

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 3 日

日本大学 総長 殿

氏 名 小見山 道



所属・資格 松戸歯学部・専任講師

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)/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	咬筋抑制反射閾値に対する加齢の及ぼす影響	
3 研究の目的	三叉神経の電気刺激により咬筋および側頭筋において自発的収縮が抑制されるが、この反射は外受容性抑制反射と呼ばれ、脳幹反射であることが明らかにされている。本研究は、電気刺激に対する外受容性抑制反射の閾値を計測し、口腔、顔面領域の慢性疼痛の診査、診断における基準値を示すことを目的としている。今回の研究費の交付期間内においては、加齢が咬筋抑制反射閾値に対して及ぼす影響を検索することを目的とする。	
4 研究の概要	筋電図記録部位は咬筋中央部とする。電気刺激前の筋活動レベルは、最大かみしめ時の30%とする。筋電図での反射発現は、刺激前を基準として50%以上活動が抑制される状態が5ms以上続いた場合とする。今研究では5mAから35mAまで2.5mA間隔で13種類の刺激強度を設定する。13段階の刺激強度の中で、反射が最初に出現した刺激強度を咬筋抑制反射閾値とし、どの年齢群において変化が認められるか検討する。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

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

部科校名：松戸歯学部

氏名：小見山 道

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。）

当研究の一環として、日本人の咬筋抑制反射閾値が欧米人とどのように異なるかを検討した。

研究の結果、日本人は欧米人と比べて触覚閾値やピンプリック疼痛閾値の計測においては繊細な傾向を示したが、咬筋抑制反射閾値に関しては、日本人は出現しにくい傾向があった。

これらの内容は今年8月に開催されるイギリスのグラスゴーにて行われる第12回 World Congress on Painにて学会発表を行う予定であり、雑誌 Pain に投稿中である。

また心理学的変化が咬筋抑制反射にどのように影響を与えるかについても検討し、今年7月にカナダのトロントにて行われる International Association of Dental research General Session にて発表予定であり、この結果は雑誌 Clinical Neurophysiology に投稿中である

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 15 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 木場 秀夫



所属・資格 松戸歯学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/ <input checked="" type="radio"/> 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	インプラント体周囲における骨形成の促進	
3 研究の目的	チタンは耐蝕性に優れ、高い生体親和性を有することから、インプラント体の材料として繁用されている。しかし、チタン自体には細胞増殖や骨形成を促進させる活性は見られない。インプラント体周囲の骨再生を促進するための材料として、種々のタンパク質、ハイドロキシアパタイト（以下HA）などが注目を集めている。そこでタンパク質とハイドロキシアパタイトまたはチタンを組み合わせた複合材料の使用を考えた。本研究の目的はチタンプレートまたはハイドロキシアパタイトとともに複合材料を骨内に埋植し、チタンプレートまたはハイドロキシアパタイトに接する骨組織の再生促進作用を組織学および形態計測学的に確認することである。	
4 研究の概要	ウサギの大腿骨にダイヤモンドバーを用いて骨欠損窩洞を形成した。窩洞に種々に組み合わせた複合担体を埋植し、術後2週、8週で大腿骨を摘出した。組織学的に検索して、各群の新生骨梁形成量を測定・比較した。	
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 ・研究分担者（役割分担） 	

※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：木場 秀夫

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。)

第1実験としてウサギの大腿骨にダイヤモンドバーを用いて骨欠損窩洞を形成した。窩洞にそれぞれの埋植材（ハイドロキシアパタイト、コラーゲンスポンジ、絹フィブロインスポンジおよびチタン）を単体として埋植し、術後2週および8週で大腿骨を摘出し、組織学的に各群の新生骨梁形成量を測定・比較した。第1実験より、それぞれの埋植材による生体への影響および骨形成に及ぼす効果を調べた。

埋植実験：実験はセボフルラン吸入麻酔下で、ウサギの大腿骨にダイヤモンドバーを用いて滅菌精製水を注水しながら径3mmの窩洞を形成した。埋植材（ハイドロキシアパタイト、コラーゲンスポンジ、絹フィブロインスポンジおよびチタン）を単体として埋植し、術後2週、1ヶ月および3ヶ月で大腿骨を摘出し、マイクロカッティングマシン（BS300CL, EXAKT, 大学所有）を用いて、各窩洞を分断するように大腿骨を横断し、以下の組織学的観察に供した。各試料は10%ホルマリン固定後、5%蟻酸ホルマリン溶液にて脱灰した後、通法に従いパラフィン包埋した。包埋したブロックは4~6 μ mのパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色およびアザン染色を行ない顕微鏡観察し、それぞれの埋植材による生体への影響および各群の新生骨梁形成過程を組織学的に比較検討した。

第1実験結果：いずれの埋植材においても、周囲に異物反応や炎症反応は認めなかった。すなわち各埋植材は生体に対して偽害性がなく生体親和性の高い材料であることが示唆された。ハイドロキシアパタイトの周囲には術後2週において類骨組織が多数形成されていた。術後8週では周囲に形成された新生骨は石灰化して層板骨に変わった。コラーゲンスポンジは術後2週において1/5程度に縮小した。術後8週ではほぼ消失した。コラーゲンスポンジ周囲ではハイドロキシアパタイトと同様に、術後2週において類骨組織が多数形成されていた。術後8週では周囲に形成された新生骨は石灰化して層板骨に変わった。絹フィブロインスポンジは術後2週、術後8週において、スポンジ形態が保たれていた。絹フィブロインスポンジ周囲には多角の巨細胞が出現し、周囲から少しずつ貪食された。スポンジに接するように新生骨の形成が観察された。チタンでは術後2週において周囲に新生骨が形成された。しかし、チタンの表面は線維性結合組織に覆われていた。すなわち、チタン表面に直接新生骨は形成しないと考えられた。術後8週においても、線維性結合組織を介して新生骨の形成がみられた。

第2実験：第1実験の結果から、チタン表面に直接新生骨を形成させるためには、チタンとともにタンパク質やハイドロキシアパタイトを埋植する必要があると考えられた。そのため、以下の3群に分けて第2実験をおこなった。1群：窩洞にチタンプレートと変性コラーゲンスポンジを埋植する。2群：窩洞にチタンプレートと絹フィブロインスポンジを埋植する。

術後2週および8週で大腿骨を摘出し、第1実験と同様の方法により、埋植材による生体への影響および各群の新生骨梁形成過程を組織学的に比較検討した。第2実験は現在進行中であり、組織学的な結果はまだまとまっていない。第1実験と第2実験の結果は平成20年度歯科基礎医学会に発表予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 3 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 村田 浩一



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	奨励研究/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	日本産鳥類および飼育下鳥類におけるバベシア原虫感染に関する研究	
3 研究の目的	鳥類のバベシア原虫感染は世界的にも報告例が少なく、国内においてはカンムリワシにおいてのみ認められている。日本産野鳥および飼育下鳥類のバベシア原虫感染を研究することで希少鳥類の保全に役立てると共に、節足動物媒介性人畜共通感染症の理解にも貢献することを目的とする。	
4 研究の概要	新たにカンムリワシに認められたバベシア原虫について形態学的な観察を行った。これまで採集保存された日本産野鳥および飼育下鳥類のうち特に猛禽類を対象として血液塗抹標本を用いたレトロスペクティブな感染状況調査を行った。感染血液からDNA抽出しPCR法による原虫遺伝子検出を試みた。	
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 ・研究分担者（役割分担） 	

部科校名：生物資源科学部

氏名：村田浩一

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. 野生および飼育下猛禽類における血液原虫感染に関する研究

2004年2月から2006年12月までに、調査捕獲もしくは傷病保護された野生猛禽類17種141個体および飼育下猛禽類9種33個体から採取された血液試料を供試した。薄層塗抹染色標本を光学顕微鏡下(×400~×1,000)で観察し感染の有無を調べ、陽性検体については血液細胞10,000個中の細胞感染率(Intensity)を求めた。野生個体では5種10個体(7.1%)、飼育下個体では2種10個体(25.0%)に原虫感染が確認され、その差は統計的に有意であった($P<0.01$)。分類群別では、タカ科が10.5%、ハヤブサ科が0%、フクロウ目が33.3%であり、フクロウ目の感染率の高さが顕著であった。感染が認められた原虫は、*Plasmodium* spp.、*Haemoproteus* spp.および*Leucocytozoon* spp.であり、*Babesia* sp.はカンムリワシ(*Spilornis cheela*)においてのみ認められた。

2. カンムリワシにおけるバベシア感染に関する研究

2004年から2006年に、石垣島もしくは西表島で傷病により保護収容され、種の保存法による手続きを行なった7個体を対象とした。薄層血液塗抹染色標本を光学顕微鏡下(400×~1,000×)で観察し、バベシア原虫の形態的特徴を記録すると共に赤血球感染率を算定した。原虫および宿主細胞の長短径を画像解析ソフト(WinROOF)を用いて測定した。原虫の栄養虫体、分裂小体を宿主細胞質内に認めた。原虫細胞にマalaria色素の存在は認めなかった。細胞質内の栄養虫体は1~2個認められ、円形、卵形もしくは半円形を呈していた。長径は $1.86\pm 0.39\mu\text{m}$ 、短径は $1.55\pm 0.35\mu\text{m}$ であった。クロマチン顆粒は中央または辺縁に位置しており、青紫色を呈していた。分裂小体は $1.20\pm 0.26\times 0.99\pm 0.20\mu\text{m}$ で、主に三角形を呈していた。原虫の形態的特徴は、海外のタカ科鳥類から検出されている*B. moshkovskii*に類似していたが、栄養虫体の長径および分裂小体の長短径における差は有意であった($P<0.05$)。感染-非感染宿主細胞の間で大きさに有意な差が認められ、感染細胞が萎縮していることが判明した。赤血球10,000個当りの細胞感染率は $0.1\pm 0.17\%$ (range: 0.01-0.49%)であった。

3. バベシア原虫の遺伝子解析に関する研究

Babesia sp.の栄養虫体は鳥マalaria(*Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp.)と誤認されることがあるため、鳥マalariaのmtDNA cyt b部分領域をターゲットとしたnested-PCRを行なったが、遺伝子増幅を認めなかった。そこで、カツオドリ(*Sula leucogaster*)に感染する*Babesia poelea*の遺伝子増幅に用いられている18S rRNA領域をターゲットとしたプライマーを参考にしてnested-PCRを試みた。しかし、条件設定やプライマー設計に変更を加えても増幅は認められなかった。本原虫の宿主特異性から異なる系統の*Babesia*属原虫である可能性が示唆された。

4. 総括

日本産および飼育下の猛禽類に血液原虫感染が広く認められることが分かった。とくにフクロウ目の鳥類が高率に感染していた。バベシアの感染はカンムリワシにおいてのみ認められ、国内では稀な血液原虫であることが判明した。本原虫の遺伝子は既報のプライマーでは増幅できず、猛禽類もしくはカンムリワシ特有の新種である可能性が高い。今後、媒介昆虫や病原性も含めてより詳細な調査研究の継続が望まれる。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成20年 4月 30日

日本大学 総長 殿

氏 名 増田 哲也



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	奨励研究/ 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	「風味良好なプロバイオティク乳製品」の開発に不可欠なプロバイオティクスの要件	
3 研究の目的	市販プロバイオティク系乳酸菌含有乳製品のなかには、風味劣化のために製品価値が低いものもある。使用したプロバイオティク系乳酸菌の分解酵素の影響が考えられ、さらに溶菌して菌体内酵素漏出の影響も非常に大きい。そこで、ヒト腸管由来のプロバイオティク系乳酸菌の酵素活性および溶菌性を解明すると共に、供試プロバイオティク系乳酸菌添加フレッシュチーズの風味を検討した。	
4 研究の概要	プロバイオティク効果が期待できるヒト腸管由来の乳酸桿菌(<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>paracasei</i> そして <i>L. rhamnosus</i> の各5-6菌株)の分解酵素(主にプロテアーゼとリパーゼ)の活性と溶菌性を検討した後、選抜したプロバイオティク乳酸菌を添加したフレッシュチーズを試作し、チーズ冷蔵中の理化学的性状を検討して、「風味良好なプロバイオティク系乳酸菌含有乳製品」を開発するためには、使用するプロバイオティクスの選抜要件として、従来の消化液耐性ととともに、酵素活性と溶菌性も重要であることを明らかにした。	
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 ・研究分担者(役割分担) 	

※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：増田 哲也

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 菌体内プロテアーゼ活性

FITC でラベルしたカゼインを用いて、菌体内プロテアーゼ活性を測定したところ、*L. gasseri* に属する全 7 菌株の活性が *L. acidophilus* に属する全 5 菌株より高いことが明らかとなった。このことから、菌体内プロテアーゼ活性は菌株により異なるが、*L. gasseri* の方が *L. acidophilus* よりも高いことが示唆された。

菌体内プロテアーゼの至適温度はいずれも 45℃であったが、至適 pH は *L. acidophilus* に属する 2 菌株が pH7.0 であるのに対して、*L. gasseri* JCM11657 の菌体内プロテアーゼの場合は pH6.0 であり、菌種間で異なることが示唆された。これら菌株の菌体内プロテアーゼをホールカゼインに作用させると、*L. acidophilus* JCM11132^T 由来のものは β-カゼインを選択的に分解する、*L. gasseri* JCM11657 由来のものは α_s-カゼインに対する分解性が最も強いなど菌株間で特性が異なることが確認された。

また、供試 *L. casei* subsp. *paracasei* 6 菌株のプロテアーゼ活性も菌株間で差異が確認された。さらに、*L. rhamnosus* GG 株のプロテアーゼ活性は供試 *L. acidophilus* グループ乳酸菌に比較すると非常に低いことが確認された。

② 菌体内リパーゼ活性

L. acidophilus JCM1229 を除いて、菌体内リパーゼ活性は菌種ごとの特徴的な傾向が明らかとなった。すなわち、*L. amylovorus* に属する菌株が最も高く、次ぎに *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus* の順であった。

L. amylovorus JCM5811 の活性は供試菌株中最も高く、最も活性の低い *L. crispatus* JCM8779 の 6 倍以上の値となった。溶菌などにより菌体内リパーゼが菌体外に漏出する可能性がある場合には、*L. acidophilus* に属する菌株より *L. gasseri* に属する菌株を用いた場合の方が、プロバイオティクスを添加したことによる風味の劣化を回避できるのではと思われる。

菌体内リパーゼの温度特性を検討したところ *L. acidophilus* に属する JCM11047 と JCM1132^T は、50℃ が至適温度で、一方、*L. gasseri* に属する JCM11657 と JCM1131^T の至適温度は 40℃であった。さらに JCM11047 と JCM1131^T の菌体内リパーゼ活性は 10℃では著しく低下するため、これら菌株は製品への添加に適していることが示唆された。また、これら菌株の菌体内リパーゼの pH 特性を検討したところ、*L. acidophilus* に属する菌株は pH5.0 と pH8.0 の 2 点至適 pH が確認され、2 種の酵素の存在が示唆された。*L. gasseri* 2 菌株の酵素活性は、pH5.0~pH8.0 の範囲ではほとんど差異がなかった。

また、供試した *L. rhamnosus* GG 株のリパーゼ活性は *L. amylovorus* のそれと同等であり、溶菌などにより菌対外に漏出した場合、風味に影響を及ぼすことが示唆された。

③ 溶菌性

pH7.0 で 37℃に供試 *L. gasseri* 菌株を保存した場合、24 時間後には *L. gasseri* JCM8790, JCM11657 の相対濁度はそれぞれ 30%、45%まで低下したが、それ以外の菌株は初発の 60%以上の相対濁度を示した。

しかし pH5.0 では、JCM1025 以外の *L. gasseri* 菌株で溶菌が著しく進行し、特に JCM11657 は 2 時間後で既に 50%前後まで相対濁度が低下しており、24 時間で初発の 20%以下の相対濁度となった。一方、供試した *L. acidophilus* 菌株はいずれも 24 時間後でも 70%以上の相対濁度を維持した。

したがって、37℃で pH が 5.0 の場合には、*L. gasseri* に属する菌株は *L. acidophilus* に属する菌株に比較して溶菌が顕著で、特に *L. gasseri* JCM11657 を用いて発酵乳製品を製造した場合には、菌体内酵素の漏出による風味変化を危惧する必要があることが示唆された。

次に、これら菌株を添加して製造した製品を冷蔵保存した場合を想定し、5℃での溶菌性を検討した。

pH7.0 の場合、供試した *L. acidophilus* 2 菌株(JCM1132^T, JCM11047)は保存直後に相対濁度が僅かに低下するものの、30 日後でも 80%以上の相対濁度で、ほとんど溶菌しないことが確認された。

部科校名：生物資源科学部

氏名：増田 哲也

研究の結果（つづき）

一方、*L. gasseri* JCM11657 の相対濁度は 10 日目で 60%まで低下しており、pH7.0 の場合でも 30 日後にはほとんど溶菌してしまうことが明らかとなった。なお、*L. gasseri* JCM1131^T の場合は 5℃で 20 日間保存しても相対濁度は 80%程度と僅かしか溶菌していないことが確認されたが、それ以降急激に溶菌が起こり 30 日目には相対濁度が 30%程度まで低下した。

pH5.0 では *L. gasseri* JCM11657 が 3 日目以降、JCM1131^T が 5 日目から急激に溶菌が進行し、2 週間後には 20%の相対濁度となり、これら菌株を添加した発酵乳製品の場合、添加したこれら菌株が溶菌することで菌体内酵素が漏出し、保存中に風味変化が起こる可能性が示された。

以上の結果から、いずれの場合も *L. acidophilus* よりも *L. gasseri* のほうが溶菌性の高い菌株が多く、また *L. gasseri* は pH7.0 よりも pH5.0 の環境下でより溶菌し易いことが示された。

また、*L. rhamnosus* GG 株の場合、37℃で pH7.0 に保持した際に約 25%が溶菌することが確認されたが、発酵乳製品を冷蔵保持した場合を想定した条件（pH5.0, 5℃）では、31 日後でも溶菌は僅か 5%程度であり、溶菌による風味劣化の危惧はないことが示唆された。

④ フレッシュチーズの性状

添加したプロバイオティクスの酵素活性・溶菌性がフレッシュチーズの性状に及ぼす影響を検討した。

1. pH

スターターのみで製造したチーズに比較して、供試菌株を添加したチーズの pH は製造直後でも 5.5 前後と低く、*L. gasseri* JCM1131^T を添加したチーズは冷蔵 1 週間目には pH5.0 前後となり、以後 4 週目までその値を継続した。したがって *L. gasseri* JCM1131^T を添加したチーズの場合は、溶菌により菌体内酵素が漏出した可能性が示唆された。

2. タンパク質分解状況

菌体外プロテアーゼ活性は供試 *L. acidophilus* 菌株のほうが *L. gasseri* JCM1131^T よりも強いので製造直後から冷蔵 2 週目までは *L. acidophilus* 菌株を添加したチーズの低分子窒素化合物量が多いが、冷蔵 2 週目以降は *L. gasseri* JCM1131^T を添加したチーズにおける低分子窒素化合物量が著しく増加することが確認された。さらに、*L. gasseri* JCM1131^T を添加したチーズの場合には 4 週間の保存期間でタンパク分解率が約 2%程度増加しており、溶菌により漏出した菌体内酵素が作用した可能性が示唆された。

また、*L. gasseri* JCM1131^T を添加したチーズで遊離アミノ酸の生成が経時的に増加することが確認され、溶菌により添加した *L. gasseri* JCM1131^T の菌体内ペプチダーゼが漏出したためと考えられる。

3. 脂質分解状況

4 週目のフレッシュタイプチーズの低級脂肪酸(C2~C10)の遊離状況を検討したところ、溶菌が顕著である JCM1131^T を添加したものの酢酸の生成が他のチーズより著しいことが確認された。牛乳のトリアシルグリセロールの構成脂肪酸に酢酸は存在しないため、この酢酸の増加はアミノ酸由来と考えられ、溶菌により漏出した菌体内ペプチダーゼの作用で生成されたアミノ酸が増加したためと推察される。

したがって、「風味良好なプロバイオティク乳製品」を開発するためには、従来からの指標である消化液耐性ととも、酵素活性および溶菌性も添加するプロバイオティクスの重要な選抜因子であることが明らかとなった。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 30 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 鈴木 美 和



所属・資格 生物資源科学部・助手

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/ <input checked="" type="checkbox"/> 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	鯨類における水分の摂取ならびに保持機構の解明	
3 研究の目的	海という高張環境で暮らす鯨類はどのように体内に水を摂取するのだろうか？申請者はこれまでに鯨類の尿濃縮能は種により異なり、水の再吸収を行う場である腎臓の構造と腎でのアクアポリン-2の分布がこの濃縮能と関連する傾向を見出した。尿濃縮能の低い種は水分の多い餌を食べている傾向が認められたため、鯨類は餌の水分を積極的に吸収し浸透圧を維持出来しているのではないかと考えた。この仮説の証明のためには、鯨種を増やして餌と尿濃縮能、腎臓構造との関係を明確にした上で、鯨類が消化管で直接餌から水を吸収することを証明する必要がある。そこで本研究では、複数の鯨類について餌生物の水分含量とタンパク質量を測定すると同時に、尿浸透圧と腎臓の構造を調べ、これらの関連を確認する。さらに、消化管における水吸収の分子機構の解明を行い、水の摂取と保持という観点から鯨類の浸透圧調節機構の全容解明を目指す。	
4 研究の概要	クジラ目の中でも摂餌生態の異なる群から複数種選び、各種について以下の実験を行う。 1. 摂餌生態調査と餌成分分析：各々の餌の湿重量から乾燥重量を引き各餌中の水分含量を算出する。同時にCNコーダーを用いて粗タンパク量を算出し、タンパク量と水分量の比を求める。 2. 餌構成と尿濃縮能との関係および腎臓における水の再吸収機構の解明 1) 尿浸透圧の測定：尿濃縮能を確かめるため、水族館飼育個体の排泄尿や沿岸捕鯨等により捕獲された種の膀胱から直接採取した尿を用いて、尿浸透圧を測定する。 2) 腎臓の構造観察ならびに尿細管でのAQP-2発現局在の特定：腎臓（小腎）の基本構造を観察し、同時に免疫組織化学染色法等により尿細管に発現するAQP-2の発現分布を調べる。 3. 消化管における水吸収の分子機構の解明：RT-PCR および免疫組織化学染色により、消化管での水吸収に関与するアクアポリンを探索する。	
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 ・研究分担者（役割分担） 	

※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： 鈴木 美和

研究の結果（つづき）

【尿細管に発現する AQP-2 の発現分布】

吸収した水分を効率よく使用する＝水の再吸収の能力を探るため、水の再吸収に関与するアクアポリン（AQP）2 に着目し、まず複数鯨種の腎臓での発現を RT-PCR 法により確認した結果、AQP2 の発現が確かめられた。続いて、免疫組織化学染色により分布を確認したところ、集合細管と集合管に AQP2 が局在していることが分かった。また、その分布様式が 1 で分類した各群に属する鯨類間で異なることを見出した。すなわち、尿浸透圧の高い群では AQP2 を伴う集合管が細く密であり、尿浸透圧の低い群では太く粗であることが明らかとなった。集合管が細く密であるほど、原尿からの水の再吸収には有利であり、尿濃縮能が高くなると考えられるため、この結果は妥当なものであると結論づけた。

3. 消化管における水吸収の分子機構の解明

【RT-PCR】

和歌山県太地町の追い込み漁にて捕獲されたバンドウイルカについて、胃（前胃、主胃、幽門胃）および腸（小腸、大腸）における10種類のAQP（AQP 1～10）の発現をRT-PCRにより解析した。その結果、前胃にはAQP-2, 3, 6, 10が、主胃にはAQP-1, 2, 3, 4, 8が、幽門胃にはAQP-2, 3, 8が、小腸および大腸にはAQP-1, 2, 3, 7, 8が各々発現していることが示された。また、これらのAQPについてcDNA塩基配列の決定を試み、AQP-2の全長および他のAQPの部分配列を決定した。

【免疫組織化学染色】

消化管（特に水吸収作用の大きいと考えられる小腸と大腸）における餌からの直接的な水分摂取の分子機構を探ることを目的として、RT-PCRにより発現が確認されたAQPについて、免疫組織化学染色法により分布部位を観察したところ、小腸および大腸の吸収上皮細胞において、AQP-1が管腔膜に存在する微絨毛に、AQP-3, 8がいずれも基底膜側に分布しており、これらのAQPがイルカの餌からの直接的な水分摂取に寄与すると推察された。この結果はヒトやラットにおける報告と一致しており、鯨類が陸上哺乳類と共通のAQPを用いて腸から水を吸収していることが示唆された。続いて、代表的なイオンチャンネルであり、AQP-1と共役的に働き、水吸収に関与すると考えられる $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ の分布を調べたが、腸の吸収上皮細胞での分布は認められなかった。また、胃においても複数種のAQP分布が認められ、粘液や胃酸、ペプシノゲンの産生・分泌に各々関与していると考えられたが、胃では水分吸収を担うと考えられる組織学的構造やAQPは観察出来なかった。

本研究により、鯨類は、腸の吸収上皮細胞における複数のAQPの働きにより餌から積極的に水分を吸収しており、水分含量の多い深海性魚類などの餌を食べる鯨種ほど多くの水分を得ることが出来るため、それほど高度な尿濃縮能を有した腎臓をもたず、一方、水分が少なくタンパク質の多い餌を食べる種ほど相対的に高い尿濃縮能を有する腎臓をもつことが明らかとなった。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20年 4月 8日

日本大学 総長 殿

氏 名 高橋 恭子



所属・資格 生物資源科学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/ <u>一般研究(個人)</u> /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	腸管上皮の透過性亢進に対するマスト細胞の関与と食品成分によるその制御	
3 研究の目的	食物アレルギーやクローン病・潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患の病変部ではマスト細胞の増加が観察され、症状へ直結する腸管上皮の透過性の亢進に関与していることが知られている。本研究では、マスト細胞の活性化と腸管上皮の透過性亢進の関わりを明らかにし、食品特にプロバイオティクスによるマスト細胞の活性化の制御の可能性を検討する。	
4 研究の概要	マスト細胞と腸管上皮細胞の共培養系を用いて、マスト細胞の活性化と腸管上皮の透過性亢進の関係を明らかにする。さらに、マスト細胞の活性化、中でもIgE及び抗原(アレルゲン)により誘導されるアレルギー応答が食品特にプロバイオティクス菌体あるいはその成分により調節されるかどうか、及びその機構を解析する。	
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 ・研究分担者(役割分担) 	

※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：高橋 恭子

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。）

孔質膜インサート上層でラット結腸由来上皮細胞株 DHD/K12/TRb を単層培養し、インサート下層にマウス骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)を添加し TNP 特異的マウス IgE 及び 0~30 ng/ml の TNP-BSA 抗原にて刺激した。上皮細胞層の透過性をインサート上層と下層の間の電気抵抗値(TER)を測定することにより評価した。マスト細胞を添加することによりどの抗原濃度においても、TER の低下、すなわち上皮細胞層の透過性の亢進が観察された。また、抗原濃度が 3 ng/ml までは抗原濃度依存的に TER が低下し、それ以上の抗原濃度では TER が徐々に増大した。一方、*in vitro* においてβ-hexosaminidase 活性を指標として BMMC の脱顆粒を測定したところ、濃度 3 ng/ml までは濃度が上昇するにつれ脱顆粒の程度が増大し、3 ng/ml で最大となり、それより高濃度では減少した。したがって、(1) マスト細胞を抗原刺激しない場合にも上皮細胞層の透過性の亢進が観察されたことから、マスト細胞が恒常的に産生する物質により上皮細胞層の透過性の亢進が誘導されること、(2) 上皮細胞層の透過性の亢進の程度とマスト細胞の脱顆粒の程度が相関していたことから、マスト細胞の脱顆粒により放出される物質が上皮細胞層の透過性の亢進に関与することが示唆された。

次に、プロバイオティクスのモデルとしてヒト糞便より単離されたビフィズス菌株 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCM 7041(Bp)の超音波破碎菌体を用いて、ラット好塩基球形白血球株 RBL-2H3 及び BMMC の脱顆粒応答に対する影響を解析した。超音波破碎 Bp 菌体で前処理することにより、IgE/抗原刺激時の RBL-2H3 及び BMMC の脱顆粒応答が抑制された。超音波破碎 Bp 菌体処理により RBL-2H3 細胞表面への IgE の結合は影響を受けなかった。さらに、Bp より調製したペプチドグリカン画分にも同様の脱顆粒抑制効果が認められたことから、TLR2 リガンドによりマスト細胞のアレルギー応答が抑制される可能性が示された。そこで、TLR2 の合成リガンド Pam3CSK4 を用いて前処理を行ったところ、IgE/抗原刺激時の RBL-2H3 及び BMMC の脱顆粒応答が抑制された。また、Pam3CSK4 は、RBL-2H3 細胞からのロイコトリエン C₄ の産生、IL-13、TNF-αの産生に対しても抑制作用を示すことが明らかとなった。さらに、Pam3CSK4 の存在下及び非存在下で IgE 感作した BMMC を W/W^v マウスの背中の皮下に移入する系において、抗原の尾静脈投与により誘導される血管透過性の亢進が BMMC を Pam3CSK4 処理することにより抑制された。したがって、Pam3CSK4 はマスト細胞が誘導する *in vivo* での炎症反応に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。次に、TLR2 リガンドによるマスト細胞のアレルギー応答の抑制機序を明らかにするために、Pam3CSK4 が細胞内シグナル分子の活性化に及ぼす影響を解析した。Pam3CSK4 処理により、RBL-2H3 細胞の IgE/抗原刺激時の全チロシンリン酸化パターンには顕著な変化が認められず、IgE 受容体(FcεRI)直下のシグナルには影響を及ぼさないことが示された。一方、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇パターン及び Erk の活性化の低減が観察され、これら下流シグナルの減弱がマスト細胞の活性化の抑制に関与すると考えられた。

以上の結果から、プロバイオティクスはマスト細胞の活性化の抑制を介して腸管上皮の透過性亢進の誘導を抑制し、食物アレルギーや炎症性腸疾患に対して有効な作用を呈する可能性があると考えられる。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成20年4月30日

日本大学 総長 殿

氏 名 関 泰一郎



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	奨励研究(<input checked="" type="radio"/> 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	Adipomin/RMCP-1 を中心としたメタボリックシンドローム発症機構の解明	
3 研究の目的	新奇線溶酵素 adipomin/RMCP-1 を中心としたメタボリックシンドローム発症機構を解明する目的で、adipomin/RMCP-1 が前駆脂肪細胞の増殖、脂肪細胞の分化、成熟脂肪細胞の機能に及ぼす影響について基礎的な検討を行い adipogenesis の分子メカニズムを明らかにしようとした。	
4 研究の概要	本研究では、まず、ラット白色脂肪組織を出発材料として各種クロマトグラフィーを用いて adipomin/RMCP-1 の精製法を確立した。最終精製標品を LC-MS/MS による同定の後、adipomin/RMCP-1 が脂肪細胞の増殖や分化に及ぼす影響について検討を行った。脂肪細胞に及ぼす影響については 3T3-L1 前駆脂肪細胞をモデル細胞として、各種分子細胞生物学的な研究手法を用いて <i>in vitro</i> で基礎的な検討を行った。また、肥満モデルラット OLETF における発現動態について基礎的な検討を行った。	
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 ・研究分担者 (役割分担)	

※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：関 泰一郎

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。）

- 1) 脂肪組織からイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて線溶酵素 adipomin を高度に生成する方法を確立した。また、その構造を解析し adipomin が chymase (RMCP-1) と同一、もしくは homologue であることを確認した。以下 adipomin/RMCP-1 と表記する。
- 2) Adipomin/RMCP-1 が前駆脂肪細胞、成熟脂肪細胞におよぼす影響と脂肪細胞への分化に及ぼす影響を 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いて検討した。

2-1) 3T3-L1 前駆脂肪細胞に対する影響

3T3-L1 前駆脂肪細胞について、adipomin/RMCP-1 添加群では vehicle 添加群に比較して濃度依存的に細胞数が増加した。特に 200 ng/ml adipomin/RMCP-1 添加群では vehicle 群と比較して生細胞数が約 2 倍に増加した。このことから、adipomin/RMCP-1 は 3T3-L1 前駆脂肪細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

2-2) 成熟脂肪細胞に対する影響

成熟脂肪細胞について、adipomin/RMCP-1 添加群では vehicle 添加群に比較して生細胞数が濃度依存的に減少した。さらに、これらの細胞の核の形態を Hoechst 33342 により染色して観察したところ、アポトーシス細胞に特徴的な凝集化した核を有する細胞が観察され、これらの細胞数は adipomin/RMCP-1 濃度依存的に増加した。このことから、adipomin/RMCP-1 は成熟脂肪細胞に対してはアポトーシス様の細胞死を誘導することが明らかとなった。

2-3) 脂肪細胞の分化に対する影響

脂肪細胞の分化に対する影響を検討するため、脂肪細胞への分化誘導と同時に adipomin/RMCP-1 を添加し、分化誘導後 9 日目まで培養した。その結果、vehicle 添加群では、分化誘導後 9 日目までに細胞内に大きな脂肪滴を持つ脂肪細胞が出現した。一方で、adipomin/RMCP-1 添加群では濃度依存的に脂肪滴の形成が阻害され、前駆脂肪細胞様の形態が維持されていた。さらに、vehicle 添加群では分化誘導後、経時的に脂肪含量が増加するのに対して、400 ng/ml adipomin/RMCP-1 添加群では脂肪は検出されなかった。このことから adipomin/RMCP-1 は脂肪細胞分化、成熟を抑制することが明らかとなった。

3) 肥満モデル動物 OLETF における adipomin/RMCP-1 の発現動態

肥満モデルラット OLETF における adipomin/RMCP-1 発現動態について、非肥満の対照ラットである LETO と対比して検討した。その結果 LETO と比較して OLETF の脂肪組織において adipomin/RMCP-1 の活性が高いことが明らかとなった。

以上、本研究では、脂肪組織内の線溶酵素 adipomin の存在を発見するとともに、その構造を解析し、RMCP-1 と同一タンパク質、もしくは homologue であることを確認した。このことから、脂肪組織が chymase を発現していること、さらに chymase が線溶活性を有していることをはじめ指摘することができた。

OLETF ラットの脂肪組織内において adipomin/RMCP-1 活性が上昇していた。さらに、adipomin/RMCP-1 は脂肪細胞に対して細胞死を誘導し、脂肪細胞への分化を抑制した。これまでの *in vivo*, *in vitro* 実験の結果から、adipomin/RMCP-1 は脂肪組織内で脂肪細胞数を調節する negative regulator として作用していることが示唆された。現在、adipomin の全アミノ酸配列について検討中である。今後、chymase 阻害剤が食餌誘導性肥満動物の体重増加、インスリン抵抗性に及ぼす影響について検討する予定である。


課題番号	個 07-108
------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 28 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 高 橋 令 二 

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	<input checked="" type="radio"/> 奨励研究/ <input type="radio"/> 一般研究(個人)/ <input type="radio"/> 一般研究(共同)/ <input 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	各種環境からの亜硝酸酸化菌の分離と新たな分子系統分類指標の開発	
3 研究の目的	<p>種々の環境から亜硝酸酸化菌のうち、おもに <i>Nitrobacter</i> 属を新規分離し、その菌学的特性を明らかにするとともに同属内の詳細な分子系統分類を可能にする新規分類指標を開発する。亜硝酸酸化菌に特異的でありエネルギー獲得系の主幹酵素である亜硝酸酸化還元酵素遺伝子 (<i>norB</i>) に注目し、<i>Nitrobacter</i> 属内の詳細な分子系統分類を試みる。本指標により解像度の高い <i>Nitrobacter</i> 属内の詳細な分類が可能になれば、広範な環境に分布し亜硝酸酸化菌の中でも優占的に生息すると推定される同属について、分布解析等にも有効なマーカーとして応用が可能となる。</p>	
4 研究の概要	<p>(1) 土壌、植物根面、海水、陸水、汽水、脱臭装置等の自然界の広範な環境に由来する分離源から無機塩培地を用いた集積培養を行ない、ゲランガムをゲル化剤として使用する希釈平板法により亜硝酸酸化菌を純粋分離する。新規分離菌について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析により属を推定した。(2) 亜硝酸酸化還元酵素遺伝子 (<i>norB</i>) についても同様に、分子系統分類を行い、16S rRNA の結果との比較により新規系統分類指標としての有効性を検討した。また培養特性の検討は、各種至適条件や培養促進・阻害要因等について行なった。同時に電子顕微鏡像により形態的特性を確認した。</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 ・研究分担者 (役割分担) 	

※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：高橋令二

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。）

亜硝酸酸化菌（NOB）は硝化の後段である亜硝酸から硝酸への酸化反応を担う環境微生物で、窒素循環系における重要性が認識されており、その 16S rRNA 遺伝子配列と細胞形態とにより現在 4 属に分類されている。alpha-proteobacteria に属する *Nitrobacter* 属は、自然界に広範に生息していることが推定されており、NOB のなかでも最も多くの知見が得られているが、単一菌についての生理・生化学的特性についての情報はごくわずかな菌株に限られており未解明の部分が多い。本研究では種々の環境（土壌、植物根面、脱臭装置等）を分離源として、無機塩培地を用いた集積培養を経た後、ゲランガムをゲル化剤にした希釈平板法により多数の *Nitrobacter* 属の菌株を純粋分離した。特に、未だ単一菌の分離の報告が少ない酸性環境からも複数の分離菌を得るに至った。から *Nitrobacter* 属を新規分離し、その菌学的特性を明らかにするとともに、新規指標による同属内の詳細な分子系統分類の可能性を検討した。

(1) 各種環境からの亜硝酸酸化菌の分離

タイ国の酸性硫酸塩土壌（バンナ試験場、トウモロコシ根面、インゲン根面）、東京都江東区、東京都小平市、神奈川県厚木市の土壌、市販の水質浄化剤の原料とされている海水性試料と淡水性試料等から純粋分離を試みた。タイ国酸性硫酸塩土壌、市販浄水剤（海水性、淡水性）の集積培養中の検体から亜硝酸の酸化が確認された。東京都江東区木場の花壇土壌より亜硝酸酸化菌 SS101214 を単離し、DGGE 解析により純粋分離菌と確認されたので、16SrRNA 遺伝子解析の結果、*Nitrobacter* 属であると判断された。また、培養的諸性質については、生育至適温度 30℃、生育至適亜硝酸ナトリウム濃度 14.3mM であることが確認された。同様にタイの酸性硫酸塩土壌（インゲン栽培土壌：pH3.2）由来の *Nitrobacter* sp.KAB4 株は pH9.0 で、また亜硝酸ナトリウム濃度については 36.5mM で良好な生育を示した。当研究室により既に得られている亜硝酸酸化菌の分離株は、一般的に分離源にかかわらず、分離菌の至適培養条件は概ね 30℃、pH8.0、至適窒素源（亜硝酸ナトリウム）濃度は 15~20mM であった。

(2) 亜硝酸酸化菌の分離と分子系統分類

本研究（前項）で得られた *Nitrobacter* sp.KAB4（タイ・インゲン栽培土壌）および当研究室により既に得られている亜硝酸酸化菌の分離株 *Nitrobacter* sp.ATB531（厚木市土壌）、*Nitrobacter* sp.ATB19、*Nitrobacter* sp.HMB14（ブルーベリー[ホームベル種]根面）、*Nitrobacter* sp.KAMB6（タイ・インゲン栽培土壌 菌根施用）について亜硝酸酸化還元酵素遺伝子（*norB*）1542bp の塩基配列を決定した。これらの結果を既に当研究室により解析されている亜硝酸酸化菌の *norB* 塩基配列との相同性を調べたところ、*Nitrobacter* sp.KAB4 と *Nitrobacter* sp.KAMB6 の相同性は 97.28% で（両菌株ともタイ・インゲン栽培土壌由来）であった。しかし、他菌株については、分離源が同じで相同性も高いという傾向は見られなかった。また、同様にアミノ酸配列における相同性の比較も行ったところアミノ酸は *Nitrobacter* sp.KAB4 と *Nitrobacter* sp.KAMB6 の相同性は 97.47% で、この両菌株のみ分離源が同じで相同性も高い結果となった。さらに、*norB* の系統樹を作成し 16S rRNA の系統樹と比較したところ、*Nitrobacter* sp.ATB531 と *Nitrobacter* sp.HTN8（オオムギ Hannechen 根面）、*Nitrobacter* sp.HMB14 と *Nitrobacter* sp.WHN5（コムギ根面）は両系統樹において分類学上非常に近縁であるということが明らかになった。*Nitrobacter* 属について提唱されている、16S rRNA 遺伝子による属内のサブグループ分類に対応する、*Nitrobacter* 属内の詳細な分子系統分類の可能性が示唆された。

(3) 新たな分子系統分類指標の開発

本研究で得られた知見をもとに、広範な環境に分布し亜硝酸酸化菌の中でも優占的に生息すると推定される亜硝酸酸化菌の *Nitrobacter* 属について、解像度の高い同属内の詳細な分類を可能にする、また非培養系の分布解析等にも有効なマーカーへの応用を検討中である。すなわち、得られた *norB* 塩基配列情報をもとに、*Nitrobacter* 属特異的プライマー領域の確認を行なっている。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 5 月 19 日

日本大学 総長 殿

氏 名 明石智義



所属・資格 生物資源科学部・専任講師

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/ <input checked="" type="radio"/> 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	ダイズ型イソフラボノイドのバイオテクノロジー生産	
3 研究の目的	健康補助食品成分として注目度の高いマメ科ダイズ由来の有用イソフラボンを用いてイソフラボンを利用したイソフラボン含有微生物で人工的な制御のもとに生産させる。	
4 研究の概要	イソフラボン系の酵素遺伝子を植物から取り出して、微生物等で生合成系を再構築し、ダイズ型イソフラボン(ゲニステイン, ダイゼイン)を生産させる。	
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 ・研究分担者 (役割分担) 	

※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：明石智義

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。)

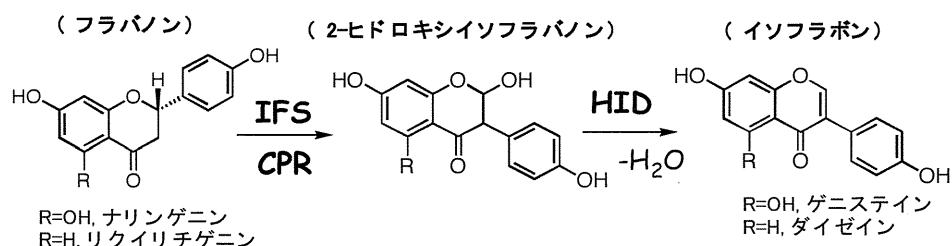
マメ科のイソフラボンは、一般フラボノイド(フラバノン)から cytochrome P450 (P450)の 2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素 (IFS)と引き続く 2-ヒドロキシイソフラバノン脱水酵素 (HID)による反応で生合成される。P450 の機能発現には cytochrome P450 reductase (CPR)による電子伝達が必須である。IFS cDNA と HID cDNA は、すでにマメ科カンゾウからクローニングしている。本研究では、CPR cDNA をクローニングすした。またイソフラボン系の酵素をコードする cDNA を用いて以下の研究を行った。

(1) ミヤコグサ CPR cDNA のクローニング

既知配列情報をもとに、expressed sequence tag データベース情報を利用して全長 ORF を持つミヤコグサ CPR cDNA (LjCPR1)を取得し、酵母発現系を用いて機能を確認した。IFS 単独発現酵母と IFS, LjCPR1 共発現酵母からそれぞれミクロソームを調製し、in vitro での IFS アッセイを行うと、共発現酵母の方が単独発現酵母よりも約 8 倍活性が高いことがわかった。

(2) 組換え酵母でのイソフラボン生産

IFS 単独発現酵母と IFS, LjCPR1 共発現酵母を前駆体 (ナリンゲニン) 存在下で培養して生成物を解析した。共発現株での総イソフラボノイド含量は、IFS 単独発現株の総イソフラボノイド含量と比べて約 3 倍増加していた。また IFS cDNA と HID cDNA を組み込んだ酵母細胞を作成した。前駆体存在下で培養して生成物を解析すると、IFS, HID 共発現株での総イソフラボノイド含量は、IFS 単独発現株の総イソフラボノイド含量と比べて約 1.5 倍増加していた。現在 IFS, HID, LjCPR1 トリプル発現酵母の作成を行っている。



課題番号	個07-110
------	---------

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 11 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 浅 見 寛



所属・資格 薬 学 部 ・ 助 教

下記のとおり報告いたします。

1 種 目	奨励研究 / <input checked="" type="radio"/> 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	Ewing's 肉腫 Family 腫瘍における新規治療薬の開発研究	
3 研究の目的	Ewing 肉腫 (ES) Family 腫瘍 (ESFT)では共通して、EWS 遺伝子と ETS family 遺伝子との相互転座による融合遺伝子を有することが報告され、この融合遺伝子は様々な遺伝子の発現に関与している。そこで、この融合遺伝子の発現を抑制することにより、ES 細胞に与える影響を検索し、新薬に結び付けていく。	
4 研究の概要	現在医薬品として用いられている anti-sense oligonucleotide を応用して、最も細胞への導入効率が良く、標的遺伝子を抑制できる塩基配列を確定する。更に標的遺伝子の抑制のみでなく、他の因子に及ぼす影響を同時に観察し、他のシグナル伝達系に及ぼす影響についても検索することにより、新たな分子標的物質として副作用の少ない新規治療法に結びつける。	
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 ・ 研究分担者 (役割分担) 	

※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：浅見 寛

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。）

Ewing 肉腫 (ES) は、小円形細胞腫瘍群に属し、primitive neuroectodermal tumor (PNET) や Askin 腫瘍と数多くの同様の性質を有することから、これらを ES family 腫瘍 (ESFT) に分類している。そして多くの ESFT において、*EWS* 遺伝子と *ETS* family 遺伝子 (*FLII*, *ERG*, *ETV1*, *E1AF*, *FEV* など) との相互転座による融合遺伝子を有することが報告されている。またこれらの融合遺伝子が、様々な遺伝子の発現に関与していることが知られている。中でも *transforming growth factor- β* (*TGF- β* シグナル伝達系)における *TGF β II* 型受容体の発現低下により、細胞増殖抑制作用やアポトーシス誘導抑制作用が生じたり、*inhibitor of DNA binding 2* (*Id2*) 遺伝子の発現量増加により細胞を cell cycle へ導入したりして、腫瘍の発生や悪性化に関与している。今回我々は、細胞周期に関連する遺伝子の発現量を定量し、シグナル伝達に関与する遺伝子の異常について検索した。

今回使用した antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) は、7 種類の AS-ODN のうち最も抑制効果を示した AS-ODN を用いた。使用した AS-ODN の種類は非コード領域の 5' 末端側が 3 種類、3' 末端の poly A 鎖手前付近を 2 種類、更に *EWS*(exon 7)-*FLII*(exon 6) 融合遺伝子の転座部位を含む塩基配列 2 種類の AS-ODN を用いて、MTT assay により細胞の生存率により有効性を検索した。標的遺伝子としたのは、ES において高い割合で出現する *EWS*(exon 7)-*FLII*(exon 6) 融合遺伝子で、この融合遺伝子に特異的に作用する AS-ODN の設計を試みた。通常、mRNA は複雑な 3 次元構造を取っているが、その立体構造は pH をはじめ、温度などの因子により 3 次元構造が変化する。コンピューターを使用した解析において、この 3 次元の立体構造を決定するのは難しいとされている。そのため、AS-ODN を設計する場合、比較的単純構造をしていて、成功例の多い、*EWS* 5' 側の非コード領域を中心に設計を行った。その結果 6 種類で細胞の生存率が S-ODN 処理による生存率よりも減少することが確認できた。さらに negative control よりも抑制効果に有意差を示したのは今回用いた AS-ODN ($p < 0.05$)のみであった。

そこで、顕著な細胞増殖抑制効果を示した AS-ODN を用いて融合遺伝子の発現量と FCM による S 期移行率の変化を検索した。細胞によって発現効果に差はあるものの、どの *EWS-ets* 融合遺伝子を有する ESFT 細胞培養株でも AS-ODN の処理によって、融合遺伝子の発現量の減少が認められたことより、AS-ODN の有用性が示唆された。そのため、融合遺伝子が細胞周期に影響を与えるかどうかを検索するために、AS-ODN 処理により融合遺伝子を抑制した時に細胞周期に影響を比較した。SK-N-LO 細胞では AS-ODN 処理後 48 h で唯一有意差 ($p < 0.01$) を生じ、96 h では $p < 0.001$ で有意に S 期への移行率が減少した。

また、SK-N-LO 細胞以外の ESFT 細胞では時間と共に S 期への移行率が減少していた。さらに、SCMC-ES1 細胞、KP-EW-MS 細胞では、AS-ODN 処理後 96h 後で S 期への移行率に減少が認められた ($p < 0.01$)。これらのことから、細胞によって効果発現時間や効果持続時間に差はあるものの、どの ESFT 細胞培養株でも AS-ODN 処理後 96 h 経過すれば有効に作用することが確認できた。一方、融合遺伝子を持たない control 細胞である MCF-7、HL-60、Jurkat 細胞では多少の減少はあるものの、AS-ODN による S 期移行率の減少は認められなかった。以上のことから、AS-ODN が *EWS-ets* 融合遺伝子を抑制し、それにより S 期への移行率が減少している可能性が示唆された。*EWS* (exon7) - *FLII* (exon6) 融合遺伝子を有する SK-N-LO 細胞のみでなく、exon が異なる *EWS* (exon10) - *FLII* (exon5) 融合遺伝子を有する KP-EW-MS 細胞も SK-N-LO 細胞と同様に S 期への移行率が減少した。また、*ets* family 遺伝子の異なる *EWS* (exon7) - *ERG* (exon6) 融合遺伝子を有する SCMC-ES1 細胞においても S 期移行率が減少したことから、今回用いた AS-ODN は exon タイプや *ets* family 遺伝子が異なる細胞培養株にも有効であることがわかった。さらに、AS-ODN が S 期への移行率を減少させることから、ESFT に特徴的に発現する *EWS-ets* 融合遺伝子は、細胞周期を S 期へと導入している可能性が明らかとなった。そのため ESFT の発癌メカニズムは、*EWS-ets* 融合遺伝子が細胞周期制御機構の破綻を起し、細胞を S 期に導くことが原因の 1 つである可能性が示唆された。FCM の測定により最も細胞

部科校名： 薬 学 部

氏名： 浅 見 覚

研究の結果 (つづき)

周期に影響を与えた SK-N-LO 細胞を用いて、細胞周期に関与する遺伝子の発現量を検索した。*EWS-ets* 融合遺伝子が及ぼす細胞シグナル伝達機構の解明ではまず、*EWS-ets* 融合遺伝子が過剰発現させていることが知られている *Id2* 遺伝子の検索を行った。negative control 細胞である Jurkat 細胞ではほとんど発現が認められなかったのに対し、SK-N-LO 細胞では報告通りに過剰発現していることが明らかとなった。*Id2* 遺伝子の過剰発現は、ESFT の癌化に何らかの関与をしていることが示唆された。また、SK-N-LO 細胞では、AS-ODN 処理後 4 h で、negative control、S-ODN 処理したものとは比べ有意 ($p < 0.05$) に発現量が減少した。

Id2 遺伝子が結合する *Rb* 遺伝子と S 期で発現する *Cyclin A* 遺伝子では融合遺伝子を有する SK-N-LO 細胞と融合遺伝子を有さない Jurkat 細胞の両細胞とも AS-ODN、S-ODN、negative control では差が生じず、各細胞とも同様の発現量を示した。さらに *E2F-1* 遺伝子では Jurkat 細胞でほとんど発現が認められなかったのに対して、*EWS-ets* 融合遺伝子を有する SK-N-LO 細胞では高値を示したが、AS-ODN 処理での変化は認められなかった。これらの遺伝子(*Rb*, *Cyclin A*, *E2F-1*)は細胞周期で E2F/DP/Rb 複合体や CDK4/CyclinA、CDC2/CyclinA の複合体を形成するものの、複合体が解離した後も単体で細胞内に存在する。そのため、これらの複合体が解離した後に遺伝子が過剰発現し、これらの因子の合成をつかさどるとい報告がないため、細胞周期の S 期への移行を抑制してもこれらの遺伝子には影響を与えないことが示唆された。

G₁ 期から S 期への移行に関与する *Cyclin E* 遺伝子は、SK-N-LO、Jurkat 細胞とも 0 h での発現量は同量であり、融合遺伝子を持たない Jurkat 細胞では AS-ODN、S-ODN 処理をしても発現量に変化は認められなかった。融合遺伝子を持つ SK-N-LO 細胞では S-ODN 処理で変化は生じなかったが、AS-ODN 処理を施すと時間とともに発現量が減少し、16 h 後 ($p < 0.001$) と 26 h 後 ($p < 0.01$) で有意に発現量が減少したことから、*EWS-ets* 融合遺伝子が *Cyclin E* 遺伝子に関与して細胞を S 期に導いていることが示唆された。さらに、DNA 合成酵素である *PCNA* 遺伝子も *Cyclin E* 遺伝子を同様に発現量の減少を示し、SK-N-LO 細胞で AS (34-58) 処理した後、16 h 後 ($p < 0.001$) と 26 h 後 ($p < 0.05$) で有意に減少したことから *EWS-ets* 融合遺伝子を抑制することで S 期での DNA 合成が減少していることが明らかとなった。

細胞周期に抑制的に働いている *p21* 遺伝子と *p27* 遺伝子は、融合遺伝子を持たない Jurkat 細胞ではほとんど発現が認められなかったが、融合遺伝子を有する SK-N-LO 細胞では発現量は高値を示した。さらに AS-ODN 処理によってこれらの遺伝子 (*p21*, *p27* 遺伝子) の発現量が増加し、*p21* 遺伝子では AS (34-58) 処理後 4 h 後 ($p < 0.05$) と 8 h 後 ($p < 0.05$) で有意に増加しており、*EWS-ets* 融合遺伝子を抑制することで、細胞周期を抑制できる可能性が示唆された。また、*p27* 遺伝子では有意差を示さなかったことから *EWS-ets* 融合遺伝子は *p21* 遺伝子により関与している可能性が高いことが明らかとなった。

Asami S, Chin M, Shichino H, Yoshida Y, Nemoto N, Mugishima H, Suzuki T., Treatment of Ewing's sarcoma using an antisense oligodeoxynucleotide to regulate the cell cycle., Biol Pharm Bull., **31(3)**, 391-394(2008)

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 3 月 31 日

日本大学 総長 殿

氏 名 鈴木 豊 史



所属・資格 薬学部・専任講師

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)/ <input checked="" type="radio"/> 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	麻薬拮抗薬の血液脳関門取り込み輸送に関わる有機カチオントランスポーターの役割	
3 研究の目的	本研究では、麻薬性鎮痛薬・麻薬拮抗性鎮痛薬と類似の化学構造を有するが、薬理作用をもたない麻薬拮抗薬を用いて、血液脳関門取り込み輸送をインビボで評価し、その輸送に関わる有機カチオントランスポーターの関与を明らかにすることを目的としている。	
4 研究の概要	ラットの総頸動脈から投与した薬物溶液の約20%は内頸動脈へ、約80%は外頸動脈へと流入するため、内部標準物質を投与液に含め、内頸動脈に流入した薬物量を個体ごとに補正した。投与した薬液は、組織毛細血管を流れていき、内部標準物質は細胞膜を非常に早い速度で透過し組織中に取り込まれ、同時に目的物質も細胞膜透過速度に比例して組織中に取り込まれる。投与液の薬物濃度を変化させたり、種々の有機カチオントランスポーターの基質や阻害剤を共存させたりすることから、それらの関与について調査した。	
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 ・研究分担者（役割分担） 	

※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：薬学部

氏名：鈴木豊史

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。)

麻薬拮抗薬であるナロキソン (NLX) は、モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬を用いたときに生じる急性中毒の改善を目的に臨床で用いられているが、その血液脳関門透過性についての詳細は明らかではない。

循環血液中から脳組織方向への取り込み速度を示す ^3H NLX の血液脳関門透過クリアランス (PSinf) は、投与液中の非標識体 NLX の濃度が 0.5 μM から 15 mM の範囲において濃度の増加にともななって PSinf は減少し、飽和性が認められた。この NLX 濃度範囲において、 ^3H NLX の濃度に対して組織細胞膜透過速度 J を Michaelis-Menten 型の飽和を示す項と非飽和性の項の両方を取り入れた次式を用いて非線形最小二乗法解析プログラム (WinNonlin) を用いて速度論的に解析し、速度論的なパラメータを算出した。ここで、 J_{\max} は最大取り込み速度、 K_t は Michaelis 定数、および K_d は非飽和過程速度定数を示している。

^3H NLX の脳内取り込み機構について、ミカエリス-メンテン型の飽和性を有する項と非飽和の項の両方を取り入れて速度論的に解析した結果、 J_{\max} は $0.015 \pm 0.017 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g brain}$ 、 K_t は $0.082 \pm 0.042 \text{ mM}$ および K_d は $0.220 \pm 0.008 \text{ mL}/\text{min}/\text{g brain}$ であった。トランスポーターの輸送効率を示す J_{\max}/K_t および薬物自身の脂溶性に従う単純拡散の速度定数である K_d は、それぞれ $0.18 \text{ mL}/\text{min}/\text{g brain}$ および $0.22 \pm 0.01 \text{ mL}/\text{min}/\text{g brain}$ となり、ほぼ同等の値を示した。このことより、 ^3H NLX の血液脳関門を介した脳内取り込み輸送の約 5 割は、トランスポーター介在機構が関与していることが示された。

次に、 ^3H NLX の脳内取り込みに関与している輸送担体を明らかにするために、有機カチオントランスポーター (OCTs/OCTNs) の基質あるいは阻害剤を用いて阻害実験を行った (Table 1)。 ^3H NLX の脳内取り込みは、OCTN1 の基質である Ergothioneine、OCTN2 の基質である L-carnitine、TEA および OCT1 の基質である Choline により阻害が認められなかった。また、OCT2 の基質である MPP⁺、NMN、Amantadine、Guanidine および Procainamide においても ^3H NLX の取り込みに阻害効果が認められなかった。 ^3H NLX の脳内取り込みは、Diphenhydramine、Lidocaine、Propranolol および Pyliramine などの有機カチオン化合物によって、それぞれ約 70%、50%、60% および 80% 阻害された。

^3H NLX の脳内取り込み過程に及ぼす各種有機アニオントランスポーター (OATs/OATPs) の基質および阻害剤の影響を示している。 ^3H NLX の脳内取り込みは、OAT1 の基質である PCG、Furosemide および PAH によって阻害されなかった。また、OAT3 の基質である Cimetidine、OATPs の阻害剤である TCA および Probenecid においても ^3H NLX の取り込みに阻害効果が認められなかった。 ^3H NLX の脳内取り込みは、既知の有機カチオントランスポーターや有機アニオントランスポーターの基質あるいは阻害剤によって阻害効果が認められなかった。しかしながら、ジフェンヒドラミン、リドカイン、プロプラノロールおよびピリラミンのようなカチオン性化合物によって、 ^3H NLX の脳内取り込みは有意に阻害された。

これらの結果より、 ^3H NLX の脳内取り込み過程にカチオン性化合物を認識する未同定のトランスポーターが関与している可能性が示唆された。

Table 1 Effect of OCTs/OCTNs inhibitors on BUI of ^3H NLX

Compound	n	BUI (%)	Relative BUI (%)
Control	3	43.7 ± 0.6	100.0 ± 1.3
+Ergothioneine	3	60.6 ± 11.2	138.7 ± 25.7
+L-carnitine	3	36.1 ± 3.2	82.6 ± 7.3
+TEA	3	45.0 ± 0.9	102.9 ± 2.1
+Choline	3	38.5 ± 2.0	88.1 ± 4.5
+MPP ⁺	3	62.7 ± 5.3	143.4 ± 12.0 *
+NMN	3	37.3 ± 5.5	85.3 ± 12.5
+Amantadine	3	55.3 ± 5.7	126.6 ± 13.0
+Guanidine	3	46.1 ± 2.5	105.4 ± 5.7
+Procainamide	3	41.9 ± 3.8	95.9 ± 8.7

A mixture of ^3H NLX (75 nM) and [^{14}C]butanol was administered to the common carotid artery in the absence or presence of OCTs/OCTNs inhibitor. Rats were decapitated at 15s after administration. Each value represents the mean ± S.E. (n=3). * Significantly different from the control value (p<0.05).

注：課題番号を記入してください。

平成 19 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 11 日

日本大学 総長 殿

氏 名 田 口 博 之



所属・資格 薬学部・専任講師

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)/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	シクロデキストリンを乳化剤として用いた新規エマルジョン基剤の開発	
3 研究の目的	一般に安定なエマルジョンを調製するために、乳化剤として界面活性剤が広く使用されている。しかし、界面活性剤には、皮膚刺激性、溶血性等を引き起こすものもあり、その選択および使用には十分考慮する必要がある。本研究では、 β -シクロデキストリンを乳化剤として用いた新規エマルジョン基剤の開発について検討を行った。	
4 研究の概要	β -シクロデキストリン (CD) を乳化剤として用いて <i>n</i> -alkane/水エマルジョンの調製およびその性質について検討を行った。調製された <i>n</i> -alkane /水エマルジョンはいずれも O/W 型であり、 <i>n</i> -octane < <i>n</i> -dodecane < <i>n</i> -hexadecane の順に安定性が高いことがわかった。偏光顕微鏡観察および粉末 X 線回折測定から、 β -CD と <i>n</i> -alkane との包接錯体である析出物が油水界面に配向して固体膜を形成することが明らかになった。さらに、エマルジョン中に析出物により形成された高次構造が、エマルジョンの安定性に寄与していることが示唆された。本研究により開発されたエマルジョン基剤は、新たな製剤基剤として期待される。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

※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： 田 口 博 之

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) エマルション基剤の調製と相状態

n-alkane (*n*-octane、*n*-dodecane または *n*-hexadecane)/ β -CD/水の3成分を量りとりホモジナイザーを用いて10,000 rpm、5分間攪拌してエマルション基剤の調製を行った。1時間静置後、相状態を目視および顕微鏡で観察して3成分系状態図を作成した。いずれの油を用いて調製されたエマルション基剤も、O/W型の安定なエマルション相(O/W(S)相)を形成できる領域が確認された。O/W(S)相は乳白色の外観を呈しおり、その分散相は均一な粒子径(約10 μ m)をもつ球状粒子(油滴)であることがわかった。また、偏光顕微鏡で観察したところ、油滴界面に偏光性が認められたことから、結晶構造を有する析出物がエマルションの形成に関与していることが明らかになった。さらに、O/W(S)相を示した領域よりも水の割合が増えると、不安定なエマルション相(O/W(U)相)を形成することがわかった。O/W(U)相では、O/W(S)相に比べて、その油滴の粒子径は大きく、また、油滴の形状は球形ではなく歪んだ楕円形のものも多く確認された。一方、O/W(S)相よりも油の割合が増えると、沈殿物の形成が認められた。

2) エマルションの形成メカニズム

エマルションの形成メカニズムを詳細に明らかにするため、エマルション中の析出物の粉末X線回折測定を行った。X線回折パターンの結果から、いずれの油を用いたエマルション基剤の析出物も結晶性を有することがわかった。また、いずれの析出物も β -CD単独のX線回折パターンと異なることから、析出物は β -CDと*n*-alkaneとの包接錯体であることが示唆された。したがって、 β -CDを乳化剤としたエマルション基剤は、 β -CDと*n*-alkaneとの包接錯体からなる析出物が油水界面に吸着してエマルションを安定化させていることから、固体微粒子を乳化剤としたPickeringエマルションの一種であることが明らかになった。

Pickeringエマルションでは、エマルションの型は油/水界面における固体粒子の接触角(θ_{ow})がエマルションの型を決める重要な因子であり、 $\theta_{ow} < 90^\circ$ の場合O/W型エマルション、 $\theta_{ow} > 90^\circ$ の場合はW/O型エマルションが安定化されることが報告されている。そこで、エマルション中の析出物をプレート成形したものについて θ_{ow} を測定した。 β -CDを乳化剤とした*n*-alkane/水エマルションからの析出物はいずれも $\theta_{ow} < 90^\circ$ を示したことから、Pickeringエマルションと同様にO/W型のエマルションが安定化されたものと考えられた。

$\theta_{ow} > 90^\circ$ となればW/O型のエマルションが安定化されるものと考え、数種類の界面張力の低い油を用いてエマルションの調製を試みたが、 β -CDを乳化剤とした場合ではいずれも $\theta_{ow} < 90^\circ$ を示し、W/O型のエマルションを調製できないことがわかった。

3) エマルション基剤の安定性

エマルション基剤の安定性を調べることは製剤の基剤へ応用するために重要である。そこで、*n*-alkane/水エマルション中の油滴の粒子径に及ぼす β -CD添加濃度の影響について検討した。いずれの油を用いた場合も β -CD濃度の増加に伴い、油滴の粒子径は小さくなることがわかった。これは、 β -CD濃度の増加に伴い β -CDと*n*-alkaneとの包接錯体である析出物の量が増加するため、油滴粒子径の減少に伴い表面積が増大しても、安定化するために必要な析出物を油滴界面へ供給できるためであると考えられる。また、油滴粒子径の大きさは、*n*-octane > *n*-dodecane > *n*-hexadecaneの順であった。

次に、エマルション基剤の安定性の経時変化を調べたところ、*n*-octane < *n*-dodecane < *n*-hexadecaneの順に安定性が高いことがわかった。これは、 β -CDと*n*-hexadecaneとの包接錯体からなる析出物が優れた親水性-疎水性のバランスを有しているため油滴界面への配向性が高く、界面から脱離されにくいためであると推察される。

4) エマルション基剤の粘弾性

エマルション基剤のレオロジー特性を明らかにすることは、安定性、使用感、適用性などの観点から重要である。そこで、粘弾性測定装置を用いて、エマルション基剤の貯蔵弾性率 G' および損失弾性率 G'' の応力依存測定を行った。エマルション基剤は、いずれの油の場合も応力に対して変化を示さない線形粘弾性領域を有していた。また、*n*-octane < *n*-dodecane < *n*-hexadecaneの順に G' および降伏値が大きくなることがわかった。これらのことより、*n*-alkaneの鎖長の増加に伴い、エマルション中の β -CDと*n*-alkaneとの包接錯体である析出物により形成される高次構造がより強固になったことが推察される。高い粘弾性をもつエマルションは、分散相(油滴)の合一や相分離を生じにくいことから、*n*-octane < *n*-dodecane < *n*-hexadecaneの順に安定性が高くなったものと考えられる。次に、 G' および G'' の周波数依存測定を行ったところ、低周波数側では G'' が優位であるためエマルションは液体としての性質が強いが、高周波数側では G' が優位であるためエマルションは固体としての性質が強くなることがわかった。さらに、本エマルション基剤の粘弾性は、粘弾性基本モデルであるマクスウェルモデルに相当することが示唆された。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20年 2月 26日

日本大学 総長 殿

氏 名 九 川 文 彦



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	奨励研究/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	ドキシソルビシンの心筋細胞障害性に関する薬物動態	
3 研究の目的	ドキシソルビシンはアントラサイクリン系の抗がん抗生物質としてがんの化学療法にはよく用いられている。しかし、この薬剤には長期服用により心筋にたいして特異的な毒性が発現されることが知られていた。臨床報告では、心筋毒性はアポトーシス様細胞死とそうでない細胞死の混在であることが報告されているが、詳細の解明には、心筋細胞を使った細胞生物学的観点からの薬物動態研究が必須である。そこで、ヒト心筋由来初代細胞を用いて、ドキシソルビシンの心筋毒性を検討した。	
4 研究の概要	心筋細胞は、ヒト心臓血管由来の繊維芽細胞の初代細胞株（CF細胞）を用いた。これにドキシソルビシンの臨床投与量から換算した濃度のドキシソルビシン溶液を添加し、経日的に、細胞の生存性、位相差顕微鏡像、蛍光顕微鏡像、DNA fragmentation assay によるアポトーシスの判定を行った。また、ドキシソルビシンの血中タンパク質結合率は、ドキシソルビシンのパッケージインサートからの文献データを参照した。	
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 ・研究分担者（役割分担） 	

部科校名：薬学部

氏名：九川文彦

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。）

ドキソルビシンはアントラサイクリン系の抗がん抗生物質である。がんの臨床でよく用いられ、乳がん、悪性リンパ腫、白血病、多発性骨髄腫などに適用されている、特に白血病に代表される血液がんの一時選択薬として有名である。しかしその一方、ドキソルビシンの長期服用により、がん患者に心疾患を誘発する特異的な副作用があることが知られていた。すなわち、がん患者は、ドキソルビシンの化学療法を長く続けることにより、心疾患を副作用として併発するものである。この心疾患は、拡張型心筋症に代表されるものであるが、極めて予後不良な心疾患として知られ、多くは心臓移植の適応を必要とするものである。

興味深いことに、ドキソルビシンの心筋毒性は、まさしく心臓だけに対して発現する毒性であり、他の臓器には（骨髄抑制のように、抗がん剤において一般的に認められる毒性は除いて）際立った副作用が認められていない。そこで、ドキソルビシンの心筋毒性は、薬剤の細胞障害性の観点から多くの注目を集め、細胞生物学的、薬物動態学的な基礎研究、モデルマウスの作成を介する遺伝学的研究等も盛んに行われている。しかしながら、心筋毒性を発症した患者由来の心筋標本に、典型的なアポトーシス像が TUNEL assay によって見つかっている等の報告はあるものの、その実体は依然不明であり、がんの化学療法において、抗がん剤による重篤な副作用を防止するという観点からも、本研究の推進は極めて有意義な研究といえる。

私は、ヒト乳がん由来の培養がん細胞株である MCF-7 細胞に対し、臨床使用濃度に準じる濃度でドキソルビシンがアポトーシスを誘起することを見出している。そこで、本研究では正常ヒト心臓血管繊維芽細胞由来の初代細胞（Cell Systems 社：CF cell）を用い、MCF-7 細胞に投与したときと同じドキソルビシンの濃度で、なにが細胞に起こるのかを検討した。

まず、細胞に対するドキソルビシンの与えるストレスを判断するために、アラマブルーアッセイによる細胞生存性を検討した。その結果、ドキソルビシンにより CF 細胞は経日的に細胞数を減少させ、投与後 4 日で完全に死滅した。この生存率の減少スピードは、MCF-7 におけるドキソルビシンのそれに比べて約 2 倍早いものであった。次にヘキスト 33258 染色による CF 細胞の核の形態観察を行った。薬剤投与 4 日目において細胞内の核膜は完全に保持していたが、核内の DNA は凝集してはいたものの、典型的なアポトーシス時に観察される DNA blebbing とは言いがたく、前アポトーシス段階というべき形態を示していた。最後に DNA fragmentation assay を行ったが、スメア様のラダーが認められ、典型的なアポトーシスとはかけ離れたものであった。

ドキソルビシンの血漿タンパク結合率は、文献的には 1mg/ml で約 84%であることが知られている。従って、これらの研究を元に、ドキソルビシンと心臓および他の臓器間でのタンパク結合率を算出することが、今後のドキソルビシンも心筋特異的な細胞毒性の解明に寄与すると考えられる。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20年 3月 15日

日本大学 総長 殿

氏 名 小林 俊亮



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	奨励研究(<input checked="" type="radio"/> 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	神経系における YB-1 遺伝子の転写調節機構とターゲット mRNA に関する研究	
3 研究の目的	YB-1 タンパク質は、細胞質で mRNA に結合して翻訳調節因子として働いている。我々は、神経系の YB-1 を単離し、その発現が生後2週目までは多く、その後急激に減少することを見出した。このように、YB-1 は非常に特徴的な転写調節を受けるため、脳の発達、成長過程で YB-1 が結合する mRNA の翻訳反応が大きく変化すると考えられる。本研究は、脳において YB-1 の発現が劇的な変化を示すメカニズムと YB-1 により翻訳の調節を受ける mRNA を解析することを目的としている。	
4 研究の概要	(1) YB-1 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、転写に必要な配列(領域)を調べる。 (2) その配列に結合する核内タンパク質(転写因子)を検出し、幼若期と4週齢でそのタンパク質の結合のレベルに違いのある配列を知り、転写因子の実体を明らかにする。 (3) 幼若期に YB-1 が結合している mRNA を同定し、YB-1 による翻訳調節について調べる。	
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 ・研究分担者(役割分担)	

※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： 小林俊亮

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。)

(1) ヒトのニューロblastomaである SH-SY5Y 細胞のゲノム DNA より、YB-1 遺伝子を含む領域をクローニングし、SH-SY5Y とげっ歯類の神経系培養細胞である NG108-15 細胞を用いて YB-1 の転写に関わる領域を調べたところ、ヒト由来の細胞でもげっ歯類由来の細胞でも神経系で YB-1 の転写に必要な範囲は、-115 ~ +206 の間にあることがわかり、種が違って神経系では同様の転写因子が関与していることが考えられた。また、最も 5' 上流の転写開始点と言われるポイントより内部にも神経系で機能するプロモーターが存在することもわかった。さらに、マウス脳の細胞核抽出液を用いた *in vitro* の転写実験とゲルシフトアッセイから、5 日齢の脳では行われている YB-1 遺伝子の転写が 4 週齢では大きく減少するという現象に関わると考えられる配列が 3 つの領域に存在することがわかった。そのうちの 1 つは 5' 隣接領域にあり、5 日齢と 4 週齢でその領域に結合するタンパク質には差は見られなかったが、その領域がないと転写活性が 60% まで減少した。したがって、そこに結合するタンパク質は YB-1 の転写には関わるが、生後、急激に減少することには関与していないことが予想された。その他の 2 つは 5' 非翻訳領域内に存在する E-box 配列と E2F-1 サイトであり、これらを認識するタンパク質は、YB-1 の転写が抑制される 4 週齢で DNA 結合性が大きく減少することがわかった。また、この E-box 配列と E2F-1 サイトに変異を導入した遺伝子は、プロモーター活性をほとんど示さないことを見出した。現在、この E-box に結合するタンパク質は未同定であるが、神経系の E-box 結合タンパク質ファミリーは脳の発生期や胎生期に多く、生後減少するものが多い。そのため、これまでのところではこの E-box 結合タンパク質の DNA 結合性の減少は量的変化によると考えるのが妥当である。一方、E2F-1 は 5 日齢の脳でも 4 週齢の脳でも発現していた。したがって、5 日齢と 4 週齢の間の E2F-1 のゲルシフトのパターンの変化は量的なものではなく、その DNA 結合性の抑制によると考えられた。そこで、E2F-1 の DNA 結合性を阻害する因子として、E2F-1 と相互作用の報告のある Pur α タンパク質に注目した。Pur α の脳における発現は YB-1 と逆相関を示し、胎生期や生後間もない時期には非常に少なく、成長とともに増加した。また、抗 E2F-1 抗体を用いた免疫沈殿のデータから、4 週齢の脳の細胞核中で E2F-1 と相互作用していることが明らかとなり、さらに、Pur α の共存によって E2F-1 の DNA 結合性が阻害されたので、生後の脳では Pur α の増加に伴って YB-1 遺伝子のプロモーターに E2F-1 が結合できなくなると考えられる。現在、E-box 配列に結合する転写因子の同定を進めている。

(2) 生後の脳で YB-1 が結合している mRNA を調べるため、抗 YB-1 抗体を用いて YB-1 を含む RNA タンパク質複合体を免疫沈殿し、その中に含まれる mRNA の cDNA クローニングを試み、得られたクローンの配列を調べた。その中には、神経系の受容体やシグナル伝達に関わると考えられるいくつかのタンパク質の cDNA クローンが含まれていた。今後、それらがコードすると考えられるタンパク質に対する抗体を用いて、YB-1 による翻訳への影響について調べる予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 8 日

日本大学 総長 殿

氏 名 三宅宗晴



所属・資格 准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/ <input checked="" type="radio"/> 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	グルタミン酸受容体阻害活性を持つ脳神経保護の開発研究	
3 研究の目的	グルタミン酸受容体の一種の NMDA 受容体は記憶・学習の形成や神経の発達に寄与している。NMDA 受容体が過度に活性化されると多量の Ca ²⁺ が細胞内に流入することで神経細胞死が誘発され、アルツハイマー病などの原因ともなる。本研究は、NMDA 受容体活性阻害作用を有する化合物を創製することにある。	
4 研究の概要	非環状シクロファンはその構造から、疎水性相互作用や静電的相互作用によりグルタミン酸と複合体を形成することが期待される。NMDA 受容体のアゴニストであるグルタミン酸と複合体を形成する非環状シクロファンを合成し、NMDA 受容体活性に対する阻害効果をアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法にて検討した。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者（役割分担） 	

※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：三宅宗晴

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。）

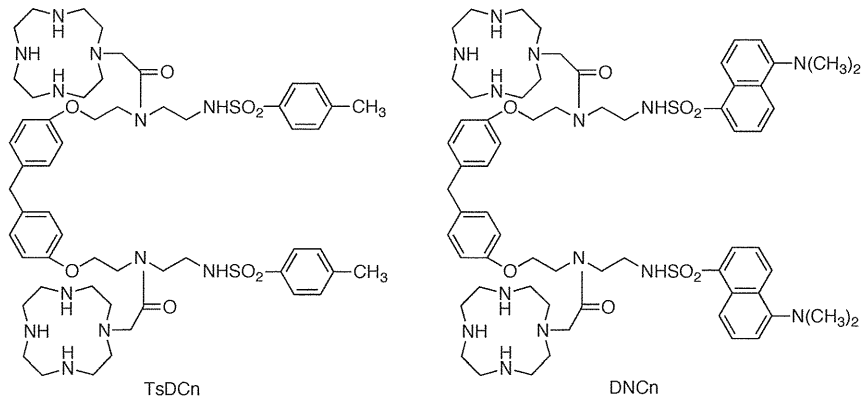
ジフェニルメタン骨格を基本骨格として、その側鎖にスルホンアミド基と環状ポリアミンであるサイクレンを有する非環状シクロファン TsDCn および DNCn を合成し、NMDA (NR1/NR2A, NR1/NR2B, NR1/NR2C, NR1/NR2D) 受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞膜上に発現させ、これらの化合物の阻害作用について静止膜電位 ($V_h = -70\text{mV}$) で検討した。10 μM TsDCn および DNCn の影響を検討した結果、いずれも NR1/NR2A 受容体活性を顕著に阻害した。また、NMDA 受容体サブタイプである NR1/NR2B, NR1/NR2C, NR1/NR2D 受容体をも阻害した。NR1/NR2A 受容体に対する TsDCn と DNCn の IC₅₀ 値を濃度-阻害曲線から算出したところ、それぞれの IC₅₀ 値は 0.23、0.35 μM であり、現在アルツハイマー病治療薬として使用されているマンチン (IC₅₀ 値=1.0 μM) に比べて 3-5 倍程度強いことが明らかになった。TsDCn および DNCn の NMDA 受容体に対する阻害メカニズムを明らかにするため、膜電位を $V_h = -20\text{mV}$ 、 $V_h = -100\text{mV}$ に固定したときの阻害作用について検討した。これらの化合物による NMDA 受容体活性阻害は膜電位が $V_h = -20\text{mV}$ のときよりもさらに膜電位差が大きい $V_h = -100\text{mV}$ の時の方が強く観察されたことから、NMDA 受容体活性に対する阻害作用には電位依存性が認められた。このことから、TsDCn および DNCn はオープンチャンネルブロッカーとして作用し得ることが示された。次に、NMDA 受容体チャンネル・ポア形成に関与すると考えられているアミノ酸残基と細胞外および細胞内領域に位置するアミノ酸残基の変異体を用いて、TsDCn と DNCn の作用部位の同定を検討した。細胞外領域に位置する NR1 (E662Q) やチャンネル・ポア入り口付近に位置する NR1 (W563L) では TsDCn による阻害効果が減弱し、NR1 (N650A) では TsDCn と DNCn による阻害作用の顕著な減弱が認められた。一方、チャンネル・ポアの最狭部形成に関与している NR1 (N616), NR2B (N615) および NR2B (N616) の変異体では、これらの化合物による阻害効果にほとんど影響されなかった。さらに、細胞内領域の M1-M2 ループに位置する NR1 (E598Q), NR1 (T602G) および NR1 (E621Q) においても阻害作用は影響されなかった。このことから、TsDCn および DNCn はチャンネル・ポアの比較的浅い部分に直接作用することが明らかになった。TsDCn および DNCn はアミノ酸の疎水部を補足するジフェニルメタン骨格を有し、スルホンアミド基と環状ポリアミンのサイクレンによるアミノ酸のカルボキシル基やアミノ基との静電的相互作用により、NMDA 受容体のチャンネル・ポアとのアフィ

部科校名：薬学部

氏名：三宅宗晴

研究の結果 (つづき)

ニテイーが高まり、NMDA 受容体活性阻害効果を示したものと考えられる。



注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 4 日

日本大学 総長 殿

氏 名 高 綱 博 文



所属・資格 通信教育部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/ <input checked="" type="radio"/> 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	近代上海における日本人の活動と意識に関する歴史的研究	
3 研究の目的	本研究の目的は、これまで十分に研究が進んでいなかった近代上海における日本人居留民の活動と意識の在り方を歴史具体的に究明し、「国際都市」上海における日本人の実態を考察するものである。	
4 研究の概要	(1) 近代上海における日本人の活動と意識に関する史料を調査・収集する。 (2) 上海日本人居留民に関する歴史的検証を行った論文を作成する。	
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 ・研究分担者（役割分担） 	

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

部科校名：通信教育部

氏名：高綱 博文

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。）

日本大学通信教育部『研究紀要』第21号（2008年3月）に発表したところの拙稿「内山完造の新史料—『大正14年上海内山通信』」は、「日中友好の架け橋」として活躍した内山完造の参天堂（現・参天製薬株式会社）上海出張員時代の新史料—「大正14年上海内山通信」—が、新たに発見されたので、それを翻刻し紹介したものである。これまで内山完造の参天堂上海出張員時代の記録がほとんどなかっただけに、「上海内山通信」は当時の活動を伝える一次史料として貴重なものである。

「上海内山通信」の基本的な性格は、参天堂本店宛への上海出張員（内山完造）の業務報告書であり、大学眼薬をはじめとする参天堂薬品の取引状況やそれに伴う諸問題を報告するものであるが、内山完造の見た1925年の上海を中心とした中国の政治・経済・社会状況にも具体的に言及されており、当時の民衆史料としても極めて貴重なものである。

拙稿「上海日本人居留民の歴史意識の生成—沖田一の場合—」は、現在日本大学史学会の会誌『史叢』に投稿中である。拙稿は、上海日本人居留民の一人である沖田一の上海時代と上海史研究の概要を明らかにしようとするものであり、それを通して上海日本人居留民の上海に対する歴史意識の生成過程を具体的に考察するものである。日本における上海史研究の先駆者である沖田一の事績を掘り起こし、それを歴史的・批判的に検証することは、沖田と同じく上海史、特に戦前の日本と上海の関係、上海日本人居留民史に関心を抱くものにとっては避けて通れないことである。

戦前日本の上海史研究者としては『上海史話』を著した米澤秀夫（1905～90）は有名であるが、いま一人日本における上海史研究の先駆者である沖田一（1906～85）のことを忘れることはできない。沖田一の上海史研究は、アジア太平洋戦争期に上海において集中的になされた。その研究は上海と日本の関係、上海における日本人の歴史を明らかにし、上海の古蹟を調査し、また上海の地名誌研究にも先鞭をつけた。さらに彼は戦前における最も完備した『上海に関する文献目録』を作成した。しかしながら、こうした沖田の数多くの研究業績はそのすべてが戦前の上海で刊行されたため、日本の敗戦ともに散逸し、現在それらを見ることは容易ではない。また、戦後は沖田自身が本来の専攻分野であるヘンリー・ジェイムズ研究を中心とした英文学研究に専念したこともあって、彼の上海史研究はほとんど顧みられることはなかった。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 5 日

日本大学 総長 殿

氏 名 佐藤 稔



所属・資格 通信教育部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/ <input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人) <input type="radio"/> 一般研究(共同) <input 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	所得税制の現状と問題点－所得税制のあり方を中心に－	
3 研究の目的	<p>現行税制は、シャープ勧告に基づく昭和25年の税制を基礎として、爾来、これに必要な改正を加え現在に至っている。この間における社会経済的環境変化は、税制に対してさまざまなひずみを生じさせているのが実情である。これは、税制それ自体が社会経済情勢の変化に対応することが困難となってきたことに起因するものである。</p> <p>本研究では、斯かる状況下にある所得税制のあり方について考察しようとするものである。</p>	
4 研究の概要	<p>下記の三視点からの現状分析を通して所得税制のあり方を明らかにしようとするものである。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 所得税が租税体系上いかなる地位を占めているか、租税統計資料の解析を通して明らかにする。 2. 所得税負担について外国との比較分析を通して現状を把握する。 3. 最近の所得分布の状況を考慮し、税率構造のあり方について分析する。 	
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 ・研究分担者（役割分担） 	

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

部科校名：通信教育部

氏名：佐藤 稔

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。）

経済再生のためには不断の税制改革が必要で、消費行動、投資行動、就業形態などの諸誘引を考慮して中立的な税体系の構築が求められている。特に、所得税制は中立性を損なっている面も少なくなく、租税負担感の公平性、社会政策への役割分担が大きな課題となっている。

所得税制はさまざまな視点から総体的、包括的に検討する必要があるが、本研究では、

1. 所得税が租税体系上いかなる地位を占めているか、租税統計資料の解析を通して明らかにする。
2. 所得税負担について外国との比較分析を通して現状を把握する。
3. 最近の所得分布の状況を考慮し、税率構造のあり方について分析する。

の三視点からの分析を試みたものである。資料収集ならびに統計的解析についてはほぼ終了し、本研究課題の結果は平成21年3月発行予定の通信教育部「研究紀要」に発表予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20 年 4 月 10 日

日本大学 総長 殿

氏 名 水野 満



所属・資格 グローバルビジネス研究科 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)/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	タイ、マレーシア、韓国、フィリピンのベンチャー市場の特性と課題	
3 研究の目的	ベンチャー企業の成長に欠くことのできないベンチャー市場の育成について東アジア4カ国のベンチャー市場を比較し、アジア諸国に最適なベンチャー市場の育成方法と東アジア諸国のベンチャー市場のモデルを考察することが本研究の目的である。研究の特色としてあげられるのは株式公開までの支援体制や上場基準等の市場整備とベンチャー企業の成長との関連性を比較研究できることである。	
4 研究の概要	持続可能な経済システムを確立するには競争力のある企業セクターの育成・構築が鍵となる。21世紀を迎え、新世紀のイノベーションとベンチャー企業を支援するインフラの構築が求められている。例えば、高付加価値型の産業への転換や将来の産業を主導するハイテク・ベンチャーの出現を促進する環境整備等である。東アジア諸国はこうした認識の下、ベンチャー支援の環境整備を図ってきた。支援策の一環として各国が取り組んできたのが、ベンチャー企業に成長資金を供給するベンチャー市場の育成である。本研究ではタイ、マレーシア、韓国、フィリピンのベンチャー市場を研究対象として取り上げ、各国のベンチャー市場の特性と果たしてきた役割・実績と問題点を分析し、これら諸国のベンチャー市場が更なる発展を遂げるための課題と方策について考察する。	
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 ・研究分担者 (役割分担)	

※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: グローバルビジネス研究科

氏名: 水野 満

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. はじめに

アジア金融危機後、東アジア諸国は金融と企業の改革に取り組んできたが、グローバル化した世界経済の中で、持続可能な経済システムを確立するには競争力のある企業セクターの育成・構築が鍵となる。成長性が高く競争力のある産業を育成することは経済成長を確保する観点から取り組まなければならない課題でもある。東アジア諸国の持続的な発展を考えると、競争力のある企業セクターの育成を行い、産業構造の高度化を図っていかなければならない。ベンチャー企業は、革新的な技術や独創的なビジネスモデルを生み出し、新産業の創出や産業活性化、雇用の拡大に寄与し、経済全体のイノベーションに貢献する。近年、アジアに対する直接投資が中国に集中しており、中国の製造業の国際競争力は著しく高まってきた。今後、中国を含めた東アジア諸国の競争は益々激しくなっていくものと予想される。このため、東アジア諸国はより一層、産業の高度化を図り、経済基盤を強化することを迫られよう。21世紀を迎え、新世紀のイノベーションとベンチャー企業を支援するインフラの構築が求められている。例えば、高付加価値型の産業への転換や将来の産業を主導するハイテク・ベンチャーの出現を促進する環境整備等である。東アジア諸国はこうした認識の下、ベンチャー支援の環境整備を図ってきた。支援策の一環として各国が取り組んできたのが、ベンチャー企業に成長資金を供給するベンチャー市場の育成である。ベンチャー市場はベンチャー企業にリスクキャピタル (VC) を供給するベンチャーキャピタルにとっても資金回収の出口として重要な意味を持つ。我が国でもジャスダックに加え、マザーズとヘラクレスが開設され、VCの投資活動が活性化された。しかし、ベンチャー企業と投資家が相対するベンチャー市場が健全に成長・発展するためには投資家が安心して投資できるような市場でなければならない。また、ベンチャー市場の信頼性を高める情報開示や適切な審査や管理体制等が求められる。本研究では韓国、タイ、シンガポール、フィリピン、マレーシア、香港のベンチャー市場を研究対象として取り上げ、各国・地域のベンチャー市場の特性と果たしてきた役割・実績を吟味し、これら諸国のベンチャー市場が更なる発展を遂げるための課題と方策について考察する。

2. 東アジア諸国のベンチャー企業の上場の推移と各国市場の特色

表1は東アジア諸国・地域のベンチャー企業のIPOの推移を示している。設立はシンガポールが1987年と一番早くベンチャー市場を創設したが、後述するように上場基準を大幅に緩和した市場改革を行い、2007年12月にSesdaqからCatalistへと名称を変更している。他の東アジア各国・地域のベンチャー市場は韓国を除き、いずれもアジア通貨危機以降に設立された。従って、シンガポールのベンチャー市場は20年の歴史があるが、他のアジア諸国・地域のベンチャー市場の歴史はいずれも10年前後とわが国のベンチャー市場(マザーズ、ヘラクレス)並みである。東アジア諸国・地域でのベンチャー市場創設の目的は、次代の産業の担い手である新興企業にリスクキャピタルを提供し、経済構造の高度化を図るためである。シンガポールと香港では地域の金融・資本市場の中核として更なる発展を促す意味あいもある。2006年末の上場企業数をみると、経済規模の大きな韓国が962社と最も多く、中国企業の上場も多い香港とシンガポールならびにベンチャー企業育成に力を入れているマレーシアが続いている。タイも2004年以降、上場数が増加してきている。一方、フィリピンは2004年から新規の公開企業がみられず、3社と低迷している。

注：研究助成金申請時のタイトルは表題の通りであるが、本稿ではシンガポールと香港のベンチャー市場についても論じている。

部科校名：グローバルビジネス研究科

氏名：水野 満

研究の結果（つづき）

表1：東アジア諸国・地域のベンチャー企業の IPO の推移

	設立	2001	2002	2003	2004	2005	2006	会社数
韓国 (Kosdaq)	1996	171	158	75	54	70	56	962
タイ (MAI)	1999	3	6	6	14	14	6	42
シンガポール (Catalist)	1987	19	17	28	31	19	11	169
フィリッピン (SME Board)	2001	1	0	2	0	0	0	3
マレーシア (Mesdaq)	1998	1	8	20	31	46	22	128
香港 (GEM)	1999	57	57	27	21	10	6	198

出典：World Federation of Exchanges 各年及び各国のベンチャー市場を基に作成。

注1：各国のベンチャー市場は次の通り。韓国：Kosdaq、タイ：MAI、シンガポール：Sesdaq、フィリッピン：SME Board、マレーシア：Mesdaq、香港：GEM。なお、中国はまだベンチャー市場を創設していない。

注2：上場会社数は2006年末現在である。

東アジア諸国・地域のベンチャー市場の時価総額は2000年のITバブルの崩壊を受け、減少したが、その後、上場会社数の増加と株式市場の回復から持ち直してきている（表2）。韓国では1998年末の時価総額は7.9兆ウォンに過ぎなかったが、ITバブルで市場が過熱し、1999年末には12.5倍の98.7兆ウォンまで急増した。香港のGEM市場でもGEMインデックス（基準日は2000年3月17日で基準インデックスは1000）が2001年末には199.4、2002年末には110.4と急落したが、2003年からはインデックスは上昇に転じ、時価総額も回復している。シンガポールでも同様の傾向が見られる。Sesdaqインデックス（基準日は1987年2月18日で基準インデックスは100）は2001年末に51.89、2002年末に52.56と下落したが、2003年には110.2まで回復した。2006年には143.5まで上昇し、Sesdaq市場の時価総額を押し上げている。マレーシアとタイでは市場インデックスが2003年にピークに達したが、公開企業が増加したので、時価総額は毎年順調に増加してきた。また、1社あたりの時価総額では、韓国、香港、シンガポール、マレーシア、タイ、フィリッピンの順番となっている。

表2：東アジア諸国・地域のベンチャー市場の時価総額推移（単位：百万米ドル）

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	1社あたり平均時価総額
韓国	39450.4	31248.7	31209.2	30048.3	70402.3	77563.1	81
タイ	9.1	89.4	224.9	260.0	346.1	597.8	15
シンガポール	1650.5	1747.2	3579.6	3550.6	3533.9	6414.7	38
フィリッピン	0.7	1.1	5.1	4.7	5.5	6.6	2
マレーシア	46.7	203.3	1018.2	1762.8	2068.6	3751.2	29
香港	7818.0	6695.8	9039.2	8583.4	8590.2	11428.8	58

出典：World Federation of Exchanges 各年、2007 World Growth Markets Guide 及び各国のベンチャー市場を基に作成。

注：1社あたりの平均時価総額は2006年末現在の数字である。

部科校名: グローバルビジネス研究科

氏名: 水野 満

研究の結果 (つづき)

表3は東アジア諸国・地域のベンチャー市場でのIPO時点の資金調達額推移を表している。国別ではIPO数を映して韓国のKosdaq市場の資金調達額が多いが、2002年と2006年は香港のGEM市場がKosdaq市場を上回っている。これはGEM市場での1社あたり資金調達額がKosdaq市場に比べ大きかったことによる。特に、2006年ではGEM市場は公開会社数は6社と少なかったが、大型株が上場したこともあり、Kosdaq市場の56社の資金調達額を超えている。シンガポールのSesdaq市場は2005年まで1社あたりの資金調達額が3百万ドル～5百万ドルと比較的に少額であったが、2006年には12百万ドルと調達規模が急増した。マレーシアのMesdaq市場は1社あたりの資金調達額がピークで5.2百万ドルで少額である。タイも1社あたりの資金調達額が1百万ドル～3.6百万ドルの範囲に止まっており少額である。一方、フィリピンは2社が上場した2003年のデータがないため、正確な判断はできないが、2001年のデータでは1社あたりの資金調達額が僅か0.1百万ドルと極めて少ない。

表3：東アジア諸国・地域のベンチャー市場での資金調達額推移 (単位：百万米ドル)

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	1社あたりの平均調達額
韓国	868.6	567.2	484.8	445.6	220.7	224.7	4.0
タイ	2.9	13.7	18.5	35.4	36.5	22.0	3.7
シンガポール	56.5	61.9	96.9	150.6	95.6	132.6	12.1
フィリピン	0.1	0	NA	0	0	0	—
マレーシア	2.3	41.7	56.5	153.9	183.0	78.9	3.6
香港	527.7	898.9	266.6	345.9	85.5	227.7	38.0

出典：World Federation of Exchanges 及び各国のベンチャー市場。

注：IPO時点の資金調達額で1社当たり平均資金調達額は2006年の公募株の金額である。

2-1：Kosdaq (韓国)

韓国でベンチャー企業が続々と生まれてきた契機は1997年の経済危機である。企業や研究所からスピンアウトし起業した企業は、本格化したITベンチャーの育成策に後押しされ、急成長を遂げてきた。ベンチャー企業が増えていった背景には、政府の支援があった。政府の建物での創業を認めただけでなく、独立後3年間は研究所に戻れるなど、スピンオフのリスクを最小化した。また、ベンチャー特区を指定し、法人税減税を含む創業支援を強化した。こうして育ったベンチャー企業の中から多数の企業がKosdaq市場で株式公開を果たしている。上場会社区分は、一般、ベンチャー企業と投資会社に分けられる。ベンチャーの中でも特に技術評価の高いベンチャーは成長型ベンチャーと呼ばれている。創業者の年齢(2006年)は40代が4割強と最も多い。また、最終学歴では高卒4.8%、大卒67.1%、修士17.8%、博士10.3%と高学歴者が多いのが特徴となっている。投資家別に見ると個人投資家が約90%、機関投資家が約3%、外国人が約4%、その他が約3%となっており、リーテール市場であるといえる。IPOまでの期間は各年で異なるが平均すると、8-9年で日本のマザーズやヘラクレスと略、同期間である。上場時のPERは7-9倍程度である。Kosdaq市場の時価総額はITバブルの2000年1月には1000億ドルに達したが、ITバブル崩壊後は暫く市場は低迷を余儀なくされた。しかし、2004年頃から徐々に回復してきている。Kosdaq市場は過去10年あまりの間にベンチャー市場としては世界有数の市場に育ってきた(時価総額では米国Nasdaq、Jasdaq、AIMに次いで4番目の大きさである)。取引の活発さを表す回転率(取引額/時価総額)は871.9%と新興市場の中では最高水準にある。また、経済面でも貢献している。コスダック上場企業の2005年の売上高は61.6兆ウォンで、GDPに占める割合は7.6%に上り、2005年末の従業員は18万9595人で1999年末の2.3倍に増加した。このように、順調に成長してきたKosdaq市場ではあるが、問題がないわけではない。持続的な成長性に問題が見られる企業が多いこと、不祥事の発生、上場企業は玉石混交で上場資金を成長のための投資ではなく運転資金に使っている例も見られること、優良ベンチャー企業が少ないことなどが問題点として挙げられている。

部科校名：グローバルビジネス研究科

氏名：水野 満

研究の結果（つづき）

量的な成長は遂げてきたので、今後は質的な向上が求められよう。なお、世界的な証券市場の再編の流れに対応し、資本市場の効率化と強化のため、2005年に証券取引所、先物市場と Kosdaq 市場が統合し、韓国証券先物取引所が発足した。

2-2：MAI（タイ）

MAI (Market for Alternative Investment) の創設は 1999 年であったが、トレーディングがスタートしたのは 2 年後の 2001 年からである。MAI を創設した主な目的は高い成長性を持つ革新的な企業に資金調達の機会を与え、VC 投資を活発にするとともに、投資家に多様な投資機会を与えることである。タイには株式市場として大手企業向け市場と、中小・ベンチャー企業向け市場である MAI の 2 つがあるが、両市場ともタイ証券取引所の管轄下にある。このため、両市場は上場基準が異なるものの、情報開示及びモニタリング体制は同じである。タイにはまだ、ベンチャーに特化した政策はないが、中小企業政策の中で触れられている。2001 年 2 月に発足したタクシン政権はそれまでの「外資・外需（シングルトラック）重視」一辺倒を修正し、「外資・外需と内資・内需（デュアルトラック）とのバランス」をどって発展していこうというデュアルトラック（複線型成長路線）政策を導入した。この背景には、通貨危機以前は過度に輸出に依存していたという反省がある。タクシン政権では発展ビジョンとして 7 つの項目が取り上げられ、その中で、起業家的社会、知識と学習基盤をもつイノバティブな国家が目標としてあげられている。発展ビジョンを実現するため、ビジネス形成・発展に適した環境、コミュニティー・ビジネスや R&D、技術への継続的投資ならびに革新を刺激する環境の整備が求められた。上場に関しては量よりも質を重視した姿勢を堅持し、公開予定企業は上場直前に利益を計上しなければならない。財務諸表についても MAI の上場基準ではメインボードと同じく、上場企業が取引所の規定に従って財務諸表を作成し、取引所が認定した監査人の監査を経て提出すべきことを規定している。2006 年末で 42 社が上場しているが、既にメインボードに 7 社が鞍替えしているため、実質的には 49 社が上場したこととなる。2007 年 9 月時点のセクター別の内訳では製造業が 16 社と最も多く、次いでエンジニアリングなどのプロフェッショナルな仕事を専門とする業種が 11 社、情報通信関連が 7 社、メディア関連が 4 社、貿易業が 2 社、金融が 2 社となっており、ハイテク関連はまだ少ない。MAI に上場している企業の PER はメインボードの企業と大差なく、成長期待はそれほど高くない。投資家では圧倒的に個人投資家が多く、全体で 97% を占め、機関投資家は 3% と少ない。また、政府は上場支援策として上場する企業に対し、上場後 3 年間税の軽減措置を取っている。

2-3：Catalist（旧 Sesdaq シンガポール）

シンガポールは東アジア諸国では最も早く、ベンチャー市場を創設した国である。政府は 1998 年からハイテク企業を支援する TIP（テクノロジー・インキュベーター・プログラム）を開始し、産業構造の高度化を図ってきた。21 世紀の経済戦略の鍵として打ち出されたのが、Technopreneurship 21（テクノプルナーシップ 21）計画である。先端技術の開発・起業を奨励し、多国籍企業の製造拠点、地域のサービスハブとしてのシンガポールの役割を強化することが目的で、政策の柱として、①教育（起業向き人材育成のための大学教育改革等）、②環境整備（学術研究都市開発等）、③法制度の整備（起業をサポートするための各種法整備）、④金融（10 億ドルのベンチャー支援資金）があげられている。セクターでは IT、ナノテク、バイオ、ゲーム産業などの誘致に力点が置かれている。EDB（経済開発庁）の資料によれば、2004 年にシンガポールで設立されたハイテク関連企業は 3,664 社に達し、その内 624 社が外資系である。

部科校名：グローバルビジネス研究科

氏名：水野 満

研究の結果（つづき）

また、SEEDS（新興企業開発制度）の支援を受けたスタートアップ企業は、2001年の制度開始以降の4年間で124社に達し、この内約4分の1の企業が外資人起業家によるもので、国籍は12ヶ国にわたっている。このようにシンガポールは国内の起業家のみならず、海外からの起業家も積極的に誘致して次代を担う産業の育成につとめてきている。正確な統計はないが、シンガポールのベンチャー市場は上場企業の中には中国をはじめとして外国の企業も多数上場しており、地域新興市場としての色彩を帯びているのが特色である。CatalistはSesdaqを引継ぎ2007年12月に誕生した新しいベンチャー市場である。Catalistはロンドン証券取引所が運営するAIMをモデルとして作られたもので、最低株主数が200人以上の上場要件はなく、アジア諸国の中では最も、基準の緩い市場である。シンガポールがCatalistを創設した理由は、地域のベンチャー市場として強固な基盤を築くためである。ベンチャー・キャピタルは政府系VCのほかに2004年末の時点で、157社のベンチャー・キャピタルやプライベート・エクイティが存在し、約161億シンガポールドルのベンチャー・キャピタル基金がシンガポールから運営されている。また、ベンチャー・キャピタルにより支援を受けているシンガポールの地元企業は2003年には802社であったのが、2004年には856社に及んでいる。

2-4：SME Board（フィリピン）

フィリピンで新興市場が創設されたのは2001年と東アジア諸国の中では最も後発である。政府は中小企業振興に力を入れており、マイクロインダストリーはそれなりに育ってきてはいるが、ベンチャーの範疇に入る企業の絶対数が不足している。上場企業数は他の東アジア諸国に比べ、極端に少なく、取引所の2部市場に移転した1社を含めても僅か4社に過ぎない。しかし、IT関連企業も徐々に育ってきていることから今後、公開企業が増える可能性は十分ある。ベンチャー・キャピタル産業が未発達なこともIPO数が少ない理由である。また、ベンチャー市場の上場要件にも検討の余地がある。上場要件として役員数は最低7人が必要となっているが、多すぎるのではなかろうか。上場後2年間は株式の売却を制限するロックアップ条項がつけられているが、ロックアップ期間は長すぎる。通常は6ヶ月ないし1年で、ベンチャーの創業者にとっては公開による創業者利益の取得の道が閉ざされているうえ、ベンチャー・キャピタルもIPO時に資金の回収ができない。このことが、ベンチャー企業とベンチャー・キャピタル発展の阻害要因の一つとなっていると思われる。上場している企業のセクター別類型ではインターネット、ソフトウェア、金融の3社で、バイオはない。フィリピンでは、現在市場改革を検討している。成長の観点からベンチャー市場と2部市場を区分しているが、ベンチャー市場と2部市場を統合し、幅広く中小・ベンチャー企業の成長を支援していく計画である。そのため、ディスクロージャーは厳格にするが上場要件は緩和する意向である。今後、上場企業を増やしていくためにはSME（中小企業）育成策の一環としてベンチャー戦略と支援策とともに上場基準の緩和や広報・誘致活動の活発化も課題となる。

2-5：Mesdaq（マレーシア）

Mesdaqは1998年に創設されたが、2002年に資本市場開発計画の一環としてクアラルンプル取引所と統合した。Mesdaqに上場した企業のうち、既に数社が取引所に移転している。上場にはスポンサーが必要であるが、最終上場審査は取引所が行っている。労働集約的産業から技術・知識産業に転換するビジョン2020を実現するため、高い成長性を有する技術ベンチャーの育成はマレーシア政府の重要な政策課題となっている。政府はハイテク産業の受け皿としてのサイエンス・パークの建設、政府主導のR&Dによる技術蓄積ならびにハイテク分野への投資誘致などの施策により、テクノロジー産業の発展を図ってきた。

部科校名：グローバルビジネス研究科

氏名：水野 満

研究の結果（つづき）

育成するハイテクベンチャーとしてはエレクトロニクス、計測機器、自動化製造システム、バイオテクノロジー、光学機器、高級素材、環境技術、航空宇宙技術、輸送関連技術、通信、技術関連コンサルティングがあげられている。上場企業のセクター別分類では IT などのテクノロジーが 64%、製造業が 18%、商業が 13%、金融が 4%、その他が 1%となっており、テクノロジーの比率が高い。ベンチャー市場の投資家のうち 75%前後が個人投資家である。流動性確保のため 14 社の証券界会社がマーケットメイキングを行っていたが、取引が期待したほど、活発にはならなかったため取りやめている。1999 年以降、政府は VC の育成のため、25 億リングギットを投入。民間の VC25 社を含め、上場企業の 3 分の 1 以上の会社が VC より支援を受けている。マレーシアはシンガポールと同じく知識集約国家を目指しているが、シンガポールと比較すると GDP に対する研究開発投資比率は低く、人材の層も薄い。効率的な R&D 投資と技術教育機関の拡充による人材育成やベンチャー企業の創業者となりうる人材の育成の強化などが課題である。

2-6 : GEM (香港)

GEM 市場はロンドン証券取引所のベンチャー市場である AIM の刺激を受け、1999 年に香港証券取引所の第 2 市場として創設された成長企業向けの市場である。上場企業は成長見込みのある企業であればよく特に業種の制約はないが、ハイテク絡みの成長企業の取り込みに注力している。香港政府は香港の長期発展戦略の観点から金融・サービス業やイノベーション・科学技術に重点を置いており、既にサイエンスパークやサイバーポートを開設している。ターゲットとする企業は香港企業だけでなく、広く中国や世界の IT 関連企業である。GEM 市場のターゲットも、また、香港企業だけでなく、中国や台湾などのハイテクベンチャー企業で、GEM もシンガポールの Catalist と同様、地域のベンチャー市場を目指している。2000 年から 2006 年の 7 年間に GEM 市場からメインボードである香港証券取引所に移転した企業は 14 社に及んでいる。一方、上場基準を満たすことができずに上場廃止に追い込まれた企業は 11 社に達している。2005 年末の PER はメインボードが 15.7 に対し、GEM 市場では 22.9 と高く、成長が期待されている企業が多いことが窺える。上場企業のセクター別内訳ではソフトウェア、製造業、情報・通信、バイオ、ネットビジネス、メディア、環境・エネルギー、インフラ事業と多岐に亘っている。Asian Venture Capital Journal によれば香港を拠点とする VC の規模はアジア有数で 185 社が、400 億米ドルの資金を東南アジア地域で投資している。GEM 市場を運営する香港証券取引所は 2005 年から GEM の更なる発展を目指すために改革を検討してきた。市場関係者からの意見を参考の上、証券・先物取引委員会とも協議して 2007 年 7 月に今後の方向性に関して次のように提言した。

- ・ 基本的には現状を維持する。現在でもメインボードの 2 部市場として考えられているが 1 部市場への登竜門として明確に位置づける。
- ・ AIM モデルは成功しているが、ロンドンと香港の市場環境には違いがある。ロンドンではプロの機関投資家が多いが、個人投資家の多い香港で AIM モデルを取り入れるのは現時点では妥当とはいえない。
- ・ 近年、規制当局や市場関係者により公開企業のコーポレートガバナンスの強化が推進されてきているので AIM モデルを導入するとこの活動を弱める危険がある。
- ・ 規模の小さなベンチャー企業に対しても門戸を開くべく公開手続きの簡素化とコストの低減を図る。

部科校名：グローバルビジネス研究科

氏名：水野 満

研究の結果（つづき）

- ・ 半面、数量的な基準では、上場前 2 年間、営業キャッシュフローで 2 千万香港ドル、同じ経営陣、時価総額は社歴に拘らず 1 億香港ドル以上など公開企業の質的向上を求めていく。

3. 上場基準比較

東アジア諸国のベンチャー市場の上場基準は各国・地域により違いがあるが、株主数、資本金・自己資本、時価総額、創業年数、利益、その他で区分してみると表 4 に示す通りである。株主数では規定がない国も見られるが、公開企業としての観点から最低株主数と流通株数でしぼりをかけている国・地域が多い。資本金・自己資本では、シンガポールや香港のように最低資本金・自己資本を上場要件としない市場もあるが、韓国、タイ、フィリピン、マレーシアのように最低資本金・自己資本を条件として課している市場もある。時価総額に関しては、上場要件としていない市場がほとんどであるが、タイのように社歴が 1 年しか経過していない場合は、時価総額が 15 億バーツ以上、香港のように時価総額は 46 百万香港ドル以上で、1 年しか社歴がない場合は 5 億香港ドル以上という市場もある。創業年数では韓国のベンチャーと認定された企業、シンガポール、及びマレーシアの技術系企業では創業年数は問われない。他の市場では概ね、1-2 年の社歴が必要とされている。利益計上を上場要件としている市場は韓国、タイ、フィリピンでシンガポール、マレーシア、香港市場は赤字であっても公開の道が開かれている。リスク資金を提供するベンチャー市場の上場基準が証券取引所に比べ緩やかなのは当然としても、どの程度基準を緩和し、かつ投資家保護とのバランスを保っていくかがポイントとなる。

部科校名：グローバルビジネス研究科

氏名：水野 満

研究の結果 (つづき)

表 4：各国・地域のベンチャー市場の上場基準

	株主数	資本金・自己資本	時価総額	創業年数	利益	その他	
韓国 Kosdaq	500人以上で30%、または10%で1-5億株以上が流通株であること。	ベンチャー企業は15億ウォン、一般企業は30億ウォン以上の自己資本。	なし	企業タイプにより、0-3年。ベンチャー企業はなし、一般企業は3年以上。	必要	質的要件として市場性、技術性、経営力を見る。	
タイ MAI	300人以上で20%以上が流通株であること。	株主資本が2千万バーツ以上であること。	社歴参照。	2年間創業し、上場直前の1年間、経営陣に変化のないこと。創業後1年しか経過していない場合は、時価総額が15億バーツ以上。	上場直前年度に利益を計上していること。	株式公開にあたっては資本金の15%以上に相当する株数を公募。ファイナンシャル・アドバイザーが必要。	
シンガポール	Sesdaq	500人以上で15%、または50万株以上が流通株であること。	なし。	なし。	実績がない場合はプロジェクトを精査。	必要ないが成長と利益の見込みがあること。	公開幹事会社が2年間後見役を果たす。
	Catalist	200人以上で15%以上が流通株であること。	なし。	なし。	なし。	なし。	スポンサーが必要。
フィリピン SME Board	なし。	2千万ペソ以上の授権資本で25%以上が払込済であること。	なし。	1年以上。	上場直前年度にEBITDAが黒字であること。	株式の額面は1ペソ以上。有形固定資産はIT産業以外は5百万ペソ以上。	
マレーシア Mesdaq	なし。	2百万リングット以上の資本金。	なし。	技術関連は必要ないが、それ以外は1年以上。	なし。	スポンサーが必要。	
香港 GEM	100人以上で3千万香港ドルかつ時価総額が40億香港ドル未満では25%、40億香港ドル以上では20%以上が流通株であること。	なし。	46百万香港ドル。ただし、1年しか社歴がない場合は5億香港ドル。	2年。ただし、売上高が5億香港ドル以上であれば1年でも可。	なし。	スポンサーが必要。	

出典：Global New Markets Guide 2007 と各国のベンチャー市場。

注：シンガポールは2007年12月にSesdaqをKatalistに変換した。

部科校名：グローバルビジネス研究科

氏名：水野 満

研究の結果（つづき）

4. 東アジア諸国・地域の起業環境

表5は起業戦略、起業文化、起業教育、法律・会計サービス、ITインフラ、ネット普及率、R&D/GDP、VCの環境整備といった観点から、東アジア諸国・地域の起業環境を評価したものである。この創業環境指標を用いて各国を比較してみると先頭グループにはシンガポール、韓国、香港、第二グループにはマレーシアとタイ、第三グループにはフィリピンと中国が入る。ただし、中国は参考として示している。先頭グループのシンガポール、韓国、香港は国家・地域戦略として明確に知識集約型産業の振興を打ちたて、ベンチャー企業の支援に力点を置いている。マレーシアでも知識創造型の産業の発展を狙っているが、前述した通り、人材面の育成で遅れており人材育成が課題である。タイはまだ、ハイテクベンチャー政策が見られず、中小企業政策の一環として取り上げられており、ベンチャーの起業環境もあまり整備されていない。フィリピンもベンチャー育成政策が後れておりベンチャーの起業環境は芳しくない。

表5：東アジア諸国・地域の起業環境の評価

	起業戦略	起業文化	起業教育	法律・会計サービス	ITインフラ	ネット普及率	R&D/GDP	VC
韓国	4	3	3	3	4	4	4	3
タイ	2	2	2	2	2	2	2	2
シンガポール	4	3	3	3	4	4	3	3
フィリピン	2	2	2	2	2	2	1	1
マレーシア	3	3	2	2	3	3	2	2.5
中国	2	2	1	2	2	2	2	2
香港	4	3	2	3	4	4	2	3

出典：各種データから筆者作成。

注：1はあまり進んでいない、2はある程度進んでいる、3はかなり進んでいる、4は先進国のレベルに達するほど進んでいることを表す。

5. 課題

東南アジア諸国・地域の新興市場はベンチャー企業に成長資金調達のため重要な役割を果たしてきたが、さらなる発展のためには改善の余地がある。ベンチャー市場が成功する条件は上場予備軍となる企業が多数存在することとハイリスク・ハイリターン市場で投資する投資家層が存在することである。ベンチャー市場はハイリスクな市場なのでベンチャー企業に対するリスク資金調達の場を提供するとともに投資家保護が鍵となる。投資家の信認を獲得し、投資家保護を徹底するため十分なディスクロージャーと適切な上場審査が重要である。リスクヘッジのための株式インデックスやオプション市場の整備も必要だ。また、証券市場は公正で秩序ある価格形成に寄与しなければならない。この点で流動性を確保できるマーケット・メーカーシステム幅広い活用と不健全企業の退出ルールの明確化が求められる。ベンチャー市場は本質的にリスクで極めて専門家向きの市場であるので、投資家教育を強化することも考慮しなければならない。投資家の中には専門的な知識もなく、投機的な目的のためだけに株式売買をする人もいるからである。一方、ベンチャー企業を支援するVCの役割も強化する必要がある。東アジア諸国のVCは従来ハンズオンをあまり行っていないが、近年投資先企業をハンズオンで支援するVCも見られる。しかし、公開企業を増加させるためにはVCのハンズオンによってベンチャー企業の成長を加速させることが求められる。同時にベンチャーキャピタリストの企業育成能力の向上も必要だ。VCはファイナンスの観点からベンチャー企業を見るのが多く、企業分析はするものの企業育成力は不十分である。シリコンバレーを見れば企業の支援者としてのVCの役割が理解できよう。

部科校名: グローバルビジネス研究科

氏名: 水野 満

研究の結果 (つづき)

6. Catalist は東アジアのベンチャー市場モデルになれるか

東アジアのベンチャー市場は各国・地域の経済・産業・金融の実情を勘案しながら、設立・形成されてきたことから、ベンチャー市場の上場要件、情報開示やコーポレートガバナンスには差異が見られる。従って、東アジアでベンチャー市場のモデルはまだ存在していない。しかしながら、東アジアでも市場間競争の兆しが見られ、その中で東アジアのベンチャー市場のモデルが出現するかもしれない。シンガポールの Catalist 市場の創設は地域市場を目指したものだといえるが、果たして Catalist は東アジアのベンチャー市場のモデルになることができるだろうか。Catalist はヨーロッパで最も成功しているロンドン証券取引所が運営する AIM をモデルとして作られたもので、上場基準は最低株主数が 200 人のみで、アジア諸国の中では最も基準の緩い市場である。その上、上場までの期間とコストを短縮するとともに、増資や企業買収などで企業の自由度を高めた。Catalist ではスポンサーが企業の審査に全責任を負い、シンガポール証券取引所がスポンサーを監督する体制とした。スポンサーは取引所による厳重な審査によって決定され、ベンチャー企業はその中からスポンサーを選択する。スポンサーは 3 年間、責任をもってその役割を果たさなければならない。もし、十分に役割を果たさない場合には刑罰の対象となる。また、Sesdaq の場合は証券取引所が上場審査を行っていたが、上場幹事会社 (投資銀行他) は上場後 2 年間だけ企業の後見をする必要であったが、Catalist では上場している間はスポンサーが必要となった。従って、Sesdaq に既に上場している企業は経過措置期間の 2 年間のうちにスポンサーを見つけなければ上場廃止となる。

従来、東アジア諸国では投資家の自己責任が重視される AIM のような市場は文化的にもなじまないという風潮があったが、シンガポールで思い切って AIM 同様の市場を創設した理由は何か。シンガポールが Catalist を創設したのは単にシンガポールだけでなくアジア地域の有望な中小・ベンチャー企業、とりわけ中国とインドの企業を引き付け、地域のベンチャー市場の拠点とする意図があったからである。外国のベンチャー企業が Catalist に上場を考える要因としては、資金調達のほか、市場でのプレゼンス、自国市場よりも高いバリュエーションや流動性が期待できることなどがあげられる。Catalist の創設は、シンガポールの資本市場としての厚みを増すとともに新たなビジネス展開を、シンガポールをハブとして促進させたい狙いもある。Catalist はいまのところ市場関係者からは概ね、歓迎されているが、成功するかどうかは明らかでない。成功の条件としては質の高いスポンサーが任命されること、スポンサーが的確に審査・モニタリングを行うこと、アジア地域の中小・ベンチャー企業が Catalist に関心をもつことがあげられる。アジアで AIM に類似した野心的なベンチャー市場が成功するかどうかは今後のアジア諸国におけるベンチャー市場の改革に大きな影響を与えることとなる。

8. おわりに

東アジア諸国・地域のベンチャー市場は各国・地域の将来を見据えた産業構造の高度化と競争力の強化を視野に入れて誕生し、発展してきた。ベンチャー市場の動向を概観すると各国・地域の新しい産業の方向性やベンチャー支援政策が窺える。東アジア諸国・地域の起業環境は先進諸国と比べ、いまだ十分整備されているとは言いがたく、更に整備を進めていく必要がある。起業家精神が活発に涵養されベンチャーインフラが整備されれば東アジア地域から有望なベンチャー企業が輩出できる。上場基準も各国・地域により異なっており、東アジア地域に適用できるベンチャー市場モデルを構想するのは時期尚早であろう。

部科校名: グローバルビジネス研究科

氏名: 水野 満

研究の結果 (つづき)

この中で、シンガポールの Catalist の創設が注目される。この動きは東アジア地域でのベンチャー市場間競争時代の幕開けとも考えられる。東アジア地域でのベンチャー市場の核を目指しているのはシンガポールの Catalist のほか、香港の GEM や日本のマザーズがあげられる。わが国でも、成長戦略の柱の一つとして新興市場の抜本的改革が「金融・資本市場の競争力強化プラン」の中で謳われている。金融・資本市場の活性化、国際競争力の強化を図っていく観点から、プロの投資者については、一般投資者と区別した上で、自己責任に立脚した、より自由度の高い取引を可能としていくことが求められている。東京証券取引所はロンドン取引所が運営する AIM のノウハウを取り入れて「プロ向けの市場」を創設する意向である。「プロ向けの市場」ではアジアなどの外国の企業は日本語での情報開示と四半期開示が免除される予定で、こうしたアジア企業などを取り込むことで市場の活性化を狙っている。東アジア地域でのベンチャー市場間競争に勝ち残れるかはアジアの有望な企業をいかに発掘し、投資家を引き付けられるかにかかっているといえよう。

参考文献

- 金宗年 (2006) 「道のり遠い韓国店頭市場コスダック」、サムソン経済研究所、2006年6月 第559号。
 金融庁 (2007) 「金融・資本市場の競争力強化プラン」2007年12月、
<http://www.fsa.go.jp/policy/competitiveness/01.pdf>
 水野 満 (2006) 「新興市場は期待した役割を果たしたか」、証券経済学会年報第42号、2007年7月
 山内 徹 (2005) 「シンガポールの産業技術開発政策の動向」、2005年9月、No.474、ジェトロ・シンガポール・センター
 Arcot, S., Black, J. and Owen, G., (2007) "From local to global: the rise of AIM as a stock market for growing companies", Report commissioned by London Stock Exchange from The London School of Economics and Political Science
 GEM の HP : <http://www.hkgem.com>
 Grant Thornton (2007) "2007 World Growth Markets Guide, Grant Thornton", Grant Thornton
 Hong Kong Exchange and Clearing (2006), *Discussion Paper on the Growth Enterprise Marke*, Hong Kong: Hong Kong Exchange and Clearing
 Kosdaq の HP : <http://www.kosdaq.or.kr>
 MAI の HP : <http://www.set.or.th>
 Mesdaq の HP : <http://www.bursamalaysia.com>
 Sesdaq と Catalist の HP : <http://www.sgx.com>
 SME Board の HP : <http://www.pse.com.ph>
 World Federation of Exchanges (2002-2007), "Annual Report", World Federation of Exchanges

注：課題番号を記入してください。

平成19年度 学術研究助成金実績報告書

平成 20年 5月 20日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 松岡 直美



所属・資格 総合社会情報研究科・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/ <input checked="" type="radio"/> 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	アメリカにおける村上春樹の受容	
3 研究の目的	これまでの日米比較文化・文学研究においては、日本におけるアメリカ文化・文学の受容、とりわけ、日本の作家に及ぼしたアメリカ文学の影響研究が中心であった。しかし、近年、村上春樹の文学がアメリカ文化シーンに、ごく自然に受け入れられ、その一部ともなっている状況がある。本研究は、こうしたアメリカにおける村上春樹受容の検証を目的とする。とかく文化グローバリゼーションとはアメリカニゼーションと看做されがちだが、敢えて日本からの関与を具体的に提示することで post-national、trans-national な現代文化の状況を改めて認識することに意義がある。	
4 研究の概要	日本の「文壇」からは距離を置く村上春樹だが、米国有数の文芸誌 <i>New Yorker</i> 誌の常連作家として多くの短編を発表し、米国「文壇」に受容されている。この状況を分析し、アメリカ比較文学学会2008年度大会（本年4月）において報告した。一方、長編小説については、ロシア・フォルマリズムを代表するバフチンの「対話性」の観点から、村上春樹の「二重」小説における対話構造の分析と考察を試みたが、これは現代アメリカ文学との共時性を確認する作業でもある。後者の成果は日本アジア研究学会（本年6月）において報告の予定である。	
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 ・研究分担者（役割分担） 	

※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：総合社会情報研究科

氏名：松岡 直美

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。)

『ニューヨーカー』誌常連作家としての村上春樹」にフォーカスした考察から、村上の短編が現代社会と現代人の状況および心理風景を観想するものであることが確認できた。アメリカの主要文芸誌である *New Yorker* には既に20篇を超える短編が掲載され、これは外国人作家としてだけでなく、アメリカ作家にも例を見ない破格の扱いである。掲載された短編のテーマは、次の3つに大別できる。1) 都市生活者の不条理感 (=後期資本主義社会における個人の疎外感)、2) 戦争の記憶と語り (=修正主義的歴史観)、3) 大地震や同時多発テロ後の世界と人間 (=近代の一つの到達点として)。このような human condition は、日本だけでなく、現代アメリカ、さらには世界の多くの地域に共通する今日的普遍性であり、これが、村上文学が広く受け入れられる理由であると考えられる。

長編小説については、その「二重性」について研究を進めた結果、バフチンの主張した小説の本質としての「対話性」が確認できた。初期作品を含め、村上の長編小説の多くは二つの声で語られ、二つの部分によって構成され、或いは二つの物語から織り上げられている。その顕著な例が『世界の終わり』と『ハードボイルド・ワンダーランド』と『海辺のカフカ』である。前者については二つの世界が章ごとに交互に展開している。後者では、カフカ少年と中田老人の二つの物語が交錯する。それぞれ独立した世界であり、物語ではあるのだが、同時に複雑かつ緊密な関係が維持されている。平行して進むかと思えば、交差、合流し、または、通じ合い、響きあう。しかし、最終的な合致や統合はない。そこにあるのはバフチンの言う「対話性」であって、読者の読みのための余地が確保されているということになる。すなわち、読者とテキストとの相互作用によるポストモダン・ゲームが成立していると言える。こうした小説の本質、小説というジャンルにのみ可能な本来の力を十分に備え、主体性確保という現代人の欲求を満たすものであることも村上文学が現代世界に広く受け入れられる要因であると考えられる。

村上春樹はその文学修行にあたり、フィッツジェラルドやサリンジャー、ヴォネガットらアメリカ現代文学に多くを学び、川端康成や谷崎潤一郎、また三島由紀夫や大江健三郎ら、先行世代の日本文学を新たな方向、ポストモダン・ゲームの文学へと押し進めてきた。さらに、アメリカ現代文学を多く翻訳してきた経験から、自らの作品の英語訳に関しても寛容で、優れた翻訳者 (Alfred Birnbaum, Jay Rubin, Philip Gabriel) に翻訳の自立性・創造性を認め、結果、広く英語圏に自らの文学を発信し続けてきた。まさに日本とアメリカという二つの文化の媒体者であり、その意味において今日的「世界文学」の担い手であることが今回の短編、長編、それぞれに焦点を絞った研究から明らかとなった。

尚、今回の研究成果については下記の要領で報告を行い、また、その準備を進めている。

①アメリカ比較文学会2008年度大会

(カリフォルニア、ロングビーチ、2008年4月24日-27日)

ワークショップ: World Writers and Local Place

研究発表題目: Haruki Murakami as a *New Yorker* Writer

②日本アジア研究学会2008年度大会 (東京、立教大学、2008年6月21日、22日)

研究発表題目: Dialogic Structure in Haruki Murakami's "Double" Novels