を共有した。また、George Pinkによって、北米での論文ベースのサーベイは終了した。

特に、George Pinkのサーベイによれば、北米での医療BSCの傾向は次のように変化があった。2003年の調査のときには、医療施設による分類、医療分野でのBSCの適用の種類による分類、臨床医学の領域での分類、医療組織の部分的な利用での分類、政策的利用での分類という5領域での仕分けでの研究で可能であったが、2008年の同様な調査では、それぞれをより具体的に絞り込んで分類で比較することが必要になった。たとえば、医療施設による分類ではMayo Clinic, Franciscan Health System, Bridgete Hospital Brigham and Women's hospital, US Coast Guard Office of Health Servicesなどに見られる戦略的利用での議論に特化してきた。医療分野でのBSCの適用の種類による分類では、Public Information, Clinical, Pathway, quality of Care and Outcome Measurement, Hospital Department Performanceなどに見られるBSC導入での問題点。臨床医学の領域での分類では、Costs, Customer Satisfaction, Lab Processes Efficiency, Partners and Suppliers Satisfaction, Employee motivation and productivityなどでのデータの質と情報の諸問題。医療組織の部分的な利用での分類では、Team, Service, Clinical, Market, Financialなどに見られる成果測定の課題。政策的利用での分類では、Delta Rural Hospital Improvement Project政策的統合の道具としての利用に特化した論文が多くあったことがわかった。これらの結果に、他のインターネット検索などを広く加味してまとめると、バランスト・スコアカードを中心として、「プロセス・改善」、「成果測定」、「医療の質・経営の質」および「政府の説明責任」という4つのキーワードが、現在の世界での医療バランスト・スコアカードの研究の方向が整理できた。

次に、国際比較するためのアンケート調査を作成した。バランスト・スコアカードが病院経営における導入意図、利用方法と成果を関係させて評価するモノサシ（指標）の仮説を構築し、検証を行うために、インタビューと実際のBSCと使用されているいくつかの指標の変化から分析することが主にした。

日本で、業績評価、戦略実行、地域医療、行政による政策立案、政策実行、専門職教育あるいは業績評価のみ、あるいはオペレーションのみのBSCなど様々な利用範囲別に導入意図、成果の評価、戦略との関連と成果などをアンケート項目として、アンケート原案を作成し、協力病院でのアンケート予備調査を行った。その後、カナダでのアンケートのバージョンをBrownと高橋によって作成した。この段階で、大変苦労した。医療制度、病院開設主体などが異なる国で、同じアンケート調査を行うことの難しさに直面し、日本バージョンをカナダバージョンに変えるのに約8か月要した。

高橋淑郎が、2008年8月にカナダのオンタリオ州保健省で、Brownの協力で、カナダのオンタリオ州での医療成果測定、政策としてのBSC導入意図、実際の政策実行プロセス、その成果に関して調査を行い、その成果をアンケート調査に活かし、Brownのよきアドバイスによってアンケートとして完成した。日本バージョンとカナダバージョン（オンタリオバージョン）を、2009年の夏実際に調査の準備を進めている。現在、イタリア、フランスのバージョンを基本原案に沿って作成している。

また、高橋淑郎およびその仲間によって、Smith著の“Business Process Management and The Balanced Scorecard” (willy, 2007)を翻訳し、北米でのBSC導入時の障害の克服に関する詳細な事例研究明らかにすることができた。この書籍は生産性出版から2009年6月に出版予定である。

このようにマクロとミクロから、個別と政策から、様々な研究をこの1年間（2008年度）行い、2009年度のインタビュー、国際アンケート調査につなげていく基礎を作った。

一方で、5月に高橋淑郎、青木武典、劉慕和とBrownによって、カナダのオンタリオ州およびアメリカ病院協会で調査をおこなった。11月にイギリス、イタリアの医療でのBSCの実地調査を高橋淑郎などで行い、北米とヨーロッパの主たる国の医療BSCの現状を把握した。

部科校名： 商学部

氏名：高橋淑郎

研究の結果（つづき）

また、2009年1月に、Adalstainn Brown、大道久、白神誠、青木武典、渡辺明良、高橋淑郎、などとわが国でのBSC開発につなげるための国際共同研究会を開催した。これによりBSCの医療での応用について、これまでの成果を再確認し、諸課題を抽出した。

まず、北米での医療BSCの論文をレビューした結果分かったことを、その利用意図、成果を様々な角度から検討した。議論のテーマは、**Some Observations on the Growth and Development of the Balanced Scorecard in the United States**とした。

第2セッションでは、カナダのオンタリオ州のシステムレベルのBSCの開発と浸透と成果について、如何にして各病院に州の医療政策を浸透させるか、また、その前段階として、各病院、医療政策の開発に関係させて成果測定を、臨床、経営様々な面から行った意味などについて議論した。テーマは**Linking strategy, performance measurement, and decision-making in health care using the BSC : Experiences from Ontario, Canada**とした。

第3セッションは、オンタリオ州の病院では、州の政策を受けていかにして、戦略的病院経営を実行していくか、個別の病院でのBSCの導入を踏まえて議論した。テーマは**The Balanced Scorecard – Its implementation in hospitals**とした。

第4セッションでは、山形県病院事業管理者から、4つの県立病院でBSCを実際に導入し、運用されている県の病院のトップとしてのご経験を。沖縄県の敬愛会中頭病院・ちばなクリニックの仲田清剛院長先生からは、民間病院でBSCを導入し、全組織あげて取り組んでおられる経験を踏まえて、民間病院のお立場から、東京都の病院経営本部から、東京都の病院でのBSC利用の考え方、実践、政策に適用した意図などを議論した。

我が国の現状を概観すると、確かに、BSCはKaplanらの一つのモデルにすぎないと見ることできる。また、経営とすれば当たり前のことを行う経営実践のフレームにしか過ぎないともいえる。しかし、我が国の病院で、科学的に戦略を立てて、実行し、モニターし、改善に結び付けている病院、根拠と方法を示し、ゴールを設定し、検証する枠組みを持っている病院がどのくらいあるか。さらに、BSC作成プロセスで、共通言語、コミュニケーション向上、情報の共有などの副産物も多く出現する。これを利用することが経営には求められる。

また、BSCのブームは去ったということもときたま耳にするようになった。産業界ではどうか分からないが、少なくとも医療界では、BSCはブームではないと考える。一步一步病院経営を進めていく、ごく当たり前の経営の基礎となる実践のフレームワークだと考えれば、けっしてブームなどというものではない。わが国では病院単体でのBSCの利用は公私を問わず、企業よりは浸透度が早い、一進一退の状況といえる。一方、県や市町村の医療政策としてのシステムレベルのBSCの利用は難しい状況のように見られるが、山形県、宮城県などの着実な歩みも見られている。また、公立病院ガイドラインが公表され、効率だけを求められている公立病院は、よりBSCのような地域性や病院の価値観や価値判断を入れ込んだ、非財務データの重要性を認識した戦略マップの作成が現実には求められていると考える。

以上のように、2008年度は、医療BSCの文献およびインターネットでの文章を北米の研究者が2名で、調査した。分類・整理した。それらの結果を生かしながら、アンケート調査の日本版を作成し完成した。そのアンケート調査のプレテストも終了した。そのアンケートを基にしてオンタリオ版のアンケート調査を苦勞の末作成した。さらに、実際の個別組織でのBSCとプロセスマネジメントの課題や障害をあぶりだし、解決策を示した優れた事例研究の書籍を翻訳することで、実際の細部にまで検討した事例を検討した。この翻訳書は生産性出版から2009年6月末に刊行予定である。また、高橋が昨年8月にオンタリオ州での政策としてのsystem-levelのBSCを調査、多角的に検討した。これについて、研究成果の一部として日本大学商学部商学研究所の研究誌「会計学研究」第23号pp.35-74にBalanced Scorecard as Health Policy in Ontario, Canada: Intent and Process of Implementation, Evaluation, and Challengesを英文で投稿した。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 20 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 _____ 中村 英夫



所属・資格 _____ 理工学部・電子情報工学科・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------------------------|--|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <u>総合研究</u> | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 車両の総合的安全を目指したオンボード・センシングシステムの構築に関する研究 | |
| 3 研究の目的 | <p>福知山線の列車事故や平成17年12月に発生した羽越線の列車脱線事故はこれまでの前提や管理限界を越える「超限界要因」による事故といえ、今後の鉄道輸送の安全確保には抜本的な取組が要請されている。これまで車両によるデータ収集は、専用検測車を用いた「詳細ではあるがインターバルの長い保全データ収集」が行われてきた。これは緩慢な状況変化を前提としたものであり、「超限界要因」を前提とした事象の対策には、高頻度でかつ各種要因の総合作用による運動特性データから本質的な保全データを抽出する技術の確立が求められている。具体的にはプローブ車両等の先行研究を発展させ、上記目的にかなうオンボード・センシング技術としてまとめることであり、データの中から軌道系や車両系、そして風圧など自然の影響を弁別して抽出する技術の確立が期待される。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>開発するオンボード・センシングシステムは、データ収集部とデータ処理部からなり、データ収集部は情報の管理に不可欠な位置検知機能を基本に、車両運動解析や軌道状態の計測及び各種保安システムの状態を計測するデータ収集機能を有する。データ収集部はこれらの計測データを解析処理する。</p> <p>① 位置検知機能は、加速度センサと回転角速度計を組み合わせた簡便な方法により、軌道の勾配に影響されず、走行中の車両の位置を精度よく検知できるシステムを開発する。</p> <p>② データ収集機能としては自然状態や車両と軌道状態に伴う車両運動を計測する機能と地上側の信号を計測する機能を基本とする。信号設備の計測機能としては、自動列車停止装置(ATS)及び軌道回路を対象としてきた先行研究を発展させ、踏切制御子への適用を検討する。さらに、20年度には、これまで課題とされてきたレール破断やレール絶縁箇所絶縁破壊について対象を広げて検討するとともに位置検知精度のさらなる向上を意図した現車試験を実施する。</p> | |
| 5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) | <p>・研究代表者 中村 英夫 理工学部・教授 研究統括 システム統合の検討</p> <p>・研究分担者 (役割分担)</p> <p>網島 均 生産工学部・教授 軌道計測診断部の検討</p> <p>高橋 聖 理工学部・専任講師 保安システム制御診断部・位置検知処理部の検討</p> <p>丸茂 喜高 生産工学部・専任講師 車両運動解析部の検討</p> <p>望月 寛 理工学部・助手 保安システム制御診断部・位置検知処理部の検討</p> <p>水間 毅 独立行政法人 交通安全環境研究所・主幹研究員 位置検知処理部の検討</p> | |

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

部科校名： 理 工 学 部

氏名：中村 英夫

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

オンボード・センシングシステムとしてこれまで、軌道回路とATSの検知及び踏切制御子の計測方法について開発し、具体的な方法を確立した。本年度は、事業者のヒアリングの中で提起された課題（レール絶縁破壊やレール破断）について計測方法を研究し、有力な手法を開発した。さらに、保全情報データ解析システムを作成し、昨年得られた成果を実際に解析するシステムとしてまとめ上げた。一方、オンボード・センシングシステムで重要となる位置検知技術については、GPSの利用による高精度化について研究を深めた。これらの成果は、今後鉄道事業者に披露し、現場試験を実施するつもりである。

また、これらの成果を広く社会に公開し、意見を聞く場としてNU-RAILと銘々した公開シンポジウムを本年3月に理工学部の1号館で開催し、オンボード・センシング技術を核とした研究成果を披露した。シンポジウムには、60名を越える研究者技術者が集い、熱心な議論を繰り広げた。

以下、本年度の研究成果について具体的に説明する。

(1) レール破断・レール絶縁破断の自動計測

列車の安全運転に重要な信号装置は、軌道回路という列車検知装置が基本となる。その軌道回路の境界部には電流を遮断するため、絶縁体を挟み込んだレール絶縁を設けている。このレール絶縁が絶縁破壊を起こすと、隣接軌道回路の信号電流が流れ込み軌道回路が正常に機能できなくなる。しかし、この絶縁破壊を目視で見出すことは困難であり、絶縁機構を分解して確認するなどの方法が取られるが、この作業には多大な時間を要するため、その間列車運行を阻害することになる。今回開発した手法は、絶縁破壊時に生じる電流の流れ込みを車上受電機で計測することにより容易に検出するもので、鉄道信号システムの保全に利用できる。

a. 計測原理〔レール絶縁破壊〕

レール絶縁挿入箇所は、軌道回路境界部分であり、そこには図1に示すようにインピーダンスボンドが挿入されている。従って、インピーダンスボンドの打ち込み箇所と絶縁部分は通常、死区間となり電流は流れない（図1におけるa-RI間やb-RI間など）。しかし、異物介入や鉄粉によるブリッジなどによりRIの絶縁が機能を果たさなくなる（絶縁破壊）と、死区間にも電流が流れるようになる。

オンボード・センシングシステムでは位置検知を行っているため、この死区間において電流を検知したなら、レール絶縁破壊と認識できる。

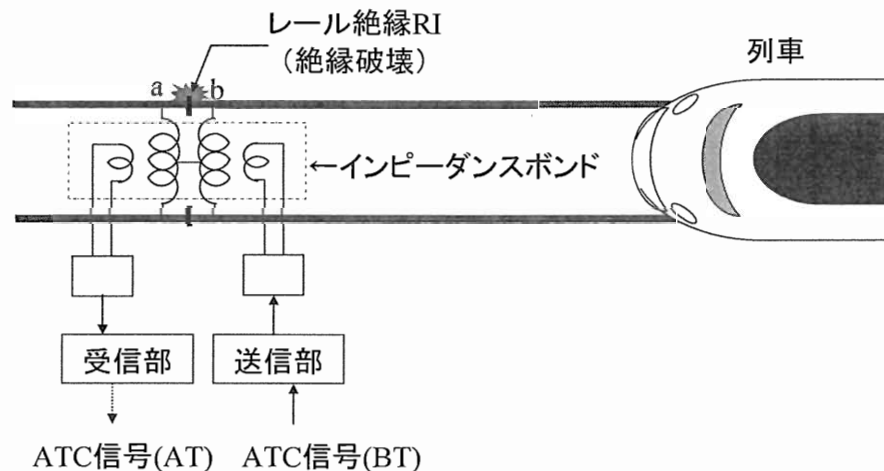


図1 軌道回路境界部分とレール絶縁

b. 計測原理〔レール破断〕

鉄道システムにとって、レールの破断は安全走行を妨げるRISKとなるため、早期検出が望まれる。軌道回路が設置されている区間においては、レール破断が発生すると信号電流が遮断されるため、軌道リレーが落下し停止現示となる。この原理により、軌道回路を設けることがレール破断検知には有効とされる。しかし、完全に破断せず、列車接近に伴って断続的に軌道回路電流が遮断されるようなケースも多い。このようなケースでは走行の安全には全く問題とならない。しかし、新幹線などATC設備の場合無信号による非常停止が発生するため、輸送障害を発生させる。しかも、厄介なことに通常時は破断が擬似的で信号電流が流れるため、原因究明に困難を伴う。

部科校名： 理 工 学 部

氏名：中村 英夫

研究の結果（つづき）

この困難な課題に、オンボード・センシングシステムの立場からの解決方法を検討した。列車を走らせる電車電流は、左右のレールに並行にしかも同相で流れる。通常 ATC 信号の受電は、左右のレールに流れる帰線電流による受電電流を打ち消す方向に接続することで、実現している。時々断発生時には、破断状態になったときのみ、そのレールの帰線電流はカットされるため、左右のレールに流れる帰線電流は不平衡になる。オンボード・センシングシステムでは、このことを利用してレール破断を検知することにした。しかも、この半破断箇所を通り過ぎれば、また左右の帰線電流は平衡するため、そのときの位置を検知することにより、時々断箇所の特定も可能になる。

ATC システムでない場合にも、この検知方法は有効である。ATC システムでない場合には、この状態では停止信号現示を発生させない。しかし、いずれは完全な破断に至り、輸送障害をもたらす。提案の方法を用いることにより、事前に検出されるため、輸送障害に至る前に対応が可能になる。

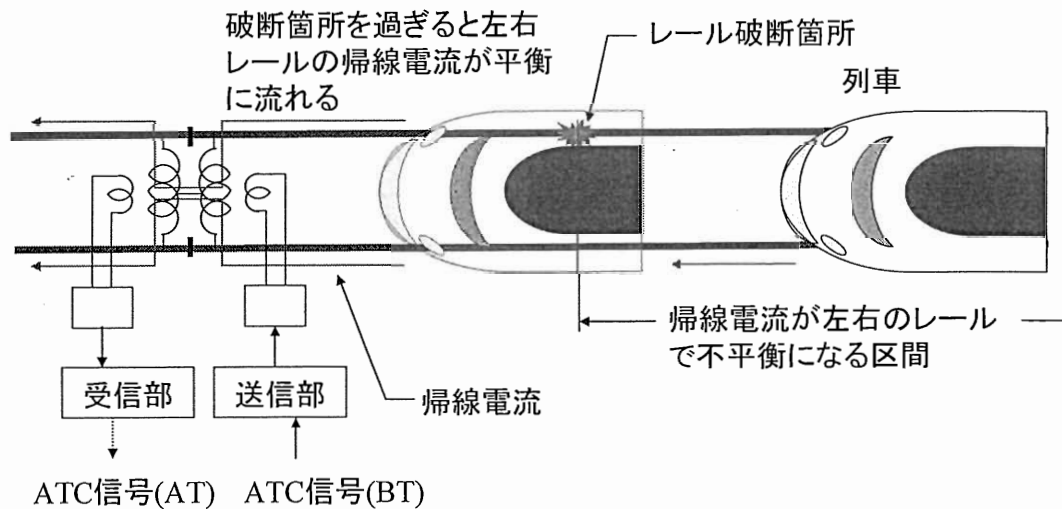


図2 レール破断検知技術の原理

(2) 保全情報データ解析システムの開発

オンボード・センシングシステムの中でこれまで確立してきた各種計測技術を取りまとめ、保全情報データ解析システムとしてソフトウェアの開発を行った。

オンボード・センシングシステムの有する機能は、次の通りである。

a. データ収集

- イ) 波状摩耗と摩耗レベル計測
- ロ) ATS地上子データ計測
- ハ) 軌道回路レベルと位相計測
- ニ) 軌道回路定数の算出

b. データ解析

- イ) 波状摩耗箇所特定と摩耗レベルの導出
- ロ) ATS地上子のQ値解析と保全レベル判定
- ハ) 軌道回路レベルと位相計測値による軌道回路データの解析と保全レベル判定
- ニ) 軌道回路定数と時系列変化の管理

本システムは、「VisualStudio2008」統合開発環境の下でC#言語を用いて作成した。統合開発環境には「ServicePack1」をインストールしている。実行環境は「NetFlameWorks3.5」の下で動作するものとした。パソコン上では上記環境の下、CD-ROMの「Source」フォルダ配下の maintenance-system.sln を開くことにより操作できる。

部科校名： 理 工 学 部

氏名：中村 英夫

研究の結果（つづき）

(3) 位置検知技術の高精度化

位置検知技術については前年度に加速度センサと角加速度センサのハイブリッドによる手法を確立し、報告した。しかし、この方法は相対位置や速度は算出できるものの、絶対位置は何らかの手段で入力しなければならない。このため、本年度はGPSとのハイブリッドによる高精度化について研究を進めた。

車上には列車の前後に二つのアンテナを配置し、入力データの相互比較とあらかじめ既知であるアンテナ間隔から、GPSの誤差を把握し、誤差の少ないときに限り、絶対位置補正に用いることにした。また、進行方向と直角になる誤差をマップマッチングにより算出し評価した。これらの現車による確認実験は、山形鉄道において行ったが、良好な測位精度が得られるとの見通しを得た。

7. 部外発表等の成果

これらの成果は、学会研究会、協会誌などに発表された。以下、主な成果を示す。

国際学会発表論文

- (1) DEVELOPMENT OF HIGH-SPEED RAIL TRANSMISSION SYSTEM USING DIGITAL SIGNAL PROCESSOR FOR RAILWAY SIGNALING; Eleventh International Conference on Computer System Design and Operations in the Railway and Other Transit Systems, 15 - 17 September, 2008, Toledo, Spain
- (2) PROPOSAL OF CDMA-QAM METHOD AND APPLICATION TO HIGH-SPEED RAIL TRANSMISSION TECHNOLOGY FOR RAILWAY SIGNALING; The 23rd International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications, July 6-9, 2008, Shimonoseki, Japan

学会全国大会論文

- (1) 中村英夫；21世紀の鉄道を支えるセンサ技術、平成21年電気学会全国大会 S27-1, 北海道大学, 19.3.2009
- (2) 近藤、工藤、水間、中村英夫；GPSを用いた列車の連続的位置検知の低速域補完技術に関する一検討、平成20年電気学会産業応用部門大会 Y-135, 高知大学 27.8.2008
- (3) 林、中村、高橋、望月；踏切制御子の状態監視に関する一考察、平成20年電気学会産業応用部門大会 高知大学 27.8.2008
- (4) 近藤、中村、工藤、水間；GPSを用いた列車連続的位置検知の精度向上に関する検討、平成21年電気学会全国大会、5-086, p138, 17.3.2009

技術協会誌論文

- (1) 中村 英夫；プローブ車両用信号設備計測技術の開発, JREA. 日本鉄道技術協会. 50 巻 9 号 p.32734 9.2007
- (2) 中村 英夫；列車制御から見たメンテナンス・省力化への戦略. JREA. 日本鉄道技術協会. 51 巻 11 号 pp 33745-33748, 11.2008

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年4月20日

日本大学 総長 殿

氏 名 浅田 泰男



所属・資格 理工学部・一般教育・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|--------------------------|---|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 微生物コンソーシアを利用した環境浄化に関する研究開発 | |
| 3 研究の目的 | <p>環境浄化とエネルギー生産の両立をめざして、嫌気性微生物と光合成細菌との混合固定化系を用いた糖質からの水素生産について研究してきた。クモノスカビ (<i>Rhizopus</i>) と光合成細菌との混合培養を用い高収率の理由と同時に限定要因を検討し、さらなる収率の向上が可能かどうかについて研究する。また、廃糖蜜や生ゴミなど実際の廃棄物についてこの混合培養系を適用してみる。また、光合成細菌の新たな固定化方法と遺伝子導入についても検討する。</p> <p>引き続き脱リンや脱窒素処理を行うため、脱窒性リン蓄積細菌について研究する。上記の残存有機物(酢酸など)を有効に利用可能であり、かつ、脱リンによるリン回収と脱窒による窒素除去を一つの細菌種で行なうことができる。特に、亜硝酸を電子受容体(エネルギー源)として利用できるため、リン回収と脱窒に伴う消費エネルギーおよび固形廃棄物である汚泥発生量を飛躍的に削減可能な細菌として注目されている。本助成の研究期間においては、亜硝酸を電子受容体とする嫌気-無酸素環境下において微生物の群集構造解析を行ない、脱窒性リン蓄積細菌の優占的利用を可能にする環境条件を明らかにすることである。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>まず、モデル廃液としてグルコースを用いて、発酵菌(今回、主として <i>Rhizopus oryzae</i> を用いた)と光合成細菌を寒天ゲル中に混合固定化して、水素の回収率を主な指標として、研究した。何度か実験を繰り返したところ、多少のバラツキを含むが、理論収率の12モル(消費グルコース1モルあたり)に対して8モルから9モルに近い変換効率を示した。従来にない高収率であった。</p> <p>しかし、廃糖蜜を用いた実験では、収率は3程度であり、結果は良くなかった。糖の定量方法による誤差の問題も疑われるが、の蔗糖分解活性に問題があるかもしれない。</p> <p>光合成細菌の固定化に、ある種のプラスチックシート(断熱用)が有用であることが示された。</p> <p>ポリリン酸蓄積細菌のグラニュール形成能について検討した。主要2種のポリリン酸蓄積細菌を集積培養し、凝集・沈降性に関わる因子を測定したところ、ポリリン酸蓄積細菌は他の共存細菌と比較して分散性が高く、流出し易い結果が得られた。</p> | |
| 5 研究組織(共同研究・総合研究のみ該当します) | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 浅田 泰男 (研究全体の統括、嫌気性細菌と光合成細菌による水素生産) ・研究分担者(役割分担) <ul style="list-style-type: none"> (学内) 齋藤利晃 (脱窒性リン蓄積細菌を用いたエネルギー回収廃液のポリッシュアップと資源回収) (学内) 吉田征史 (同上) (学内) 石見勝洋 (廃液諸成分の分析) (学内) 神野英樹 (光合成細菌の遺伝子導入) (学外) 若山樹 (バイオマスの存在量や本技術の社会的適合性) (学外) Anatoly Tsygankov (アナトリー・ツガンコフ) 光合成細菌の固定化 | |

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

部科校名： 理 工 学 部

氏名： 浅田 泰男

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

(研究代表者、浅田および石見 担当分)

【*Rhizopus oryzae* NBRC5384 と *Rhodobacter sphaeroides* RV の固定化混合培養による水素生産】
(基本的な方針と手法)

グルコースは、単糖および多糖類として、バイオマスの基本的物質である。本研究は、グルコースを全て水素と炭酸ガスに変換することである。1モルのグルコースは12モルの水素に変換し得るが、このためにはエネルギーの投入が必要である。嫌氣的発酵微生物は、グルコースを有機酸と水素に変換するが、有機酸からは、外部からのエネルギー投入無しでは水素の生産はできない。光合成細菌は、光エネルギーを利用することによって有機酸から水素を生産することができる。

よって、それぞれ別に培養した嫌氣的発酵微生物と光合成細菌を寒天で混合固定化し、グルコースないし廃糖蜜 (の希釈液) を加えて、光照射条件で発生した水素を捕集、定量した。

1. 混合固定化における *Rhizopus oryzae* NBRC5384 の菌体濃度の水素生産に及ぼす影響

初めに、これまでに行われた発酵菌と *Rh.sphaeroides* RV の混合培養では菌体濃度 OD=1.5 が適していたため、本研究でも RV の OD (菌体濃度指数) を 1.5 とし *Rh.oryzae* の菌体濃度が水素発生量に及ぼす影響についての検討を行った。*Rh.oryzae* の菌体濃度を OD=0.3 および 0.9 として水素発生を行った。ともに、水素は約7日で800ml発生し、対糖収率 8.2mol が得られた。また培養液を経時的に少量ずつ取り出し、生成した有機酸の分析を行った。生成した有機酸はどちらも、乳酸、酢酸、コハク酸、ギ酸であった。また、グルコースは約5日で完全に資化されており、それに伴い水素発生も止まっていた。

2. 前培養1の培養時間の長さが水素生産に及ぼす影響

1の結果より、*Rh.oryzae* の菌体濃度を 0.3 に固定し、*Rh.oryzae* と *Rh.sphaeroides* RV の菌体濃度をそれぞれ 0.3 および 1.5 とし、培地濃度を1倍とし前培養1を1~4日間行った。前培養を2日間行ったところ、水素は約8日で980ml発生し、対糖収率 9.0mol が得られた。また、1日、3日、4日培養したものの対糖収率はそれぞれ 7.5、6.9、6.3 mol であった。以上の結果より、前培養1の培養時間は2日間が適していることがわかった。

3. 前培養1における *Rh.oryzae* の培地濃度が水素発生に及ぼす影響

2の結果より、*Rh.oryzae* の菌体濃度は OD=0.3、培養時間は2日であったためこの結果をもとに、続いて培地濃度の検討をおこなった。ここでは、PDB (ポテト・デキストロース) 培地の濃度を1倍、1/2、1/5、1/10と条件をふりわけた。培地濃度を希釈していくにしたがい、水素発生量は減少していった。そして濃度を1倍とした時水素は8日間発生し、対糖収率 9.9mol が得られた。また、PDB 培地濃度 1/2、1/5、1/10の時の対糖収率はそれぞれ、8.4、6.1、5.9mol であった。

4. 最適条件での水素発生

これまでの結果より、*Rh.oryzae* は菌体濃度が 0.3、培養時間が2日間、PDB 培地の濃度が1倍という条件が適していたため、これらの条件を用いて再度混合培養を行った。さらに、これまでの混合培養では gL 培地からの持ち込み乳酸からの水素生産についても考慮していなかったため、持ち込み乳酸からの水素生産を行った。その結果、水素は8日間で1000ml発生し、対糖収率 9.40mol が得られた。また、gL 培地の持ち込み乳酸からは100mlの水素が発生した。よって、持ち込みの分を差し引くと 8.5mol となり、理論収率の70%の水素を回収することができた。

5. *Rh.oryzae* NBRC5384 と *Rhodobacter sphaeroides* RV のスクロースおよび廃糖蜜からの固定化混合培養による水素生産1) *Rh.oryzae* を PDB 培地で生育させた場合におけるスクロースからの水素生産

廃糖蜜からの水素生産を行うために、廃糖蜜に含まれる糖分を分析したところ、スクロース、グルコース、フルクトースが含まれておりその中でもスクロースが最も多く含まれていた。そのためスクロースからの水素生産を行った。

これまでと同様に、*Rh.oryzae* を PDB 培地で生育させたものを使用し、RV との混合培養を行い、炭素源をグルコースからスクロースに代え窒素源としてグルタミン酸を添加し水素生産をおこなった。その結果、水素は7日で約185ml発生し、対糖収率 3.0 が得られた。

部科校名： 理 工 学 部

氏名：浅田 泰男

研究の結果（つづき）

2) *Rh.oryzae* を PDB 培地で生育させた場合における廃糖蜜からの水素生産

廃糖蜜からの水素生産では、糖蜜を Basal 培地で希釈し、窒素源として加えたものと加えないものという条件で行った。その結果、グルタミン酸を添加した時水素は約 7 日で 240ml、添加しなかった時は 270ml 発生した。

3) *Rh.oryzae* を Potato-sucrose 培地で生育させた場合におけるスクロースからの水素生産

Rh.oryzae を PDB 培地で生育させたものと RV の混合培養では、期待されたほどの水素は発生しなかった。そこで、PDB 培地から炭素源をスクロースに代えた Potato-sucrose 培地に交換し水素発生をおこなった。その結果を Fig.18 に示す。水素は 6 日で 200ml 発生した。PDB 培地培地で生育させた *Rh.oryzae* と比べて、わずかであるが水素発生量の増加が改善された。さらに培養液のサンプリングを行い生成した有機酸および消費糖の経時変化を追った。その結果、生成した有機酸は乳酸であり、乳酸は完全に資化されずに蓄積していた。

4) *Rh.oryzae* を Potato-sucrose 培地で生育させた場合における廃糖蜜からの水素生産

ここでも先ほどと同様に、*Rh.oryzae* を Potato-sucrose 培地で生育させ、RV との混合培養を行った。水素生産の条件としては、糖蜜を Basal 培地で希釈しグルタミン酸を添加したもの、Basal 培地での希釈のみさらに、糖蜜を蒸留水で希釈しグルタミン酸を添加したもの、蒸留水での希釈のみの条件で行った。この時の水素発生量の経時変化および有機酸、消費糖の経時変化を観察した。

初めに、糖蜜を Basal 培地で希釈し、グルタミン酸を添加した場合と添加しなかった場合であるがそれぞれ水素は 260ml、550ml 発生した。また、窒素源としてグルタミン酸を添加したことで水素発生量はおよそ半分に減少してしまった。

次に、廃糖蜜を蒸留水で希釈しグルタミン酸を添加した場合と添加しなかった場合であるがそれぞれ水素は 200ml、560ml 発生した。水で希釈した場合も Basal 培地で希釈したときと同様に、グルタミン酸を添加することで水素発生量は大きく減少していた。

生成した有機酸はどちらの場合でも、乳酸、ギ酸、コハク酸であり、乳酸は完全に資化されていたが、ギ酸とコハク酸が最後まで蓄積していた。

5) 本節のまとめと考察

廃糖蜜とは、砂糖作物原料の絞り汁を濃縮し砂糖を晶析分離したあとの母液を指し、糖分（スクロース、グルコース、フルクトース等の混合）を 40 から 60%含有している。さらに原料作物由来のアミノ酸など、微生物の生育に有効な有機物も多く含むため良好な発酵原料となり、糖あたりの価格としては約 100 ドル/t と発酵原料の中では最も安価であるといわれている。

今回使用した廃糖蜜の糖分析を HPLC で行ったところ、糖分として含まれているのは、一般的な廃糖蜜に含まれている糖分であるスクロース、グルコース、フルクトースと同じであることが確認された。(Table 14) そこで、含有量が最も多いスクロースからの水素生産について検討をおこなった。はじめに *Rh.oryzae* をこれまでと同様に PDB 培地で生育させたものと *Rh. sphaeroides* RV の混合系ではグルコースからの水素生産に比べ、水素発生量は大きく低下してしまった。この原因として *Rh.oryzae* はグルコースに比べスクロースを効率良く資化することができなかった、すなわちグルコースとフルクトースの結合を分解する酵素系を持っていないためと考えられる。

次に、*Rh.oryzae* をスクロース培地で培養することでグルコースとフルクトースの結合を分解する酵素系を誘導できるのではないかと考え、*Rh.oryzae* をポテトスクロース培地で生育させたものと *Rhodobacter sphaeroides* RV の混合培養を行った結果、多少ではあるが水素発生量の改善がみられた。これはおそらく、ポテトスクロース培地で培養することで *Rh.oryzae* のスクロース資化能が活性化されたためと考えられる。このことから、スクロースから水素生産を行うためには *Rh.oryzae* を Potato-sucrose 培地で培養することで水素生産が可能であると示唆された。

廃糖蜜からの水素生産についても、初めに *Rh.oryzae* を PDB 培地で生育させたものと *Rhodobacter sphaeroides* RV の混合培養を行ったが、スクロースからの水素生産と同様に期待されるほどの水素は発生しなかった。この原因もスクロースからの水素生産と同様で、スクロースを効率良く分解できなかったためと考えられる。しかし、スクロースからの水素生産よりも多少発生量が多いのは、おそらく、廃糖蜜中のグルコースを分解し発生したものであると考えられる。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名： 理 工 学 部

氏名： 浅田 泰男

研究の結果 (つづき)

続いて、*Rh.oryzae* を Potato-sucrose 培地で培養したもので *Rhodobacter sphaeroides* RV との混合培養を行った。その結果水素発生量は大きく改善することができた。ここでは、窒素源としてグルタミン酸を添加した場合と添加しなかった場合で水素生産を行ったが、グルタミン酸を添加することで水素生産は阻害された。さらに廃糖蜜を蒸留水で希釈しただけでも、無機塩が入った Basal 培地で希釈したものと同じくらいの水素が認められた。先ほども述べたように、廃糖蜜中にはニトロゲナーゼを阻害する原料作物由来のアミノ酸 (グルタミン酸など) や微生物の生育に必須な無機塩が含まれていたためと考えられる。

以上

(アナトリー・ツガンコフ担当分)

【*Rhodobacter sphaeroides* RV の固定化による水素生産】

表面処理したプラスチックシートに RV を固定化し、厚みの異なる方形の瓶を自作し、g/L (グルタミン酸、乳酸) 培地で満たし、水素生産量を比較した。詳細は、論文作成中の模様であるため省略する。

以上

(神野担当分)

【*Rhodobacter sphaeroides* RV への異種遺伝子導入】

既に開発した RP4 由来の接合伝達系が作動することを再度確認し、藍藻および異種光合成細菌由来の遺伝子を導入し、発現することを見いだした。本研究については、特許出願を検討中につき、詳細は省略する。

(齋藤・吉田担当分)

【脱窒性リン蓄積細菌を用いたエネルギー回収廃液のポリッシュアップと資源回収】

エネルギー回収後の廃液は発酵残液であり、酢酸を主成分とする揮発性脂肪酸と未分解のタンパク質、更に、富栄養化問題を引き起こす窒素およびリンを大量に含んでいると考えられる。これらの処理に期待されるのは、近年注目されている脱窒性リン蓄積細菌の利用である。本研究では、省エネルギー型新規窒素リン除去として、脱窒性リン蓄積細菌を優先的に利用する嫌気無酸素グラニューール法の開発を試みた。プロセスの特徴は、脱窒性リン蓄積細菌のグラニューール化により、省エネルギー機能をより高度に利用可能なプロセスに改良した点である。グラニューール形成条件を調べるため、嫌気無酸素法で培養している汚泥について、処理水を引き抜くまでの沈殿時間を変え、沈降性の劣る汚泥を強制的に排出させた。その結果、汚泥量の減少に比べ、リン除去性能の悪化が顕著に観察されたことから、グラニューール形成に主要な影響を及ぼすと考えられるポリリン酸蓄積細菌が選択的に流出したと考えられる。その後、リン除去性能の回復とともに、SVI や沈降性が改善し、グラニューール様の汚泥を得ることができた。以上の結果を基に、ポリリン酸蓄積細菌の凝集・沈降性を調べた。主要 2 種のポリリン酸蓄積細菌を集積培養し、凝集・沈降性に関わる因子を測定したところ、ポリリン酸蓄積細菌は他の共存細菌と比較して分散性が高く、流出し易い結果が得られた。一般に、ポリリン酸蓄積細菌は沈降性が良いと考えられていることから、既存の常識を覆す極めて重大な知見を得たと考えられる。また、両細菌種における沈降性の差異は大きくはないが、グラニューール形成に寄与するとされる細胞外ポリマー含有量は、タンパク質についても糖質についても、 β -Proteobacteria に属する *Rhodocyclus* 近縁種の方が Actinobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌よりも大きいなど、沈降性に及ぼす細胞外ポリマーの寄与は明らかではなかった。一方、混合による沈降性の変化も観察されたことから、表面電荷の影響など瞬時の反応が沈降性に及ぼす影響も考慮して行く必要があるかもしれない。本助成により得られた以上の知見を基に、今後、グラニューール形成条件ならびに関与する微生物群の共生関係を明らかにし、嫌気無酸素グラニューール法の開発を進めていきたいと考えている。

以上

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 4月 1日

日本大学 総長 殿

氏 名 神田 亮



所属・資格 生産工学部 ・准教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|--------------------------|--|---------------------|
| 1 種目 | 奨励研究/一般研究(個人)/一般研究(共同)/ <u>総合研究</u> | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 揺れによる低頻度大災害の心理的・物理的・経済的リスクマネジメント | |
| 3 研究の目的 | 本研究の目的は、自然現象が引き起こす大災害を如何に軽減し安全な生活環境を維持するかを、工学的な立場のみならず、社会学および心理学的な側面から検討し、それを理論的に検証することである。 | |
| 4 研究の概要 | 本研究では、多方面のアプローチをうまく研空に組み込みお互いの成果を反映させながら研究を遂行するため、WGを設ける。そのWGは、WG1：リスクに関する評価と社会的心理、WG2：揺れの心理的評価、WG3：リスク軽減のための居住空間の構築、WG4：リスクアセスメントとライフサイクルコストである。 | |
| 5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します） | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 神田 亮 研究の総まとめ、リスクアセスメントとライフサイクルコスト ・研究分担者（役割分担） ○ 研究分担者（学内） 小野 清秋 リスク軽減のための居住空間の構築 鳥居塚 崇 揺れの心理的評価 中村 卓史 リスクアセスメントとライフサイクルコスト 吉田 典正 揺れの心理的評価 渡辺 亨 リスク軽減のための居住空間の構築 時田 学 リスクに関する評価と社会的心理 ○研究分担者（学外） 大鳥 靖樹 リスクに関する評価と社会的心理 菊池 真弓 リスクに関する評価と社会的心理 八木 絵香 揺れの心理的評価 | |

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

部科校名：生産工学部

氏名：神田 亮

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

研究計画書でも記述したように、この研究グループでは、多方面のアプローチをうまく研空に組み込みお互いの成果を反映させながら研究を遂行するため、4つのWGを儲け、そのWGごとに研究を遂行した。さらに、年数回の打ち合わせ会を開催し、各WGの情報交換を行い、その情報をもとに、研究遂行について若干の修正を行った。以下に、WGごとに平成20年度の研究成果を報告する。

WG1：リスクに関する評価と社会的心理（鳥居塚、神田、大鳥、菊池、八木）

WG1では、リスクに関する評価と社会的心理に関して、心理学的な指標を用いることができるかという点について、予備的検討を行った。成果の概要は以下のとおりである。

本研究費によって購入した、FMS社製のFINOMETER MIDIを用いて、言語刺激を用いた、精神的な動揺に関する実験を行った。FINOMETER MIDIは、生体内の各点において時々刻々と変化する、血液の圧と流れと体積についての測定するいわゆる血行力学（hemodynamics）的指標を測定することが可能である。その対象となる典型的なパラメーターは、血圧（blood pressure :BP）、心拍数（heart rate :HR）・心拍出量（cardiac output :CO）・全末梢抵抗（total peripheral resistance :TPR）などである。今回の実験では、精神的な動揺を因る言語刺激を提示し、被験者の反応については、今後の実験計画に反映させるため、言葉による反応を求めた。

今回の実験結果から、HRとCOについて、有意差が見られ、TPRについては有意差が見られなかった。言語的な刺激によって、血行力学的な指標の一部に変化が生じ、心理生理学的に幅広く揺れを捉える指標としての可能性が示唆されたと考えられる。現在さらに被験者の人数を増加させ、検討を加えているところである。また、今後は、より具体的な刺激を用いて検討すること際に揺れを映像的に見せ、検討を加えていく。

WG2：揺れの心理的評価（鳥居塚、時田、吉田、八木）

H20年度は、より詳細に揺れの感じ方の特徴を明らかにするために定量的評価を試みた。人間は感じた揺れを様々なことばを用いて表現することを考えれば、その揺れを表現したことばを解析することにより実際の揺れの特徴を明らかに出来ると考えた。そこで、揺れを表現することばに対してどのような特徴の揺れを表現するのか明らかにすることを目的とした。

PCのディスプレイ上に揺れを表現することばをマウスの操作によって揺れを表現し、マウスポインタの移動した座標を取得し、保存できるプログラムを作成し実験を行った。ことばの表現は図WG2-1の①の領域内に表現してもらった、計測時間は被験者がマウスを操作し始めてから2秒後から7秒後までの5秒間とし、1人の被験者につきそれぞれのことばで5試行ずつ実験を行った。そして座標データをPCに保存した。被験者には揺れを表現することばを上下(縦)の揺れ、または左右(横)の揺れのどちらかで表現してもらった。実験に用いたことばはこれまでの一連の研究同様14種類のことばであり、被験者は男女学生20名である。実験画面を図に示す。

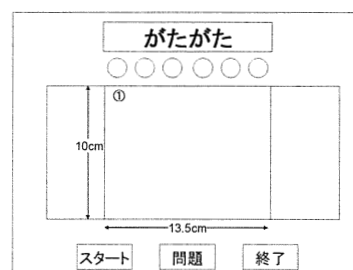


図 WG2-1 実験画面

部科校名：生産工学部

氏名：神田亮

研究の結果（つづき）

プログラムを用い、被験者に揺れを表現することばを表現してもらった結果、上下(縦)に振幅が大きい揺れ、左右(横)に振幅が大きい揺れの表現が存在した。そのためにことばごとに縦軸の軌跡の座標、横軸の軌跡の座標を被験者全体でまとめて解析を行った場合、被験者の縦、横の揺れの特徴を打ち消し合ってしまうことが考えられる。そこで被験者が表現した揺れが縦の揺れを表現したものなのか、横の揺れを表現したものなのか分類を行ない方向別で解析を行うことが必要と考えた。

縦の揺れをイメージした表現、横の揺れをイメージした表現の分類方法は被験者に表現した揺れの曲線の形状から分類を行った。縦揺れ型、横揺れ型に曲線を分類をしたのち、それぞれのデータをFFTを施し、最大振幅と最大周波数を抽出した。そして最後に全てのことばの値を正規化を行い分類項目ごとに平均値の算出を行った。結果を図 WG2-2、図 WG2-3 に示した。

横揺れ型に関して図 WG2-2 から音を表現することばと、体で感じる揺れの表現のブロックで対に位置する象限に固まる結果となった。またゴーゴー、ゴーのみ最大周波数、最大振幅が大きい値の第1象限に位置した。よって横揺れ型の特徴として音を表現することばの揺れの特徴は、周波数の大きく、振幅が小さい揺れであり、体で感じる揺れを表現することばの揺れの特徴は、振幅が大きく、周波数が小さい揺れになることがわかった。縦揺れ型に関して図 WG2-3 から最大周波数の大、小で音を表現することばと体で感じることばで大きく分かれた。また最大振幅の大きさに関しては音の表現のことばの揺れと体で感じる揺れではそれほど差がないことがいえる。このため縦揺れ型に関しては最大周波数の大きさを音の表現することばか体で感じる揺れを表現することばで分かれていることがわかる。

以上の結果から縦揺れ型と横揺れ型の結果を比較すると、音を表現することばは縦揺れ型、横揺れ型共に最大周波数の値が大きな値になった。一方、体で感じる揺れを表現することばは最大周波数が小さい値になる。よっていずれの方向にせよ周波数の大きさが揺れの特徴に影響を与えている。最大振幅に関しては横揺れ系では音の表現と体で感じる揺れで大きく分かれたが縦揺れ系ではそれほど差は生じなかった。これは揺れの振幅の大きさは縦方向では揺れによりそれほど差を感じず、縦方向よりも横方向の振幅の大きさを感じていることがいえる。このために縦揺れ型では音の表現と体で感じる揺れの表現では振幅の大きさに差が生じなかったことがいえる。方向別に解析を行った結果、ことばで表現される揺れの縦方向のイメージ、横方向のイメージが明らかになった。

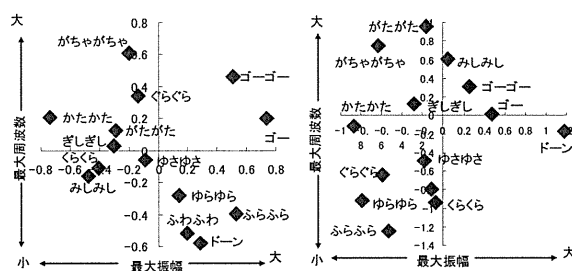


図 WG2-2 横揺れ型の最大周波数と最大振幅

図 WG2-3 縦揺れ型の最大周波数と最大振幅

以上、本研究結果とこれまでの研究結果を併せると、表 WG2-1 のようにまとめることができる。以上の結果、揺れの大小や、恐怖感との関係を左右する要因として第一に揺れの周波数の大きさが関係していることがいえる、また、揺れの大きさや恐怖感に影響を与えている要因として揺れにより発生する音、聴覚による影響も考えられる、このことからイメージすることばによって表現される揺れの特徴の一部が明らかになったことがいえる、これにより人間の主観を取り入れた評価基準の構築のための基礎データの蓄積が出来たといえる、

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

| | |
|------------|--------|
| 部科校名：生産工学部 | 氏名：神田亮 |
|------------|--------|

研究の結果（つづき）

表 WG2-1 揺れを表現することばの特徴

| 揺れの大きさ | 最大周波数の大きさ | 揺れを表現することば |
|--------|------------------|---|
| 大きい揺れ | 大 ↑ ↓ 小 | <u>ゴ—ゴ—</u> <u>ぐらぐら</u> <u>がたがた</u> |
| 中程度の揺れ | | みしみし <u>がちゃがちゃ</u> <u>ぎしぎし</u> <u>かたかた</u> |
| 小さい揺れ | | ゆらゆら ふらふら ゆさゆさ くらくら |

※表中の下線が付いているものは、恐怖に感じることを示す

参考文献

瀬野友也ほか：地震の揺れを表現することばに関する研究， 日本人間工学会第 47 回大会講演集， PP118-119， 2006

WG3：リスク軽減のための居住空間の構築（渡辺、神田、大鳥、中村）

WG3 の目的は「リスク軽減のための居住空間の構築」であるが，ここでは風・地震による建物の振動を最大のリスクとみなし，それを軽減しうる制振システムの構築を目指している．この目標に沿い，昨年度は「リスク低減効果を評価するソフトウェアプラットフォームの開発」および「風力係数の実験的同定」を行った．この成果を踏まえ，本年度は（1）プラットフォームへの風外力の組み込み（2）実時間で模擬風外力を生成する数値シミュレータの開発を行った．以下，それら成果について報告する．

まず（1）であるが，デバッグを完了させ，「地震外乱を受ける複数構造物のベンチマーク問題」としてほぼ完全な動作ができるようになった．このプラットフォームに，昨年度に計測を行った風力係数を使用し風荷重を算出，得られた風荷重データをモデルに換算し，風外乱モデルの構築を行った．図 1 に作成した風外乱をプラットフォームに組み込んで得られた構造物モデルの応答シミュレーションの例を示す．風外乱データは風向が 5° ピッチずつ全部で 72 方向のデータが得られているが，この全てを用いることは「ベンチマーク問題」としては過大な負担となるため，いったん全方位について応答シミュレーションを行い，最も特徴的な応答を示した 4 方位，すなわち 0°・170°・195°・280° を代表外力として用いることとした．表 1 に各方位における構造物最大変位応答を示す．

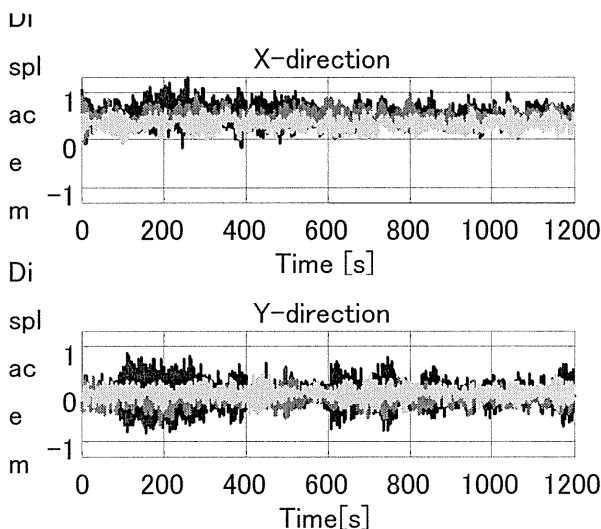


図 1．構造物の風外力時刻歴応答の 1 例

表 1．各方位における構造物最大変位応答

| | | 1棟[m] | 2棟[m] | 3棟[m] |
|------|-----|----------|----------|----------|
| 0° | X方向 | 1.30E+00 | 9.59E-01 | 7.82E-01 |
| | Y方向 | 8.45E-01 | 6.50E-01 | 4.45E-01 |
| 170° | X方向 | 1.66E+00 | 9.28E-01 | 9.69E-01 |
| | Y方向 | 1.19E+00 | 3.29E-01 | 9.72E-01 |
| 195° | X方向 | 1.47E+00 | 9.79E-01 | 9.70E-01 |
| | Y方向 | 1.45E+00 | 3.74E-01 | 6.68E-01 |
| 280° | X方向 | 1.28E+00 | 6.11E-01 | 3.45E-01 |
| | Y方向 | 1.80E+00 | 1.20E+00 | 3.39E-01 |

注：必要に応じて，このページをご使用ください。

部科校名：生産工学部

氏名：神田亮

研究の結果（つづき）

WG4：リスクアセスメントとライフサイクルコスト（神田、渡辺、中村）

WG4 では、高層免震建物を対象にして、地震荷重と風荷重の相反性に対して、確率的アプローチを用いた合理的な構造パラメータの決定法を提案開発し、いくつかのタイプの高層免震建物に適用した。成果の概要は次のようなものである。

19年度は、地震外乱と風直交方向外乱に対してそのトータル的な超過確率を求めたが、本年度は、さらにそれを発展させ、両外乱に加え、風方向外乱に対しても検討を行った。また、クライテリアとして、多数回繰り返しによる損傷を加えた。具体的には、免震層の疲労損傷は、 $0.4Q_{max}$ に対して $2Q_y/3$ とした。ここで、 Q_y は降伏荷重、 Q_{max} は免震層のせん断力の変動成分の最大値である。

求めた超過確率を Fig.1, 2 にそれぞれ示す。Fig.1, 25 は上部構造の層間変形角のクライテリア（以下、 CL_a ）が $1/200\text{rad}$ の場合の結果である。

Fig.1, 2 より超過確率が最小となる構造パラメータを推定すると、モデル1は $\alpha=0.13, \beta=1.8$ 、モデル2は $\alpha=0.09, \beta=1.6$ と推定できる。しかし、モデル1は端の方に超過確率が最小となるパラメータがあるので、設定するパラメータをもう少し広い範囲で考える必要がある。また、Table 1,2 に推定した構造パラメータの超過確率とレベル2相当の風荷重による降伏を許容しない場合の最小超過確率を示す。Table 1,2 よりモデル1で CL_a が $1/200\text{rad}$ の場合を除き、 $1/2\sim 1/7$ 程度となっていた。そのため、クライテリアやモデルによっては風荷重による降伏を許容してパラメータを設定するほうが超過確率は小さくなる。さらに、現行示方書へのキャリブレーションを行い、許容確率を定める。本推定例では、現存する建築物をモデルにして超過確率を求め、許容確率を 5.25% と定めた。これより、モデル2の CL_a が $1/300\text{rad}$ と $1/400\text{rad}$ の場合は許容確率を超えているため、構造計画もしくはクライテリアの設定を再考する必要がある。このように超過確率はクライテリアにより変動するため、クライテリアはコストなどの他の要因も考慮して定める必要がある。2つのモデルに対する構造パラメータの推定を行い、次のような知見を得た。

- ① 高層免震建築物の耐震性能と耐風性能を超過確率で評価することで、構造パラメータを推定できる可能性を示した。
- ② クライテリアやモデルによっては、風荷重による免震層の降伏を許容するほうが許容しない場合に比べ、超過確率が小さくなる。

超過確率はクライテリアにより変動するため、クライテリアはコストなどの他の要因も考慮して定める必要がある。

Table 2 Comparison of Minimum Exceedance Probabilities (model2)

| CL_a (rad) | Exceedance Probability (%) | |
|--------------|----------------------------|-------------------------|
| | Case1 | Case2 ($\beta = 3.0$) |
| 1/200 | 1.36 | 6.56 |
| 1/300 | 7.86 | 24.7 |
| 1/400 | 20.6 | 42.9 |

Table 1 Comparison of Minimum Exceedance Probabilities (model1)

| CL_a (rad) | Exceedance Probability (%) | |
|--------------|----------------------------|-------------------------|
| | Case1 | Case2 ($\beta = 2.1$) |
| 1/200 | 0.06 | 0.06 |
| 1/300 | 0.18 | 0.54 |
| 1/400 | 0.66 | 4.48 |

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：生産工学部

氏名：神田亮

研究の結果 (つづき)

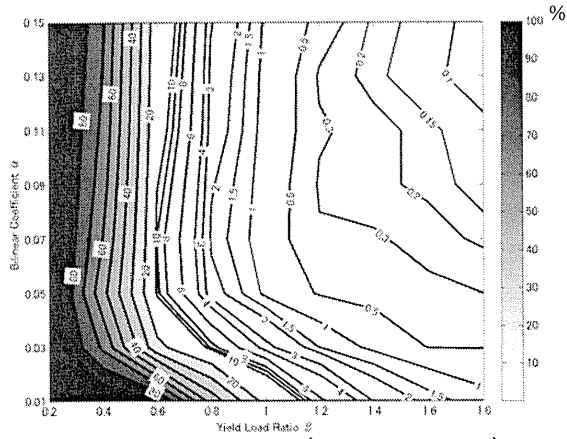


Fig.1 Exceedance Probability (model1:1/200 rad)

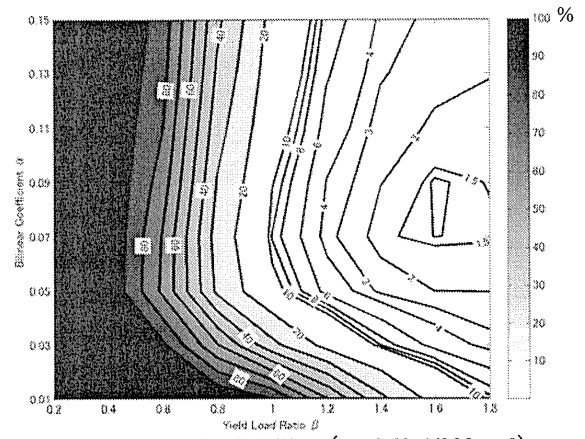


Fig.2 Exceedance Probability (model2:1/200 rad)

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 4月 13日

日本大学 総長 殿

氏 名 邊 吾 一



所属・資格 生産工学部・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------------------------|--|---------------------|
| 1 種目 | 奨励研究/一般研究(個人)/一般研究(共同)/ <u>総合研究</u> | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | ナノ粒子添加による環境低負荷型グリーンコンポジット創製法の開発と評価に関する研究 | |
| 3 研究の目的 | 現存のガラス繊維強化プラスチックの代替としてグリーンコンポジット (GC) を用いる場合に、強度と剛性不足が否めないし、特に高温状態での特性の低下が懸念される。そこで、今世紀に発見された最も重要な新材料一つであるナノ粒子 (チューブ, フレーク, クレイ) をGCに添加・分散させることでGCの力学特性だけでなく、他の物理特性の向上を図り、環境負荷低減型の新しい構造材料を創製し、循環型社会に貢献することを目的とする。 | |
| 4 研究の概要 | 平成20年度に代表者と分担者が実施した研究の概要を以下に示す。 ①ナノ粒子の中でナノクレイを生分解性樹脂のポリ乳酸(PLA)やポリブチレンサクシネート(PBS)に添加し(重量で10%以内)、一様に分散させる方法とその後にペレットを作るための手法を研究経費で設置したペレタイザー(ペレット作成機)を用いて、確立した。 ②ナノクレイを添加・分散させた生分解性樹脂のペレットを用いて、天然繊維の中で、研究実績のあるケナフ繊維に含浸させながら、研究室にある引き抜き機を用いて、ナノクレイ添加一方向ケナフ繊維強化グリーンコンポジットの試験材を成形し、その際に温度、速度等の引き抜き条件の最適化を探索した。 ③ナノクレイを添加・分散させた生分解性樹脂のペレットを溶かして、短繊維のケナフと混合させたペレットを再度作り、実用化を考慮した形状寸法の試験体を研究室にある射出機で成形を行ない、圧力、温度、速度等の射出条件の最適化を探索した。 ④ホットプレス成形機を用いて、ナノクレイを添加したGC板を成形し、その力学特性を評価した | |
| 5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) | ・研究代表者 邊 吾一(生産工学部・教授) 研究の総括, ナノ粒子添加・分散法の開発 ・研究分担者 (役割分担) 青木 義男 (理工学部・教授) 引き抜き成形法の確立 上田 政人 (理工学部・専任講師) 加熱・加圧成形法の確立 高橋 進 (生産工学部・教授) 射出成形法の確立 依田 満夫 (工学部・教授) 高温時の力学特性の解明 今村 仙治 (工学部・教授) 常温時の力学特性の解明 青木 隆平 (東京大学・教授) 物理特性の解明 | |

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

| | |
|------------|----------|
| 部科校名：生産工学部 | 氏名： 邊 吾一 |
|------------|----------|

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

6.1 生分解性樹脂を用いたナノコンポジットの機械的特性に関する研究

生分解性樹脂のポリブチレンサクシネート(PBS)と有機変性粘土鉱物(ナノクレイ)を用いて、熔融混練法によりナノコンポジットを成形し、その機械的特性に及ぼすナノクレイ含有量の影響について、ここでは報告する。

(1) 熔融混練法 母材にPBSペレット(昭和高分子, ビオノーレ#1020, 融点 115°C, 密度 1.26g/cm³, 粒径約 3mm)を用いた。ナノクレイは Southern Clay Products 社製の 3 種類の Cloisite を用いた。それぞれの物性値を表 1 に示す。成形前に PBS のペレットを真空乾燥機(ヤマト科学, ADP300)で 70°C, 3h, -0.1MPa の条件で乾燥を行った。

表 1 ナノクレイの種類と物性

| nanoclay | content (wt%) | XRD peak position 2θ (°) | Interlayer space (nm) | Δd (nm) |
|----------|---------------|--------------------------|-----------------------|---------|
| 10A | powder | 4.51 | 1.96 | — |
| | 3 | 4.02 | 2.20 | 0.24 |
| | 6 | 3.84 | 2.30 | 0.34 |
| 15A | powder | 2.66 | 3.32 | — |
| | 3 | <2 | >4.4 | >1.08 |
| | 6 | 2.35 | 3.76 | 0.44 |
| 30B | powder | 4.74 | 1.86 | — |
| | 3 | <2 | >4.4 | >1.08 |
| | 6 | <2 | >4.4 | >1.08 |

2軸押出機(テクノベル, KZW15TW-45MG, スクリュー径 φ15mm, L/D=45)を用いて, PBS とナノクレイの熔融混練を行った。事前に PBS ペレットとナノクレイを所定の濃度(3 または 6wt%)になるよう計量し, ブリーザーバック内にて攪拌したものをホッパーに投入した。バレル温度 150°C, スクリュー回転 200rpm にて運転し, 混練されたストランドを水冷後, 再びペレット化した。

(2)特性試験 試験片の成形前にナノクレイを含有したペレットを真空乾燥機で乾燥(70°C, 3h, -0.1MPa)させた。その後, 油圧成形機(河中産業, CP-400-254HC)を用いて圧縮成形を行った。成形条件はペレットを 180°C で 10min 加熱後, 自然冷却させた。試験片形状(ASTM D638

TypeV)の金型を用い 3mm 厚の試験片を得た。ナノクレイの PBS 中の分散を JISK0131, X線回折分析通則に準じて, X線回折試験を行った。試験機は X線回折装置(リガク, RINT2100)を用いた。試料には粉体状のナノクレイ単独とナノコンポジット試験片を 1cm 角に切り出して用いた。試験条件は管電圧 40kV, 管電流 20mA, 対陰極に Cu-Kα(λ=0.154056nm), 走査ステップ 0.004°, 走査速度 1°/min, 走査範囲 2θ=2~10°で行った。得られた測定波形は解析ソフト(JADE ver5.0)でスムージングを施した。層間距離 d は測定された回折強度極大(XRD ピーク)の回折角 θ を用いて, 2d・sin θ = λ により求めた。次に, 試験機にオートグラフ, 試験速度 1mm/min, ナノコンポジットで作成したダンベル形状試験片を各 3 本用いて引張試験を行った。また弾性率の算出にはひずみ区間 0.05~0.5%を使った。

(3)結果と考察 (a)X線回折試験(XRD) いずれのナノコンポジットも XRD ピークは低角度側へ移動し, ピーク強度も小さくなった。これはナノクレイの層間に PBS ポリマーが挿入したことによる層間距離の拡大を示す。このことより熔融混練法によって層間挿入型ナノコンポジットを得られたことが確認された。また, 30B>15A>10A の順で層間距離は拡大したが, 使用したナノクレイは施された有機処理の違いにより疎水性に 15A>10A>30B の関係がある。疎水性と層間距離の関係にはある最適値があるものと推測され PBS に対しては 30B が層間距離を拡大する上で適しているといえる。

(b)引張試験 ナノクレイの含有率を変化させた時の引張強さおよび弾性率は 3 本の平均値で検討した。引張強さはナノクレイの含有量の増加と共に低下した。これは PBS/ナノクレイの界面相互作用が弱いためと考えられる。一方, 弾性率はナノクレイ含有率の増加するにつれて向上する傾向を示した。これはナノクレイが鉱物を原料とする事によるものと考えられる。バラツキに関してナノクレイの含有により PBS 単体と較べ大きくなる。また, 層間距離の拡大と機械的特性との因果関係は必ずしも見られず, 層間距離拡大が最も少ない PBS/10A が弾性率・強度ともに高い値を示した。このことからナノコンポジットの機械的特性はナノクレイの分散状態のみならず PBS/ナノクレイの界面相互作用の影響も受けると考えられる。

(4)まとめ 2軸押出機を用いた熔融混練法により PBS/ナノクレイコンポジットを成形したが, XRD 試験より層間挿入型のナノコンポジットが得られたことを確認した。引張試験より弾性率がナノクレイ含有率の増加とともに向上し, PBS/10A (6wt%)において PBS 単体と比べ 90%向上した。一方, 強度は低下し PBS/15A (6wt%)において PBS 単体と比べ 21%低下したため, PBS の表面処理を施すことを今後の課題とし, 本結果をグリーンコンポジットに応用する。

| | |
|------------|---------|
| 部科校名：生産工学部 | 氏名：邊 吾一 |
|------------|---------|

研究の結果 (つづき)

6.2 引抜成形法によるケナフ繊維強化グリーンコンポジットの開発と機械特性

ここでは、撚り糸状ケナフ繊維束と生分解性樹脂からなるグリーンコンポジットの成形手法の開発とその高温時も含めた引張り特性を実験で評価した。生分解性樹脂には植物由来のPLA (Poly lactic acid) と、現在は石油由来であるが、植物から取り出す研究が行われているPBS (Poly butylene succinate) を用いた。

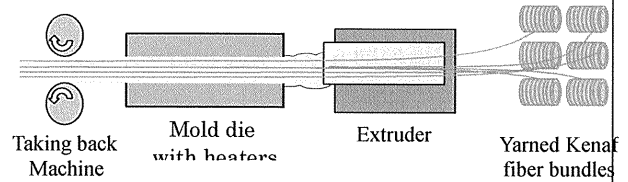


図1 引き抜き成形法の各装置の略図

(1)構成材と成形法 連続成形である引抜成形を行うために連続繊維である撚り糸状ケナフ繊維束(ユニパックス製、繊維直径 0.8 mm)と押出機に投入するPLAペレット(三井化学製、粒径約 4 mm)とPBSペレット(昭和高分子製、粒径約 3 mm)を用いた。また、PLAのガラス転移点は58℃、融点は148℃であるが、PBSは熱変形温度の97℃まで室温と同じ特性を示し、融点は114℃であった。成形には図1に示すように、押出機と引取機を使用した。熱硬化性樹脂の場合は一般的に樹脂槽を用いるが、今回は熱可塑性の樹脂を用いたので、樹脂を溶融して液状化するために用いた押出機が重要な役割を担っている。強化繊維として、ボビンに巻いた撚り糸状ケナフ繊維束(以後ケナフ繊維と示す)を40本用意した。その束をまず押出機に通し、ケナフ繊維に融解した樹脂を含浸する。次に、形状を整えることと樹脂と繊維の含浸性を高めるために加熱した金型(断面寸法 15×2mm)に通し、引取機で引き抜いた。金型の入口に余分な樹脂が溜まりそれにより繊維に張力をかけた状態で成形することが可能となった。また、押出機を通り抜けた繊維と樹脂は金型を通過することで徐々に冷却されるが、最後の引取機により成形速度を調節した。この成形方法を用い、PLAを用いた試験体とPBSを用いた試験体の二種類の複合材を成形したが、それぞれの最適成形条件を検討した。

(2)静的引張試験 成形した連続的な試験体を160mmずつにダイヤモンドカッターにより切断し、2×15×160mmの短冊状にした。標点間距離が100mmとなるように両端にタブを接着し試験片とした。試験速度1mm/minで引張試験を行った。静的引張試験結果を表2に示す。比較のために加熱圧縮成形した0°繊維強化材(UD0°)の試験結果を併せて示す。引張試験結果からPLA/Kenaf材における引き抜き成形品の引張強度は樹脂単体と比べて約3倍の値を示し、弾性率においては約4倍の値を示した。また、PBS/Kenaf材における引抜成形品の引張強度は樹脂単体と比べて約3倍の値を示し、弾性率においては約12倍の値を示した。更に引抜き成形品は、織物を加工して一方向材を用いた加熱圧縮成形品のUD0°と比較してPLAを用いた試験体とPBSを用いた試験体は共に、引張強度および弾性率が向上し、高強度の複合材を成形することができた。両成形法においては、同じ繊維束を用いたが、成形後の繊維直径が異なることから、引抜成形において張力をかけた状態で成形できていることが確認できる。また、加熱圧縮成形では張力がかかっていない状態で成形したことから、加熱圧縮時に繊維の撚りを緩めてしまい、試験体の表面写真から見て取れるように繊維方向が引張方向から傾いてしまう。引抜成形では張力を掛けながら成形したことで繊維方向が引張方向とずれないため、引抜成形法による引張強度・弾性率の向上が達成できたと考えられる。

表2 グリーンコンポジットの静的試験結果

| | | Vf [%] | Tensile strength [MPa] | Young's modulus [GPa] |
|-----|--------------------------|--------|------------------------|-----------------------|
| PLA | PLA alone | 0 | 54.9 | 3.4 |
| | Hot press molding UD 0° | 38 | 112.3 | 11.8 |
| | Pultrusion molding UD 0° | 30 | 152.4 | 13.5 |
| PBS | PBS alone | 0 | 30.4 | 0.8 |
| | Hot press molding UD 0° | 38 | 86.2 | 8.8 |
| | Pultrusion molding UD 0° | 27 | 98.3 | 10.2 |

(3)高温下での引張試験 常温では、PLA樹脂を用いた複合材の方が高い引張り特性を持っていたが、高温下での引張試験を行い、高温下での引張り特性について評価した。これまでの試験機に高温槽を設置して試験温度25, 50, 100℃において試験を行った。PLA単体ではガラス転移点の58℃に近づくため、軟化し、50℃以上では結果を得られなかった。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

| | |
|------------|---------|
| 部科校名：生産工学部 | 氏名：邊 吾一 |
|------------|---------|

研究の結果（つづき）

次に PLA/Kenaf 材ではケナフ繊維を複合していることにより 50℃においても常温の約 6 割の強度を示したが、100℃では PLA 単体と同様に結果は得られなかった。PBS 単体では 100℃では結果を得られなかったが、PBS/Kenaf 材は 100℃においては常温の約 5 割の強度保持を示した。これより、PLA と PBS 両方の樹脂において、ケナフ繊維の補強効果による高温下での引張り特性の向上が確認できた。

引抜成形法と加熱圧縮成形法により作成した PLA/Kenaf 材と PBS/Kenaf 材の高温下での引張試験の結果を表 3 に示す。

25℃において、引抜成形品、加熱圧縮成形品ともに PLA/Kenaf 材は PBS/Kenaf 材より高い値を示した。そして、50℃において、PLA/Kenaf 材と PBS/Kenaf 材の引張強度は近い値となり、100℃において、PLA/Kenaf 材の引張強度は樹脂の軟化により結果を得られなかった。それに対し PBS/Kenaf 材は常温の約 5 割の強度保持を示した。また弾性率においても、25℃では、PLA/Kenaf 材の方が PBS/Kenaf 材よりも高い値を示したが、50℃において PLA/Kenaf 材と PBS/Kenaf 材の弾性率は近い値となり、100℃において、PLA/Kenaf 材の弾性率は樹脂の軟化により結果を得られなかった。それに対し PBS/Kenaf 材は 7 割以上の弾性率を保持した。これらの結果より PBS/Kenaf 材の方が、PLA/Kenaf 材よりも高い耐熱性があることを示した。

(4)グリーンコンポジットの FRTP 開発 前述の引抜成形法では、幅 15mm、厚さ 2mm のグリーンコンポジットを連続的に成形することができたが、より幅の広い板材、あるいは厚い板材を成形するために、このグリーンコンポジットを用いることが可能である。このグリーンコンポジットは熱可塑性樹脂で成形されているため、CFRP でのプリプレグ材と同じように使用できるが、プリプレグ材よりも取り扱いがはるかに容易である。その可能性を検討するために、引抜成形法により作成した PBS/Kenaf 材を積層して加熱圧縮成形により一方向材板の成形を行った。引抜き成形の PBS/Kenaf 材を金型に 3 プライとなるように一方向に積層した。積層した PBS/Kenaf 材を加熱圧縮成形法にて、4×70×200mm の複合材料板を作成した。この一方向材板を成形品 A とする。この成形品 A から 4×20×200mm の試験片を 3 本、切り出し引張試験を行った。結果として代表的な応力-ひずみ曲線を図 2 に示す。比較のため、引抜成形品(PBS/Kenaf)の引張試験の結果を併せて示す。成形品 A と引抜成形品は強度、弾性率ともに近い値を示した。これにより、引抜き成形品を FRTP 材として用いて圧縮成形による板材の成形が可能であり、引張特性も不変であることを示した。

(5)まとめ 撚り糸状ケナフ繊維束と押出機を用いた、引抜成形法によりグリーンコンポジットの連続成形が可能であることを示した。撚り糸状ケナフ繊維束を PLA、PBS に複合化させることで生分解性樹脂の強度・弾性率の改善が可能であることが確認できた。また高温下の引張試験結果から、高温においても、ケナフ繊維の補強効果が確認できた。引抜成形では、撚り糸状ケナフ繊維束に張力をかけながら成形することにより、高い引張強度と剛性を与えることを示した。高温下において PBS/Kenaf 材の方が、PLA/Kenaf 材よりも高い引張り特性を示した。このことから PBS の高い耐熱性を確認できた。繊維体積含有率の異なる PBS/Kenaf FRTP 材による板材の成形が可能であることが示せた

表 3 グリーンコンポジットの高温引張り特性

| Test temperature [°C] | Tensile strength [MPa] | | | |
|-----------------------|------------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | PLA kenaf UD 0° | | PBS kenaf UD 0° | |
| | Pultrusion molding | Hotpress molding | Pultrusion molding | Hotpress molding |
| 25 | 152.4 | 112.3 | 98.3 | 86.2 |
| 50 | 92.4 | 81.7 | 84.1 | 85.7 |
| 100 | N.A. | N.A. | 51.6 | 50.4 |
| Test temperature [°C] | Young's modulus [GPa] | | | |
| | PLA kenaf UD 0° | | PBS kenaf UD 0° | |
| | Pultrusion molding | Hotpress molding | Pultrusion molding | Hotpress molding |
| 25 | 13.5 | 11.8 | 10.2 | 8.8 |
| 50 | 8.7 | 6.6 | 8.0 | 8.7 |
| 100 | N.A. | N.A. | 7.8 | 7.0 |

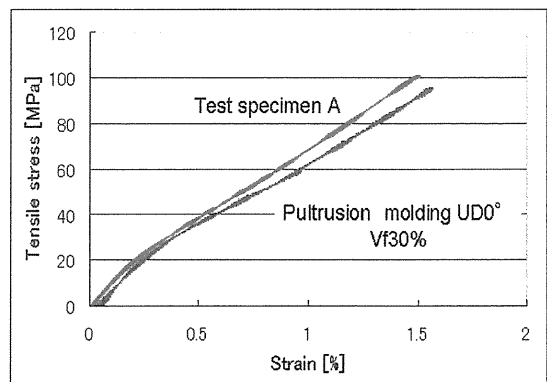


図 2 両成形法による引張り強度の比較

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

| | |
|--------|---------|
| * 課題番号 | 総08-013 |
|--------|---------|

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 5月 15日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 武内 惇



所属・資格 工学部情報工学科・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|--------------------------|--|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 総合大学としてスケールメリットを活かす安心安全ユビキタスプラットフォームの研究 | |
| 3 研究の目的 | <p>学生が安心して学べる大学、父母が学生を安心して託せる大学、教職員が安心して働ける大学を教育の情報化と言う視点で、大学のブランド化も視野に入れながらIT化にメスを入れ、成績・取得単位などの重要な個人情報を確実に管理し、安全で多機能なサービスを提供するための基盤となるシステムと提供サービスを追求する。</p> <p>すなわち、キャンパスライフをサポートするための基盤となる個人認証やユビキタスプラットフォームとしてのあり方及び、安心安全をサポートするための既存サービスや新たなサービスの提供方法について明らかにする。特に、学部ごとに異なる複数のITシステムによる既存サービスを効率的に統合・連携し、安心安全に結びつく新たなサービスを効率的に提供するための個人認証法とユビキタスプラットフォームを確立して各種サービスの統合・連携を実現する。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>総合大学のスケールメリットを活かしたITシステムの構築には、個人認証の「ワンサイン・アクセス」が重要な要素となる。その基本たるべき「学生番号」が学部ごとに作成され、運用法も異なるため、「ワンサイン・アクセス」ができないような状況にある本学に求められるユビキタスプラットフォームは、以下の要件を満たす必要がある。① セキュリティを強化した「ワンサイン・アクセス」の実現、② 学部ごとに異なる既存ITシステムのサービスを継続して提供、③ 新たなサービスを全学共通サービスとしてタイムリーに提供。各学部の既存のサービスを継続するとともに、新たなサービスを柔軟かつ効率良く提供できる拡張性の高いプラットフォーム。即ち、既存システムがそのまま使用できるユーザーに優しい改革ができること、新たなサービスは全学共通で、柔軟に効率良く提供できるプラットフォーム構想が必要である。そのため、既存のサービスは、SOAに基づく「サービスバス」により今まで通りの提供を維持するとともに、新たなサービスはSaaSに基づく学術総合情報センターをハブとするネットワークを介して効率良く提供できる。</p> | |
| 5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します） | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 武内 惇 ・研究分担者（役割分担） 関根 好文（仕様設計・評価） 泉 隆（仕様設計・評価） 荒関 仁志（システム設計・開発・評価） 金子 正人（システム設計・開発・評価） 藪田 孝造（システム設計・開発・評価） | |

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

部科校名：工学部

氏名：武内 惇

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

1. 「ICカード学生証」によるサービスへの「ワンサイン・アクセス」の検討、実験

(1) 「ICカード学生証」の検討

- ①ICカードに記録する個人情報の検討を行った。
- ②ICカード用の学生基本番号「日本大学版コードブック」の検討を行った。
- ③各学部システムの個人認証の分析を行った。

(2) 「ICカード学生証」の実証実験

理工学部ならびに工学部において、授業への出席状況のデータ収集を行う出席システムを開発した。それぞれのシステムは、学部間のデータ連携実験のことを考えて、異なるシステムとした。

(a) 理工学部システム[1]

目的：ICカードを利用して、いつでもどこでも出席をとることができ、かつ各種問い合わせに対しフレキシビリティに応える、日大グローバルを視野に入れたオンライン出席管理システムの開発を目的とする。出席管理システムのプロトタイプシステムの開発およびシステムの検討を行った。

システムの概要

RFIDのICチップ情報を読み取ることのできる出席ボード端末（以下、ICカードリーダー）とその情報を受け取るためのサーバとでシステムを構成する。ICカードリーダーとサーバはネットワーク（HTTP通信）を介して接続し、クライアント（以下PC）からWebブラウザにより情報を参照するものとする。

システムの機能

ICカードをリーダーにタッチすると、リーダーはそのICカード情報等を、ネットワークを介して指定されたサーバにHTTP送信する。送信内容は、ICカードに一意に付与されたユニークなID（カードID）、リーダーに割当てられた端末ID（リーダーID）そしてタッチした時刻である。

(i) データベース

データの検索を容易にするため、データベース管理システムを利用した。データベースは、学生情報、カード情報、ログ情報、端末情報、時間割情報の5つのテーブルを基本として構成した。

(ii) システム機能

本システムで開発した機能を次の表に示す。

| | |
|----------------|---|
| 利用者登録 | 学生情報やカード情報など、利用者情報の登録機能。 |
| ログ参照 | 特定の日時に、誰が・いつ・どこでリーダーにタッチしたかなどを参照できる機能。検索オプションを用いることで詳細な絞込みも可能。 |
| 在室管理 | 在室状況を確認できる機能。検索オプションを用いることで詳細な絞込みも可能。 |
| メール通知 | メールアドレスを登録することにより、リーダーにタッチしたときにタッチしたことをメールで通知する機能。タッチした学生の安心機能。 |
| データ転送 | 端末に指定してあるサーバへ送られてきた情報を、リアルタイムに別のサーバに転送する機能。他学部履修や図書館利用などに対応可能。 |
| インポート | エクセルファイルなどに記録された学生情報を、データベースにインポートする機能。紙やバーコードリーダー等による出席を考慮。 |
| 授業時間ごとの出席（未実装） | タッチした時刻およびリーダーIDによって、授業ごとに対応付けを行い、授業単位に出席一覧で表示する機能。 |

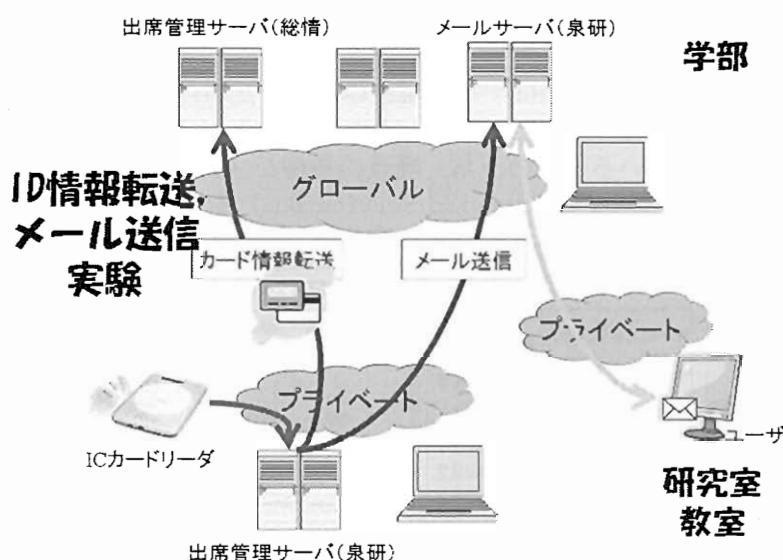
動作実験および検討

開発システムの動作実験として、まず研究室に出席管理サーバおよびICカードリーダーを設置し、研究室学生を対象に出席管理を行った。次に、日大グローバルを想定し、図のような他学部へのデータ転送も視野に入れた実験環境とした。データ転送実験は、理工学部（船橋）から総合学術情報センター（所沢）とした。開発したシステムでは、サーバ機能、データベース機能、データ転送機能など、正常に機能稼動することが確認できた。引き続き、図の形態での実験を継続している。

部科校名：工学部

氏名：武内 惇

研究の結果（つづき）



まとめ：

IC カードを利用したオンライン出席管理システムのプロトタイプを開発し機能の確認を行った。本システムの特徴は次の通りである。

- ・いつでもどこからでもリーダ端末があれば出席をとることができ、そして閲覧することができる。
- ・その他の方法でとった出席ファイルもサーバに転送すれば同様に扱うことができる。
- ・サーバ間のデータ転送機能を利用することで日大全域を対象とする出席管理システムとすることができる。

本システムの利用により、教師の出席をとる手間・時間の削減のほか、メール送信機能等により学生自身が自ら確認でき安心感向上などにもつながる。一方、サーバ間データ転送機能により日大グローバルでの利用ができ、相互履修による出席確認のほか他学部図書館利用等に対して有効に機能するものと考えられる。

(b) 工学部システム[2]

- ・出席システムの基本機能の確認のために開発した。
- ・カードの番号、学籍番号、入室時刻、退出時刻を蓄積し外部からも参照可としている。
- ・安否システムと連携し、欠席時、本人からの状況報告を可能としている。

(3) 残された課題

サービスへの「ワンサイン・アクセス」の実現法については来年度検討する。

2. SOAに基づく「サービスバス」の検討[2][3]

サービスの分析技術、および、サービスバスの使用法に関する研究を行った。

(1) サービスの分析

サービスの考え方とサービスを既設のシステムから分割する方法、サービスを構成するサービスコンポーネントの決定法について研究した。以下に概要を示す。

(a) サービスの考え方とサービスの分割法

業務システムを構成する「サービス」は作業者が作業を進めるために価値のある「情報（データ）」であると考え、サービスとサービスを受ける作業者の作業の進め方と情報の流れについて分析を行

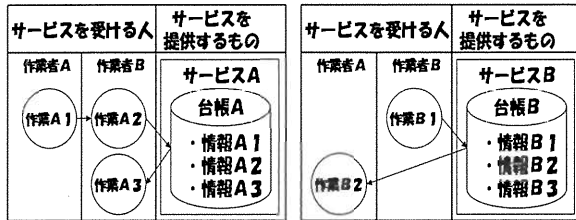
部科校名：工学部

氏名：武内 惇

研究の結果（つづき）

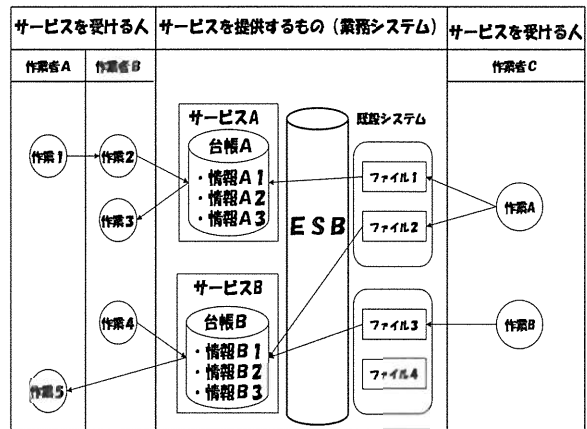
う. すなわち, 図1に示すように, 作業者の作業フローを作成し, その中に業務システムが入手, または, 提供する情報を示す. 次に, 提供する情報を作成するために必要となる情報を台帳と呼び, 台帳が作業者に価値のある情報を提供する「サービス」であるとする (サービスの抽出).

さらに, 台帳に格納されている情報のうち, 既設の業務システム (外部システム) との間で入手, または, 提供するものは全て ESB (Enterprise Service Bus) を介して, 既設の業務システムとの間で入手, または, 提供すると考える (サービスの連結). サービスの抽出とサービスの連結により, 業務システムを構成するサービスを分割する.



(a) サービスの抽出

図1. サービスの分割法



(b) サービスの連結

(b) サービスコンポーネントの決定法

サービスは, サービスコンポーネント (以下コンポーネントと記す) というサービスを実現するためのプログラムにより構成する. ESB を介したサービス間の連携を容易にするために, コンポーネントの役割を明確にし, コンポーネントの構成を標準化する. このため, オフィスワークプロセスをモデル化する OSCAR プロセスモデル (以下 OSCAR モデルと記す) に基づいて, コンポーネントを構成する (表1, 図2).

表1 OSCAR モデルの分類

| OSCAR分類 | 要件 | コンポーネントの役割 |
|------------|--------------------|---------------------------------------|
| Order | 作業場の設定 | サービスが働けるようにするための外部システムへの情報入手・提供に関する指示 |
| Stream | UIからシステムへのデータ入力・蓄積 | サービスと外部システムとの間のデータの送受 |
| Coordinate | ユーザとシステム間の情報交換 | サービスと作業者の間の情報の送受 |
| Action | データの加工・操作 | 台帳に格納される/されているデータの加工 |
| Report | ユーザへの情報提示 | サービスから作業者への情報の提示 |

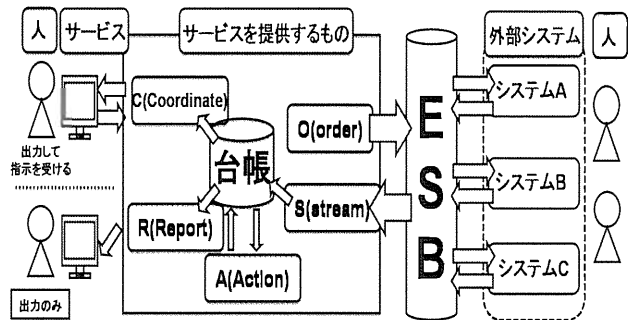


図2 サービスコンポーネントの構成

(2) サービスバスの検討

本研究における SOA サービスとは、親元から離れている学生が授業に出ているか、健康状態は良いかを学生の父母が知るために使用することを目的としたサービスである。学生の出席情報閲覧はシステムに既設の出席システム、学生の状況情報の確認のために既設の安否システムを利用し、両サービスを連携させた構成とする。(図3)

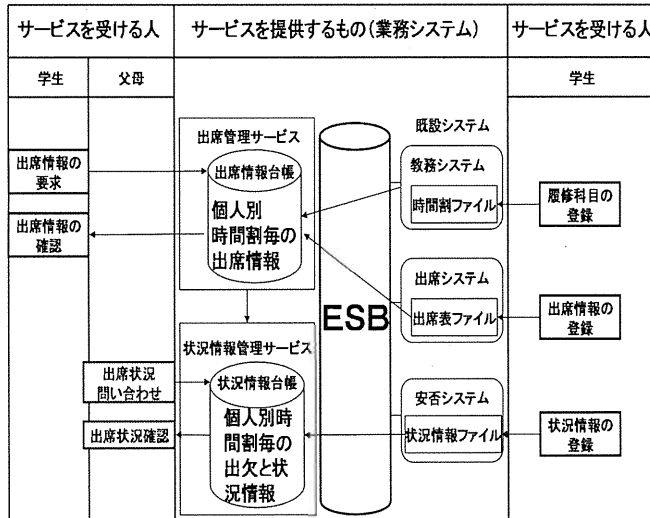


図3 学生サービスの作業フロー分析

次に、学生サービスを事例に用いた際のサービスコンポーネントの構成を、学生が出席情報の登録を確認する場合を例に説明する。

学生が出席情報の登録を確認するためには、まず、Coordinate で学生の特定を行う。次に、個人の時間割を特定するために教務システムに対する Order で時間割表ファイルの要求を行い、Stream で個人の時間割を出席情報台帳に取り込む。

さらに、出席システムに対する Order で出席表ファイルの要求を行い、Stream で個人の出席状況を出席情報台帳に取り込む。出席情報台帳に取り込んだ時間割と出席状況のファイルを Action で時間割ごとの出席情報として追加する。最後に、Coordinate で学生は自分の出席情報の登録を確認することができるという流れになっている(図4)。

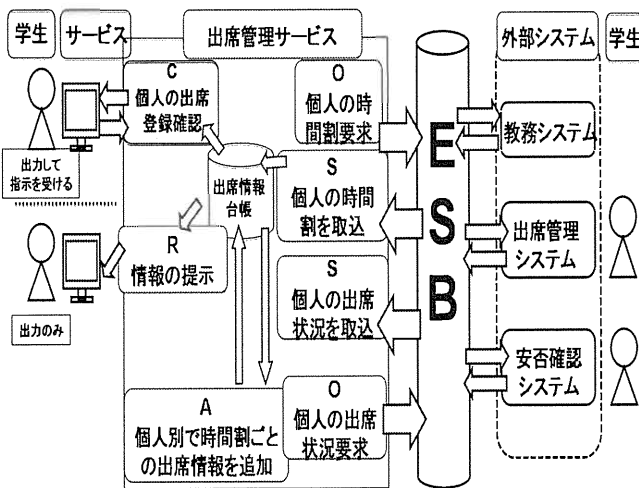


図4 学生サービスのサービスコンポーネントの構成

部科校名：工学部

氏名：武内 惇

研究の結果（つづき）

（3）まとめ

今回、EBSには富士通（株）のInterStageを使用し、出席システムと安否システムに関するアダプタプログラム、学生サービス（利用者インターフェースプログラム）を開発し、それらを連結して学生サービスシステムを試作した。学生サービスシステムを試作し、今回考案した、①サービスの分割法、②サービスコンポーネントの分割法が使える見込みが得られた。また、SOAに基づくシステム構成法、特に、ESBの使用法についての理解することができた。

（4）今後の課題

(a)サービスの分析

サービスの分割法とサービスコンポーネントの分割法の基本を決定することはできたので、さらに、複雑なシステムへの適用、性能面からの考察を行う。

(b) サービスバスの検討

実務での使用を可能とするため、応答特性やガバナンスの仕組みを考慮したコンポーネントの構成法を検討する。

3. 新たなサービスを全学共通サービスとしてタイムリーに提供する Saas 技術の検討

各学部ではいろいろなサービスを装備しており、Saasに基づいて新規に開発するよりもハブとなる総情センターコンピュータ設備の軽量化・低価格化を図り、システムの管理運用費の低減も図ることができるため、Saas技術の採用検討は中止した。

4. 文献

- [1] 泉隆，一倉昌平，関根好文，荒関仁志，武内惇，藺田孝造，ICカードを利用したオンライン出席管理システム，平成20年度日本大学理工学部学術講演会、A2-1（2008-11）。
- [2] 鈴木孝秀，金子正人，武内惇，藺田孝造：SOAにおけるサービス連携法に関する一考察、電子情報通信学科東北支部連合大会、2008.8
- [3] 鈴木潤，鈴木孝秀，金子正人，武内惇，藺田孝造：SOAにおけるサービス分割法に関する一考察 平成20年度情報処理学会東北支部研究会 2-2 2009.3

以上

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 20 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 松本 絃一



所属・資格 医学部・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------------------------|---|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 進行性腎障害に対する PI ポリアミドによる遺伝子治療の開発 | |
| 3 研究の目的 | 慢性糸球体腎炎を含めた進行性腎障害の薬物療法は未だ有効なもの無く、新規治療薬の開発が急務である。我々は工学部、薬学部と共同で TGF-β1 をターゲットにゲノム化学に基づいた新規遺伝子制御薬ピロールイミダゾール(PI)ポリアミドの創薬開発を行い、腎傷害への著明な改善効果を認め、実用化に近づける必要がある。また全身性エリテマトーデス(SLE)も進行性腎障害を起こすが、この原因に IgG Fc 受容体(FcR)γ鎖が関与を羅らは見いだした。今回の総合研究では TGF-β1 に対する PI ポリアミド実用化の為薬物動態、GLP 創薬開発と FcRγ鎖 PI ポリアミドの設計、合成から in vitro 実験、さらに SLE マウスを用いた動物実験を行う。 | |
| 4 研究の概要 | TGF-β1 に対する PI ポリアミドの薬物動態を UV による HPLC での検出システムを構築した。PI ポリアミドの基礎物性として溶解度、LogD、安定性、細胞透過性を評価した。PI ポリアミドは FcRγ鎖プロモーターの基本転写領域に近く、基本転写に関係している領域に対し、8塩基対を認識するよう設計した。PI ポリアミドのターゲットへの結合はゲルシフトアッセイにて確認した。PI ポリアミドの FcRγ鎖プロモーター活性に対する効果は、293 細胞に発現ベクターを導入し、種々濃度の PI ポリアミドを添加し、プロモーター活性を測定した。PI ポリアミドの腎メサンジウム細胞での FcRγ鎖 mRNA 発現、蛋白発現に対する効果を real time PCR、蛋白発現を Western blot で評価した。FcRγ鎖に対する PI ポリアミドの in vivo での取り込み FITC ラベル FcRγ鎖に対する PI ポリアミドを尾静脈から投与、24、48 時間後に各臓器を摘出し、無染標本で紫外線で PI ポリアミドの取り込みを評価した。またラベルしていない FcRγ鎖に対する PI ポリアミドをマウスに投与し、血液と尿での PI ポリアミドの量を、先の UV HPLC システムで評価した。 | |
| 5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 松本 絃一 (研究の総括、腎臓を用いた実験指導) ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 羅 智靖 (IgG 受容体に対する PI ポリアミドの研究) 齋藤 烈 (ポリアミドの化学修飾、分子設計) 松本 宜明 (PI ポリアミドの物性、薬物動態) 福田 昇 (PI ポリアミドの開発実験) 上野 高浩 (PI ポリアミドの開発実験) 杉山 弘 (PI ポリアミドの設計、合成) | |

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

部科校名：医学部

氏名：松本統一

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

1. マウス FcR γ 鎖遺伝子プロモーターの転写調節機能の検討

マウス FcR γ 鎖プロモーターの転写調節領域の詳細は報告されていないため、医学部内科松本統一研究グループでは、先端医学系羅研究グループと共に、ヒト FcR γ 鎖の構造からマウスゲノム FcR γ 鎖のプロモーター配列を決定し、TFSEARCH プログラムにて転写調節領域を予想した。これを基に、マウス遺伝子 DNA からプロモーター領域 DNA を PCR 法にて作成し、塩基配列をシーケンサーにて確認した後、プロモーター機能解析用ベクターである pGL-3 Basic に挿入し、マウス FcR γ 鎖プロモーター発現解析用ベクターを作成した。このマウス FcR γ 鎖プロモーター発現ベクターを基に、転写開始部位より上流へ様々な長さのプロモーター遺伝子フラグメントを作成し、さらにこれらのフラグメントを挿入したデリーションミュータントベクターを作成した後、それぞれをリポフェクタミンを用いて培養 293 細胞に導入し、無刺激と Phorborester miliacetate (PMA)、LPS、TNF- α 刺激でのルシフェラーゼ活性を指標に主要転写調節領域を決定し、PI ポリアミドのターゲットとした。

これとは別に羅研究グループにおいて、ヒトおよびラット FcR γ 鎖プロモーターの詳細な機能解析を行った。デリーションミュータントベクターなどを用いた方法にて、転写に重要な役割を担う領域絞り込み、さらに一塩基変異導入ベクターと転写因子との組み合わせによる *in vitro* での発現解析実験を繰り返し、FcR γ 鎖遺伝子発現調節において主要な役割を担う領域の同定と、これらの領域で転写にかかわっている転写因子の絞り込みを行った。これらの結果をさらにチップアッセイなどを用いて確認した。以上の検討により新たに同定された転写因子結合領域も PI ポリアミドのターゲット領域とした。

2. マウス FcR γ 鎖プロモーターに対する PI ポリアミドの分子設計

京都大学杉山、工学部齋藤と医学部羅研究グループで FcR γ 鎖プロモーターに対する PI ポリアミドの分子設計を行った。

1 で同定したマウス FcR γ 鎖遺伝子発現に重要な役割を担う転写因子の結合ターゲット配列に対して、まずマウス FcR γ 鎖遺伝子発現のノックダウンを目的に、PI ポリアミドによりマウス FcR γ 鎖プロモーター活性を完全に抑制するため、FcR γ 鎖プロモーターの基本転写領域に近く、基本転写ユニットに含まれる転写因子の結合に関わる領域に対して PI ポリアミドを設計した。

さらに、マウス FcR γ 鎖遺伝子発現の病的状態（血管内皮障害時やループス腎炎発症時）での抑制は NRF-2 領域、AP-1 領域など、その転写調節と疾病との関連がすでに示唆されている転写因子のプロモーター上の結合配列に競合して結合する PI ポリアミドを設計した。この場合は、生理的活性には影響を与える可能性が低く、各疾病ごとの治療薬として選択的に投与することができ、副作用が極めて少ないと考えられる。

PI ポリアミドの構造はループ型とし、3 塩基と 2 塩基の間に β リンカーを入れた 3- β -2 の構造を基本とし、DNA の 8 塩基対を認識するよう設計した。

3. PI ポリアミドの薬物動態の検討

薬学部の松本宜明研究グループでは静脈投与を想定し、UV による HPLC で代謝産物を検出システムを確立し、PI ポリアミドの血清と分子量 1000 の代謝用 PI ポリアミドと分子量 1700 の TGF- β 1 に対する PI ポリアミドの薬物動態を検討した。その結果、PI ポリアミドは通常の薬剤と同様に血清での線形性減衰をしめし、尿中排泄が殆どで、一部胆汁性排泄であることが確認された。AUC も検討し、同様に線形性を示していた。

また医学部腎臓高血圧内分泌内科で腎臓、大動脈、心臓、肺、肝臓、脳での TGF- β 1 に対する PI ポリアミドの取り込みを観る為、FITC ラベル PI ポリアミドを DMSO に溶解して、Wistar ラットの尾静脈から iv し、1 日、7 日、14 日目にラットを貫流し、各臓器を取り出し、核染色をした後、蛍光顕微鏡を用いて FITC ラベル PI ポリアミドの取り込みを評価した。FITC ラベル PI ポリアミドは腎尿管、大動脈中膜、肝臓、肺の核によく取り込まれ、さらに PI ポリアミドは最低でも 14 日後までは核内ににとどまり、標的配列に結合している事が明らかとなった。心臓、脳にも投与 1 日後には取り込まれていたが、その後は徐々に減衰した。

4. PI ポリアミドの基礎物性について薬学部で検討

溶解性試験

分子量 1700 の PI ポリアミドは精製水、0.1%酢酸に溶解され、メタノール、エタノール、アセトニトリルには殆ど溶解しなかった。薬剤としては粘性があり、凍結乾燥の際の粘性と考えられた。

部科校名：医学部

氏名：松本紘一

研究の結果（つづき）

5. PI ポリアミドの安全性試験

薬学部でマウスに MW1000 の代謝マップ用 PI ポリアミドを 22-80 mg/kg の量で one bolus で静注したところ、5匹のマウスの内3匹は iv 直後に死亡した。致死量は 40 mg/kg 以上であった。また 20 mg/kg ではマウスは5日間全く元気で、5日目の血液検査では肝機能、腎機能に異常が無く、20 mg/kg 以下のポリアミドは副作用が無く、安全であることが分かった。従って ED50 は 30 mg/kg と考えられた。

6. FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドのリード化合物の決定

2. で分子設計した複数の FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドを島津製 PMMS-8 ペプチド合成機にて、Fmoc 固相自動合成で合成した。合成した PI ポリアミドの効果を評価するため、マウス由来単球/マクロファージ cell line である J774 細胞で FcR γ 鎖 mRNA、Fc γ RIII 蛋白発現を認めることをリアルタイム PCR、免疫染色、ウェスタンブロットティングにて確認した。この J774 細胞を用いて FcR γ 鎖 mRNA 発現、蛋白発現に対する in vitro 効果が無刺激及び刺激として PMA、LPS、TNF- α を添加し FcR γ 鎖発現刺激を確認した。

FcR γ 鎖プロモーターの複数の部位に対する PI ポリアミドが合成されているため、これらの中で有効であるものを抽出するための実験をこの J774 細胞を用いて行った。J774 細胞に FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドを 1、0.1、0.01 μ M にて添加し、48 時間後に mRNA を抽出、逆転写後にリアルタイム PCR にて FcR γ 鎖 mRNA 発現を比較した。さらに Fc γ RIII 蛋白発現は、やはり J774 細胞に FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドを 1、0.1、0.01 μ M にて添加し、48 時間後に抗 CD16、32 抗体を用いた免疫染色、FACS 解析で FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドが確実に in vitro で FcR γ 鎖発現を抑制する事を確認し、最も効果の高い PI ポリアミドをリード化合物として設定した。

7. FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドのターゲットへの結合確認

リード化合物の PI ポリアミドを決定し、Biotin ラベル PI ポリアミドとターゲット 2 本鎖 DNA とのゲルシフトアッセイを行った。特異性を確認するために、標的 DNA に 2 塩基置換を入れ、結合性が無くなることを確認した。また mismatches-PI ポリアミドでも、ゲルシフトアッセイを行い、標的 DNA に結合の無いことを確認した。さらにターゲット 2 本鎖 DNA との結合はリアルタイムで BiaCore アッセイで、その結合常数などにて結合能を確認した。

8. SLE マウス (Newzeland Black/White F1) の腎障害の評価

ループスマウスである Newzeland B/W F1 は全てが SLE やループス腎炎を起こす訳ではなく、ある割合でループス腎炎を起こす。30 匹の Newzeland B/W F1 を購入し、マウス用代謝ゲージで蛋白尿を定量し、2ヶ月観察、蛋白尿を示すマウスのみ実験に供した。それらの SLE マウスについて、1) 血液中 Cr, BUN、2) 腎皮質 FcR γ mRNA を RT-PCR で評価し、IgG、C3、CD16、alpha-actinin 免疫染色を、C57B/L6 マウスと比較した。

9. FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドのマクロファージへの作用

リード化合物を用い、in vitro でマクロファージでの CD16 発現を FACS 解析し、その抑制効果を検討した。

J774 細胞を FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドを 1 μ M 存在下で 48 時間培養し、抗 CD16、CD32 抗体を用いた FACS 解析を行い、J774 細胞表面に発現する Fc γ RIII (CD16、32) 蛋白発現に対する PI ポリアミドの抑制効果を in vitro で確認した。

さらに in vivo で FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドを C57B/L6 マウスに 1mg/kg で経静脈的に投与した後 48 時間後に末梢血を採取し、単核球を分離した後に、この単核球分画における Fc γ RIII (CD16、32) 蛋白発現を FACS 解析により評価し、今回デザイン、合成してリード化合物と決定した FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドが in vivo でも Fc γ RIII (CD16、32) 蛋白発現を抑制し、有効であることが確認された。

10. 平成 20 年度において in vivo 実験に移行したが、ループス腎炎マウスでは常に、蛋白尿が出ない事と腎障害まで時間がかかるので、腎障害モデルを急性腎障害を起こす抗基底膜抗体による腎炎 (馬杉腎炎) を in vivo の対象にした。そのためにヤギに基底膜成分を投与し、抗血清を取得した。これからこの抗血清を投与した急性腎炎モデルを作成し、これに対して FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドを投与し、実際の臨床像への効果を評価してゆく予定である。

| | |
|--------|----------|
| * 課題番号 | 総 07-022 |
|--------|----------|

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 3月 20日

日本大学 総長 殿

氏 名 岡田 明子



所属・資格 歯学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------|--|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人) / 一般研究(共同) / 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 片頭痛に随伴する光過敏発症における三叉神経脊髄路核ニューロンの関与 | |
| 3 研究の目的 | <p>片頭痛は有病率が高く、日常生活に支障をきたす疾患である。また、随伴症状として光過敏が知られているが、その発症機構は全くわかっていない。我々は、延髄三叉神経脊髄路核(MDH)及び第2頸髄(C₂)に存在する片頭痛関連ニューロンの解明を電気生理学的に進めてきた。その過程で、片頭痛関連ニューロンのあるものは光刺激に应答することを突き止めた。よって、片頭痛発症に関与する頭部硬膜の炎症により、MDH-C₂領域に分布する光応答ニューロンの活動性増強、および三叉神経節やMDH-C₂領域におけるMAPキナーゼを介した細胞内情報伝達系の亢進などが予想された。また従来より、光の情報は視蓋前域および上丘のみに伝達されるとされ口腔顔面の体性感覚とは異なる情報処理がなされていると考えられてきた。しかし、本研究により光情報によるMDH-C₂領域ニューロン活動の変調機構が解明できれば、片頭痛の治療方法の開発だけに留まらず、医学生理学の定説を覆す重要な発見になるものと期待された。そこで、組織学的研究法や行動学的研究法などを用いて、MDH-C₂領域における片頭痛に随伴する光過敏の神経メカニズムを解明することを目的とした。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>1)片頭痛モデルの作成 ペントバルビタールナトリウム(20mg/kg, i.p.)による適麻酔下、Sprage Dawley(SD)系雄性ラット約300gを脳定位固定装置に置き、ドリルで左側頭蓋前頭骨に直径2mmの小穴を注意深く開け、左側前頭部 transverse sinuses blood vessels と superior sagittal sinuses blood vessels 上硬膜(頭部硬膜)を露出させる。シリコンチューブを硬膜上に植立し、10%マスタードオイル10μl(片頭痛モデル群)またはミネラルオイル(Vehicle) 10μl(コントロール群)をマイクロシリンジポンプにて注入する。</p> <p>2)行動学的研究 ウレタン(1.3g/kg)による浅麻酔下、片頭痛モデル群とコントロール群それぞれにおいて、薬剤注入前後に左眼に強光刺激(2joule)と弱光刺激(0.3joule)を与え、瞬きの回数を測定する。また、カテーテル先端を上頸髄(C₂)領域においた硬膜下カテーテルを植立し、薬物投与を行う。さらに、ペントバルビタールナトリウム(20mg/kg, i.p.)による適麻酔下、左側三叉神経第1枝を切断し瞬き回数を測定する。</p> <p>3)電気生理学的研究 片頭痛モデル群を脳定位固定装置に固定後、C₂領域を露出する。術中の麻酔はイソフルレンを酸素に混ぜて行い、神経活動記録中は臭化パンクロニウムにて非動化し人工呼吸を施す。光刺激に应答する侵害受容単一ニューロン活動を記録する。次に、10%マスタードオイル10μlを頭部硬膜に注入し、ニューロン応答の変化を調べる。</p> <p>4)免疫組織化学的染色 a)延髄三叉神経脊髄路核、第2頸髄の染色 片頭痛モデル群とコントロール群を還流固定し、三叉神経脊髄路核から第2頸髄までの組織を取り出し、40μmの凍結切片を作成する。浮遊切片を10%ヤギ血清にてブロッキングを行った後、一次抗体 pERK (anti-Phospho-P44/42-Map Kinase)、二次抗体(BA-1000)にインキュベートする。その後ABC反応を行い、DABにて発色させる。また各群の左眼に強、弱光刺激を10分間与え還流固定し、同様に pERK 一次抗体にて免疫染色を行う。また、抗 pERK 抗体にインキュベートさせ、次に抗 NeuN 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 Iba1 抗体を引き続きインキュベートさせる。そして、FITC と Rodamine を用いて2重蛍光発色させる。 b)網膜の染色 片頭痛モデル群とコントロール群を還流固定し、両側眼球を取り出す。さらに網膜を取り出し10μmの貼り付け切片を作成する。次に、10%ヤギ血清にてブロッキングを行った後、一次抗体の抗 CGRP 抗体、抗 Substance P 抗体、抗 TRPV1 抗体そして二次抗体(BA-1000)にインキュベートする。その後ABC反応を行い、DABにて発色させる。また、抗 CGRP 抗体、抗 Substance P 抗体、抗 TRPV1 抗体と抗オプシン抗体をインキュベートさせ、FITC と Rodamine を用いて2重蛍光発色させる。</p> | |

部科校名：歯学部

氏名：岡田 明子

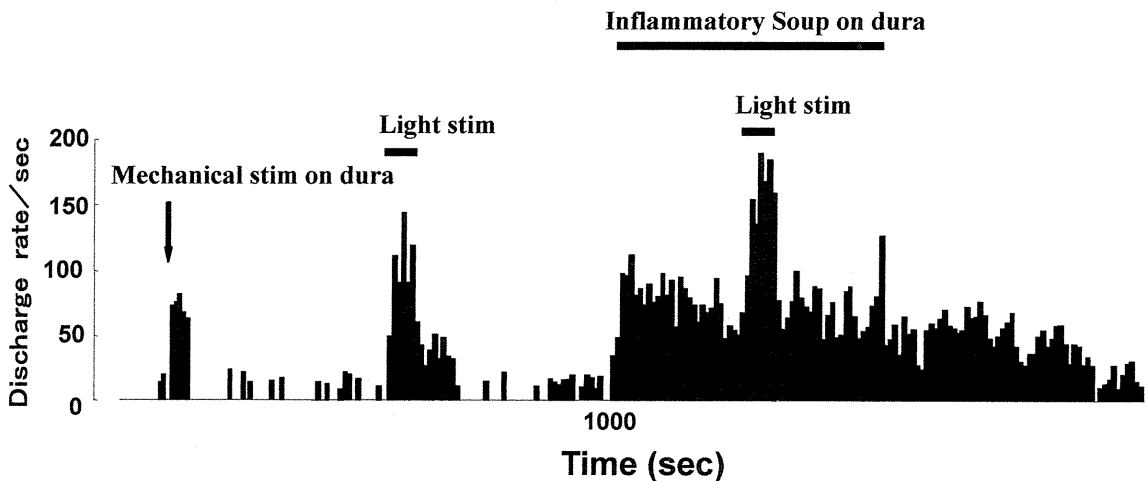
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）

- ・ 研究代表者
岡田 明子
- ・ 研究分担者(役割分担)
 - 今村 佳樹（組織学的検討）
 - 岩田 幸一（モデルの作製、電気生生理学的検討）
 - 坪井 美行（組織学的検討—三叉神経脊髄路核における免疫組織染色）
 - 近藤 真啓（組織学的検討—網膜における免疫組織染色）
 - 草間 貞（薬物注入後の行動解析）

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

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

我々は、まだ解明されていない片頭痛における光過敏発症のメカニズムを調べるために、まず延髄三叉神経脊髄路核(MDH)から第 2 頸髄(C₂)領域に存在する片頭痛関連ニューロンの解明を電気生生理学的に進めた。その過程で、片頭痛関連ニューロンのあるものは光刺激に応答することを突きとめた(下図)。



片頭痛に光過敏が併発するメカニズムにMDH-C₂領域が関与しているという仮説が新たに考えられたが、これまでにMDH-C₂領域に光刺激に応答するニューロンが存在するという報告は全くない。よって、この仮説を証明するために以下の実験を行った。Strassman AMらが1996年にNatureに発表して以来用いられてきた片頭痛モデルの変法として、本研究では、左側頭部硬膜に10%マスタードオイルを投与した片頭痛モデル群と、vehicleのミネラルオイルを投与したコントロール群を作成した。そして、両群の左眼に弱光刺激と強光刺激を10分間与え、片頭痛における光過敏の発症を調べた。しかし、実験を進めるにあたり、新たな神経経路を証明するには注意しなければならない点がいくつか考えられた。視神経は網膜より視蓋前域および上丘へと入力するが、角膜や網膜周囲の筋肉に分布している神経は三叉神経であり、MDH-C₂領域に入力している可能性があった。よって、光刺激が2次的に角膜や網膜周囲筋を刺激して三叉神経を活性化させていないことを確かめた。本実験では全て、右眼は眼帯で覆い光刺激が入らないようにした。また、角膜は乾燥によって刺激されるため、蒸留水を含ませた小コットンを角膜に置くことにより角膜の乾燥を防いだ。光刺激により熱が発生し角膜を刺激することを防ぐため、断熱性の光刺激装置を用いた。さらに、2%キシロカインにより角膜を局所麻酔し光刺激を与えた後、細胞活性マーカーであるERKのリン酸化(pERK)の陽性発現を調べたが、局所麻酔をしない状態での発現と変わりがなかったことから、本実験においては角膜の刺激はないものと考えた。また、電気生生理学的実験時に筋弛緩薬を投与しても光応答ニューロンの活動性は変化しないことから、網膜周囲の筋肉の関与もないと考えた。

次に、片頭痛モデル群において、左側頭部硬膜に10%マスタードオイルを処置した2分後に還流固定し、免疫組織化学的染色を行ったところ、MDH表層からC₂後角表層にわたり多くのpERK陽性発現が見られた。この抗pERK抗体と抗NeuN抗体(ニューロンのマーカー)や抗GFAP抗体(アストログリアのマーカー)、抗Iba1抗体(マクログリアのマーカー)との2重蛍光免疫染色により、pERK陽性発現細胞の多くにおいてNeuN陽性発現が多く認められたが、GFAPやIba1の発現は認められなかった。近年、2次ニューロンにおけるグリアが片頭痛に関与しているという報告がいくつかみられるが、本研究ではグリアの関与は認められなかった。このpERK陽性発現を詳細に調べたところ、特にC₂後角表層処置側において、反対側やコントロール群と比較し有意に増加していることが分かった。さらに、コントロール群の左眼に強光刺激を与え、pERK陽性発現を調べた結果、片頭痛群同様、左側C₂後角表層においてpERK陽性細胞が有意に増加したが、弱光刺激ではpERK陽性細胞は全く認められなかった。一方、片頭痛モデル群に弱光刺激を与えると、片頭痛群(10%マスタードオイル処置のみ)に比べ、pERK陽性細胞が有意に多く発現することを示した。片頭痛における光過敏の行動学的観察として、両群に弱光刺激と強光刺激を与え瞬き回数を測定したところ、弱光刺激、強光刺激ともに、コントロール群に比べ片頭痛モデル群において瞬き回数が有意に増加した。次に、MAPキナーゼキナーゼ選択的インヒビター(pERK阻害薬)のPD98059を硬膜下カテーテルよりC₂領域に3日間持続投与した片頭痛モデル群では、弱光刺激、強光刺激ともに、片頭痛モデル群、コントロール群に比べ、瞬き回数が有意に減少した。

以上の結果より、正常状態では強光刺激が網膜よりC₂後角浅層に伝えられ、同部におけるpERKがその情報伝達機構を担

部科校名：歯学部

氏名：岡田 明子

研究の結果（つづき）

い、弱光刺激には関与しないと示唆された。一方、頭部硬膜の炎症による片頭痛状態では、C₂ 後角浅層の神経細胞に多くの pERK 陽性発現がみられたことから、同部の中枢性感作を引き起こしていると考えられ、弱光刺激も強光刺激と同じようにC₂ 後角浅層に伝えられて pERK がその情報伝達機構を担う可能性が考えられた。そして、弱光刺激でも眩しく感じる光過敏発症の神経メカニズムに強くつながることが示唆された。しかし、従来から光の情報は視蓋前域および上丘のみに伝達されるとされ、口腔顔面の体性感覚とは異なる情報処理がなされていると考えられてきた。つまり、網膜からの光情報が、三叉神経節を経て延髄や脊髄に入力することはないとされている。そこで、神経トレーサーである 10%フルオロゴールド(FG)10 μ l をラット左眼網膜に注入し、その投射部位を詳細に調べてみると、左側三叉神経節第 1 枝領域に投射されていることが示された。さらに、光刺激の入力が三叉神経を介したものであることを調べるために、左側三叉神経第1枝を切断し、MDHからC₂ レベルにおけるニューロンの pERK 陽性細胞発現を調べると、有意に減少していることが分かった。また、三叉神経第1枝を切断した後、再び瞬きの回数を測定した。すると、コントロール群、片頭痛モデル群共に、切断前に比べ弱光刺激、強光刺激による瞬き回数が有意に減少した。

従来、三叉神経節からMDH-C₂ 領域の投射経路は口腔顔面の体性感覚、特に侵害情報を伝達する経路といわれてきた。よって、片頭痛モデルにおいて光刺激を侵害刺激として伝えている可能性を確かめるために、光刺激の受容体が存在する網膜に侵害受容器である、神経ペプチドの calcitonin gene-related protein (CGRP) や Substance P (SP) の受容体、カプサイシン受容体 TRPV1 マーカーの免疫組織化学的染色を行った。その結果、SP は網膜の外網状層と内網状層に、CGRP は内網状層と杆・錐体層に、TRPV1 は外網状層に陽性発現が認められた。さらに、視細胞での発現を確かめるために、視細胞特異的マーカーであるオプシンと各 CGRP 受容体、SP 受容体、TRPV1 マーカーとの 2 重蛍光免疫染色をおこなった。その結果、オプシン陽性細胞の多くでこれら受容体マーカーとの発現陽性がみとめられた。特に、これら受容体のうち TRPV1 の網膜視細胞における存在は今までに報告がなく、新たな発見となった。そこで我々は TRPV1 に着目し、その拮抗阻害剤であるカプサゼピンを網膜に注入し、光刺激に対する瞬き回数を調べた。その結果、(片頭痛モデル+カプサゼピン注入)群は、片頭痛モデル群に比べ弱光刺激、強光刺激による瞬き回数が共に有意に減少したが、コントロール群では変化がなかった。

以上の結果より、頭部硬膜と網膜の求心性神経線維がC₂ニューロンに収束し、MAP キナーゼを介した細胞内情報伝達系を介してC₂ニューロンの変調を生じ、片頭痛時の光過敏が引き起こされる可能性が示唆された。また、光刺激により網膜の外網状層の視細胞に存在する TRPV1 などが活性化され、C線維末梢神経を含む三叉神経第1枝を介して、C₂ニューロンに光刺激が伝達される可能性が示唆された。これらの結果は、片頭痛に随伴する光過敏のメカニズムの一端を解明でき、片頭痛の治療方法の開発につながっていきける可能性を示唆するものである。また、光情報が侵害情報として、網膜に存在する神経を介して三叉神経節とC₂領域へ伝えられるという新たな神経経路を発見することができた。これは医学生理学の定説を覆す重要な発見になる可能性が考えられた。

現在まで以上の結果を順次まとめ、以下のように学会発表を行ってきた。

- 1.Ogawa A, Iwata K, Imamura Y: Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (pERK) in migraine rat model after light stimulation in the spinal trigeminal nucleus (SpV) neuron and trigeminal ganglion (TG). 13th The International Headache Society (Stockholm), 2007 June.
- 2.小川明子、今村佳樹、岩田幸一、片頭痛モデルラットの光刺激により三叉神経脊髄路核に発現する Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase(pERK)陽性細胞の分布様式、第60回日本大学歯学会総会・学術大会、東京、2008年5月17日
- 3.小川明子、今村佳樹、岩田幸一、片頭痛モデルラットの光刺激により三叉神経脊髄路核に発現する pERK 陽性細胞の分布、第30回日本疼痛学会、福岡、2008年7月19、20日
- 4.Ogawa A, Iwata K, Imamura Y. pERK in upper cervical spinal cord neurons following photic stimulation in rats' model with migraine. 12th International Association for the Study of Pain, Glasgow 2008, Aug.

各発表では、片頭痛や光過敏症を研究している研究者達と重要な情報交換ができ、本研究をさらに発展させることができた。現在にはさらに、これらの結果を英文論文にまとめ、国際雑誌 Cephalgia に投稿しているところである。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

| | |
|--------|----------|
| * 課題番号 | 総 08-023 |
|--------|----------|

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 4 月 2 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 鈴木 直人



所属・資格 歯学部・准教授

()

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------------------------|---|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人) / 一般研究(共同) / 総合研究 | 注:該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 骨リモデリングに及ぼす短鎖脂肪酸の影響 | |
| 3 研究の目的 | 短鎖脂肪酸を代表とする嫌気性菌の代謝産物は、口腔はもとより全身の健康と密接な関係がある。短鎖脂肪酸の一つである酪酸は、骨芽細胞の機能を亢進することで、局所における増骨に関与しているとの報告もある。しかし、重層扁平上皮からなる歯肉上皮をどのようにして短鎖脂肪酸が侵入するのか、侵入した短鎖脂肪酸が骨リモデリングにどのように影響するのかについてはほとんど解明されていない。さらに、局所の免疫担当細胞が種々のサイトカインを分泌し、骨リモデリングに密接に関与していることが示唆されているが、免疫担当細胞に対する短鎖脂肪酸の影響、とくに骨代謝との関連については全く解明されていない。これらの背景から、本研究では 1)上皮細胞における短鎖脂肪酸の侵入様式、2)骨芽細胞および破骨細胞に及ぼす短鎖脂肪酸の直接的な作用および 3)免疫担当細胞を介する骨リモデリングに及ぼす短鎖脂肪酸の影響を明らかにすることを企図した。 | |
| 4 研究の概要 | <p>(1) 短鎖脂肪酸の侵入様式の検討 ヒト歯肉上皮由来株細胞あるいはそれに準じた細胞モデルを用い、酪酸が細胞間接着に及ぼす影響を検討する。</p> <p>(2) 短鎖脂肪酸が骨芽細胞に及ぼす影響の検討 株化ヒト骨芽細胞様細胞あるいは株化マウス骨芽細胞様細胞を用いて、種々の濃度の酪酸を作用させ、骨芽細胞の分化に関与する転写因子群、の遺伝子およびタンパク発現を調べる。また、破骨細胞の分化に関与する M-CSF や RANKL などの遺伝子およびタンパク発現に及ぼす酪酸の影響を検討する。</p> <p>(3) 短鎖脂肪酸が免疫担当細胞に及ぼす影響の検討 ヒト T 細胞を用いて、酪酸が IL-17 や IL-23 などのサイトカイン発現および RANKL 発現に及ぼす影響を遺伝子およびタンパクレベルで検討する</p> | |
| 5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 鈴木 直人 ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 大塚 吉兵衛 (細胞生物学的分野の総括・タンパク発現解析) 落合 邦康 (微生物学的分野の総括) 山本 正文 (免疫学的分野の総括) 落合 智子 (免疫担当細胞の培養・サイトカインの定量・分析) 津田 啓方 (細胞培養・共焦点顕微鏡による検討) | |

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

部科校名：歯学部

氏名：鈴木 直人

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

平成 20 年度は、主に骨芽細胞に及ぼす酪酸の影響について検討した。骨芽細胞として正常ヒト骨芽細胞を用いた。細胞を刺激する際の酪酸濃度は、1) 歯周病原菌が産生する揮発性短鎖脂肪酸が口腔粘膜から侵入して歯周組織に傷害を起こすという Kurita-Ochiai らの報告、2) 短鎖脂肪酸が歯周疾患を憎悪させるという Niederman らの報告、3) 線維芽細胞による炎症性サイトカイン(IL-6 および IL-11)の産生が

酪酸によって促進され、これらサイトカインによって引き起こされる歯周組織中の T 細胞のアポトーシスが健常歯肉線維芽細胞によって回避されるという Kurita-Ochiai らの報告を参考にして 10^{-4} 、 10^{-6} および 10^{-8} M とした。

まず、細胞増殖に及ぼす酪酸の影響について検討した。細胞を 96 穴マイクロプレートに 1×10^4 cells/cm² となるように播き、酪酸添加・非添加の条件で 12 日間培養した。細胞増殖は市販の MTT アッセイキットを用いて比色定量によって調べた。その結果、細胞増殖に及ぼす酪酸の影響は認められなかった。一般に、細胞の分化は、細胞増殖が盛んに行われている時期ではなく、細胞の増殖が定常状態になった時期に始まると言われている。酪酸が細胞増殖に影響を及ぼさなかったという本研究結果は、酪酸が骨芽細胞の分化を促進している可能性を示唆するものである。

次いで、石灰化 nodule 形成に及ぼす酪酸の影響について検討した。細胞を 6 穴プレートに 1×10^4 cells/cm² となるように播き、50 µg/ml アスコルビン酸と 50 mM β-グリセロリン酸を加えた培養液を用い、酪酸添加・非添加の条件で 10 日間培養した。石灰化 nodule の観察は、細胞を固定後、アリザリン赤染色を施して行った。また、石灰化 nodule 中に含まれるカルシウムの定量は市販のカルシウム定量キットを用いて行った。その結果、アリザリン赤に対する染色性ならびにカルシウム量は添加した酪酸の濃度依存的に増加した。これらの所見から、酪酸が骨芽細胞による骨形成の促進、とくに細胞外マトリックスへのヒドロキシアパタイト結晶形成を促進することが考えられた。

アルカリホスファターゼ(ALPase)は、アルカリ性下で有機リン酸化合物のエステル結合を加水分解する酵素として、骨基質の石灰化において重要な役割を担っている。この酵素は、ピロリン酸や ATP などの石灰化抑制物質を加水分解するだけでなく、ヒドロキシアパタイト結晶形成に必要なリン酸濃度の押し上げにも関与している。また、ALPase 活性値は、骨芽細胞によるマトリックス形成後の石灰化開始時期に高い活性値を示し、骨芽細胞の分化マーカーとして捉えられている。そこで、ALPase 活性値に及ぼす酪酸の影響を検討した。細胞を 96 穴マイクロプレートに 1×10^4 cells/cm² となるように播き、酪酸添加・非添加の条件で 12 日間培養した。活性値は *p*-ニトロフェニルリン酸を基質とし、酵素反応の結果生じる *p*-ニトロフェノール量を比色定量して求めた。その結果、ALPase 活性値には酪酸添加の影響はほとんど認められなかった。この結果は、ALPase 活性値の上昇によって引き起こされたヒドロキシアパタイトの結晶のその後の成長には、酪酸の関与はあまりないのではないかと考えられた。

次いで、細胞外マトリックス成分の遺伝子およびタンパク質発現に及ぼす酪酸の影響について検討した。本研究で着目した細胞外マトリックス成分は I 型コラーゲン、骨シアロタンパク質(BSP)およびオステオポンチン(OPN)である。I 型コラーゲンは、骨の細胞外マトリックスを構成する最も主要なタンパク質であり、石灰化のプロセスにおいて、とくにヒドロキシアパタイト結晶核形成の足場として機能している。コラーゲン以外の非コラーゲン性タンパク質は、コラーゲンを主成分とする細胞外マトリックスの中で、ヒドロキシアパタイト結晶形成やその成長を調節するという重要な役割を演じている。骨の主な非コラーゲン性タンパク質としては、シアル酸含有タンパク質である BSP と OPN、オステオカルシン、オステオネクチンなどが知られている。高リン酸化シアロタンパク質である OPN は、骨の石灰化した細胞外マトリックスを構成する重要な成分の一つである。OPN はその分子中にリン酸化部位を有し、ヒドロキシアパタイト結晶との結合に深く関与している。骨形成と骨リモデリングにおける OPN と他のタンパク質との機能的な違いは、OPN が生体防御や組織の修復に置いても重要な役割を演じているということである。事実、骨リモデリングのプロセスを詳細に検証すると、そこには通常、炎症反応に伴う組織修復のプロセスが多く認められる。BSP は糖および硫酸を含有するシアロリンタンパク質であり、石灰化を起こす結合組織で特異的に認められる。骨形成において BSP は、その分子内に RGD 配列を有していることから、細胞接着に積極的に関与しており、ヒドロキシアパタイトの結晶形成にも深く関与している。これらの背景から、I 型コラーゲン、BSP および OPN の遺伝子およびタンパク質発現に及ぼす酪酸の影響について検討した。

部科校名：歯学部

氏名：鈴木 直人

研究の結果（つづき）

細胞を6穴プレートに 1×10^4 cells/cm² となるように播き、酪酸添加・非添加の条件で12日間培養し、培養3, 5, 7, 10 および12日目にRNAと培養上清を回収した。遺伝子発現はRNAからcDNAを作製し、real-time PCRによって調べた。また、タンパク質発現はELISAによって検討した。その結果、いずれの遺伝子およびタンパク質発現も酪酸添加によって増加した。これらの知見は、酪酸が細胞外マトリックス成分の産生促進を介して、骨形成を促進する可能性を示唆している。

骨芽細胞は骨形成に関与するのみでなく骨吸収にも関与している。骨芽細胞は、破骨細胞前駆細胞との細胞間相互作用によって破骨細胞の形成に深く関わっている。破骨細胞前駆細胞は、M-CSFの存在下で細胞膜上にRANKを発現し、骨芽細胞の細胞膜上に発現するRANKLと細胞間相互作用によって結合し、破骨細胞へと分化する。また、骨芽細胞はRANKLに対するおとりの受容体OPGを合成・分泌し、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との細胞間接触を抑制して破骨細胞の形成を調節している。そこで、M-CSFおよびOPGの遺伝子およびタンパク質発現に及ぼす酪酸の影響について、前述の細胞外マトリックス成分の遺伝子およびタンパク質発現と同様に、real-time PCRおよびELISA法で検討した。その結果、酪酸の添加によってM-CSF遺伝子発現は減少し、OPG遺伝子およびタンパク質発現は増加した。これらの所見は、酪酸が骨形成を促進するのみでなく、骨吸収の抑制にも関与していることを示唆するものである。

以上のことから、酪酸は骨芽細胞による細胞外マトリックス成分、とくにBSPおよびOPN発現増加を介して石灰化nodule形成を促進し、OPG発現増加とM-CSF発現低下によって破骨細胞分化を抑制することが示唆された。

平成20年度は、酪酸の骨芽細胞に対する影響を検討するとともに、酪酸の侵入様式についても併せて検討を行った。歯周病原菌の産生する酪酸が骨芽細胞に作用するためには、酪酸が歯肉上皮のバリアーを通過して歯槽骨に到達する必要がある。このメカニズムを解明するため、歯肉上皮細胞のモデル細胞である株化ヒト歯肉上皮癌由来細胞(Ca9-22細胞)を用いて検討を行った。

まず、酪酸が歯肉上皮細胞間の細胞接着に“ゆるみ”を与えることによって、酪酸自身が上皮細胞の間隙を通過するのではないかと考えた。ケモタキシスウェルの上底にCa9-22細胞をコンフルエントになるように播き、培養液に蛍光物質(PKH67 green fluorescent)を添加して、下底に浸出してくる蛍光物質量を測定することで、酪酸の細胞間隙に及ぼす影響を調べた。その結果、 10^{-4} 、 10^{-6} および 10^{-8} Mの酪酸をCa9-22細胞に作用させても、下底への蛍光物質の浸出には変化が認められなかった。この結果は、酪酸が細胞接着に“ゆるみ”を与えることによって上皮細胞間を通過するのではないかという予想とは大きく異なっていた。従来から酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸が細胞のアポトーシスを誘発するとの報告がある。そこで、酪酸刺激によって誘発された細胞のアポトーシスによって細胞形態が縮小し、そのことによって生じた細胞間隙を酪酸が通過するのではないかと考えた。Ca2-22細胞に酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸を作用させ、蛍光物質(SYTOX Green)を用いた細胞死アッセイを行ったところ、酪酸、プロピオン酸、酢酸、イソ酪酸およびイソ吉草酸は、それぞれ1, 5, 40, 10, 5mM以上の濃度でコントロール分比べて有意に細胞死を引き起こした。とくに、他の短鎖脂肪酸に比べて、酪酸は低濃度で歯肉上皮細胞の細胞死を誘発することが明らかになった。また、酪酸はアポトーシスマーカーであるAnnexin Vの細胞表面への結合の増加とカスパーゼ3活性の上昇およびアポトーシスの回避に関与する*bcl-2*遺伝子発現のへ減少を引き起こした。しかし、カスパーゼ阻害剤の一つであるZ-VAD-FMKは、酪酸によるアポトーシスをわずかに抑制したのみであった。これらの所見から、酪酸は歯肉上皮細胞のアポトーシスを誘発するが、酪酸によって起こる細胞死はアポトーシスのみではないことが考えられた。そこで、オートファジーを介する細胞死に及ぼす酪酸の影響について検討した。その結果、酪酸はLC3-I分子のLC3-II分子への移行、両分子の産生量増加、細胞質でのオートファゴソームへの集積を促進した。さらに、オートファジー抑制剤の一つである3-methyladenineは、酪酸誘導による歯肉上皮細胞の細胞死を抑制した。これらの所見から、酪酸は歯肉上皮細胞のアポトーシスとオートファジーの両方を介する細胞死を引き起こす可能性が示唆された。

平成20年度は、前述のように骨芽細胞の分化に及ぼす酪酸の影響および酪酸の上皮侵入のメカニズムについてその一部を明らかにすることができた。

| | |
|--------|----------|
| * 課題番号 | 総 08-027 |
|--------|----------|

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 16 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 杉 谷 博 士



所属・資格 松戸歯学部・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------------------------|---|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 唾液腺機能再生に向けての分子学的アプローチ | |
| 3 研究の目的 | <p>口腔は消化管の入り口としての機能を持つ重要な器官である。また、舌を動かし、言葉を発することにも携わっている。こういった口腔機能の維持のために、唾液は重要な役割を担う体液である。また、唾液には多くの抗菌作用物質も含まれ、口腔内環境維持ばかりでなく、全身疾患に関わる細菌の感染防御にも寄与している。そのため、唾液の分泌低下は、口腔機能維持や全身の健康維持に大きく影響し、QOL の低下を招く。唾液分泌低下には多くの原因が考えられており、高齢者のみならず、若年者層にも口腔乾燥症状を訴えるケースも増加している。本研究は唾液腺における唾液分泌機構に関わる分子を明らかにし、細胞レベルから個体レベルまでの統合的な研究を行い、唾液腺機能再生を目指すことを目的としたものである。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>唾液腺からの唾液分泌は自律神経の二重支配により調節されている。自律神経系の神経伝達物質が細胞外からの情報として唾液腺細胞に作用すると、その情報を受容し、それに続く細胞内シグナルの活性化が惹起され、最終的にタンパク質分泌および水分分泌が引き起こされる。本研究では、神経伝達物質受容後の唾液腺細胞における水の分泌機構およびタンパク質分泌機構についての検討を行った。水分分泌調節に関しては、唾液分泌不全モデルとしての E2F-1 KO/NOD/SCID の唾液分泌機能を検討した。また、水チャネルアキュアポリンの役割、特に AQP6 の発現、局在、機能について検討を行った。さらに、タイトジャンクションの役割を、タイト機構調節、IGF-1 による機能維持を中心に検討を行った。タンパク質分泌調節に関しては、分泌顆粒形成・成熟と endocytosis の役割や開口分泌における MARCKS の役割を検討した。さらに、腺房細胞の分化・脱分化制御についての知見が得られたため、その細胞内シグナルについて検討した。</p> | |
| 5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) | <ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 杉谷 博士 松戸歯学部・教授 ・ 研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 吉垣 純子 松戸歯学部・准教授 (初代培養系を用いた発現タンパク質の検索) 勝俣 治 松戸歯学部・専任講師 (臓器レベルにおける分泌機能の検討) 成田 貴則 松戸歯学部・助教 (唾液腺における発現遺伝子の検索) 中尾 寿美 松戸歯学部・助手 (分泌顆粒形成機構の検索) 茂呂 周 大学院総合科学研究科・教授 (分泌型抗体産生の分子機構の検索) 浅野 正岳 歯学部・専任講師 (分泌型抗体産生の分泌機構の検索) 伊藤 芳久 薬学部・教授 (ノックアウトマウスにおける唾液分泌能の検討) 小菅 康弘 薬学部・助教 (初代培養系を用いた水チャネル発現の検索) | |

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

部科校名：松戸歯学部

氏名：杉谷博士

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

1. 水分分泌調節

1) 唾液分泌不全モデルとしての E2F-1 KO/NOD/SCID

唾液腺機能研究においては唾液腺機能不全マウスが必要となる。従来、NOD マウスがシェーグレン症候群のモデルマウスとして広く用いられていたが、さらに転写因子の一つである E2F-1 をノックアウトすることにより、より唾液腺機能不全が顕著になった。しかし、その段階では同時に糖尿病を発症しているために、真の唾液腺機能不全モデルとしては不十分な状態であった。われわれは、NOD/SCID マウスの E2F-1 をノックアウトすることにより、糖尿病を発症せず、唾液腺機能が低下するマウスを作成した（投稿中）。このマウスを用いて、ピロカルピン投与による唾液分泌機能を検討したところ、対照群と比べて有意に唾液分泌量は低下していた。現在、さらに、唾液腺機能不全のメカニズムを検討中である。

2) アクアポリンの役割

水の分泌調節に関しては、水チャンネルであるアクアポリン (AQP) について検討した。AQP は水を選択的に透過するチャンネルタンパク質として発見されたものであるが、現在までに AQP のファミリーとして 13 種類が認められている。唾液腺においては、AQP1、AQP4、AQP5 および AQP8 の発現の報告があり、AQP5 の機能についてはよく検討がなされている。従来、AQP5 は細胞膜に存在するといわれている AQP ファミリーの 1 つであったが、われわれは AQP5 が分泌顆粒膜にも存在することを既に明らかにしている。また、新たに、タンパク質分泌に関わる分泌顆粒内浸透圧調節に関与することも示唆した (J Membr Biol, 2005; 2006)。

(1) AQP6 の発現：唾液腺における AQP の研究を進める中で AQP6 に関して検討を進めたところ、ラットおよびマウスの耳下腺、顎下腺、涙腺、腭外分泌腺に抗 AQP6 抗体に反応するタンパク質の存在をウエスタンブロット法により認めた。さらに、mRNA の発現を RT-PCR で検討したところ、既に存在が認められている腎臓と同様の産物がラットおよびマウスの耳下腺、顎下腺、涙腺、腭外分泌腺に検出され、AQP6 の発現が示唆された。

(2) AQP6 の局在：ラット耳下腺における AQP6 の局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いた間接蛍光法にて検討したところ、耳下腺腺腔側膜近傍に局在することを認めた。タイトジャンクションのマーカータンパク質である ZO-1 との共局在をの検討から、ZO-1 の近傍に局在することが認められ、マウスにおいても、耳下腺腺房細胞のタイトジャンクション近傍に AQP6 の局在が認められた。

(3) AQP6 の機能：

AQP は水を選択的に透過するチャンネルとしての機能を持つことで発見されたタンパク質であるが、近年、AQP の中にはイオンチャンネルとしての機能を持つことも示唆されている。AQP6 は塩素イオンを含むハロゲン族のイオン透過性をもつことが電気生理学的な手法により明らかにされており、唾液腺における AQP6 も塩素イオンチャンネルとしての機能が推測される。塩素イオンの分泌は唾液の生成に重要な役割を担うことから、耳下腺においては腺腔側膜に局在することは唾液生成や分泌に関連すると考えられる。パッチクランプ法を用いて、マウス耳下腺腺房細胞のイオン透過性を検討したところ、硝酸イオンを透過するチャンネルが認められた。さらに、このチャンネルは塩素イオンも透過することから、AQP6 の可能性が考えられた。

2) タイトジャンクションの役割

唾液分泌課程において、水の輸送は細胞を經由する系と細胞間を經由する系が存在する。細胞間を經由する系を傍細胞輸送系とよんでいる。この傍細胞輸送系の調節に関わるのがタイトジャンクションである。

(1) タイト機構：SMIE 細胞はタイトジャンクションをもつ細胞であるため、傍細胞間を經由する機能解析には極性を維持した培養系である。この系を用いることにより、傍細胞間経路の機能は抵抗値とデキストランの透過性で確認できた。また、タイトジャンクションを形成するタンパク質としては、ZO-1、クローディン 3、オクルーディンの発現をウエスタンブロット解析および共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織化学により確認した。しかし、一般的にタイトジャンクション機能を有する細胞での発現のみられる他のクローディンの発現は認められなかった。そこで、クローディンの 1 つであるクローディン 4 を過剰発現させ、傍細胞間機能の検討を行ったところ、抵抗値が上昇し、デキストランの透過は悪くなったことから、クローディン 4 が唾液腺傍細胞輸送系の機能調節に関与することが示唆された (Cell Tissue Res 2008)。

(2) IGF-1 による機能維持：唾液腺細胞には成長因子の一つである IGF-1 の発現が知られている。そこで、タイトジャンクション機能維持にかかわる IGF-1 の機能を検討した。有血清培地では、SMIE 細胞は増殖し、タイトジャンクションタンパク質と機能を維持していた。血清 (FCS) の代わりに HGF, EGF, TGF- β などを用いた場合は SMIE 細胞のタイトジャンクション維持は認められなかったが、IGF-1 存在下ではほぼ血清と同様な効果が認められた。IGF-1 受容体阻害剤を用いた場合は IGF-1 の効果も血清の効果も阻害されたことから、血清中に含まれる IGF-1 が SMIE 細胞におけるタイトジャンクション機能維持に関与することが認められた。

部科校名：松戸歯学部

氏名：杉谷博士

研究の結果（つづき）

2. タンパク質分泌調節

1)分泌顆粒形成・成熟と endocytosis の役割：タンパク質分泌に関わる因子の検討に関して、分泌顆粒形成機構の検討も行った。一連の分泌機構は分泌タンパク質の合成に始まり顆粒内への濃縮・分配、細胞内の輸送・成熟、そして開口放出という過程に分類することができる。分泌顆粒の成熟過程の解明を目的としてラット耳下腺分泌顆粒について検討を行ったところ、パーコールの密度勾配を利用することにより、未成熟と成熟分泌顆粒が分離された。それぞれの分泌顆粒膜に存在するタンパク質発現をウェスタンブロット解析により検討したところ、両者に違いがあることを明らかにした。特に未成熟顆粒には分泌顆粒の生成時への関与が考えられている syntaxin6 が多く局在し、成熟顆粒には少ないことを認めた。この結果から、分泌顆粒の生成過程に必要である syntaxin6 が未成熟顆粒からほかのオルガネラに輸送されることが考えられた (Biochem Biophys Res Commun, 2006)。

一方、一度刺激をして細胞内の分泌顆粒を空にした状態からの分泌顆粒の合成を観察すると、腺腔側からの形成が認められたことから、腺腔側からの endocytosis が分泌顆粒形成に関与するという仮説をたてた。耳下腺を刺激し再合成される顆粒に関しては未成熟と思われるものが分離され、細胞内への不透過性蛍光物質であるデキストリンで全処理をしておく、未成熟顆粒への取り込みも認められている。さらに、そのメカニズムについての検討を進めている。

2)開口分泌における MARCKS の役割：唾液腺におけるタンパク質は開口放出により分泌される。モデル系として耳下腺腺房細胞におけるアミラーゼ分泌を使用して検討を進めたところ、MARCKS というタンパク質の発現を認めた。耳下腺腺房細胞における開口放出は cyclic AMP が細胞内シグナルとして必須である。しかし、MARCKS は C キナーゼの基質として知られているタンパク質であることから、cyclic AMP 系、C キナーゼ系、MARCKS のアミラーゼ分泌への関与を検討した。その結果、C キナーゼは約 10 種類のアイソフォームが知られているが、その中の C キナーゼ δ が関与することが認められた。さらに、cyclic AMP の下流に存在する A キナーゼの活性化により C キナーゼ δ が活性化されることが明らかとなった。引き続き、C キナーゼ δ は MARCKS をリン酸化することも明らかとなり、さらに、C キナーゼ δ -MARCKS リン酸化系がアミラーゼの開口放出に関わることが明らかとなった。これにより、cyclic AMP から開口放出に至るシグナル経路の一部が明らかとなった（投稿中）。

3. 腺房細胞の分化・脱分化制御

唾液腺における分泌機能や分泌顆粒の生成等に関する研究においては、培養系細胞を用いることが有利と考えられる。しかし、外分泌腺細胞は高度に分化しており、機能を維持したままの培養は極めて困難である。唾液腺においても分泌能を維持した培養細胞は確立されていなかった。このことから、我々は、分泌機能を維持した唾液腺腺房細胞の培養系の確立に着手した。その結果、ラット耳下腺腺房細胞を利用し、48 時間目までは自律神経からの神経伝達物質に対する分泌応答能を維持した初代培養系を確立することに成功した (Cell Tissue Res, 2005)。この培養系を用いて、腺腔側タンパク質やタイトジャンクションタンパク質の動態が培養に伴って大きく変化することを認めた。すなわち水分泌に関与する AQP5、分泌タンパク質であるアミラーゼの合成、タイトジャンクションタンパク質のクロードイン 3 は低下し、一方クロードイン 4 の合成と発現が促進された。このことは、腺房細胞が導管細胞に脱分化された現象と解釈された。そこで、これらのタンパク質をマーカーとして細胞内シグナルを検討したところ、Src および p38 MAP キナーゼを阻害することにより、その脱分化の阻害が認められた。これらのことから、腺房細胞の分化・脱分化調節が極めて重要であることを明らかにした (Am J Physiol Cell Physiol 2008)。

以上のいくつかの知見は、唾液腺機能の再生に向けた研究の大きな礎となり、さらに詳細な検討が続いている。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21 年 3 月 23 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 西 山 典 宏



所属・資格 松戸歯学部・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------------------------|---|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | ワンステップボンディング材による歯質接着システムの構築 | |
| 3 研究の目的 | <p>ワンステップボンディング材に多用されているメタクリル酸エステルモノマーのエステル基は、ボンディング材中に含まれる酸性メタクリル酸エステルモノマーの酸性基の解離によって生成したH⁺イオン共存下で加水分解するため、ワンステップボンディング材は経時的に変質し、歯質に対するレジンの接着強さが低下することが報告されている。</p> <p>本研究では、N-メタクリロイル-2-アミノエチルホスホン酸 (NMEP)、N-メタクリロイルグリシン (NMGly) および架橋剤として多官能性メタクリル酸アミドモノマーを合成し、これら機能性メタクリル酸アミドモノマーを用い、従来のメタクリル酸エステルモノマーからなるボンディング材に比べ、加水分解安定性の高い新規ワンステップボンディング材を開発することを目的とする。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>1. グリシンのアミノ基にメタクリロイルクロリドを縮合した NMGly, 2-アミノエチルホスホン酸のアミノ基にメタクリロイルクロリドを縮合した NMEP, およびヘキサミンまたはオクタンジアミンのアミノ基にメタクリル酸を脱水縮合した多官能性メタクリル酸アミドモノマーを合成し、合成物の確認を行う。</p> <p>2. NMGly 水溶液に NMEP または従来の酸性メタクリル酸エステルモノマー (MDP または MEP) を添加した歯質処理材 (プライマー) を調製し、40℃恒温槽中に保管した後、カーボン 13 NMR スペクトルを測定して、酸性モノマーの構造が加水分解安定性におよぼす影響を検討する。</p> <p>3. 保管したプライマーを用いて象牙質を処理し、コンポジットレジンの象牙質に対する接着強さを測定して、プライマーの劣化が接着安定性および接着耐久性におよぼす影響を検討する。</p> | |
| 5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) | <p>・研究代表者 西山 典宏 (アミドモノマーの合成・確認, モノマーと歯質との相互作用および総括)</p> <p>・研究分担者 (役割分担) 前田 隆秀 (接着強さの測定) 曾田 雅啓 (接着強さの測定およびモノマーと歯質との相互作用) 中島(藤田) 光 (アミドモノマーの合成・確認およびモノマーと歯質との相互作用) 平田 光男 (アミドモノマーの合成・確認)</p> | |

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

部科校名：松戸歯学部

氏名：西山典宏

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

本研究では、N-メタクリロイル-2-アミノエチルホスホン酸 (NMEP, 酸性モノマー), N-メタクリロイルグリシン (NMGLy, 親水性モノマー) および架橋剤として多官能性メタクリル酸アミドモノマーを合成し、これら機能性メタクリル酸アミドモノマーをベースモノマーとした新規ワンステップボンディング材をデザインし、従来のメタクリル酸エステルモノマーからなる市販ワンステップボンディング材に比べて、接着安定性および接着耐久性の高いワンステップボンディング材を開発する。

まず始めに、2-アミノエチルホスホン酸およびグリシンのアミノ基にメタクリロイルクロリドを水酸化ナトリウム水溶液中で脱水縮合し、NMEP および NMGLy を合成した。また、ヘキサメチレンジアミンおよびオクタメチレンジアミンのアミノ基にメタクリル酸をジクロロメタン溶媒中で脱水剤 (N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド) を用いて縮合し、多官能性メタクリル酸アミドモノマーを合成した。なお、合成物したメタクリル酸アミドモノマーの確認はプロトン (^1H) およびカーボン 13 (^{13}C) NMR 法で行った。

加水分解安定性の高いワンステップボンディング材を開発するため、本実験で合成した NMEP および現在市販されているワンステップボンディング材に多用されている酸性メタクリル酸エステルモノマー、10-メタクリロキシデシルジハイドロジェンホスフェイト (MDP) または 2-メタクリロシエチルジハイドロジェンホスフェイト (MEP) を NMGLy (メタクリル酸アミドモノマー, 親水性モノマー) 水溶液に溶解し、酸性モノマーと親水性モノマーおよび水とからなる歯質処理材 (プライマー), NMEP-NMGLy プライマー, MDP-NMGLy プライマーおよび MEP-NMGLy プライマーを調製し、これらプライマーの保管安定性をカーボン 13 NMR 法を用いて検討した。すなわち、5 mol% の NMGLy を蒸留水中に溶解して調製した NMGLy 水溶液 1 g に対して、NMEP, MDP または MEP を 0.5 mmol 添加し、NMEP-NMGLy プライマー, MDP-NMGLy プライマーおよび MEP-NMGLy プライマーを調製した。つぎに、これら 3 種類のプライマーを 40°C 恒温槽に 1 週, 3 週, 6 週, 10 週および 14 週間保管し、酸性モノマーの加水分解・劣化させた後、NMEP-NMGLy プライマー, MDP-NMGLy プライマーおよび MEP-NMGLy プライマーのカーボン 13 NMR スペクトルを測定した。つぎに、NMGLy に由来するカーボン 13 NMR ピークに対する NMEP, MDP または MEP のカーボン 13 NMR ピークの相対強度比を求め、酸性モノマーの構造および性質が酸性モノマーの加水分解・劣化速度におよぼす影響を検討した。なお、親水性モノマーとして現在多くの製品に多用されている 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA, メタクリル酸エステルモノマー) の代わりに本実験で合成した NMGLy を用いた。

ワンステップボンディング材に多用されている従来のメタクリル酸エステルモノマー, MDP の加水分解・劣化挙動を明らかにするために、MEP の加水分解・劣化挙動についてまず検討した。MEP-NMGLy プライマーを 40 °C の恒温槽中に保管すると、MEP のメタクリロキシおよびリン酸のエステル基が経時的に加水分解し、1) 保管時間が 14 週の間 MEP-NMGLy プライマー中に添加されている MEP が完全に加水分解・劣化すること、2) 副生成物として水に可溶性の 2-ヒドロキシエチルジハイドロジェンホスフェイト, HEMA, エチレングリコールおよび正リン酸などが生成されることが明らかになった。また、ワンステップボンディング材に多用されている従来のメタクリル酸エステルモノマー, MDP を添加した MDP-NMGLy プライマーを 40 °C の恒温槽中に保管した場合、MEP と同様に MDP のメタクリロイルおよびリン酸のエステル基が経時的に加水分解・劣化し、1) 保管時間が 14 週の間 MDP-NMGLy プライマー中に添加されている MDP の約 80 % が加水分解・劣化すること、2) 水に難溶性の 10-ヒドロキシデシルジハイドロジェンホスフェイト, 10-ヒドロキシデシルメタクリレートが生成されることが明らかとなった。しかし、MDP のメタクリロキシおよびリン酸のエステル基の加水分解により生成されるデカンジオールの生成はカーボン 13 NMR 法では確認できなかった。

以上の結果から、MDP-NMGLy プライマーまたは MEP-NMGLy プライマーを 40°C に保管すると、プライマー中に添加されている酸性メタクリル酸エステルモノマー (MDP または MEP) の割合が経時的に減少し、加水分解により生成された副生成物の割合が増加することがわかった。これは、プライマーに添加されている MDP または MEP のリン基がプライマー水溶液中で電離し、リン酸基の電離によって生成された H^+ イオンが MDP および MEP のメタクリロキシおよびリン酸のエステル基の加水分解・劣化を促進するためと考えられた。しかし、同じ酸性メタクリル酸エステルモノマーでありながら MDP と MEP との間で加水分解・劣化速度に差異が生じた。これは、MEP は完全に水に溶解し、大部分のリン酸基が電離するのに対して、MDP はほとんど水に溶解しないため、リン酸基の電離が抑制され、その結果、MDP の加水分解速度が遅くなったものと考えられた。しか

部科校名：松戸歯学部

氏名：西山典宏

研究の結果（つづき）

し、40℃でのMDP-NMGlyプライマーの保管時間をさらに延長すれば、最終的にはMDPもMEPと同様にすべて加水分解劣化するものと考えられた。

これに対し、酸性メタクリル酸アミドモノマーであるNMEPを添加したNMEP-NMGlyプライマーを40℃恒温槽に14週間保管した場合には、NMEPのアミド基の加水分解により生成される2-アミノエチルホスホン酸のエチレン基のメチレンカーボンに帰属されるカーボン13NMRピークはNMRスペクトル上に検出されず、NMEPはほとんど加水分解・劣化されないことが明らかとなった。

しかし、これらのプライマーに親水性モノマーとして添加されているメタクリル酸アミドモノマーのNMGlyは約3～5%加水分解・劣化し、副生成物としてグリシンを生成することが判明した。しかし、NMGlyは従来のHEMAのメタクリロキシエステル基に比べて酸性溶液中で非常に安定であることが明らかとなった。

つぎに、40℃恒温槽に6週および14週間保管したNMEP-NMGlyプライマー、MDP-NMGlyプライマーおよびMEP-NMGlyプライマーを象牙質に作用させ、歯科用コンポジットレジンに接着させた場合のレジンのせん断接着強さを測定し、保管に伴うプライマーの変質が接着安定性におよぼす影響を検討した。

その結果、MEP-NMGlyプライマーを6週間保管すると、象牙質に対するレジンの接着強さは18MPa（コントロール）から6MPaと大きく低下し（有意差あり）、保管時間が14週では約7MPaを示した。これは、保管時間の経過に伴い、酸性モノマーとして添加されているMEPのメタクリロキシおよびリン酸のエステル基が加水分解し、1) MEPの割合が低下したこと、2) 加水分解により生成された水溶性の副生成物の割合が増加したことなどのため、レジン-象牙質接着界面に形成された樹脂含浸層に接着欠陥が生じ、樹脂含浸層の質が低下したためと考えられた。しかし、保管時間が14週と長くなり、MEP-NMGlyプライマーに添加されているMEPが100%加水分解・劣化しても、保管時間が14週後の接着強さは6週後の接着強さと近似し、6週間と14週間の接着強さ間には有意差は認められなかった。これは、親水性モノマーとして添加されているNMGlyが象牙質接着性を有しているためと考えられた。

MDP-NMGlyプライマーの場合もMEP-NMGlyプライマーと同様に、MDPは経時的に加水分解・劣化し、MDP-NMGlyプライマーが変質するため、接着強さは6週間保管で約10MPa、14週間保管では約10MPaと初期値（コントロール：13MPa）に比べ低下した。しかし、接着強さの低下は約3MPaと、MEP-NMGlyプライマーの約11MPaよりはるかに小さかった。これは、MDP-NMGlyプライマーを14週間保管しても、1) 約20%のMDPが残留していること、2) MDPの加水分解により生成される副生成物は水に難溶性であること、3) 親水性モノマーとして添加されているNMGlyが象牙質接着性を有していることなどのため、接着強さの低下が小さかったものと考えられた。

しかし、NMEP-NMGlyプライマーを象牙質に作用させた場合には、コントロールでは約19MPa、6週間保管では約18MPa、14週間保管では約18MPaとプライマーの保管時間が長くなっても、初期の接着強さ（コントロール）がほとんど維持され、優れた接着安定性を示すことが明らかとなった。これは、NMEPのアミド基は酸性溶液中において非常に安定で、しかも加水分解・劣化し難いためと考えられた。

さらに、40℃恒温槽に6週間保管したNMEP-NMGlyプライマー、MDP-NMGlyプライマーおよびMEP-NMGlyプライマーを象牙質に作用させ、歯科用コンポジットレジンに接着させた後、これらの試験体に20,000回サーマルサイクル（4℃と55℃の冷温水中に1分ずつ交互に接着試験体を浸漬する試験法）を施し、レジンのせん断接着強さを測定して、保管に伴うプライマーの変質が接着耐久性におよぼす影響を検討した。

その結果、サーマルサイクルを施すことにより、MEP-NMGlyプライマーの場合、コントロールでは18MPa（初期値）から15MPa、6週間保管では6MPa（初期値）から4MPaへと低下した。また、MDP-NMGlyプライマーの場合には、コントロールでは13MPa（初期値）、サーマルサイクル後では14MPaとサーマルサイクル前後における接着強さの低下は認められなかったが、6週間保管では10MPa（初期値）から7MPaへと接着強さは低下した。しかし、NMEP-NMGlyプライマーの場合は、サーマルサイクルを施すことによりコントロールでは19MPa（初期値）から16MPa、6週間保管では18MPa（初期値）から16MPaへと接着強さのわずかな低下は認められたが、接着強さの低下は小さく、サーマルサイクル後も16MPaと高い接着強さを示し、NMEP-NMGlyプライマーはMEP-NMGlyプライマーおよびMDP-NMGlyプライマーより高い接着耐久性を示すことが明らかとなった。現在14週間保管したNMEP-NMGlyプライマー、MDP-NMGlyプライマーおよびMEP-NMGlyプライマーについても接着耐久性を検討中である。

以上の結果から、メタクリル酸アミドモノマーを用いたワンステップボンディング材を創製すれば、加水分解安定性が高く、接着安定性および接着耐久性の優れたワンステップボンディング材が開発できることができると考えられた。

部科校名：松戸歯学部

氏名：西山典宏

研究の結果（つづき）

現在、ヘキサメチレンジアミンまたはオクタメチレンジアミンのアミノ基にメタクリル酸を脱水縮合して合成したアミド系多官能性モノマーを NMEP-NMGly プライマーに添加した新規ワンステップボンディング材を調整し、その接着性を検討中である。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月 28日

日本大学 総長 殿

氏 名 森 司

印

所属・資格 生物資源科学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------------------------|--|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 捕食者誘導による表現型の可塑性と脳形成、そして遺伝子の転写と翻訳制御に関する研究 | |
| 3 研究の目的 | 本研究はエゾアカガエルをモデルとした捕食者による表現系の可塑性を支配している鍵となる遺伝子を同定し、可塑性の基本的メカニズムを明らかにする。且つ、可塑性を支配する高次の機能としての脳からのシグナル伝達と遺伝子の発現、そしてオタマジャクシの体内での蛋白への翻訳に繋がる、それぞれが有機的に関連するメカニズムを明らかにする。 | |
| 4 研究の概要 | 上記研究の足懸りとして、先ず捕食者としてサンショウウオ幼生の添加により、エゾアカガエル幼生の形態が膨満化することに強く関連する遺伝子をスクリーニングし、その構造から遺伝子の機能を探り、組織化学的手法を用いることにより、遺伝子の発現場所から膨満化形態を誘導する意味を調べる。 | |
| 5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 森 司 研究計画立案・マイクロアレーの作成と遺伝子発現解析 ・研究分担者 (役割分担) 司馬 肇 (タンパク質の分離分取) 荻原 淳 (たんぱく質のMSによる同定) 朝比奈 潔 (組織切片の作成と組織化学) 鈴木 美和 (ストレス指標ホルモンの測定) 早川 智 (ストレス関連ホルモンなどの計測) | |

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

部科校名：生物資源科学部

氏名：森 司

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

昨年度に引き続き研究費を頂くことが出来たため、本年度ようやく成果の一部（全体で4本の論文を計画する中の1本目）を世界的に有名な国際誌である PLoS ONE に仮アクセプトにまで漕ぎ着けることが出来た。その論文をこの報告書と共に添付する。

1. 捕食者誘導による表現型の可塑性を支配する遺伝子のスクリーニング

個体発生のアウトラインは遺伝プログラムによって制御されている。進化的解釈に従えば、形態・生活史といった生物の表現型は、環境と遺伝の揺らぎの中で自然選択を通してデザインされてきたと考えられる。形質の発生過程は一般に堅牢・安定的で、同一の遺伝子型を有する個体は、環境の揺らぎの下でも同一の形質発生を示す。一方、形質の発生過程が、環境条件に敏感に反応する可塑的側面があることも、また事実である。同じ遺伝子型の個体が環境の違いに応じて異なる表現型を示すことを表現型の可塑性と呼ばれ、これがどのように遺伝的にプログラムされているのか、また、どのような選択要因によって進化してきたかは進化生物学上、大変興味深い問題である。我々はこれまでの研究の中で、捕食者誘導により大きく形態を変化させる両生類無尾類（エゾアカガエル *Rana pirica*）の幼生（オタマジャクシ）を用いて研究を行ってきた。このオタマジャクシは捕食者であるエゾサンショウウオ幼生と同所的に暮らして発生が進むと、頭胸部が膨満型の形態になり、ヤゴと同所的に生息することにより尾部のみを著しく肥大化させる。これらの形態は対捕食者誘導形態防御と捉えられる。*Rana*, *Hyla* 属カエルのオタマジャクシの、捕食者に反応した形質の可塑性は、ヨーロッパ・北米でも研究されている。しかし、エゾアカガエルに見られる対捕食者誘導形態防御は他の研究で報告されているものとは著しく異なり、捕食者であるエゾサンショウウオ幼生に特異的な反応である。膨満型の防御形態誘導はエゾサンショウオの捕食圧に対して特異的に進化してきたものと考えられる。

我々はこれらの現象を分子のレベルで説明を加えるために分子生物学的な手法（遺伝子の引き算とマイクロアレイ）で解析してきた。特にサンショウウオ誘導型に焦点を当てて表現型の可塑性を示すオタマジャクシを解析し、膨満型の頭胸部での組織とコントロールの頭胸部でそれぞれにユニークに発現している遺伝子群を見出した（Mori et al., 2005. BBRC 330:1138-1145）。その結果、十分膨満化している段階では、血液凝固を抑え、血管系を確保するための遺伝子が働き出すことが判った。また、結合組織を緩やかに壊し、更に結合組織の再構築を行っていることも遺伝子発現から推測された。さらに、ヒトでは難治性である類天疱瘡の遺伝子とほとんど同じ遺伝子が発現していることも判った。このように、実にユニークな多くの遺伝子がオタマジャクシの膨満化に関与していることが見出された。

更にこれらの遺伝子の中で特に膨満化に中心的な役割を果たしている遺伝子を検索するために、サンショウウオを添加後6時間で発現し4日、8日と増加して、4日間サンショウウオと飼育していたが捕食者を抜いた4日の群（8day out）と比較することにより発現が有意（ $p < 0.05$ ）に減少する遺伝子のスクリーニングをマイクロアレイを用いて試みた。

実験方法：そのためこれらの遺伝子の中で特に膨満化に中心的な役割を果たしている遺伝子を検索するために膨満化誘導と捕食者を飼育期間中に抜く膨満化解消実験を行った。この実験により膨満化と正の相関をもって発現してくる遺伝子と逆に逆の相関を持って発現してくる遺伝子のスクリーニングが可能となる。そのために2Lの水槽に50匹のオタマジャクシを添加して飼育したものをコントロールとした。これと同様水槽に2匹のエゾサンショウウオ幼生を添加後6時間飼育した群、4日飼育した群、8日間飼育した群を作成した。更に4日間サンショウウオと飼育した後、捕食者であるサンショウウオ幼生を抜いて4日間した群（8day out）を作成した。これらの群を全て3群作成した。また、サンショウウオの捕食によるオタマジャクシの個体減耗を最小にするために更に、予備水槽として同じ状態の水槽を2群作成し、実験群のオタマジャクシが減耗した場合、オタマジャクシの補充を行い、一つの水槽にオタマジャクシの数が50匹になるように飼育実験を行った。

実験結果：その結果サンショウウオ幼生の添加により発現し、捕食者を抜くことにより減少する遺伝子として3種類の **Uromodulin-like** 遺伝子をクローニングした。一方、この逆に捕食者の添加と共に発現が弱まる顕著な遺伝子として **type1-keratin** や **type2-keratin** が示された。この直接膨満形態への変化に関与していると推測される **Uromodulin-like** 遺伝子（今回我々は **pirica** と名付けた）は受精の際の卵の透明体の機能ドメイン（ZP）を有しており、この遺伝子の発現により膜の水の不透過を引き起こすことが推測される。既に生理学的な解析により、膨満化した固体はコントロールと比べ有意（ $p < 0.05$ ）に体液水分量が高いことが判明しているため、この体内に蓄えられえた水分を保持するためにこれら **pirica** 遺伝子は重要であることが理解できる。また、これら **pirica** 遺伝子はオタマジャクシの表皮で約

部科校名：生物資源科学部

氏名：森 司

研究の結果 (つづき)

2から5 μm の厚さで発現していることが判っているため、体液を体の最外層で保持していると考えられる。これらの結果は今現在PLOS ONEに仮アクセプトの状況となっている。

2. 膨満形態形成に關与する水泡症遺伝子のクローニング

しかし、これら上述のpiricaやkeratin遺伝子で膨満化への仕組みを十分に説明は出来ない。そのため、今回更に既に膨満化と關連があることが所期のマイクロアレーの実験で示されていた水泡症遺伝子(Bullous pemphigoid antigen)の断片も基に完全長を取り出し、オタマジャクシの膨満化の機能を推測した。

実験方法：5'-及び3'-RACE法による水泡症遺伝子の全長解析

サンショウウオによる捕食ストレスをかけて膨満化したオタマジャクシ、頭胴部より抽出した Total RNA を用いて 5'-及び 3'-RACE 法を行った。この Total RNA と T17ADP primer (5'-GAG TCG ACT CGA GAA TTC TTT TTT TTT TTT TTT TT-3') を用いて逆転写反応を行い、一本鎖 complementary DNA (cDNA) を合成した。次に、これを鋳型として、3'-RACE の場合は GSP (遺伝子特異的配列) と ADP primer (5'-GAG TCG ACT CGA GAA TTC-3') の組み合わせで、5'-RACE の場合は GSP と Abridged Primer (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3') の組み合わせで PCR を行った。PCR で得られた遺伝子断片を pCR II-TOPO または TOPO XL vector に組み込み、Competent cell TOP10 へ Transformation を行った。得られたクローンから Plasmid を抽出し、DNA Sequence を行った。このようにして得られた塩基配列から順次 Primer を設計し、5'-及び 3'-RACE を行い、新規遺伝子の全長の塩基配列の解析を行った。次にこの遺伝子のタンパク質翻訳領域 (ORF) の配列を用いて PCR を行い、解析してきたそれぞれの遺伝子断片が 1 つの遺伝子として存在することを確認した。

実験結果：今回得られた水泡症遺伝子は、未だ開始コドンの出ていない 7824bp の配列と開始コドンを含めた 8639bp の配列が得られた。また、解析できた塩基配列をアミノ酸変換し、Blast 検索したところ human bullous antigen1 と相同性が高く、共に e-value は 0.0 であった。完全長を得られた配列では、塩基配列の 926-928bp に開始コドン、8591-8593bp に終止コドンが存在し、予測 pI 及び分子量は、6.33 及び約 295kD であった。このタンパクは C-末端側には plectin ドメインが、N-末端側には spectrin ドメインが存在し、この Plectin は、中間径フィラメント (ケラチン) と結合することが知られている。また Spectrin が 2 つで plakin ドメインを形成し、ヘミデスモソームに結合することが判っている。そして、bullous pemphigoid antigen1 は、ヘミデスモソームを形成し細胞と結合、更に基底膜と結合している bullous pemphigoid antigen2 とも結合して皮膚の結合組織を形成している。しかし、ヒトでは自己抗体の攻撃によりケラチン及び bullous pemphigoid antigen2 との結合が脆弱になり、表皮と真皮の間が解離し、水が流入することで水泡ができる。このことから、ケラチン遺伝子の発現低下とこの水泡症遺伝子の発現はリンクする可能性が出てきた。

3: 地理的隔離と表現型の可塑性に関する研究

地理的隔離によりエゾサンショウウオにほとんど会ったことが無いと予測される奥尻島のエゾアカガエルのオタマジャクシの頭部の膨満化は北海道産のエゾアカガエルのオタマジャクシのそれと比較すると有意に低い。このことは同種が遺伝子として膨満化の対捕食者戦略を持っている訳では無く、歴史的な過去においてサンショウウオと出会った経験が遺伝子に刻まれた可能性を示唆する。そのため、これらオタマジャクシ間でどのような遺伝子発現の差が見られるのかをマイクロアレーなどを用いて解析した。

方法：遺伝的組成を解析するために以下に示す 4 種類の交配実験を行った。北海道本島産のエゾアカガエルオタマジャクシのみで交配した個体 (HH)、北海道本島産(♂) × 奥尻産(♀) のオタマジャクシ (HO)、奥尻産(♂) × 北海道本島産(♀) のオタマジャクシ (OH)、奥尻産のオタマジャクシのみの交配個体 (OO) のそれぞれにエゾサンショウウオを暴露し、8 日目でオタマジャクシをサンプリングしておたまじゃくしの頭皮をカミソリで剥ぎ RNA 抽出を行った。これらの実験系ではそれぞれに、捕食者を暴露していない北海道本島産エゾアカガエル幼生をコントロール群とし、実験 1 で使用したマイクロアレーを用いてアレー解析をした

実験結果：発現遺伝子のクラスター解析を行った。発現遺伝子の 2 群間比較は[北海道産のサンショウウオ誘導型個体]と[奥尻産のサンショウウオ誘導型個体]の遺伝子発現データを用いて行った。その結果、fold change が 1.5 倍以上に有意差 ($P < 0.05$) のある遺伝子は 180 個存在していた。現在、これらの遺伝子の役割と機能を調べている最中である。

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年 4月30日

日本大学 総長 殿

氏 名 月瀬 東

所属・資格 生物資源科学部 ・ 教授



下記のとおり報告いたします。

| | | |
|--------------------------|--|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 超ミニブタの実験用モデル動物としての応用法に関する研究 | |
| 3 研究の目的 | <p>従来のミニブタに比べて、体型が極めて小さく体重も軽い超ミニブタ（成豚体重で10kg以下）は、実験室内でもキャビネットやチャンバーによる飼養管理が容易であり、ラットやウサギなどと同様に、実験用モデル動物として種々の実験に利用することが可能である。また、新薬開発などの各種試験にイヌ、サル等に替わる実験動物として超ミニブタの利用が強く期待される。</p> <p>近年、ヒトに多発する糖尿病は、極めて治療の困難な全身性疾患の一つとして位置づけられ、実験医学領域においても、この病気のより正確で詳細な情報が望まれている。</p> <p>本研究では、人為的に作出した超ミニブタの糖尿病モデルを用いて、全身性に発生する病態を臨床医学的、病態生理学的、形態学的ならびに形態化学的に明らかにすると共に、超ミニブタが極めて有用性の高い実験用モデル動物であることを実証する。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>I. 対照群：実験動物として未知の動物である超ミニブタの正常な組織ならびに細胞学的構築の本態を明らかにしておくことは、極めて大切である。従って、本研究では対照群につき、組織学的、細胞学的ならびに組織細胞化学的に、その正常な形態ならびに形態化学的性状を明らかにする。</p> <p>II. 実験群：成熟した雄超ミニブタにアロキサンを投与し、人為的にI型糖尿病モデルを作出する。その後、血液性状を詳細に検査し、経時経過に伴う病態の変化を追究するとともにCTやMRIによる画像をもとに、糖尿病の進行度合いを詳細に検査し、血管分布を主とする諸臓器の病的変化を観察する。</p> <p>また、剖検時に滑膜、眼、膵臓、肝臓、大脳、泌尿器などの組織を採取する。これらの組織片を試料として、光学あるいは電子顕微鏡を用い、組織学的ならびに組織化学的に病的変化を追究する。</p> | |
| 5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します） | <p>・研究代表者 月瀬 東（総括；臨床医学的観察，形態学的ならびに形態化学的研究）</p> <p>・研究分担者（役割分担）</p> <p>酒井 健夫（病態生理学的解析）</p> <p>金山 喜一（病態生理学的解析）</p> <p>大場 茂夫（糖尿病モデルの作出，臨床医学的観察）</p> <p>北川 勝人（糖尿病モデルの作出，臨床医学的観察）</p> <p>安井 禎（臨床医学的観察，形態学的ならびに形態化学的研究）</p> <p>木場 秀夫（臨床医学的観察，形態学的ならびに形態化学的研究）</p> <p>諸星 康雄（糖尿病モデルの作出，形態学的ならびに形態化学的研究）</p> <p>桑原 康（糖尿病モデルの作出，臨床医学的観察）</p> | |

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

部科校名：生物資源科学部

氏名： 月瀬 東

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

体型が極めて小さく、体重も軽い超ミニブタ（成豚体重10kg以下）は、性質も温厚で中型犬用のケージを用いて実験室内での飼育が可能であり、実験用モデル動物としての利用が期待される。

本研究は、I型糖尿病モデルを作出する前に、対照群として、超ミニブタの正常な組織ならびに細胞学的構築について検討した。

[対照群]

生後4～6ヶ月齢の雄超ミニブタから、尿生殖器系（腎臓、精巣、精巣上体、精巣輸出管、精嚢腺、前立腺、尿道球腺）、消化器系（肝臓、膵臓）、内分泌系および中枢神経系（副腎、甲状腺、下垂体、大脳）、リンパ系（脾臓、腸間膜リンパ節）、骨および関節（大腿骨、滑膜）、視覚器および外皮（眼、背部および腹部皮膚）の各器官より採取した組織片を光顕ならびに電顕用に分けて、固定、包埋した。これらを常法に従い切片とした後、各種染色を施し観察したところ、生殖腺ならびに副生殖腺はよく発達し、曲精細管の精細胞は活発に分裂し、多くの成熟した精子も観察された。精巣上体各部の上皮細胞はよく発達し、精巣上体尾部の管腔には成熟した精子の凝塊が貯留していた。また、ブタにおける雄性副生殖腺は他の哺乳類と比べて、特異的によく発達し、その腺上皮から分泌される腺液は多くの糖質を含み、精子の生理機能に重要な役割を有するとされている。本研究で観察した精嚢、前立腺、尿道球腺終末部の腺上皮は、よく発達し、上皮内には多くの分泌顆粒が認められ、腺腔内にはしばしば分泌液が貯留していた。これらの腺上皮に糖検出反応を適用すると、多くの腺細胞と腺腔内分泌物は強ないし中等度に陽性反応を示した。

本研究で作出するI型糖尿病は、超ミニブタの膵島と肝臓、腎臓、眼、脳、皮膚、骨、滑膜の毛細血管に変化が招来されると考えられることから、超ミニブタにおけるこれらの正常な組織・細胞の構築を明らかにすることを試みた。

超ミニブタの膵島は、数百～数十箇の島細胞が集合した比較的大きなものから、数箇の細胞のものまで、膵臓の腺小葉内に存在していた。膵島を抗グルカゴン、抗インスリンおよび抗ソマトスタチン抗体を用いて免疫染色を施すと、A細胞、B細胞およびD細胞がそれぞれ特異的に陽性反応を示した。また、これらの島細胞は電顕的にそれぞれの細胞内に認められる顆粒や細胞小器官の性状により、三つの型別が可能であった。肝臓は、生体における細胞生命を維持し、細胞機能を発現させるために重要な糖代謝の中心的な器官である。肝臓を光顕ならびに電顕的に観察したところ、肝細胞には多数のグリコーゲン粒子が含まれており、これらは中性糖検出反応によっても明らかとなった。また超ミニブタの小葉間結合組織は発達し、血管系が豊富に分布していた。腎臓は毛細血管網（皮質表層、尿細管周囲）、糸球体細動脈、小葉間動脈などの動脈系が豊富に分布し、血管内皮とその基底側の間質が明瞭であった。腎臓の濾過機能において極めて重要な役割を有する糸球体基底膜が電顕観察により確認された。眼球周囲の血管膜は極めて多くの毛細血管が分布し、眼房水や硝子体の生成など、視覚機能を営む上で不可欠の機能を有する。また、網膜の内果粒層から神経線維層には、網膜を養う網膜血管系が観察された。これらの毛細血管の正常な内皮細胞と内皮周囲の基底側が光顕ならびに電顕的に観察された。大脳実質に分布する毛細血管の構造では、内皮細胞と血管周囲の構造を詳細に調べた。皮膚には毛細血管が豊富に分布し、血管内皮とその周囲の構造は主として光顕的観察した。可動関節の最内側は滑膜が位置し、そこにはよく発達した毛細血管網が認められ、滑液の産生という重要な機能を有する。骨組織中の毛細血管も脱灰標本として光顕的に観察し、内皮の正常な状態を確認した。また、骨層板など正常な骨の微細構造についても観察した。

以上に述べたように、これらの器官は血管系が豊富に分布し、その組織構造ならびに超微細構造は従来のミニブタと比較して、差異は無いことが明らかとなった。

骨格形成についてX線CTを用いて観察した結果、超ミニブタにおける全身骨格系には形成異常や奇形などは認められず、ブタとしての正常な骨格系を示していた。また、血液検査においても超ミニブタの血液性状は、従来のミニブタと比較して、ほぼ一致していた。

[実験群]

I. 超ミニブタを実験モデル動物として用いたI型糖尿病の誘発

供試動物は、第1群（発症後3ヶ月）、第2群（発症後6ヶ月）および第3群（発症後12ヶ月）に分け、それぞれ6頭を用意し、そのうち各4頭を実験用として処置し、各2頭は対照とした。アロキサン（シグマ社）を蒸留水に溶解し、150～200mg/kgを静脈より投与して、アロキサン糖尿病を誘発させた。アロキサン投与後には、血中グルコース濃度は300mg/dl以上に上昇し、膵B細胞のインスリン合成機能が強く障害されたことを示した。I型糖尿病誘発後、第3日目よりインスリン1～2U/dayを皮下注射により投与して、供試動物の血中グルコース濃度を300mg/dl近くに維持した。

II. 第1群（発症後3ヶ月）の観察

アロキサン糖尿病の誘発を血液検査により確認し、3ヶ月を経過した超ミニブタをX線CTおよびMRIにより観察すると共に、剖検後膵臓、肝臓、腎臓、眼、脳、皮膚、骨、滑膜を採取して、組織学的あるいは

部科校名：生物資源科学部

氏名： 月瀬 東

研究の結果（つづき）

組織化学的に観察した。

X線CTおよびMRIによる観察：全身麻酔下でX線CTおよびMRI検査を実施した。X線CT検査においては全身を撮影後、画像処理を行い、全身骨格系について詳細に観察した。頭蓋骨、顔面骨および椎骨などの軸性骨格においては、それぞれの特徴的な形状には全く変化は認められず、これらの軟骨部や関節部にも形態的な異常などは観察されなかった。また、付属骨格（前肢、後肢）についても、軟骨部や関節部を含め、形状の変化は認められなかった。全身の骨の骨密度はやや減少傾向にあることが示されたが、骨髓などでは著変を示さなかった。MRI検査においては、脳・脊髄の中樞神経系に特に病的変化は認められなかった。膵臓、肝臓および腎臓においては、肝臓の一部に腫大した所見が観察された。

組織学的観察：膵島のH-E染色標本による観察では、その一部に空胞化と核の濃縮した細胞がみられた。膵島に対して抗グルカゴン、抗インスリンおよび抗ソマトスタチン抗体を用いた免疫染色を行ったところ、B細胞の抗インスリン抗体に対する染色性は減弱していた。膵A細胞および膵D細胞に対するこれらの抗体の染色性は、対照と比べて変化は認められなかった。膵B細胞の微細構造を電顕的に観察すると、明らかに細胞の空胞化、顆粒構造の不形成化や崩壊が観察された。眼、腎臓、肝臓、滑膜は特に毛細血管網のよく発達した器官であるので、ここではこれらの器官における観察所見を中心に述べる。眼球のうち、網膜毛細血管は内皮とその周囲の線維層はやや菲薄であったが、この部位には顕著な硬化病変は認められなかった。他の部位における眼球血管膜の毛細血管についても、同様であった。腎臓における糸球体では、メサンギウム領域の拡大がわずかにみられ、電顕的観察において一部の基底板上に肥厚が認められた。肝臓においては、類洞を中心に硬化様変化がわずかに観察された。滑膜は毛細血管が豊富に分布しており、これらの内皮細胞とその周囲の線維層についても、顕著な硬化様変性はあまり認められなかった。

Ⅲ. 第2群（発症後6ヶ月）の観察

アロキササン糖尿病誘発後、6ヶ月を経過した超ミニブタについて第1群と同様に観察した。

X線CTおよびMRIによる観察：第1群と同様に全身麻酔下でX線CTおよびMRI検査を実施した。X線CT検査により、軸性骨格および付属骨格を観察したところ、3ヶ月と同様に形態的な異常などは認められなかった。これらの軟骨部や関節部にも形態的な異常などは観察されなかった。MRI検査についても顕著な変化はみられなかった。

組織学的観察：膵島について、組織学的ならびに組織化学的に観察したところ、膵B細胞の抗インスリン抗体に対する反応は著しく減弱し、細胞の空胞化や顆粒構造の崩壊が認められた。眼球の網膜毛細血管は内皮とその周囲の線維層が菲薄となり、硬化様変性も観察された。腎臓においては、第1群と比較すると、糸球体メサンギウム基質が増生し、基底板上に肥厚も明らかであった。また、輸入および輸出細動脈についても硬化病変が認められた。肝臓では類洞を中心に、滑膜においては毛細血管内皮細胞とその周囲に、しばしば硬化による変性が観察された。

Ⅳ. 第3群（発症後12ヶ月）の観察

アロキササン糖尿病誘発後、12ヶ月を経過した超ミニブタについて第1群および第2群と同様に観察した。

X線CTおよびMRIによる観察：X線CTにより、軸性骨格および付属骨格を検査したところ、これらの軟骨部や関節部を含め、形態的な異常などはほとんど観察されなかった。MRI検査においても、諸臓器における顕著な病的変化はみられなかった。

組織学的観察：膵島を光顕ならびに電顕的に観察したところ、膵B細胞の選択的な障害が確認された。眼球の網膜毛細血管では、内皮とその周囲の線維層において顕著な硬化様変性が認められた。腎臓の糸球体については、明らかなメサンギウム基質の増生および基底板上に肥厚と硬化が観察された。輸入および輸出細動脈においても、より顕著な硬化様変化が認められた。肝臓の類洞ならびに滑膜の毛細血管内皮細胞とその周囲における硬化病変は、第2群のそれに比べ、明らかであった。

正常な超ミニブタの全身骨格系をはじめ、内臓系、中枢神経系、感覚器および滑膜は形態学的に従来のミニブタと比較して、差異は認められず、血液性状も従来のミニブタと比較して、ほぼ一致していた。

本研究では、アロキササン糖尿病を超ミニブタに誘発させることに成功し、特に急性例の観察においては典型的な症状を発症することが明らかとなった。一方、アロキササン糖尿病を誘発した超ミニブタは、高血糖に対する術後管理が難しく、長期間動物を生存させつつ継続観察することは、極めて高度の技術と実験環境が必須である。超ミニブタのアロキササンに対する感受性は、個体によりかなり大きな差異を有しており、個体によっては高血糖を得るまでに多くのアロキササン投与量を必要としたことから、諸臓器において、糖尿病の病変と、薬物による病変の区別が困難な例も生じた。本研究では、超ミニブタのアロキササン糖尿病にX線CTおよびMRIを適用したが、その病態は主として、毛細血管の病変を主徴とすることから、血管造影技術の開発が不可欠であり、本動物の読影にはさらなる検討を加える必要があろう。

注：必要に応じて、このページをご使用ください

注：課題番号を記入してください。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成 21年 3月 31日

日本大学 総長 殿

氏 名 榛葉繁紀



所属・資格 薬学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|---------------------------|---|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 体内時計の脂肪細胞特異的な破綻によるメタボリックシンドローム発症とそのメカニズム | |
| 3 研究の目的 | 肥満はメタボリックシンドロームの主因であり、ひいては動脈硬化をはじめとする様々な致死的な疾患をひきおこす。近年、シフトワーカーがメタボリックシンドローム様の症状を示すことが報告され、時計遺伝子の機能とメタボリックシンドロームの発症との関連性が急速にクローズアップされてきている。そこで本研究ではこれらの知見を基に時計遺伝子ノックアウトマウスを用いてメタボリックシンドロームの発症における時計遺伝子の役割を明らかにすることを目的とする。 | |
| 4 研究の概要 | 時計遺伝子 BMAL1 の遺伝子エクソン4-8を挟む形で lox P 配列を挿入した F1 マウスを aP2 遺伝子のプロモーター／エンハンサー部位下流に Cre 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスと交配させることにより脂肪細胞特異的ホモ欠損マウスを作製する。得られたマウスについて、生化学的パラメーターならびに病理学的所見を検討する。また各臓器における遺伝子発現量の変化を測定する。 | |
| 5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) | <ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 榛葉繁紀 ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 手塚 雅勝 (KO マウスの生化学的解析) 石毛久美子 (KO マウスの行動薬理的解析) 小宮山一雄 (KO マウスの病理学的解析) 浅野 正岳 (KO マウスの病理学的解析) 岩瀬 孝志 (KO マウスの病理学的解析) 上野 高浩 (耐糖能実験及びその解析) 福田 昇 (耐糖能実験及びその解析) | |

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

部科校名：薬学部

氏名：榛葉繁紀

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

近年、高齢化社会の進展にともない、“健康に長寿を全うしていく”ことは国民の切なる願いであり、医薬学界にとっても大きな課題となっている。一方でライフスタイルの変化により糖尿病、高血圧および高脂血症などのいわゆる生活習慣病を複数クラスターし（メタボリックシンドローム）、最終的には動脈硬化症を発症する患者数は増加の一途をたどっている。したがってその予備軍も含めた患者数を考慮すれば、メタボリックシンドロームの発症メカニズムを解明し、それに基づいた適切な予防法や治療のための新たな薬剤の開発は喫緊の社会的要請である。メタボリックシンドローム患者数の急増の原因は、脂肪性食品からのエネルギー過剰摂取、交通手段の発達による運動不足、過度のストレスなど多種多様であるが、これらに加えて、勤務年数が長い女性看護師に乳がんが多いこと、また男性のシフトワーカーに前立腺がんが多いことなどからシフトワークとメタボリックシンドロームとの関連が疑われている。シフトワークと疾病発症に関する我が国における大規模疫学調査は、2006年にまとめられ、その結果において、全体の死亡リスクは変わらないものの、シフトワークによる肥満者数の増加ならびに虚血性心疾患による死亡のリスク増大が示された¹⁾。興味深いことに、夜間に固定して勤務する限りではこのような虚血性心疾患による死亡リスクの有意な増加は認められない。同様の結果は、西欧諸国における疫学調査においても得られており、シフトワークが肥満をはじめとするメタボリックシンドロームのリスクファクターであることが示されている。これらの結果は、シフトワークによる体内時計のかく乱がメタボリックシンドローム発症のリスクファクターとなることを示唆している。

これらメタボリックシンドローム発症のリスクファクターが肥満症を誘発し、その結果として糖尿病をはじめとする代謝性疾患の発症につながることはよく知られている。メタボリックシンドロームの主因である肥満症は、脂肪細胞の数の増加ならびに肥大化によって生ずる。そこで我々は脂肪細胞機能を制御する転写因子を検索したところ、体内時計のマスターレギュレーターである時計遺伝子 Brain-Muscle Arnt Like Protein 1 (BMAL1) の発現が脂肪細胞分化の進行に伴い増加することを見出した。さらには BMAL1 が脂肪細胞機能を遺伝子レベルにおいて調節していることを明らかにした。また最近になりメタボリックシンドローム患者の内臓脂肪組織における BMAL1 機能の異常が報告されており、さらには SNP 解析により BMAL1 機能不全と糖尿病ならびに高血圧発症との関係が疑われている。これらの事実は細胞機能維持における BMAL1 すなわち体内時計の重要性のみならず、その破綻がメタボリックシンドローム発症へと通ずることを示唆している。以上をふまえて本研究では、組織特異的 BMAL1 ノックアウト (KO) マウスを作製し、これを用いて組織特異的な BMAL1 の機能を明らかにするとともにメタボリックシンドロームの発症における時計遺伝子の役割を検討した。

1. BMAL1 欠損マウスの作製

組織特異的な BMAL1 欠損マウスを作製する目的でマウス BMAL1 遺伝子中にエクソン 4-8 を挟む形で loxP 配列を挿入したターゲティングベクターを構築した。この loxP に挟まれた領域は bHLH ドメインを含むため、Cre リコンビナーゼ発現マウスとの交配の後、DNA との結合能を有しない不活性な BMAL1 タンパク質が産生される。このターゲティングベクターを C57BL/6 マウス由来 ES 細胞にエレクトロポレーションし、ES 細胞クローンを単離した。得られた ES 細胞クローンをを用いてキメラマウスを作製した。さらに交配を重ね現在 F1 (flox/flox) マウスを確立した。

2. BMAL1 KO マウスの特徴

1. で得られた BMAL1 flox/flox マウスを全身、脂肪細胞特異的ならびに肝臓特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配し、全身性 BMAL1 KO マウス（以下、BMAL1 KO マウス）、脂肪細胞特異的 BMAL1 KO マウスならびに肝臓特異的 BMAL1 KO マウスを作製した。平成 20 年度は肝臓特異的 BMAL1 KO (L-BMAL1 KO) マウスの解析を行い、以下の知見を得た。

L-BMAL1 KO マウスは通常餌飼育下においてコントロールマウスとほぼ同程度の体重を示し、また血液生化学検査においても血中ならびに肝臓中におけるトリグリセリド (TG) 量ならびに遊離脂肪酸量に違いは認められなかった。そこで肝臓での脂質代謝における BMAL1 の役割を検討する目的でコントロールマウスならびに L-BMAL1 KO マウスに高脂肪食負荷を行いその影響を検討した。その結果、L-BMAL1 KO マウスは、高脂肪食負荷によりコントロールマウス以上の体重増加を示した。また肝臓内により多くのコレステロールならびに TG の蓄積が認められた。これらコレステロールならびに TG 量は血液中においても増加していた。しかしながらその一方で L-BMAL1 KO マウスにおける脂肪組織は、コントロールマウスと比較して明らかに小さく、肝臓における BMAL1 が脂肪組織における脂質蓄積を調節していることが示唆された。

部科校名：薬学部

氏名：榛葉繁紀

研究の結果（つづき）

次いで肝臓における BMAL1 のインスリン感受性ならびに糖代謝調節への関与を明らかにする目的で L-BMAL1 KO マウスの耐糖能を検討した。経口ピルビン酸負荷試験において L-BMAL1 KO マウスは、有意に低い糖新生活性を示した。しかしながら糖新生に関わる酵素遺伝子の発現はコントロールマウスよりも高いものであった。また肝臓グリコーゲン含量が L-BMAL1 KO マウスにおいて高値を示したことから、肝細胞内において糖新生は活発に起こっているものの糖の排出が低下しており、そのため過剰な糖がグリコーゲンの形で貯蔵されたと思われる。経口ブドウ糖負荷試験ならびにインスリン負荷試験において L-BMAL1 KO マウスは、空腹時血糖値の著しい低下が示され、このことから糖新生能の低下が示された、経口ブドウ糖負荷試験において L-BMAL1 KO マウスは、コントロールマウスとほぼ同程度のグルコースクリアランスを示し、肝臓 BMAL1 が全身のインスリン感受性の調節には関与しないことが示された。

L-BMAL1 KO マウスの血液生化学検査において肝臓特異的タンパク質の減少が認められ、特にアルブミン量の減少が顕著であった。L-BMAL1 KO マウスにおけるアルブミン量の減少は mRNA レベルにおいても観察されたことから、アルブミン遺伝子の転写に関わる転写因子の発現量を検討した。その結果 HNF-1 の発現量低下が認められ、このことがアルブミン量の低下の要因であることが示唆された。

以上の結果から肝臓における BMAL1 は、肝臓内における糖・脂質代謝の調節を行うにとどまらず、アルブミン産生による物質輸送さらには未知のメカニズムによる脂肪組織の脂質蓄積の調節など肝臓と他臓器とのクロストークにも関与することが示された。今後肝臓における BMAL1 活性あるいは量的調節がメタボリックシンドローム治療薬開発のターゲットとなることが示唆された。

3. 脂肪酸による脂肪細胞における BMAL1 の発現制御

肥満に伴いマウス脂肪組織において BMAL1 発現量が顕著に増加することから、培養脂肪細胞及び肝細胞を用いて BMAL1 発現への脂肪酸の影響について検討した。3T3-L1 脂肪細胞を種々の脂肪酸により処理し、BMAL1 発現量を検討したところ、アラキドン酸処理により顕著な発現量の増加が示された。しかしながら、このアラキドン酸による BMAL1 発現量の増加はラット初代培養肝細胞においては認められなかった。次いで種々の阻害剤を用いてアラキドン酸代謝物ならびに細胞内シグナル伝達因子の BMAL1 発現への影響を検討したところ、PG 類および細胞内 Ca^{2+} がアラキドン酸による BMAL1 の発現誘導に関わることが示された。次いで Bmal1 遺伝子プロモーター領域上のアラキドン酸応答領域を同定するために、種々の長さの Bmal1 遺伝子プロモーター領域を有するレポータープラスミドを作製し（図 6A）、その活性に対するアラキドン酸の影響を検討した。その結果、Bmal1 遺伝子+3467/+9060 の領域がアラキドン酸応答領域であることが明らかになった（図 6B）。本領域中をコンピューター解析したところ、CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) 結合配列の存在が見いだされた。C/EBP ファミリーは C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP γ 、C/EBP δ 、C/EBP ϵ 、ならびに CHOP を含み、その中でも C/EBP β は、炎症時に発現が誘導され、CaMK によりリン酸化され活性化することが知られている。したがってこれらの結果から、アラキドン酸の刺激が PG 類を介して細胞内カルシウム量の増加し、その結果、リン酸化および活性化された C/EBP β が Bmal1 遺伝子プロモーターの+3467/+9060 の領域に働き Bmal1 mRNA 発現を誘導することが示唆された。一方細胞内カルシウム量の上昇により活性化される転写因子として CREB⁴⁾が、長鎖脂肪酸や PG 類をリガンドとする転写因子として PPARs が知られており、これらの Bmal1 mRNA 発現への関与を検討したが、いずれ Bmal1 mRNA 発現には影響を与えなかった。これらの結果においてもまたアラキドン酸処理による Bmal1 mRNA 発現誘導への C/EBP β の関与が支持される。

4. ヒトにおける肥満に伴う時計遺伝子発現の変化

我々は、ヒト末梢血白血球の時計遺伝子発現が肥満患者において増加し、その日内変動パターンも健常者とは異なっていることを明らかにした。この白血球における時計遺伝子発現と内臓脂肪組織ならびに肝臓における時計遺伝子発現との関連を明らかにする目的で、肥満モデルマウスにおける白血球、内臓脂肪組織、皮下脂肪組織ならびに肝臓における時計遺伝子発現の日内変動を検討した。6 週齢の db/db マウスから 6 時間ごとに各組織を摘出し、RNA を抽出した。その後、RT-qPCR 法により各遺伝子の発現を測定した。その結果、内臓脂肪組織ならびに肝臓における時計遺伝子の発現は極めて類似していた。また白血球における時計遺伝子の発現は、これら内臓脂肪組織ならびに肝臓におけるそれとの類似性を示した。これらの結果は、メタボリックシンドロームに伴うヒト内臓脂肪組織における時計遺伝子の変化を理解する上で、白血球における時計遺伝子の発現解析が有効なマーカーとなることが示唆された。

以上の結果より BMAL1 の機能異常が、メタボリックシンドローム発症へのリスクファクターとなることが示唆された。

平成20年度 学術研究助成金実績報告書

平成21年3月31日

日本大学 総長 殿

氏 名 北中 進



所属・資格 薬学部・教授

下記のとおり報告いたします。

| | | |
|--------------------------|---|---------------------|
| 1 種目 | 一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究 | 注：該当する種目を○で囲んでください。 |
| 2 研究課題 | 抗酸化活性天然薬物による保存的再生医療の確立 | |
| 3 研究の目的 | <p>再生医療は臓器不全に対する次世代治療法として期待され、下肢動脈閉塞症や虚血性心疾患に対する骨髄単核球移植療法が臨床応用されているが、生命予後に対する効果は未だ評価する段階ではない。一方、アンジオテンシン受容体拮抗薬やスタチンなどの薬剤が抗酸化作用を通して組織幹細胞や血管内皮前駆細胞(EPC)などの自己修復細胞の機能を高め、心血管臓器保護、アンチエイジングに働くことを見だし、「保存的再生医療」として提唱してきた。多くの生薬、漢方薬に抗酸化作用のあることが知られているが、これまで組織幹細胞やEPCへの作用を検討した報告はない。本目的は、抗酸化機能が期待される生薬・漢方薬及び単離成分の抗酸化作用と組織幹細胞やEPCの機能に対する作用を検討するものである。</p> | |
| 4 研究の概要 | <p>本研究の概要は、福田研究室で開発された血管内皮前駆細胞(EPC)コロニーアッセイを応用し、EPC保護作用をもつ化合物のスクリーニングを行うことである。具体的な戦略としては大きく分けて二つの方策がある。その第一は、末梢血由来EPCのコロニー発現数を上昇させる物質を探索することである。このためには、培養血液細胞を利用した評価系を検討する必要がある。第二の方策は、EPCコロニーアッセイの実績ある方法である。すなわち、高血圧ラット(SHR)に生薬、漢方薬を投与し、その血液中のEPC増加数で評価する方法である。</p> | |
| 5 研究組織(共同研究・総合研究のみ該当します) | <p>・研究代表者 北中 進 (活性物質の単離・構造決定ならび研究総括)</p> <p>・研究分担者 (役割分担) 松本 紘一 (腎臓を用いた実験指導) 福田 昇 (LRC、心筋幹細胞アッセイ) 矢久保 修嗣 (漢方薬処方 of 幹細胞保護評価) 飯島 洋 (EPCアッセイと構造活性相関解析)</p> | |

部科校名：薬学部

氏名：北中 進

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

*in vitro*系における酸化ストレス量の評価

EPCは、障害された血管内皮を修復する機能を備えており、胎児期のみ存在するとされた血管発生の機序が、成体でも成立することが証明されている。現在、この機序を利用して重症の冠動脈疾患や下肢虚血疾患（閉塞性動脈硬化症、バージャー病）患者の血管再生療法が臨床試験として開始され、その効果が期待されている。EPCを用いた研究では通常、EPCを血液から分離した後に液体培養により増殖させ、colonyを作製して実験を行なう。この理由として、EPCの実験には多量のEPCを必要とするものが多いが、骨髄から生じるEPCが末梢血中に最大でも0.01%しか含まれていないので、細胞を増殖させずに実験を行なうには絶対量が少なすぎるからである。また、EPCが増殖するにあたって、EPC数の増減に関与する因子として酸化ストレス物質がある。*in vivo*系においては、酸化ストレスを与えることにより、EPC数の減少が起こることがわかっているが、*in vitro*系においても同様にEPC数が減少するかどうかは、未だ検証されていない。そこで、酸化ストレス物質として、アンギオテンシンⅡ（AngⅡ）やエピネフリン（Epi）、 H_2O_2 などがあり、これらの物質によるEPC数の変化も、まだ研究されていない。よって本章では、EPCを多量に必要とするSA- β -Gal assayやTBARS assayを行なうために、培養によってEPCを増殖させると同時に、培養時に酸化ストレス物質を与えることで実際にEPC数がどのように変化するかをその影響を検討した。

1) 酸化ストレス（AngⅡ、Epi、 H_2O_2 ）のEPCコロニー数に与える影響

健常人ボランティアの末梢血由来の単核球（MC）画分に各種酸化ストレスを濃度を変えて添加し、EPCコロニーの発現に与える影響について検討した。酸化ストレス物質をそれぞれ濃度別にカウントしたところ、アンギオテンシンⅡ及びエピネフリンにおいては濃度依存的にEPCコロニー数の増加がみられた。それに対し、 H_2O_2 においては濃度が高くなるほどEPC数は減少した。*in vivo*系においては酸化ストレスが強ければ強いほど、EPC数は減少することが報告されている。 H_2O_2 は、酸化ストレスによるEPC数の減少が*in vitro*系において検証された。しかしながら、アンギオテンシンⅡ及びエピネフリンにおいては、酸化ストレスをかけるほどにEPCの増加がみられたため、矛盾が生じた。この結果は、*in vitro*系においては、 H_2O_2 のような細胞自体に直接酸化ストレス障害を与える物質は、EPC機能を障害し、細胞数を減少するが、アンギオテンシンⅡやエピネフリンのように情報伝達機構を介して、間接的に酸化ストレス障害を与える物質は、*in vitro*系においては、酸化ストレス効果が期待できないということが示唆された。また、AngⅡおよびEpiによりEPCコロニー数の増加がみられたことは、これらが、*in vitro*系においては増殖因子としてEPCに作用してしまふことが推定された。

2) 老化関連 β -ガラクトシダーゼ試験（SA- β -Gal assay）

SA- β -Gal assayは、老化細胞の特徴として知られている老化関連 β -ガラクトシダーゼ（SA- β -Gal）活性の発現を、細胞・組織中に存在するSA- β -Galを染色することによって検出する試験法である。SA- β -Galは、老化する以前の細胞や不死化細胞には発現しておらず、老化細胞特有のものである。酸化ストレスが増加すると、生体の構造や機能を担っている脂質、蛋白質・酵素や、遺伝情報を担う遺伝子DNAが酸化されて損傷を受けるため、生体の構造や機能が乱され、老化が早まる。つまり、老化という現象は、受ける酸化ストレス量に比例して進行するものと考えられる。そこで、健常人のMC画分を用いて、各種酸化ストレスを投与し、SA- β -Gal assayを行ない、老化細胞の割合について検討した。SA- β -Gal assayはCALBIOCHEM社のSenescence Detection Kit（Cat. No. QIA117）を用いて行なった。 H_2O_2 を添加した細胞においては濃度依存的に老化細胞の割合が増加した。しかしながら、AngⅡおよびEpiを添加した細胞では濃度依存的な老化細胞の割合の増加は認められず、むしろ、Controlよりも老化細胞の割合を低くするという結果を得た。1)の結果と同様に、*in vitro*系では、直接的に酸化ストレスを細胞に与える H_2O_2 はEPCの老化を促進することが示唆された。

部科校名：薬学部

氏名：北中 進

研究の結果 (つづき)

3) チオバルビツール酸反応物質試験 (TBARS assay)

マロンジアルデヒド (MDA) は、天然に存在する過酸化脂質である。チオバルビツール酸反応物質 (Thiobarbituric Acid Reactive Substances : TBARS) は、この脂質過酸化反応のスクリーニングとモニタリングで用いられている物質であり、MDA と反応して呈色する。発する蛍光によって、酸化ストレス量を推定できる。そこで、健康人ボランティアの末梢血由来の MC 画分に各種酸化ストレスを投与し、細胞に組織や細胞における酸化ストレスの指標としても広く用いられている TBARS assay を行なった。TBARS assay は cayman chemical company 社の TBARS Assay Kit を用いて行なった。アンギオテンシン II 及び H_2O_2 を添加した MC 画分の MDA 濃度においては、酸化ストレス物質濃度が上昇するにつれてマロンジアルデヒド (MDA) 生成量も増加した。これは、酸化ストレス物質が MC 画分を酸化することにより、細胞中に存在する不飽和脂肪酸が酸化され、MDA を多量に生成する過程を明確に表していることがわかる。しかし、エピネフリンを添加した MC 画分においては、エピネフリン濃度が上昇するにつれて、逆に MDA 濃度が低下した。このことは、酸化ストレス物質としての働きに矛盾が生じる。MDA 濃度がむしろ減少したことから、エピネフリンには MC 画分、ひいてはその画分に存在する EPC を酸化ストレスから保護するような作用があるのではないかと考えられた。

*in vivo*系における抗酸化物質の評価

高血圧や動脈硬化などの酸化ストレスによって引き起こされる疾病に対して、ARB であるロサルタンやラジカル消去剤であるテンポールの二種の医薬品は、*in vivo*系における効果が既に立証されている。しかし、それ以外の抗酸化天然薬物においてはまだ検証されておらず、抗酸化効果は不明である。よって、抗酸化効果をもつと考えられる物質を、SHR などの酸化ストレスのかかった動物を用いてスクリーニングする系の確立が必要とされている。柴胡加竜骨牡蛎湯は、ストレスによるコルチゾールやカテコールアミンの分泌亢進が原因の諸疾患に対して抑制的に働くことが知られており、その作用から、EPC 保護作用が期待できる。また、Resveratrol は天然由来の抗酸化物質である。

4) 自然発症高血圧ラット (SHR) を用いた抗酸化天然物質 (柴胡加竜骨牡蛎湯、Resveratrol) の評価

高血圧自然発症ラット (SHR) に、血圧上昇を抑制するための抗酸化物質として知られる柴胡加竜骨牡蛎湯乾燥物 (柴胡加竜骨牡蛎湯はツムラから乾燥エキス顆粒として入手)、および Resveratrol (オリザ株式会社から純品を入手) を、それぞれ実験動物用飼料 MF に混餌して投与した。また、Control には同社の実験動物用飼料 MF を与えた。

4-1) 平均体重の変化

Control 群と比較して、柴胡加竜骨牡蛎湯群、及び Resveratrol 群の順に体重増加傾向が認められた。

4-2) 平均血圧 (収縮期、拡張期) の変化

柴胡加竜骨牡蛎湯群、及び Resveratrol 群は Control 群に比べて血圧の上昇する過程において、血圧の上昇がゆるやかな傾向を示した。しかしながら、収縮期血圧、拡張期血圧ともに血圧降下作用に有意差は認められなかった。

4-3) EPC colony assay

Control 群及び Resveratrol 群は EPC によるはっきりとしたコロニーは観察されなかった。柴胡加竜骨牡蛎湯群においては平均して 7 6 個の EPC のコロニーが観察された。*in vivo*系において、柴胡加竜骨牡蛎湯の抗酸化効果が示唆された。

漢方薬の柴胡加竜骨牡蛎湯は加齢に伴う血圧上昇を若干遅らせたが、血圧には影響を与えなかった。しかし EPC を保護することが今回の研究で観察され、漢方薬に有効性が認められたことは意義あることと考える。今後、*in vitro*系の評価系を確立し、他の有用な天然薬物についても検討を行なう予定である。