

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 16 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 成 田 貴 則



所属・資格 松戸歯学部・助教

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	唾液腺の水分泌におけるアクアポリン6の役割	
3 研究目的	この研究は、AQP6が水分泌に関与していることを明らかにするために灌流唾液腺を用いたAQP6の機能阻害実験および過剰発現実験を行い水分泌に与える影響の解析を行う。	
4 研究概要	唾液腺の中でも特に水分泌の多い顎下腺を用いて実験を行う。具体的には、マウスおよびラット顎下腺の体外人工灌流システムを用いてsiRNAによるAQP6の機能阻害（ノックダウン）実験および強制発現実験を行い、水分泌の変化を観察する。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 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：成田 貴 則

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

細胞内 AQP6 の機能阻害のためにマウス AQP6 に対する shRNA 配列をもつ組換えアデノウイルスの構築を行った。それぞれ、pAdBlock-U6-mAQP6-196、pAdBlock-U6-mAQP6-266、pAdBlock-U6-mAQP6-601 の 3 種類を構築した。また、ネガティブコントロールとしてスクランブル配列をもつ pAdBlock-U6-mAQP6-ND も作製した。HEK293 細胞を用いて全てのコンストラクトの組換えアデノウイルス粒子を得ることに成功した。

深麻酔下のマウスの頬部を切開し、耳下腺へ直接 AQP6 ノックダウンウイルスおよび eGFP 発現アデノウイルス（pAdTrack-CMV-eGFP）の共感染実験を行った。その結果、多くの細胞で強い GFP 蛍光が見られ、良好に組換えウイルスが感染していることが確認された（下図）。

現在、AQP6 のノックダウン効率を判定するためにウエスタンブロッティングを行っている。AQP6 タンパク質の有意な減少が見られた場合、灌流実験へ移行する予定である。

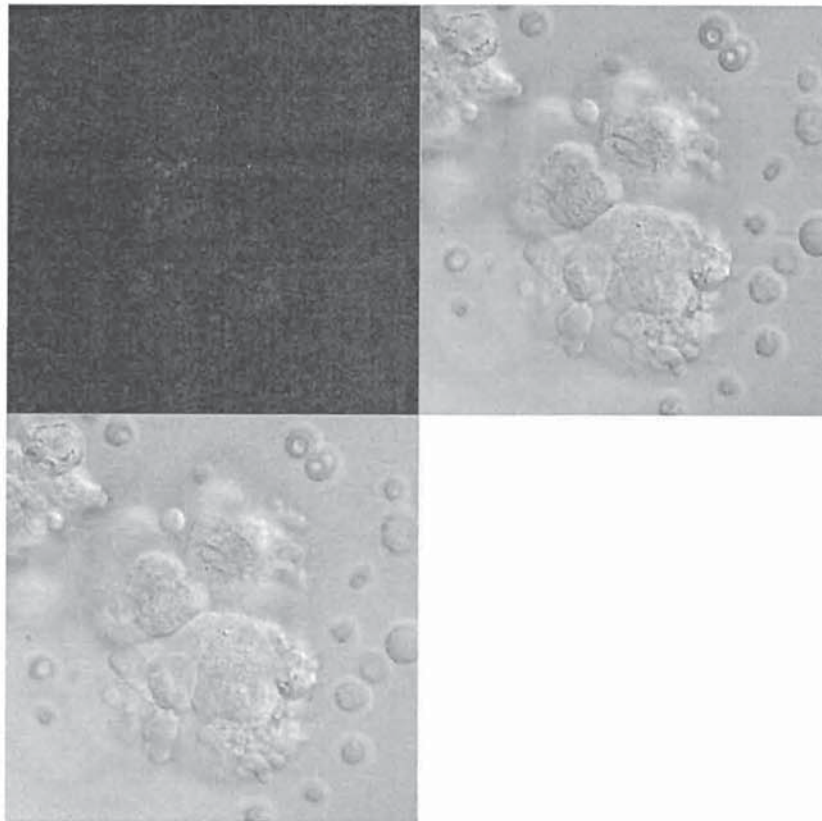


図 pAdBlock-U6-mAQP6-266 および pAdTrack-CMV-eGFP を共感染させたマウス耳下腺細胞の GFP 蛍光（左上）、透過像（右上）、重ね合わせ画像（左下）

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 5 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 橋 爪 智 美



所属・資格 松戸歯学部・助手

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	組換え型 <i>Salmonella</i> に対する腸管の抗原特異的 IgA 免疫応答誘導機序の解明	
3 研究目的	う蝕や歯周病といった口腔感染症を予防する上で経口投与型ワクチンは有効な手段であり、その開発のために腸管の IgA 免疫応答誘導システムを解明することは非常に重要である。特に組換え型 <i>Salmonella</i> に対する腸管の抗原特異的分泌型 IgA 抗体応答誘導には、パイエル板の存在が不可欠である事を筆者らは報告している。また、イタリアの研究グループによってもほぼ同時期に報告された。本研究では、さらに組換え型 <i>Salmonella</i> に対する腸管 IgA 抗体誘導機序の解析を、パイエル板を含めた腸管関連リンパ組織において、細胞学的、分子学的レベルで行う。	
4 研究概要	腸管関連リンパ組織に所属している樹状細胞が、組換え型 <i>Salmonella</i> に対する抗原特異的腸管 IgA 抗体応答誘導にどう関与しているのか、パイエル板欠損マウスを作製して、野生型マウスと <i>Salmonella</i> 免疫後の樹状細胞サブセットを比較解析する。また、 <i>Salmonella</i> 免疫後の IgA クラススイッチはパイエル板欠損マウスで正常であるのか検討する。	
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：橋 爪 智 美

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

これまでの報告で (Hashizume et al., Infect. Immun.), 経口投与された組換え型 *Salmonella* に対する抗原特異的腸管粘膜 IgA 抗体応答の誘導にはパイエル板の存在が不可欠であることが示されている。本研究ではさらに、抗体特異的 IgA 抗体がどう誘導されているかについて解析を加えた。第一に、樹状細胞に着目し解析を加えた。現在知られている樹状細胞のサブセットには、大きく分けて CD11c^{high}CD11b^{high}CD8α^{low}、CD11c^{high}CD11b^{low}CD8α^{high}、CD11c^{high}CD11b^{low}CD8α^{low}、CD11c^{int}B220^{high} の4つのサブセットが知られている。これらサブセットの組換え型 *Salmonella* 免疫後の腸管における局在についてパイエル板欠損マウスと野生型マウスを比較することにより検討した。まず、パイエル板が欠損していると抗原特異的な粘膜免疫が誘導されないという事実から、パイエル板の中に局在している樹状細胞サブセットが抗原特異的 IgA 抗体応答誘導に関与しており、*Salmonella* 抗原を捕捉後所属リンパ節である腸管膜リンパ節に移動し、腸管膜リンパ節において抗原提示が起こっているのではないか、という第一の仮説を立てた。この仮説を元に、パイエル板欠損マウスと野生型マウスに組換え型 *Salmonella* を経口投与した後の腸管膜リンパ節、パイエル板、脾臓、小腸の粘膜固有層における各樹状細胞サブセットの解析を行った。その結果、CD11c^{high}CD11b^{high}CD8α^{low}、CD11c^{high}CD11b^{low}CD8α^{high}、CD11c^{high}CD11b^{low}CD8α^{low}、CD11c^{int}B220^{high} 全て、パイエル板欠損マウスと野生型マウスの腸管膜リンパ節、脾臓に差は認められなかった。パイエル板欠損マウスの粘膜固有層における CD11c^{high}CD11b^{high}CD8α^{low}、CD11c^{high}CD11b^{low}CD8α^{high}、CD11c^{int}B220^{high} は増加が認められた。さらに、CD11c^{high}CD8α^{int} はパイエル板欠損マウスで有意に増加した。パイエル板が欠損している状況では、パイエル板に代わって孤立リンパ小節が働きを強めることが知られている。よって、CD11c^{high}CD8α^{int} は孤立リンパ小節由来である可能性が高い。この点に関しては、今後より詳細な検討が必要である。以上の結果から、腸管の所属リンパ節である腸管膜リンパ節における各樹状細胞のサブセットはパイエル板を欠損していても変化しないことが示された。このことは、第一の仮説には合致しなかった。そこで我々は、経口投与された組換え型 *Salmonella* 抗原はパイエル板内で捕捉され抗原提示、T 細胞、B 細胞の活性化がパイエル板の中で完了した場合に腸管の抗原特異的分泌型 IgA 抗体応答が誘導されるのではないか、という第二の仮説を立てた。この仮説を検討するためにリンパ球の遊走を制御する FTY720 を *Salmonella* 免疫中にマウスに投与し続け、抗原特異的な IgA 抗体応答を解析した。FTY720 を投与したマウスでは、パイエル板から腸管膜リンパ節などへのリンパ球の輸送が制御される。FTY720 投与マウスにおいて、組換え型 *Salmonella* に対する抗原特異的 IgA 産生細胞はパイエル板に残り、腸間膜リンパ節、粘膜固有層、脾臓ではモック投与マウスと比較して有意に減少した。また、FTY720 投与マウスでは抗原特異的腸管 IgA 抗体の産生レベルが有意に減少した。これらの結果から、腸管粘膜免疫応答誘導では腸間膜リンパ節における抗原提示は重要ではなく、パイエル板内で *Salmonella* に対する抗原特異的 IgA 抗体応答誘導が成立していることが分かった。

次に、パイエル板欠損マウスにおいて全 IgM から IgA へのクラススイッチが正常に起こっているのかについて脾臓、腸管膜リンパ節、パイエル板、粘膜固有層から totalRNA を抽出し、activation-induced cytidine deaminase、I μ -C α transcripts、I α -C μ circle transcripts の発現を検討した。その結果、パイエル板欠損マウスと野生型マウスにおいて、脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板、粘膜固有層における3種類の遺伝子の発現に差が認められなかった。パイエル板を欠損していても全 IgA へのクラススイッチは正常に行われていることが分かった。

以上の結果より、本研究では、パイエル板欠損マウスにおいても IgA へのクラススイッチは正常に行われていることが判明し、経口投与された組換え型 *Salmonella* に対する、抗原特異的免疫応答はパイエル板の中で抗原提示が完了していることが必要である可能性が示唆された。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 10 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 山 本 仁



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	ラット横口蓋ヒダ発生過程に出現する細胞群に関する研究、特にメルケル細胞との関係	
3 研究目的	マウス横口蓋ヒダ形成時に、横口蓋ヒダ形成領域以外の口蓋粘膜と異なる細胞骨格蛋白をもつ細胞群が一過性に出現する。横口蓋ヒダには神経線維が豊富に分布し、またこの細胞群は神経線維と結合するメルケル細胞と同じ細胞骨格蛋白をもつことから、この細胞群がメルケル細胞の前駆細胞である可能性が考えられる。そこでこの細胞群とメルケル細胞について神経誘導の観点から関係を明らかにすることを目的とする。	
4 研究概要	胎生12日から胎生15日のマウス胎仔を用いた。横口蓋ヒダ形成領域の口蓋粘膜について、粘膜表面の形状、細胞分裂の状況や細胞死を観察するために走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、p63 抗体による免疫組織化学と TUNEL 法を行った。また神経誘導の状況を観察するために PGP9.5 抗体による免疫組織化学、AM1-43 tracing 法および urea silver nitrate 染色を行った。また横口蓋ヒダ形成に関わる遺伝子に関しては、胎生期の諸器官の発生に関わっている <i>Shh</i> の発現について in situ hybridization 法で観察を行った。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・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：山本 仁

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

【口蓋粘膜の形状、細胞分裂と細胞死について】

SEM観察では、胎生12日の外側口蓋突起の表面は平滑であり、突起状の構造は全く観察されなかった。胎生13日の外側口蓋突起の前方部にわずかにスジ状の隆起が観察された。胎生14日では口蓋前方部の横口蓋ヒダは明瞭に観察された。口蓋中央部では辺縁部に横口蓋ヒダが観察されたが、正中部まで横口蓋ヒダが連続している像は観察されなかった。胎生15日になると成獣と同じように、前方から後方にかけて8-9条の横口蓋ヒダが辺縁部から正中部まで存在した。組織切片ではSEM観察と同様に胎生12日の口蓋には横口蓋ヒダの形成開始を示す上皮の肥厚が観察されなかったが、胎生13日から横口蓋ヒダ形成領域に上皮の肥厚が観察された。上皮は肥厚して間もなくは表層から基底層のすべての細胞がp63抗体に免疫陽性反応を示したが、この後には肥厚した上皮の中央部の細胞群のみがp63抗体に対して免疫陽性反応を示さなくなった。これをサイトケラチン(CK)の分布状況と比較すると、p63抗体陽性細胞はCK14陽性を示したが、これらの細胞がp63抗体に陽性反応を示さなくなるとCK14抗体に関しても免疫反応が陰性となり、変わってCK18抗体に陽性を示すようになった。TUNEL法では胎生15日の横口蓋ヒダ形成領域の細胞群に陽性反応を示す細胞が観察されたことから、この細胞群の一部はapoptosisによる細胞死を起こしていることが示された。

【神経誘導状況について】

PGP9.5抗体による免疫組織化学とurea silver nitrate染色では、胎生12日の横口蓋ヒダ形成領域部の結合組織には陽性反応がほとんど観察されなかったが、胎生14日から横口蓋ヒダ形成領域の肥厚した上皮下に陽性反応が観察された。特にurea silver nitrate染色では肥厚した上皮の中央部の細胞群に神経線維が侵入する様子が観察された。AM1-43 tracing法は、AM1-43が胎盤を通過しないことからin utero injection法により胎仔に投与した。すなわち妊娠マウスに麻酔を施し、胎盤につながったままの胎仔を羊膜に包まれた状態で腹腔から外部に出し、胎仔の背側よりAM1-43を注射した。AM1-43投与後、羊膜に包まれた胎仔を胎盤につながった状態で腹腔内に戻し、24時間後に母体を屠殺し胎仔を摘出した。胎生12日(胎生11日投与、24時間後屠殺)ではAM1-43が口蓋に取り込まれている像は観察されなかった。胎生14日(胎生13日投与、24時間後屠殺)では口蓋前方部の横口蓋ヒダにAM1-43が取り込まれていた。この試料をパラフィン切片にしてPGP9.5抗体による免疫組織化学を行ったところ、AM1-43が神経線維(PGP9.5抗体陽性構造)に取り込まれているのが確認された。胎生15日(胎生14日投与、24時間後屠殺)では胎生14日より強い反応がこの時期に存在するすべての横口蓋ヒダ部に観察された。

【遺伝子発現について】

*Shh*の発現をwhole mount in situ hybridization法により検出した。その結果胎生12日の横口蓋ヒダがヒダ状(スジ状)の構造を示さず、外側口蓋突起の表層が平坦な状態(上皮が肥厚していない状態)においても将来の横口蓋ヒダ形成領域部に*Shh*が検出された。横口蓋ヒダ形成領域の*Shh*の発現は胎生15日まで続いた。

【まとめ】

*Shh*は細胞分裂を惹起して横口蓋ヒダ形成領域の上皮の肥厚に関わると共に、この部の細胞の一部にCK18を発現させるようになる。CK18を発現した細胞は何らかのシグナルを結合組織に発信し、横口蓋ヒダ部に神経の誘導を行う。神経誘導が始まるとこの細胞群の一部はapoptosisにより死滅し、上皮は他の領域と同じ厚さになる。Merkel細胞はCK18陽性であり、かつ神経線維と結合するのを特徴とするので、Merkel細胞がCK18陽性を示し、神経誘導を行う過程は横口蓋ヒダ形成過程と類似していると考えることができた。また成獣ではMerkel細胞が横口蓋ヒダの基部に多く存在していることから、横口蓋ヒダ形成過程に一過性に出現した細胞群の一部が基部に移動してMerkel細胞に分化した可能性が示唆された。

本研究費による実験の遂行により、研究目的のかなりの部分が明らかにされたが、未だ不明な点を残しており、今後の研究によりそれらの事項を明らかにしていきたい。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 23 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 橋 爪 英 城



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	培養ヒト歯髄細胞におけるプロテアーゼ受容体の発現と歯髄炎との関係	
3 研究目的	申請者は本研究において、様々なプロテアーゼによって活性化を受ける細胞膜表面に存在するプロテアーゼ受容体 (Protease-activated receptor : PARs)の役割について培養ヒト歯髄細胞(HDP)を用いて研究を進める。PARs は生体内に広く分布しており、種々の生理学的・病態生理学的役割を担っていることから、新しい治療のターゲット分子になり得ると考えられ、PARs に対する選択的なアゴニストやアンタゴニストの開発は、様々な臨床応用への可能性を秘めている。	
4 研究概要	本研究課題において以下のことを行う。 1. Characterizationを行う。(1) PARの同定 (2) Western-blotting (3) RT-PCR 2. HDPにおけるPARs の活性化調節機能を明らかにする。 (1) 細胞内Ca ²⁺ の動態を指標にしたPARの機能：1) PARアゴニストの効果 2) PARインヒビターの効果 (2) PARの変動：早い反応性を示す起炎物質と合成を介した遅い反応を示す炎症性サイトカインの効果 1) リアルタイム PCR 2) Western-blotting 3) Ca ²⁺ 動態 で測定する。	
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 ・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：橋爪英城

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究ではヒト歯髄細胞（HDP）におけるプロテアーゼレセプター（PARs）の生理的・病態生理学的役割を明らかにすることである。本年度は以下の研究を行いそれぞれ有意義な結果を得ることができた。

- 1) **HDPにおけるPARsのCharacterization**：RT-PCR法によってHDPにおける各種PARs (PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4)のmRNAの発現を確認した。その結果、PAR-1, 2, 4の発現が認められたが、PAR-3は発現していなかった。またPAR-1の発現が最も顕著で、PAR-2, 4はわずかであった。
- 2) **HDPにおけるPARsの活性化調節機能**：次にHDPにおけるPARsの活性化調節機能を明らかにするために各種PARsアゴニストによるCa²⁺の動態を確認した。その結果PAR-1アゴニストのSFLLRN (100 μM) 刺激で明らかに細胞内Ca²⁺が上昇したが、PAR-2, 3, 4アゴニストのSLIGKV (100 μM)、TFRGAP (100 μM)、GYPGQV (100 μM)は影響を示さなかった。
- 3) **PAR-1アンタゴニストがCa²⁺の動態に及ぼす影響**：PAR-1アンタゴニストであるSCH79797 (20 μM)をあらかじめHDPに作用させたところ、SFLLRNによる細胞内Ca²⁺の上昇は抑制された。

以上の結果からHDP内における活性化調節機能にはPAR-1が重要な役割を担っていることが示唆された。

また断髄後や窩洞形成後のラット歯髄においてmatrix metalloproteinase(MMP)-3発現が亢進することが知られている。MMP-3はstromelysin-1とも呼ばれ、創傷治癒への関与、bFGFの放出など、従来考えられていたタンパク質分解の他にも多彩な機能を有することが報告されており、覆髄材や歯髄炎治療薬としての応用が期待できる。一方、connective tissue growth factor(CTGF/CCN2)は、CCNファミリーに属する38~40 kDaの分泌タンパク質で、内軟骨性骨化、血管新生、線維芽細胞の遊走などに関与することが明らかになっている。さらに、MMP-3が核内に移行して直接CTGF/CCN2遺伝子の発現を調節するとの報告もあり、組織治癒の場面でMMP-3とCTGF/CCN2の両者が作用することが想定される。

そこでヒト歯髄培養細胞におけるMMP-3刺激によるCTGF/CCN2 mRNA発現およびタンパク質産生について検討した。その結果、ヒト歯髄培養細胞において、MMP-3(100 ng/ml)刺激で時間依存的にCTGF/CCN2 mRNAの発現増加を認め、刺激30分後でCTGF/CCN2 mRNA発現が最大となった。また、MMP-3(100 ng/ml)刺激で時間依存的にCTGF/CCN2タンパク質の分泌量増加を認め、刺激1時間後でCTGF/CCN2産生が最大となった。

以上の結果より、ヒト歯髄培養細胞においてMMP-3はCTGF/CCN2の発現および分泌を促進しており、歯髄炎により誘導されたMMP-3が、CTGF/CCN2を介して歯髄の創傷治癒を促している可能性が考えられた。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 23 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 木本 統

印

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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	上顎義歯装着が歯床下粘膜の知覚神経機能におよぼす影響を探る	
3 研究目的	上顎片側遊離端欠損 (Kennedy Class II) の義歯装着者、未装着者を被験者とし、欠損側と歯列側の大口蓋孔部における電流知覚閾値を比較することで、上顎粘膜に分枝する知覚神経への義歯装着の影響を明らかにする。	
4 研究概要	上顎片側遊離端欠損 (Kennedy Class II) の有歯顎者を被験者として、Neurometer® NS3000 (Neurotron社製、米国) を用い欠損側大口蓋神経支配領域の大口蓋孔相当部粘膜および歯列側大口蓋神経支配領域の大口蓋孔相当部粘膜においてAβ線維、Aδ線維、C線維線維の電流知覚閾値を測定し、義歯装着者群と義歯未装着者群間で知覚閾値の比較検討を行う。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・研究分担者 (役割分担) 	

部科校名：松戸歯学部

氏名：木本 統

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

現在までのところ、上顎片側遊離端欠損で義歯を装着する被験者（義歯装着者群）14名、義歯を装着していない患者（義歯未装着者群）11名の測定が終了した。

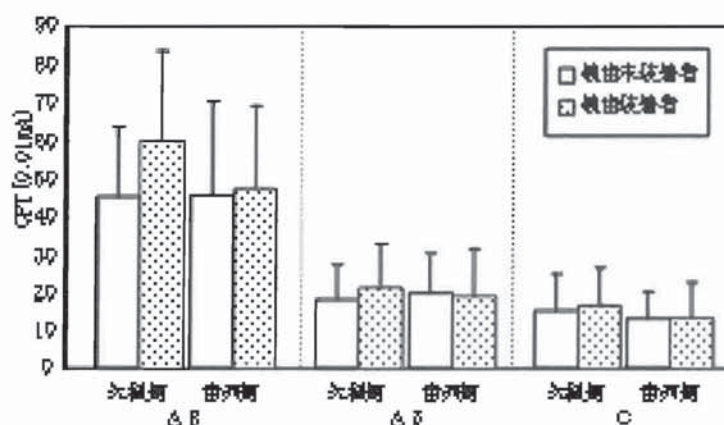
被験者の両群における背景因子を表に示す。観察項目である年齢、BMI、大口蓋孔部の粘膜厚さ、口腔内水分量の全てにおいて両群間に統計的有意差は認められなかった。

被験者の背景因子

	義歯未装着群 (n=11)	義歯装着群 (n=14)
年齢(歳)	60.5(11.6)	66.8(6.2)
BMI	24.0(3.2)	23.8(3.0)
睡眠時間(時間)	6.4(0.6)	6.4(1.2)
歯列側大口蓋孔部粘膜厚さ(mm)	3.0(1.3)	2.7(1.1)
欠損側大口蓋孔部粘膜厚さ(mm)	2.0(1.3)	3.1(1.7)
口腔水分量(%)	13.5(5.8)	17.0(9.8)

図に義歯装着者と未装着者の大口蓋孔部の CPT を示す。義歯装着者において、欠損側 Aβ-CPT が未装着者に比べ高くなる傾向が認められた (p=0.065, 95% CI: -41.8-1.4)。しかしながら、欠損側 Aδ (p=0.56, 95% CI: -16.2-9.0) および欠損側 C 線維 (p=0.79, 95% CI: -10.3-13.3) に、その傾向は認められず、義歯の使用は触覚を司る感覚線維のみに影響する可能性が示唆された。本研究では口腔外の三叉神経第2枝の支配領域領域である眼窩点部にも測定点を設け、これをコントロールとしたが、この領域には明らかに義歯の影響が及ばないため、義歯装着者と未装着者の CPT 値に差は認められなかった。

今後の本研究の展望を考え、本研究に必要なサンプルサイズを算定したところ、義歯装着者と未装着者の必要被験者数は各 33 名総数 66 名となった。今後は、必要サンプルサイズに達するまで、被験者を追加して行く予定である。



義歯装着者・未装着者の大口蓋孔部CPT

本研究の内容をもとに、日本補綴歯科学会第119回学術大会（2010年6月11日～13日）にて発表を行う予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 5 日

日本大学 総長 殿

氏 名 中 田 浩 史



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	インプラント周囲における新生骨の形成およびモデリングに関与するミネラル成分の研究	
3 研究目的	インプラントは今もっとも注目を浴びている研究分野であり盛んに研究が行われている。しかし、インプラントを支える新生骨そのものの分析報告は少なく、その性状や代謝、咬合力に対する反応などいまだ完全な回答が得られていない。そこで本研究は、未だ解明されていないインプラント周囲に形成される新生骨の骨質およびモデリングに関与するミネラル成分の観察することを目的とし、XPS と顕微 FTIR イメージング装置にて分析を行った。	
4 研究概要	本研究は、従来見過ごされてきた新生骨の形成およびモデリングに関与するミネラル成分に関する骨質評価を目的に、XPS、と顕微 FTIR イメージング装置を用いて骨組織の分析を行った。その結果、いずれの手法においても、新生骨と既存骨で骨塩量およびミネラルの配分において新生骨の形成順序の違いが明らかになった。さらに、インプラント埋入後 4 週と 8 週の新生骨の間においてミネラル成分に差異があることが認められた。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 研究分担者（役割分担） 	

※ホームページ等での公開の 可・否 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：中 田 浩 史

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本学術研究助成における結果を以下に記す。

1. XPS 分析： インプラント埋入後 4 週でインプラント周囲に形成された新生骨の XPS 分析は O1s, Ca2p, および P2p は皮質骨に比べ新生骨のピークが高エネルギー側にシフトし、半値幅が大きくなった。C1s では、皮質骨に比べ新生骨の半値幅が大きくなった。これらの各元素において、4 週の新骨は皮質骨と異なる結合状態であることが観察された。8 週では、O1s, C1s, および P2p は新生骨と皮質骨でピークと半値幅が一致した。Ca2p は、皮質骨に比べ新生骨の半値幅がわずかに小さくなった。8 週の新骨は皮質骨に近い結合状態であり、4 週の新骨とは異なる結合状態であることが観察された。Ca と P における定量分析の結果を比較すると、新生骨の Ca は 4 週：18.4 wt %で 8 週：19.4 wt %となり増加を示し、P は 4 週：9.7 wt %で 8 週：10.1 wt %となり増加を示し、皮質骨に近づく結果となった。2. 顕微 FTIR イメージング分析： インプラント埋入後、周囲に形成された新生骨と皮質骨の境界部で、新生骨の石灰化は皮質骨に接する部位から PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , および Amide I の分布量が高くなり、4 週から 8 週にかけて経時的な石灰化が観察された。

皮質骨から離れた新生骨において、 PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , および Amide I は経時的に分布量が高くなるが、皮質骨に接する部位と比較すると分布量は低かった。偏光顕微鏡において、4 週の新骨は未成熟な線維性骨であることを観察した。8 週の新骨は皮質骨と平行して数層の縦走層板、つまり第 1 次 Havers 層板と管状構造を観察し、皮質骨との境界が不明瞭であった。

新生骨の石灰化は皮質骨に接する部位から PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , および Amide I の分布量が高くなり、4 週から 8 週にかけて経時的な石灰化が観察された。皮質骨から離れた新生骨において、 PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , および Amide I は経時的に分布量が高くなるが、皮質骨に接する部位と比較すると分布量は低かった。8 週の偏光顕微鏡観察において、皮質骨から伸展する新生骨は Havers 管の観察より、微細血管構築が起こり、石灰化の進行が考えられた。そこで新生骨の石灰化は皮質骨に接する部位から微細血管構築により、4 週から 8 週において XPS で Ca と P の経時的な上昇や、顕微 FTIR イメージング分析で PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , および Amide I の分布量が高くなり、石灰化に関わる骨質変化が明らかとなった。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 5 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 増 永 浩



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	歯周治療後の患者管理の指標を決定するための免疫学および細菌学的研究	
3 研究目的	歯周治療のゴールはメンテナンス期に患者を治癒させることであるが、メンテナンス期の患者で常に再発のリスクが伴うことも事実である。近年、再生治療が一般化しており歯周治療の効果は向上している。しかしこのことにより重症化した歯が保存可能となり、メンテナンス期における再発率をあげる結果になっていることも考えられる。本研究の目的はこのメンテナンス期の再発の防止に焦点をあて、症状が悪化する前に変動する因子を検索することにある。歯周病局所における免疫応答について歯周病原細菌とIgAを中心とした粘膜応答に注目することにより解明する。	
4 研究概要	本研究では、歯周治療を行った後のリコール間隔を決定する際の指標となる細菌の動態と口腔内局所の免疫応答について検索する。特に臨床において応用可能にするため、従来からの報告を参考に特定の菌種について測定し、その結果を複合的に考えることにより、客観的な判定を行うことを可能とするようなシステムの構築を目標とする。研究期間内に歯周病との関連性が深いとされている黒色色素産性 <i>Bacteroides</i> 群と <i>Peptostreptococcus micros</i> 、 <i>Streptococcus intermedius</i> を中心として慢性歯周炎の臨床像との比較を経時的に行うことにより、患者の臨床的な病態を反映する細菌について検討を行う。また再発のリスクが高いと予想される細菌についてはIgAを中心とした粘膜免疫応答についても検討し、細菌および免疫応答の両面からの検討・評価を行う。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・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：増 永 浩

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

歯周病に対する細菌学的な検索は、特異的細菌説から細菌-宿主相互作用説と変遷してきている。現在、歯肉縁下プラークをより分離された病原性の高い細菌群が歯周病原細菌と呼ばれ、*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*A. actinomycetemcomitans*を中心に多くの基礎的研究が展開されている。しかし、歯周病原性細菌と臨床症状との関連性については結論が出ていないのが現状である。このことは、臨床研究において患者間でのデータのばらつきおよび測定者間での評価の違いなど多くのバイアスが介在することが考えられる。本研究では、まず客観的に臨床的な所見を数値化するために、炎症についてはデジタル化した口腔内写真、骨吸収に対しては規格化された平行法によるX線写真など従来からの臨床診査ではなく、診査者の主観が関与しにくい測定系を選択した。その上で歯周病原細菌に対して継続的な測定を患者ごとに行うことにより歯周治療によって変動する細菌のうち、治療効果の判定のマーカーと成りうる細菌を絞りこんだ。この条件下でリコール時の患者の臨床症状と特定された細菌群の関係を調べることにより測定項目における相関性、マーカーとしての信頼性について検討中である。また炎症のメディエーターおよび特定細菌に対する抗体価について測定することにより検査の信頼度の向上が期待できると考えられる。

今後の課題としては本研究の結果により歯周病患者のリコールの間隔およびその必要性について科学的な根拠（EBM）を与えることが可能となると考えられることから、さらにマーカーとしての精度を向上させる必要があると考えられる。すなわち本研究における結果は患者教育の際に十分なEBMに基づいた説明を可能にすると考えられる。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 20 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 辻 本 恭 久

所属・資格 松戸歯学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	活性酸素による歯周組織の炎症カスケードと抑制システムの解明	
3 研究目的	現在、歯周病は、生活習慣病の一つに列挙されており、国民の多くが罹患している。しかし、歯周病の発症や憎悪に関する詳細なメカニズムは明らかになっていない。近年、慢性疾患や炎症の進展に活性酸素種の関与がクローズアップされている。口腔内は、補綴物やバクテリアから発生が発生するとの報告もあり、口腔内の酸化ストレスの軽減は、歯周疾患の軽減に繋がると考えられる。本申請では、歯周組織の炎症と活性酸素種の関わりについて検討を行う。	
4 研究概要	ヒト歯肉培養細胞に1 mMの過酸化水素水を1時間作用させ、24、48、72時間後の細胞毒性試験を行う。また、過酸化水素水作用後、1、3時間後の遺伝子の変動について gene tip 解析を行い、酸化ストレスによって変動する遺伝子解析を行う。また、抗酸化剤である Antioxidant Biofactor (AOB) を過酸化水素水作用時に同時投与し、同様の実験を行う。また、AOBのフリーラジカルに対する scavenging activity を ESR spin trapping 法にて測定を行う。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 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。

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

Super oxide ($O_2^{\cdot -}$)およびhydroxyl radical ($OH\cdot$)に対するAOBのscavenging activityについてESR spin trapping法にて測定を行った。実験系は、二酸化チタンおよび6%の過酸化水素水を反応させ、光照射を行い、発生する $O_2^{\cdot -}$ に対する濃度別AOBの消去能を測定した。また、6%の過酸化水素水に光照射を行い発生する $OH\cdot$ に対する濃度別AOBの消去能を測定した。 $O_2^{\cdot -}$ および $OH\cdot$ ともAOBの濃度に依存してscavenging activityの上昇が認められた。 $O_2^{\cdot -}$ および $OH\cdot$ に対する IC_{50} は、0.62%および0.91%であった。このことから、AOBは、複数のフリーラジカルにマルチプルなscavenging activityを有する抗酸化剤であることが示唆された。

酸化ストレスがヒト歯肉培養細胞に対する影響を検索するため、1 mMの過酸化水素（酸化ストレス）を1時間作用させ、24、48、72時間後の細胞増殖試験を行った。酸化ストレスの暴露により、経時的な細胞数の減少が認められた。また、AOBを過酸化水素と同時投与することで、通常培養のコントロール群よりも細胞数の減少は認められるものの、酸化ストレスを単独に作用させたものと比較して細胞数の減少が抑制されることが観察された。

次に、酸化ストレス作用後の遺伝子の変動をgene tipにて解析を行った。特に、炎症の進展に深く関与していると報告されている、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）群の変動に着目し、AOB同時投与群と比較を行ったところ、酸化ストレスを作用させることでMMP-8、MMP-21およびMMP-23Aにおいて2倍以上の遺伝子発現の増加が認められた。特にコラゲナーゼとして知られているMMP-8は、組織破壊における重要な因子として知られている。また、AOBを同時投与することで、MMP-8の遺伝子発現量の抑制が認められた。

本研究結果から、ヒト歯肉培養細胞に酸化ストレスを暴露することで細胞傷害が認められ、その因子の一つにMMP-8が関与していることが示唆された。また、抗酸化剤であるAOBは、このMMP-8の遺伝子発現量の増加を抑制することで、酸化ストレスからの細胞傷害を抑制できる可能性が示唆された。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 20 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 小川 京



所属・資格 松戸歯学部・助教

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	上下顎臼歯抜歯および粉状飼料下にて継代飼育したラットにおける顎骨への影響	
3 研究目的	本研究の目的は、ラットを粉状飼料下にて飼育するだけでなく、臼歯を抜去し咀嚼機能をさらに低下させて継代飼育することにより、顎骨の発育の変化が一世代の変化として起こるだけでなく、次世代以降へ伝達、蓄積することを証明することである。	
4 研究概要	ラットを粉状飼料下にて飼育し、臼歯を抜去することにより咀嚼機能を低下させる。これを同様にラット5世代に渡って継代飼育し、各世代間の顎骨の大きさを比較することにより、咀嚼機能の低下によっておこる顎骨の発育不全が、一世代の変化として起こるだけでなく、その変化が次世代以降に伝達、貯蓄され顎骨が退化するか否かを明らかにする。	
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： 小川 京

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

3週齢のWistar系ラット雌雄12匹計24匹を購入した。これらのラットの半数(雌雄6匹計12匹)を固形標準食下にて飼育し、コントロール群とした。残りの半数のラット(雌雄10匹計20匹)に対し、第3臼歯萌出時期である5週齢に下顎両側臼歯の脱臼および抜歯を行った。抜歯後は粉状標準食下にて飼育し、これを実験群第一世代とした。10週齢にて雌雄を交配させ、雌雄3匹計6匹を得て、これを実験群第二世代とした。

これらラットを20週齢にて炭酸ガスで屠殺後、1%KOHにて軟組織を除去後顎骨標本を作製した。コントロール群と実験群の顎骨を実体顕微鏡下で比較すると、コントロール群の下顎臼歯に咬耗が認められたのに対し、実験群では咬耗が認められなかった。また実験群の下顎臼歯は、舌側の歯根が歯槽骨から露出しており、上顎臼歯を抜歯したことで下顎臼歯が延出していることが示唆された。

キャノン社製複写機(iRC3200N型)にて、左右下顎骨を舌側を下面(下顎角部、切歯舌側相当部の骨および第3臼歯の3点が安定する位置)に置き、下顎枝高、下顎骨長、下顎角の角度を測定した結果、下顎枝高はコントロール群で雄 $12.54 \pm 0.33\text{mm}$ 、雌 $12.1 \pm 0.28\text{mm}$ であったのに対し、実験群一世代で雄 $9.84 \pm 0.37\text{mm}$ 、雌 $9.48 \pm 0.38\text{mm}$ 、実験群二世代で $9.68 \pm 0.34\text{mm}$ 、雌 $9.34 \pm 0.27\text{mm}$ であった。下顎長はコントロール群で雄 $27.89 \pm 0.75\text{mm}$ 、雌 $26.79 \pm 0.67\text{mm}$ であったのに対し、実験群一世代で雄 $24.29 \pm 0.74\text{mm}$ 、雌 $23.12 \pm 0.58\text{mm}$ 、実験群二世代で $24.11 \pm 0.64\text{mm}$ 、雌 $23.24 \pm 0.42\text{mm}$ であった。下顎角の角度はコントロール群で雄 80.5 ± 0.85 度、雌 81.5 ± 0.70 度であったのに対し、実験群一世代で雄 90.5 ± 0.80 度、雌 91.0 ± 0.75 度、実験群二世代で 91.25 ± 0.85 度、雌 90.5 ± 0.75 度であった。続いて上顎骨を上顎切歯と左右の上顎臼歯咬合面が安定するようにキャノン社製複写機を用いて複写し、切歯孔前縁と蝶形骨基底後縁の距離を測定した結果、雄 $44.24 \pm 0.89\text{mm}$ 、雌 $43.79 \pm 0.69\text{mm}$ であったのに対し、実験群一世代で雄 $41.29 \pm 0.65\text{mm}$ 、雌 $40.54 \pm 0.53\text{mm}$ 、実験群二世代で $40.76 \pm 0.64\text{mm}$ 、雌 $40.11 \pm 0.53\text{mm}$ であった。下顎枝高、下顎骨長および切歯孔前縁と蝶形骨基底後縁の距離はコントロール群より実験群のほうが小さく、下顎角はコントロール群より実験群のほうが大きかったことから、咀嚼機能が低下することにより顎骨の成長が抑制されると示唆された。一方、下顎角の角度はコントロール群より実験群の方が大きかったことに関してであるが、両群の下顎骨形態を比較すると実験群の下顎角部の大きさが小さく、後方への発達が少ないためであると考えられた。

体重については20週齢でコントロール群が雄 $277 \pm 7.7\text{g}$ 、雌 $267 \pm 8.9\text{g}$ であったのに対し、実験群一世代で雄 $211.3 \pm 6.7\text{g}$ 、雌 $202.5 \pm 8.3\text{g}$ 、実験群二世代では雄 $208.3 \pm 5.5\text{g}$ 、雌 $200.5 \pm 8.1\text{g}$ であったことから、顎骨の発育と同様に咀嚼機能が低下することにより成長が抑制されると示唆された。また一世代と二世代間では二世代で顎骨の大きさおよび体重にわずかな減少傾向が認められた。

尚、当初の計画では上下顎両側の臼歯を抜歯する予定であったが、下顎の抜歯は困難であり時間を要し、また出血が多くなることから、上顎のみの抜歯とした。また五世代まで継代飼育する予定であったが、交配により得られた匹数が少なかったため、現在追加実験を行い五世代の顎骨を比較することにより、顎骨の発育の変化が一世代の変化として起こるだけでなく、次世代以降へ伝達、蓄積されるか否かを検討する予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 4 日

日本大学 総長 殿

氏 名 成 田 紀 之



所属・資格 松戸歯学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	精神と口腔	
3 研究目的	精神疾患患者を対象とした前頭葉賦活課題では、前頭葉の活動性に低下が報告されている。そこで、咀嚼を‘積極的に前頭前野を賦活しえる課題’と位置づけ、口腔に身体化症状を訴える精神疾患患者を対象に、咀嚼運動にかかわる前頭前野の活動性に関する検討を行ってきた。	
4 研究概要	<p>精神疾患にともなう口腔の身体化症状には、咬合違和感、唾液や味覚（苦味）などの口腔感覚異常などが挙げられる。とくに、執拗に噛み合わせの違和感を訴える咬合違和感症は、咬合調整や補綴治療によりかえって違和感の訴えが増悪することがあり、歯科医にとって難渋する臨床例である。</p> <p>また、噛み合わせの違和感は咀嚼筋の痛みなどによっても自覚されることから、その要因が心的であるのか、あるいは咬合異常が直接的な要因となっているのかを鑑別し、診断することは临床上、大変に困難であるととも重要とされている。</p> <p>そこで、本研究では前頭皮質の活性度をもとに口腔認知に関する f-NIRS 評価の可能性を検討した。</p> <p>結果として、健常者は咀嚼に同期した有意な前頭前野の背外側領域の活動性を示すとともに、その口腔感覚の実験的遮断は咀嚼障害ならびに前頭前野の活動性の変調（低下）を示した。このことは、口腔の認知にかかわるであろう前頭前野は、咀嚼行動の発現ならびに実行において重要であることを示唆している。</p> <p>一方、精神疾患患者では、健常者で示された前頭前野の優位な活動性は認められない。このことは、口腔の感覚運動機能の統合にかかわる前頭前野の活動性をもとに、精神疾患における口腔の認知障害の評価ならびに診断が可能と考えている。</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 ・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：成田 紀之

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究「精神と口腔」においては下記の研究計画ならびに研究方法をもとに遂行された。

本研究計画は、健常者を対象として咀嚼時の前頭皮質活動と咬合様相ならびに咀嚼運動様相との関連を明確にすること、ならびに執拗に咬合違和感を訴える精神疾患患者を対象とした咀嚼時の前頭皮質活動と咀嚼運動様相、咬合接触様相との関連を検討することにある。

また、研究方法として、被験者は、本学教職員ならびに学生、ならびに本学付属病院顎関節咬合科を受診した咬合違和感を訴える顎機能障害、咬合不全、精神疾患などの患者を対象とした。

運動課題には咀嚼運動を用い、咀嚼時の咀嚼筋筋電図（NEC 生体アンプ）、顎運動機能（MKG・K6I）、前頭皮質活動（ETG-100, HITACHI）ならびに噛みしめ時の咬合接触様相（デンタルプレスケール）を評価した。

本研究結果は以下の1～4にまとめられる。

1. 健常者は咀嚼に同期した有意な活動性を前頭前野の背外側領域に示した。さらに、これまでに、口腔感覚の実験的遮断が咀嚼障害とともに前頭前野の活動変調（低下）を引き起こすことを報告した（IADR, 2008）。これらのことから、口腔の認知にかかわるであろう‘前頭前野の活動性’は咀嚼行動の発現と実行にとって大変に重要と考えられた。
2. 咬合違和感を訴える精神疾患患者では、健常者に示された前頭前野の優位な活動性は認めなかった。
3. 咀嚼筋筋活動ならびに咬合接触様相からの評価では、健常者と精神疾患患者とに有意な差異は認めなかった、がしかし、精神疾患患者の示す咬合力では、健常者と比べて、低下する傾向を示された。この結果は、精神疾患患者は自発的な噛みしめに躊躇するといった行動の変容を有することを示唆している。
4. 著しい咬合不全の患者であっても、精神的に問題を見出せない患者では、咀嚼時の前頭前野の活動性に健常性を示した。このことから、咀嚼筋筋活動や咬合接触様相から、咬合違和感症の本質を評価することは困難であろうと考えられた。

考察

これまでに、精神疾患患者を対象とした前頭葉賦活課題では前頭前野の活動性に有意な低下が報告されている。

本研究では、咀嚼を‘積極的に前頭前野を賦活しえる課題’と位置づけ、執拗に口腔感覚異常を訴える精神疾患患者に示された、咀嚼時の前頭前野の有意な活動性低下は、咀嚼にかかわる口腔機能の認知障害と推察した。

また、近年の精神疾患患者、なかでもうつ病の脳科学に関する研究報告では、前頭皮質の体積の低下ならびに同領域のニューロン樹状突起スパインの減少、ならびに脳代謝の低下などが示されている。

これらの‘うつ病の脳科学’に関する研究報告に、本研究結果を照らせば、本研究で示された精神疾患患者における咀嚼時の前頭前野の低活性は、前頭前野の神経機能の病理的背景にもとづくものであり、とくに口腔認知の歪みを示唆すると考えられる。

結論

精神疾患患者に示された咀嚼に関連する前頭前野の低活性は、口腔認知の歪みを示唆し、さらに今後検討を加えることで、脳機能評価にもとづく「精神疾患患者の口腔認知機能に関する臨床評価」が可能と考えられた。

本研究成果は2010年のニューロサイエンスにて発表を予定している。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年4月17日

日本大学 総長 殿

氏 名 腰 岡 政 二



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	新規ジベレリン類の単離・同定とその生合成経路の解明	
3 研究目的	ジベレリン (GA) は植物の成長を制御する植物ホルモンの一群である。現在では 136 種類の GA の存在が明らかになっているが、植物体内で生理活性を示すのは初期 13 位水酸化経路上の GA ₁ と初期非水酸化経路上の GA ₄₄ が主であるとされている。しかし、筆者らによるピワ未熟種子からの新規 GA 類の発見から、高い生理活性を有する GA ₈₀ や GA ₈₄ に至る新たな生合成経路の存在の可能性が明らかになった。そこで、本研究ではピワ未熟種子中に存在すると推定される未知 GA 類の探索と、化学構造の解析・同定を行い、それらの生合成経路を明らかにする。	
4 研究概要	ピワ (<i>Eriobotrya japonica</i>) 未熟種子から、既知ジベレリン (GA) である GA ₉ 、GA ₁₅ 、GA ₁₉ 、GA ₂₀ 、GA ₂₄ 、GA ₂₉ 、GA ₃₅ 、GA ₄₄ 、GA ₅₀ 、GA ₆₁ 、GA ₈₀ 、GA ₈₄ 、GA ₁₃₃ 、GA ₁₃₄ 、GA ₁₃₅ 、GA ₁₃₆ を同定した。さらにジベレリン様の質量スペクトルを有する数種の未知化合物を発見した。その中の一つについては 11β-OH GA ₂₄ である可能性を示した。メタボロームから考察すると、ピワにおいては、GA ₉ 、GA ₁₅ 、GA ₂₄ 、GA ₆₁ によって構成される初期非水酸化経路、GA ₁₉ 、GA ₂₀ 、GA ₂₉ 、GA ₄₄ によって構成される初期 13 位水酸化経路、GA ₃₅ 、GA ₅₀ 、GA ₈₀ 、GA ₈₄ 、GA ₁₃₃ 、GA ₁₃₄ によって構成される初期 11β 位水酸化経路および GA ₁₃₅ と GA ₁₃₆ によって構成される初期 11β/13 位水酸化経路といった 4 種の生合成系が機能していると考えられる。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 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： 腰 岡 政 二

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

実験方法

開花後約 120 日後のビワ (*Eriobotrya japonica*) 未熟種子から、常法により植物ホルモンであるジベレリン (GA) 類の酢酸エチル可溶性区分を得た。Bondesil-DEA カラムによって予備精製を行った後に ODS-HPLC を行い、得られた分画についてイネ ‘短銀坊主’ による生物検定を行なった。活性の認められた分画の内、同じ GA が存在していると思われる分画同士を纏めた。必要がある場合には、さらに $N(CH_3)_2$ -HPLC を行い精製し、生物検定を行ない、GA 活性フラクションを得た。活性の認められた分画についてメチルエステル化およびトリメチルシリルエーテル化を行い、GC-MS により同定・分析した。なお、同定は標品となる GA 類のメチルエステルトリメチルシリルエーテル誘導体の Kovats リテンションインデックス値と質量スペクトルとの一致から同定した。なお、未知の化合物については、推定される化合物の合成物質の質量スペクトルパターンとの比較から、化学構造を推定した。

結果

既知 GA 類との照合から、GA₉、GA₁₅、GA₁₉、GA₂₀、GA₂₄、GA₂₉、GA₃₅、GA₄₄、GA₅₀、GA₆₁、GA₈₀、GA₈₄、GA₁₃₃、GA₁₃₄、GA₁₃₅、GA₁₃₆ を同定した。このうち基本骨格が水酸化を受けていないものが、GA₉、GA₁₅ および GA₂₄ の 3 種、1, 2 位の間に 2 重結合のあるものが、GA₈₀ の 1 種、1β 位が水酸化されたものが、GA₆₁ の 1 種、2β 位が水酸化されたものが GA₂₉ および GA₅₀ の 2 種、3β 位が水酸化されたものが、GA₃₅、GA₅₀ および GA₈₀ の 3 種、11 位が水酸化されたものが、GA₃₅、GA₅₀、GA₈₀、GA₈₄、GA₁₃₃、GA₁₃₄、GA₁₃₅、GA₁₃₆ の 8 種、13 位が水酸化されたものが、GA₁₉、GA₂₀、GA₂₉、GA₄₄ の 4 種であった。未知 GA 類としては、マスマグメンテーションから、GA₁ タイプ、GA₃ タイプ、GA₈ タイプ、GA₄₆ タイプおよび GA₆₇ タイプの数種類の存在が推定された。さらに 11β-OH GA₂₄ の存在が示唆されたので、合成物との比較を行ったところ一部のフラグメントイオンを除いてほとんど同じフラグメンテーションパターンを示した (図 1)。

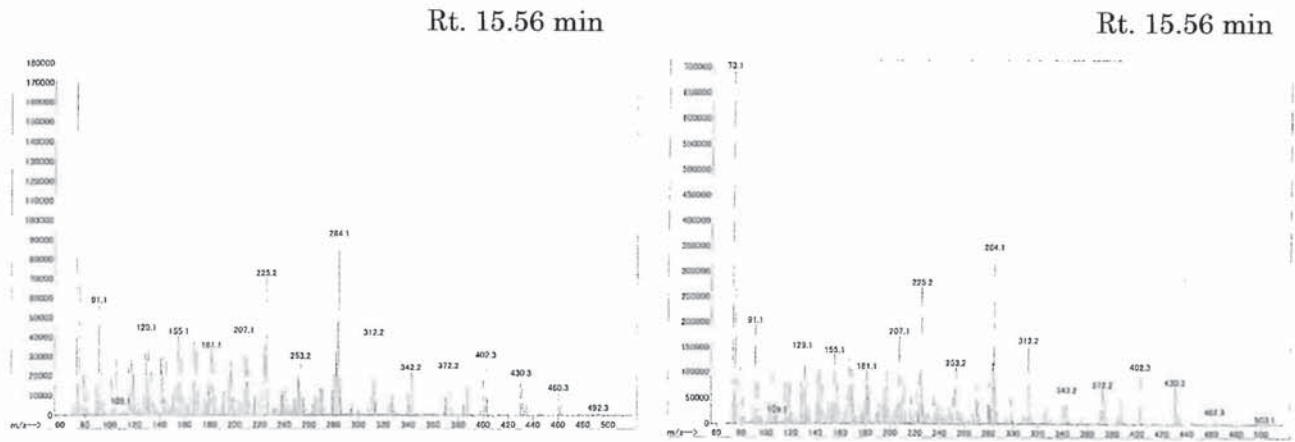
考察

同定された GA 類の化学構造から推定すると、図 2 に示すように、GA₉、GA₁₅、GA₂₄、GA₆₁ によって構成される初期非水酸化経路、GA₁₉、GA₂₀、GA₂₉、GA₄₄ によって構成される初期 13 位水酸化経路、GA₃₅、GA₅₀、GA₈₀、GA₈₄、GA₁₃₃、GA₁₃₄ によって構成される初期 11β 位水酸化経路および GA₁₃₅ と GA₁₃₆ によって構成される初期 11β/13 位水酸化経路といった 4 種の生合成系が機能していると考えられる。これら 4 種の生合成経路のうち、質量分析値および生物活性値の強さから、初期 11β 位水酸化経路が尤も主要なものであると推測される。なお、今回の研究で存在が示唆された 11β-OH GA₂₄ は、まさに初期 11β 位水酸化経路上の GA であり、新規 GA である可能性が高い。

今後の対応

今回発見した 11β-OH GA₂₄ 様化合物の種々の化学特性を、合成 GA と比較することで新規 GA であることを確定する。また、初期 11β/13 位水酸化経路の存在が示唆されたことから、経路上に存在すると考えられる 11β-OH GA₁、11β-OH GA₁₉ および 11β-OH GA₄₄ を探索する。

研究結果 (つづき)



今回発見された化合物

合成 11β-OH GA₂₄

図 1. 新規ジベレリン候補およびその合成ジベレリンのマススペクトル

Gibberellin metabolome map in *Eriobotrya japonica*

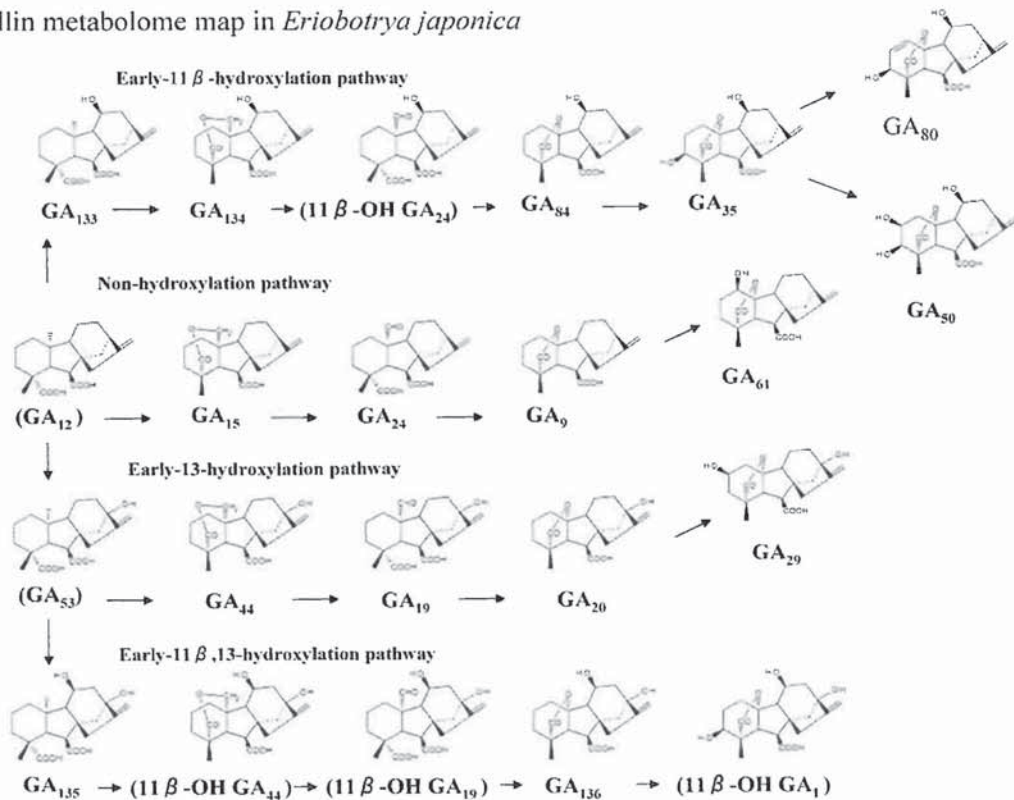


図 2. ビワにおいて機能している考えられるジベレリンの主たる代謝経路
(): 存在する可能性のある GA 類

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 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 20 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 畠山 吉則



所属・資格 生物資源科学部・助教

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	農林害虫防除の観点から見た微胞子虫の系統関係に関する研究	
3 研究目的	2007 年 3 月の調査の結果、ベトナム国カントー市において農林害虫であるハスモンヨトウ (<i>Spodoptera litura</i>) が大量発生していることが確認され調査の結果、ほぼすべての個体が微胞子虫に感染していることが判明した。微胞子虫を微生物防除剤として活用するためには、対象害虫に対して適切な効果を示す必要がある。そこで本申請では、ベトナム国カントー市にて捕獲された複数の微胞子虫の遺伝子解析を行い、既に報告されている毒性を有する微胞子虫との系統関係を検索し、両者の違いを系統分類学的に検討することを目的とする。	
4 研究概要	ベトナム国カントー市にて捕獲されたハスモンヨトウを磨碎し、微胞子虫感染率を調査した。その結果現地のハスモンヨトウは非常に高頻度に微胞子虫に感染していることが判明した。次に系統関係を調査するために微胞子虫のリボソーム RNA 遺伝子の配列解析と GP 法による二つの解析手法を用いて研究を行った。その結果 SSU rRNA の配列解析では同地域の微胞子虫が <i>Nosema bombycis</i> と類似した系統であることを示した。GP 法では同地域の微胞子虫は 3 系統存在する可能性が示唆された。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・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：畠山吉則

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

微胞子虫を微生物防除剤として活用するためには、対象害虫に対して適切な効果を示す必要がある。本研究では、ベトナム国カントー市にて捕獲された複数の微胞子虫の遺伝子解析を行い、既に報告されている毒性を有する微胞子虫との系統関係を検索し、両者の違いを系統分類学的に検討した。本研究では、従来行われてきた特定遺伝子配列比較による系統解析と、全ゲノムを比較する手法として、ゲノムプロファイル法の二つの方法を用いて昆虫寄生性微胞子虫の系統分類を行い、その両者の整合性を検証した。尚、本研究ではサンプルとしてベトナム国カントー市にて捕獲されたハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) から由来する微胞子虫株 15 系統を使用して、系統分類を行った。微胞子虫 DNA の抽出は「畠山・早坂 2002」に記載した手法を用いて行った。この DNA を用いて解析を行った。以下各実験工程別に結果を報告する。

捕獲頭数と感染率の測定

ベトナム国カントー市にて 2007 年 3 月 12 日および 13 日の 2 日間にわたり行われたハスモンヨトウ捕獲調査の結果、212 頭のハスモンヨトウが捕獲された。次に捕獲されたハスモンヨトウを乳鉢で磨砕し、検鏡にて微胞子虫胞子を観察し、感染率を調査した。その結果、46.7%にあたる 99 個体から微胞子虫が発見された。

微胞子虫胞子精製とゲノム DNA 抽出

感染率測定の結果、微胞子虫の感染が確認されたハスモンヨトウ 15 頭を任意に選抜し、すり鉢で磨砕し、ハスモンヨトウ体内に感染していた微胞子虫胞子を精製した。次に 15 系統の微胞子虫胞子から、DNA を抽出・精製した。DNA の抽出方法は、定法によって回収・精製された微胞子虫胞子の一部を別のチューブにとりわけ、グラスビーズ法（畠山ら 2002）を用いて破碎し、ゲノム DNA を抽出した。

SSU rRNA 遺伝子断片の塩基配列解析による微胞子虫株の系統解析

ベトナム国カントー市で回収された微胞子虫系統がどのようなものであるかを調査するために、小サブユニットリボソーム RNA 遺伝子 (SSU rRNA 遺伝子) の配列解析を行った。微胞子虫の SSU rRNA は配列の長さが原核生物のものよりも短い 1.2kb 程度の長さしかないことが知られており (Vossbrinck and Woese 1987) その配列は他の真核生物のものとは比べて欠落が多い。また微胞子虫の SSU rRNA は属ごとにその欠落部位が異なる可能性が示唆されており (畠山ら 1997) 塩基配列解析によって正確に微胞子虫を分類することが可能である。そこで SSU rRNA 遺伝子の解析を行った。まず DNA を鋳型にして PCR を行い、SSU rRNA 遺伝子を増幅した。この際使用するプライマーは既知の配列をベースに作成された微胞子虫特異的なものであり (畠山ら 1997) このプライマーを用いれば微胞子虫の SSU rRNA 遺伝子のみを増幅することが可能である。この結果増幅された SSU rRNA 遺伝子断片をクローニングし、その塩基配列を解析した。次に解析された配列情報と、既に報告されている微胞子虫の SSU rRNA 遺伝子の配列と比較し、ベトナム国カントー市にて単離された微胞子虫が、従来から知られている微胞子虫と系統学的にどのような関係にあるのか、その系統関係を比較・再考し、従来報告されている微胞子虫と、ベトナム国カントー市にて単離された微胞子虫との間に何らかの差があるのかを検証した。その結果、SSU rRNA の配列比較では、ベトナムで捕獲された微胞子虫株はカイコ微粒子病の原因生物 *Nosema bombycis* と非常に類似した系統である可能性が示唆された。

ゲノムプロファイル法による微胞子虫株の解析

ゲノムプロファイル法 (GP 法) はランダム PCR と TGGE で構成された技法である。ランダム PCR は検査するゲノム構成に従ってランダムな DNA 断片を増幅する技法であり、ゲノム構成が異なれば、異なる DNA 断片が増幅される。生物の系統関係を正確に調査するためには特定の配列情報ではなく、そのゲノム全体を比較する必要があるため、ランダム PCR による簡易的な全ゲノム比較は系統間の差異を反映したものとなる。このランダム PCR で増幅される DNA 断片は複数出現するため、その識別には温度勾配ゲル電気泳動装置 (TGGE) を用いる必要がある。泳動像が二次元的に示される温度勾配ゲル電気泳動層では通常使用される一次元の電気泳動層に比べ得られる情報量が多く、同じ大きさの DNA 断片であっても塩基組成が異なれば、異なる泳動像を示す。そのため二次元的に電気泳動すればゲノム構成の差異がより鮮明に示されることになる。ゲノムプロファイルの結果は画像データであり、座標上に展開された距離を測定することにより、画像間の類似性を比較することができる。この類似性の比較結果は遺伝子の配列比較と同様のものであり、得られたデータをつなぎ合わせることで、系統樹を作成することが可能となる。そこで本研究ではゲノムプロファイル法に基づいた系統樹を作成し、これまで使用されていたような塩基配列を解析することなく、微胞子虫間の系統関係を調査した。その結果、15 系統のうち 8 系統の微胞子虫は SSU rRNA 遺伝子の配列比較の結果と同様に *N. bombycis* と同様のクラスターを形成した。その一方で 2 系統の微胞子虫は *N. bombycis* とは異なる属の微胞子虫 *Vairimorpha necatrix* とクラスターを形成した。さらに 5 系統の微胞子虫は *N. bombycis* と *V. necatrix* と異なるクラスターを形成し、*N. bombycis* 以外の *Nosema* 属の微胞子虫である可能性が示唆された。このようにベトナム国カントー市で分離された微胞子虫株は GP 法の解析により、大きく 3 つのグループに大別されることが明らかとなった。この結果は SSU rRNA の配列比較による結果とは一部異なるものとなった。

部科校名：生物資源科学部

氏名：畠山吉則

研究結果（つづき）

SSU rRNA 遺伝子断片を用いた系統解析と GP 法による系統解析の違いについて

SSU rRNA の配列比較では、ベトナムで捕獲された微胞子虫株はカイコ微粒子病の原因生物 *N. bombycis* と非常に類似した系統である可能性が示唆された。一方、GP 法による解析結果では、15 系統中 8 系統の微胞子虫は SSU rRNA 遺伝子の配列比較の結果と同様に *N. bombycis* と同様のクラスターを形成した。その一方で 2 系統の微胞子虫は *N. bombycis* とは異なる属の微胞子虫 *Vairimorpha necatrix* とクラスターを形成した。さらに 5 系統の微胞子虫は *N. bombycis* と *V. necatrix* と異なるクラスターを形成し、*N. bombycis* 以外の *Nosema* 属の微胞子虫である可能性が示唆された。このようにベトナム国カンター市で分離された微胞子虫株は GP 法の解析により、大きく 3 つのグループに大別されることが明らかとなった。この 2 つの実験手法による結果のずれが生じたのかを考察した結果、以下のようなことが判明した。まず、SSU rRNA 遺伝子の配列比較は微胞子虫の持つ、単一遺伝子の配列情報を調査した結果であり、その結果得られた系統関係は調査した配列情報の系統関係を示している。そのため微胞子虫の系統関係を間接的に示したものであり、形態を反映しない可能性もある。種レベルで異なる生物の系統関係を調査する場合には、単一遺伝子の比較でも十分対応は可能である。しかしながら、同種もしくは非常に類似した生物間の系統関係を調査する場合には、単一遺伝子の比較では、配列情報の差異が小さいために、系統関係を正しく表現できない可能性がある。一方 GP 法では増幅断片を限定しないランダム PCR が解析の基本技術となっているために、ゲノム構成の違いをそのまま系統解析に用いることが可能である。単一の遺伝子では差異を生じにくい非常に近縁な生物間においても、ゲノム構成は異なっており、その違いを測定することができる GP 法は系統間の正しい系統関係を示すことが可能である。2 つの手法による結果の違いは単一遺伝子の比較結果とゲノム比較による結果の違いであり、本研究で得られた結果から、GP 法の精度が極めて高いことが改めて示された。

総括

本研究ではベトナム国カンター市にて捕獲した農林害虫ハスモンヨトウ由来の微胞子虫株の感染率調査および遺伝子解析により系統解析を行い、既に報告されている毒性を有する微胞子虫との系統関係を検索し、両者の違いを系統分類学的に検討することを目的として研究を行った。その結果同地域で捕獲されたハスモンヨトウは 46.7% と極めて高頻度で微胞子虫に感染していることが判明した。日本国内におけるチョウ目害虫の微胞子虫感染率は高くても 20% 程度であり、この地域で分離された微胞子虫株は、微生物防除資材として利用できる可能性が極めて高いものである可能性を示した。また遺伝子解析の結果、SSU rRNA の配列比較ではいずれも *N. bombycis* と同様の配列情報を有することが判明した。その一方で GP 法では同地域の微胞子虫は少なくとも 3 系統に分類することが可能であることを示す結果となった。本研究では GP 法を用いることによりゲノム構成の差異を比較することに成功した。この結果、微胞子虫の系統関係を従来の配列比較による系統関係では得られなかった詳細な違いを短期間に解析することが可能であることを示した。この手法は単一の技法ですべての生物の系統関係を調査することが可能であり、この結果はこれまでの技法では見つからなかった微細な種レベルの違いを検出することのできる可能性を示唆するものである。

このように本研究では、農林害虫であるハスモンヨトウから分離された微胞子虫株の系統解析を行うという目的を達成した。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 27 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	<input checked="" type="checkbox"/> 一般研究(個人研究) / <input type="checkbox"/> 一般研究(共同研究) / <input type="checkbox"/> 総合研究	注: 該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	外来生物に随伴して国内侵入する病原微生物およびその環境リスク評価に関する研究	
3 研究目的	<p>侵略的外来生物の一種であるグリーンアノール (<i>Anolis carolinensis</i>) に随伴して国内侵入する各種病原微生物の保有状況を明らかにし、それらが生物多様性に与える環境リスクの評価をおこなう。</p> <p>1970年代に小笠原諸島へ持ち込まれた中南米産爬虫類のグリーンアノールは、急激に増殖して本諸島の貴重な生態系を脅かす存在になっている。これまで、グリーンアノールがオガサワラシジミ (<i>Celastrina ogasawaraensis</i>) など島の固有種に与える影響に関してはいくつか研究されているが、本種に随伴して持ち込まれた、またはその可能性がある病原微生物(寄生体)に対しては、ほとんど注意が払われて来なかった。本研究課題は、宿主と同等もしくはそれ以上に生態系へ与えるリスクが大きい外来病原微生物の保有状況を調査研究し、合わせて当該微生物の環境リスク評価をおこなうことを目的とした。</p>	
4 研究概要	<p>病原微生物(寄生体)として、海外のグリーンアノールで感染報告のある住血原虫と病原性細菌を対象とした。環境省の許可を得て、小笠原諸島父島と母島の保護区域外でグリーンアノールを捕獲し、尾静脈から血液採取した。スワブを用いてクロアカから直腸便を採取すると共に、本種の生息地周辺において公衆トイレからの拭き取り調査を行った。自然環境研究センターの協力を得て、当センターで冷凍保存されているグリーンアノール死体の提供を受け、研究室内で解剖し肝臓および直腸内容を採取した。血液および肝臓塗抹染色標本を用いて光学顕微鏡下で住血原虫の有無を観察した。nested-PCR法を用いて血液、肝臓および吸血昆虫試料から同原虫遺伝子断片の増幅を試みた。増幅産物が得られた場合はダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し分子系統解析をおこない由来を検索した。採取試料を用いて主に <i>Salmonella</i> 検出を目的として細菌培養を行った。分離菌の性状確認、生化学的性状検査、血清型別、病原遺伝子検索等を試みた。</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：村田浩一

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

【住血原虫保有に関する研究】

1. 住血原虫の形態学および分子生物学的研究

1) 住血原虫検索（顕微鏡観察）

小笠原諸島（父島および母島）においてグリーンアノール 161 個体、対照試料として小笠原諸島および島外の日本産トカゲ類 39 個体を捕獲し試料採取した。尾静脈から採取した血液を用いて薄層塗抹標本作製し、99.5 %メタノールで固定後、Hemacolor 液（MERCK 社）で染色し、オイキットで封入した。塗抹染色標本を光学顕微鏡下（×400）で観察して原虫感染の有無を調べた。グリーンアノール 161 個体に住血原虫感染を認めなかった。また、トカゲ類 6 種 39 個体においても住血原虫感染を認めなかった。

2) 住血原虫の遺伝子解析

採取された血液（冷凍保存血液あるいは 99.5 %エタノールに液浸された血液細胞）および臓器（凍結肝臓組織片（約 0.1~1.0 g））から DNA 抽出した。DNA 抽出には市販の DNA 抽出キット（DNeasy Tissue Kit（QIAGEN 社））を用いた。マラリア原虫のミトコンドリア DNA チトクローム b（mtDNA cytb）領域の部分塩基配列（673 bp）を標的とした nested-PCR を行い、血液原虫の遺伝子増幅を試みた。プライマーは 1st. PCR では DW2（5'-TAATGCCTAGACGTATTCCTGATTATCCAG-3'）および DW4（5'-TGTTTTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG-3'）、2nd. PCR では DW1（5'-TCAACAATGACTTTATTTGG-3'）および DW3（5'-TGCTGTATCATACCCTAAAG-3'）を用いた（Perkins, 2000）。その終濃度を 10 μM とし、全量を 25 μl の反応系で nested-PCR を実施し、特異的増幅を試みた。PCR 反応には市販の PCR 反応キット（puRe Taq Ready-To-Go-PCR Beads（GE ヘルスケア・ジャパン社））を使用した。反応条件は、94℃-5 分の DNA 熱変性後、熱変性 94℃-1 分、アニーリング 60℃-1 分、伸長反応 72℃-1 分を 1 サイクルとし、1st. PCR および 2nd. PCR とともに 35 サイクル行い、さらに 72℃-10 分間で伸長反応の条件下で行った。1st. PCR には血液試料から抽出した DNA 検体 1 μl、2nd. PCR には 1st. PCR 後の反応液 1 μl をテンプレートとして用いた。2nd. PCR 産物は 3 μl に、6× Loading Buffer 0.5 μl を加え、2.0 %アガロースゲル（Agarose S：株式会社ニッポンジーン）で電気泳動（100 V、30 分間）を行った。電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、トランスイルミネーター（Printgraph：アトー株式会社）で紫外線照射し、PCR 増幅バンドの有無を判定した。トカゲ類 200 個体のすべての血液試料に遺伝子増幅を認めなかった。

2. 住血原虫の血流中出现時間帯に関する研究

午前 10 時から午後 8 時の間、完全に外部からの光を遮断し、室温を 24℃に保った場所でトカゲ類を飼育し、午後 8 時から午前 10 時の間は、昼夜逆転のため蛍光灯の光に暴露し飼育した。昼夜逆転飼育の実験に供したトカゲ類は、ニホンカナヘビ（*Takydromus tachydromoides*）7 個体、ニホントカゲ（*Plestiodon japonicus*）4 個体、ニホンヤモリ（*Gekko japonicus*）3 個体である。2 週間の昼夜逆転飼育の後、尾静脈から採取した血液を供試した。2)に示したと同様の方法で住血原虫の形態学および分子生物学的解析を行い、住血原虫の有無を確認した。トカゲ類の血液塗抹標本の鏡検を行った結果、すべての検体において血液細胞内に住血原虫感染を認めなかった。また、分子生物学的手法による解析でもすべての検体に遺伝子増幅を認めなかった。

3. 住血原虫の環境影響評価に関する研究

1) 生態調査

① グリーンアノールの生態に関する調査

父島および母島の中心街、集落、山間部などを中心に、グリーンアノールの生息調査および生息環境調査を実施した。父島のほとんどの地域で生息を確認した。生息環境は人の生活圏である中心街から山間部の森林に及んでいた。母島においても、ほとんどの地域で本種の生息を確認した。生息環境は父島同様、集落内から山間部の森林に及んでいた。

部科校名：生物資源科学部

氏名：村田浩一

研究結果（つづき）

② 固有爬虫類との接触機会に関する調査

調査期間中、グリーンアノールの生息場所で小笠原諸島の固有爬虫類であり準絶滅危惧種であるオガサワラトカゲ (*Cryptoblepharus boutonii nigropunctatus*) および普通種のオガサワラヤモリ (*Lepidodactylus lugubris*) とホオグロヤモリ (*Hemidactylus frenatus*) との接触機会（同所的生息の有無）について踏査調査で確認した。

父島では、オガサワラトカゲを2個体のみ確認した。唯一、確認できた2個体は中山峠に生息しており、当地におけるグリーンアノールの生息密度はきわめて高かった。オガサワラヤモリおよびホオグロヤモリは同所的な生息が各調査地において確認された。

母島では、父島よりもオガサワラトカゲの生息確認数は多かった。グリーンアノールとの同所的な生息を島内全域において確認した。オガサワラヤモリおよびホオグロヤモリについては、集落内で少数確認したのみであった。

【病原性細菌保有に関する研究】

1. *Salmonella* spp. の保菌状況に関する研究

1) 材料の採取・保存・運搬

小笠原諸島父島で捕獲したグリーンアノール141個体からクロアカ・スワブを採取した。捕獲に際しては環境省および東京都小笠原村の許可を得た。島内の研究施設で冷凍保存されていた死体（18個体分）を冷凍状態で持ち帰り、研究室で融解して解剖後、腸内容を採取し培養試料とした。また、島内で採取したノヤギ (*Capra hircus*) の糞便16検体、公衆トイレ8か所の拭き取り試料38検体をそれぞれ保存培地に移し、クロアカ・スワブと共に冷蔵状態で研究室まで輸送した。いずれの検体も採取から培養開始までの日数は最大で6日であった。

2) 細菌培養および薬剤耐性試験ならびに遺伝子解析

前培養と増菌培養を行なった後、選択培地で37°C24時間培養した。生化学性状を確認後、腸内細菌同定キットを用いて菌種同定した。分離株については血清型別ならびにKirby-Bauer法による薬剤感受性試験を行った。後者については12種の抗生剤を選択した。分離菌株における侵入性因子関連遺伝子 (*invA* gene) の存在有無をPCR法で増幅確認した。

3) 検査結果

捕獲個体から採取された141検体中46検体（32.6%）から *Salmonella* が分離され、これまでに調べた分離株の血清型はすべて *S. Oranienburg* であった。凍結保存死体、ノヤギ糞およびトイレ拭き取り検体からも、それぞれ61.1%（11/18）、12.5%（2/16）、2.6%（1/38）の割合で *Salmonella* が分離された。分離株のうち、13株がオキシテトラサイクリン耐性、5株がアンピシリン耐性であった。他株も全ての薬剤に対して感受性（中間～感性）を示した。すべての分離菌株から侵入性因子関連遺伝子が増幅された。

4) 考察

S. Oranienburg は、国内においてヒトの食中毒菌として稀に検出される血清型である。今後、本菌株の由来およびグリーンアノール体内での増殖の可能性を遺伝子解析等で解明し、島の固有種に与える影響のみならず本種との「宿主-寄生体関係」についても検討を加える予定である。外来生物対策では、本研究で行ったような宿主生物が保有する病原微生物をも視野に入れた保全医学的な取り組みが必要であると考える。

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21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 31 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 鈴木 美和 

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	<input checked="" type="checkbox"/> 一般研究(個人研究) / <input type="checkbox"/> 一般研究(共同研究) / <input type="checkbox"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	鯨類の抗利尿ホルモンに関する研究 ーアルギニンバソプレッシンの分泌と作用の解明ー	
3 研究目的	陸上ほ乳類において、体内の水分が不足した場合に尿から水を再吸収させ尿濃縮をおこす「抗利尿作用」を担う物質は、一般的にアルギニンバソプレッシン（AVP）である。しかし鯨類においては、AVP が抗利尿ホルモンとして機能するのか否かについて見解の一致が得られておらず、詳細な研究もなされていない。本研究では、鯨類において AVP が産生分泌されること、ならびに AVP が抗利尿作用を有することを明らかにすることを目指した。	
4 研究概要	<p>1) in vivo での渇水時の血中濃度の上昇の確認：飼育下のバンドウイルカを対象として、個体を絶食させ採血・採尿を行う。この試料を用いて血中 AVP 濃度の測定、尿・血液の浸透圧測定を行い、血漿浸透圧の上昇とそれに伴う AVP 濃度の上昇および尿濃縮の有無を確認する。</p> <p>2) 脳下垂体からの AVP の検出：AVP は前視床下部で作られた後に下垂体に運ばれ蓄積・分泌されるため、AVP を産生分泌していれば下垂体から検出される。そこで、和歌山の追込漁で捕獲されるバンドウイルカから下垂体を採取し、タンパク質を抽出して AVP を検出する。</p> <p>3) 腎臓での AVP 受容体の発現分布の確認：バンドウイルカの腎臓を用いて、常法に従い AVP 受容体の発現を確認すると同時に全長配列を決定する。また、タンパク質を抽出して免疫染色に付し、AVP 受容体およびその作用を受ける水チャネルの有無を確認する。</p> <p>4) in vitro での AVP の腎臓への作用の証明：イルカ腎臓の細胞を培養し、培地 AVP を付加して水吸収関連因子の発現量と分布の変化を調べ、AVP の腎臓に対する作用を確かめる。</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 ・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： 生物資源科学部

氏名： 鈴木 美和

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

鯨類が AVP を産生・分泌し、その標的器官である腎臓に作用することを確認するため、バンドウイルカを対象として、1) 渇水時の血中 AVP 濃度上昇の確認、2) 脳下垂体からの AVP の検出、3) 腎臓での AVP 受容体の発現分布の確認、4) AVP の腎臓への作用の証明を行うことを目指して実験を行ない、以下の成果を得た。

1) *in vivo*での渇水時の血中濃度の上昇の確認

【目的】イルカの水分補給を断つ（渇水状態にする）ために、対象個体を絶食させ、絶食に伴う血漿浸透圧の上昇とそれに伴う AVP 濃度の上昇および尿濃縮の有無を確認し、AVP の抗利尿作用を証明することを目指した。

【実験内容】新潟市水族館マリニピア日本海で飼育下のバンドウイルカ（4頭）を実験対象として、個体を 18～42 時間絶食させた後、採血および採尿を行った。同時に、通常のスケジュール通りに給餌を行なった後（給餌後）にも同様の作業を行なった。得られた試料を用いて、ELISA による血漿中 AVP 濃度の測定、尿および血漿の浸透圧測定を各々行い、絶食とそれに伴う AVP 濃度および尿/血漿浸透圧の変化を調べた。

【結果と考察】絶食後に AVP 濃度および尿濃縮が起こると予想して実験を行なったが、予想に反し、給餌後に比べて絶食後に AVP 濃度、尿浸透圧、血漿浸透圧が全て低下した。ただし、AVP 濃度と尿浸透圧との間には正の相関が認められたことから、AVP が尿濃縮すなわち抗利尿作用を持つことが示唆された。

絶食後に AVP 濃度および浸透圧の低下が起こったことは、陸上哺乳類で通常起こる現象と正反対のものであり、非常に興味深い。この現象が起きた理由として、(1)絶食後よりも摂餌後の方が尿濃縮をする必要があった、(2)絶食により、体内に蓄積されている脂肪が分解され、代謝水が生じたため尿濃縮が起こらなかった、等が考えられ、解明すべき新たな課題が提示された。

2) 脳下垂体からの AVP の検出

【目的】AVP は前視床下部で作られた後に脳下垂体に運ばれ蓄積・分泌されるため、イルカが AVP を産生分泌していれば脳下垂体から検出されるはずである。そこで、漁で捕獲されるバンドウイルカから下垂体を採取し、タンパク質を抽出して AVP を検出する。

【実験内容】2010 年 1 月に和歌山県太地町で追込み漁により捕獲されたバンドウイルカより脳下垂体を採取し、4%PFA 固定および凍結保存処理を施した。まず、固定試料をパラフィン包埋、薄切し、HE および PAS 染色を施して組織構造を観察した。続いて凍結試料から AVP を分泌する後葉（神経葉）部分を切り出し、液体クロマトグラフィーにより AVP を検出するため、AVP を含むタンパク質を抽出した。

【結果と考察】組織観察の結果、イルカの下垂体が前葉と後葉（神経葉）からなること、ならびに AVP を分泌する後葉が膜で隔てられ、前葉と連続していないことが判明した。また、酸によるタンパク抽出は行なったが、液体クロマトグラフィーによる同定については最終的な結果が得られておらず、現在も引き続き実験を行なっている最中である。

部科校名： 生物資源科学部

氏名： 鈴木 美和

研究結果 (つづき)

3) 腎臓での AVP 受容体の発現分布の確認

【目的】イルカにおいて AVP が抗利尿ホルモンとして機能するか否かを推定する一つ的手段として、その受容体が標的細胞である腎臓集合管に発現分布していることを明らかにする方法がある。そこで、イルカ腎臓を用いて AVP 受容体 (AVPR2) の発現分布を確認するとともに、AVP の作用を受けて活性化され、管腔膜に移動して原尿からの水の再吸収に重要な役割を果たす水チャネル (アクアポリン 2: AQP2) の発現分布も併せて明らかにすることを旨とした。

【実験概要】 2) と同様に捕獲されたバンドウイルカから腎臓を採取し、常法に従い AVPR2 および AQP2 の mRNA の発現確認を行なった。また、同試料を固定し、免疫組織化学染色に付して AVPR2 と AQP2 の分布を確かめた。

【結果と考察】腎臓での AVPR2 mRNA の発現を調べた結果、729bp の部分配列を決定することが出来た。ただし、全長決定には至っておらず、現在も引き続き実験を行なっている。また、免疫染色を施した結果、腎臓集合管において AVPR2 が分布していることが確認された。AQP2 については、腎臓において mRNA 全長 (1,469bp) を決定し、また AVPR2 と同じく腎臓集合管 (管腔膜) に分布していることが確認できた。以上の結果から、バンドウイルカ腎臓集合管において AVPR2 により活性化された AQP2 が管腔膜に分布し、原尿からの水の再吸収が起こる機構が存在することが強く示唆された。

4) in vitro での AVP の腎臓への作用の証明

【目的】イルカ腎臓における AVP の機能を確認する別の手段として、培養した腎臓の細胞に AVP を添加し、受容体の活性化やその作用を受けて働く因子の動態を追跡する方法がある。そこで、バンドウイルカ腎臓の細胞を培養し、培地に AVP を付加して各因子の動態を調べることにより、AVP の腎臓に対する作用を探ることを旨とした。

【実験概要】 3) と同様に採取した腎臓試料の一部を氷冷して大学に持ち帰り、細胞の継代培養を行なった。培養した細胞に腎臓集合管の上皮細胞が含まれることを AVPR2 および AQP2 の mRNA 発現により確かめた後に、培養細胞に AVP もしくは培地のみ (コントロール) を添加し、AQP2 の発現量の増加の有無ならびに AVPR2 と AQP2 のリン酸化の有無を調べることを試みた。

【結果】まず、イルカ腎臓細胞の継代培養を試みた結果、P4 まで順調に継代できた。続いて、P4 の細胞を用いて AVPR2 と AQP2 の mRNA 発現を確認した結果、発現を確認できたことから、集合管上皮細胞も順調に培養できていることが分かった (ただし AVPR2 は部分配列の増幅の確認に留まった)。次に、AQP2 について半定量的 PCR を行ない、AVP 添加群とコントロール群を比較することを試みたが、RNA の収量が極度に少ない群があり、比較することが困難だったため実験を完遂するには至らなかった。また、タンパク質の収量も少なく、リン酸化の有無についての比較も遂行するに至らなかった。現在、培養容器を大型にし、RNA やタンパク質の抽出法を工夫することにより収量を増やすよう努力しながら引き続き実験を行なっている。

課題番号	個09-115
------	---------

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22年 4月 5日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 佐藤 喜和



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	ヒグマの背擦り行動の意義の解明と生息数モニタリングへの応用	
3 研究目的	ヒグマは、その行動圏内の樹木に対し、幹を爪でひっかく、噛む、樹皮を剥ぐ、身体を擦りつけるといった行動(背擦り行動)をすることが知られている。海外でもこの背擦り行動に関する記載的な報告は数例見られるが、その意義についてはまだ十分な検討がなされていない。そこで本研究では、背擦り木の選択性について、背擦りに用いられる木と用いられない木との比較から明らかにした。また背擦り木の立地条件の特徴を利用して、偽木を用いた背擦り行動の誘導について検討した。	
4 研究概要	本研究は、過去に申請者が継続的にヒグマの生態調査を実施しており基礎情報が蓄積されている、北海道十勝郡浦幌町・釧路市音別町の道有林、および白糠郡白糠町の国有林を調査地として行った。調査地内で発見されたヒグマによる背擦り木の立地条件や選択性を明らかにするために、近傍同種の非背擦り木と対で、簡易GPSを用いた位置・標高の測定、樹種、胸高直径、下枝の位置、傾斜、獣道からの距離、地際の藪の状況を現地調査により記録した。現地調査で得られたデータを元に、多変量ロジスティック回帰モデルを用いて、背擦り木にとって重要な地理条件を決定する。また、ここで明らかとなった立地条件をもとに、間伐材を用いた偽木を設置し、背擦り行動が誘導できるかどうか検討した。	
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 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：佐藤 喜和

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

ヒグマは、その行動圏内の樹木に対し、幹を爪でひっかく、噛む、樹皮を剥ぐ、身体を擦りつけるといった行動（背擦り行動）をすることが知られている。これまでの研究から、特定の木が複数年にわたって利用されること、複数の個体が同じ木を利用すること、背擦り行動の頻度はヒグマが冬眠から醒める4月以降増加し、6-7月にかけてピークを迎えその後減少することなどがわかってきた。この時期はヒグマの発情期と一致していることから、ヒグマの背擦り行動には繁殖に関わる個体間の意思伝達の役割があるのではないかと考えられている。

本研究では、背擦り木の選択性について、背擦りに用いられる木と用いられない木との木の特徴や立地条件の違いの比較から明らかにした。その結果、背擦り行動に用いられる木は、針葉樹に多く、特にトドマツを選択的に利用していることが明らかとなった。また、多変量ロジスティック回帰分析の結果、背擦りに用いられる木は、胸高直径が太く、ヒグマの通り道と近接していて、背擦り面側の地面の角度が緩やかな木に多いことが明らかとなった。こうした木の特徴は、頻繁に背擦りが行われる木ほどはっきりと見られた。背擦り木の立地条件の特徴は、通り道を通過するヒグマにとって擦りやすいことを意味していると思われる。

現在北海道では、ヒグマによる人身事故や農業被害など軋轢問題が増加しており、この軽減が大きな課題とされている。一方軋轢減少策として有害駆除が盛んに行われており、一部地域では地域個体群の絶滅が懸念されている。このような中、駆除数の上限設定に関連してヒグマの生息数モニタリングの必要性が強く叫ばれているが、広範囲で実現可能なモニタリング手法はまだ模索中である。ヒグマの背擦り行動に際しては、背擦り木に体毛が残されることがわかっており、この体毛からDNAを抽出することで個体識別が可能である。また背擦り行動はヒグマが自発的に行う行動であり、頻繁に行われる場所がほぼ決まっているために、体毛試料の回収は容易である。今回の研究を通じて明らかとなった背擦り木の立地条件に関する知見により、今後、他の地域でも背こすり木の発見が容易になり、広い範囲で簡便にヒグマの個体数モニタリングができるようになる可能性がある。

さらに、今回明らかになった特徴を利用して、背擦りに適しているが、適当な木が無いために背擦りが行われていない場所に偽木を設置することで、ヒグマの背擦り行動を誘導できるようになれば、背擦り木が無い地域も含めた広域モニタリングが可能となる可能性がある。そこで、背擦り木の立地条件を参考に、カラマツ間伐材製の杭（直径10cm、長さ2m）を設置し、背擦り行動を誘導できないか検討した。


11 本の偽木を設置し、そのうち1カ所で背擦り行動が観察され、個体識別に用いる体毛を回収することができた。設置日数当たりの体毛回収率は大変小さいが、偽木を用いて背擦る行動を誘引できる可能性は示された。今後、より効率的な背擦り行動の誘発を行うために、偽木の太さや長さ、偽木に含ませる様々な年齢クラスのヒグマの匂いや、ヒグマの好む針葉樹の匂いなどを検討していく必要がある。

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 21 日

日本大学 総長 殿

氏 名 高 橋 令 

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"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	アンモニア酸化菌におけるウレアーゼ発現機構の解明	
3 研究目的	申請者らは、既に酸性硫酸塩土壌より、ウレアーゼ産生株を新規分離しており、単一菌としての生理・生化学的特性について明らかにしてきた。AOB は窒素源であるアンモニアの飢餓環境等への適応あるいは耐酸性の獲得等への対処としてウレアーゼ活性を発現させている。本研究では、種々の環境ストレスに対していかなるメカニズムにより AOB の本酵素が発現するのかを解明することを目的とした。	
4 研究概要	リアルタイム逆転写 PCR により、 <i>Nitrospira</i> sp. 17SS 株のウレアーゼの発現をコードする <i>ureC</i> 遺伝子は、ウレアーゼの必要性の有無に関わらず定常的に発現していることが認められた。加えて、本菌株は酸性環境から分離されているにも関わらず、培養環境が弱アルカリから中性付近の場合に <i>ureC</i> 遺伝子の発現が高くなる傾向を示した。	
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：高橋 令二

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究にさきがけて、既に申請者らのグループにより、タイの酸性硫酸塩土壌を分離源とした純粋分離が行なわれ、特にウレアーゼ活性の高いネムノキ栽培土壌（pH 3.0）からアンモニア酸化菌（AOB）*Nitrosolobus* sp. 17SS 株が得られていた。本研究ではこの *Nitrosolobus* sp. 17SS 株（以下 17SS 株）を中心に解析を行った。

ウレアーゼの発現は、ライトサイクラーによる定量 PCR（qPCR）により解析した。すなわち、ウレアーゼの γ サブユニットである UreC をコードする *ureC* 遺伝子領域、アンモニアモノオキシゲナーゼをコードする *amoA* 遺伝子、そして 16S rRNA 遺伝子の mRNA を指標として、培養系より mRNA を抽出、RT-PCR、cDNA 合成の後、その分子数を測定する定法を用いた。

17SS 株を、窒素源として硫酸アンモニウムのみ、あるいは尿素のみとし、それぞれ pH4.0~8.0 に調整した合計 10 種類の各種培養環境において培養を行った。培養期間は 20 日間とした。生育の確認として Griess-Ilosvay 法に準じた亜硝酸生成量の測定を行い、亜硝酸生成量を指標とした生育曲線を作成した。培養の結果、尿素を唯一の窒素源とした系では、pH8.0 でもっとも良好な生育を示した。硫酸アンモニウムを唯一の窒素源とした系でも pH8.0 で良好な生育を示すという類似した結果となった。また、生育の立ち上がりは硫酸アンモニウムを窒素源とした系の方が早いという結果となった。なお、pH4.0~5.0 の酸性条件下では生成された亜硝酸が不安定となり、亜硝酸生成量を指標とした生育測定は困難となるため、16S rRNA 遺伝子の変動を生育の指標とした。

生育試験と並行してそれぞれのサンプルから一定日数ごとに mRNA の抽出を行った。得られた mRNA をもとにリアルタイム逆転写 PCR による *ureC* 遺伝子、*amoA* 遺伝子、および 16S rRNA 遺伝子の定量解析を行った。硫酸アンモニウムを窒素源とした場合、pH5.0~8.0 では *amoA* の mRNA は *ureC* と比較して約 100 倍の発現量を示した。そして生育の指標である 16S rRNA の発現量と相関して *ureC*、*amoA* においても pH8.0 でもっとも高い発現量を示した。しかし、pH4.0 では、*ureC*、*amoA* 遺伝子は検出限界以下であり、16S rRNA 遺伝子は培養 5 日目まで発現が確認できた。尿素を窒素源とした場合、pH5.0~8.0 では *amoA*、*ureC* 領域の mRNA の発現量に大きな差は確認されなかった。そして生育の指標である 16S rRNA の発現量と相関して *ureC*、*amoA* においても pH8.0 でもっとも高い発現量を示した。しかし、pH4.0 では *ureC*、*amoA* 遺伝子は検出限界以下であり、16S rRNA 遺伝子は培養 5 日目まで発現が確認できた。

また、本菌株においては、硫酸アンモニウム、尿素が共存する場合、硫酸アンモニウムの方が窒素源として優先的に使われていると示唆されるデータも得られている。

一方硫酸アンモニウムのみ、尿素のみ、そして尿素と硫酸アンモニウムを共存させた系列の 3 種類を窒素源として用いた培養系で、17SS 株と標準菌株として *Nitrosolobus multiformis* ATCC25196 株についてそれぞれ異なる pH(4~8)での各遺伝子の発現と生育との相関について検討した。標準環境由来の *N. multiformis* 株もウレアーゼを構成酵素として利用しているが、培地中の基質の変化に影響を受けることが示唆された。このことが、生息環境によるウレアーゼ発現の相違を説明する 1 つの要因となり得る可能性が示唆された。

以上より、リアルタイム逆転写 PCR により、*Nitrosospira* sp. 17SS 株のウレアーゼの発現をコードする *ureC* 遺伝子は、ウレアーゼの必要性の有無に関わらず定常的に発現していることが認められた。尿素のみを窒素源とした場合に *ureC* 遺伝子発現量の増加が認められた。加えて、酸性環境から分離されているにも関わらず、本菌株は弱アルカリから中性付近で *ureC*、*amoA*、16S rRNA 各遺伝子の発現が高くなる傾向を示した。また、本菌株が優先的に利用する窒素源は硫酸アンモニウムであることが示唆された。また、17SS 株と *N. multiformis* 株に培養的側面からの大きな違いは見出せなかった。だが、酸性環境由来の 17SS 株はウレアーゼを構成酵素として利用し、培地中の基質変化に影響を受けないことが示唆された。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22年 4月 20日

日本大学 総長 殿

氏 名 野口 章



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"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	カドミウム汚染米産出水田土壌の迅速判定法の開発	
3 研究目的	植物のカドミウム (Cd) 吸収性は土壌の酸化還元電位によって容易に変化するため、水田土壌の Cd 汚染判定には土壌分析を適応できず、産出される玄米中の Cd 濃度によって規定される。したがって Cd 汚染米の産出は、労力的、エネルギー的、時間的なロスを生ずる。本研究では、土壌中の可給性養分の判定法として申請者らが提案した「導管液法」を利用し、水田土壌の Cd 汚染米産出の可能性をより早い時期に、迅速に判定することを目的とする。	
4 研究概要	0、3、30 mgkg ⁻¹ のカドミウムを添加した土壌を用いて、異なる水管理法（常時湛水および幼穂形成期以降落水）で水稲をポット栽培し玄米を得た。このとき、1.水稲株脇に同時栽培したヘチマ幼植物から得た導管液、2.ポット土壌からポーラスカップで採取した土壌溶液、3.ポットから採取した土壌の溶媒抽出液中のカドミウム濃度を、苗移植時、幼穂形成期、出穂期にそれぞれ分析し（1.導管液法、2.土壌用液法、3.溶媒抽出法）、玄米中カドミウム濃度との相関から、各方法で玄米中カドミウム濃度の判定が可能か否かを検討した。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・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：野口 章

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

● 水管理の差異に基づく玄米中カドミウム濃度の相違

3 および 30mgkg⁻¹カドミウム添加時の玄米中カドミウム濃度は、常時湛水処理では 2.22 および 3.88mgkg⁻¹、幼穂形成期以降落水処理では 3.12 および 4.03mgkg⁻¹であり、落水処理により玄米中カドミウム濃度が高くなる従来知見通りの結果を得た。

● 導管液法、土壤溶液法、溶媒抽出法により得られるカドミウム濃度

表記のいずれの方法で得られるカドミウム濃度とも、添加濃度の高い方が高かった。さらに以下の諸点を認めた。

各種方法で得られるカドミウム濃度は当然のことながら異なる画分であり、導管液法<<土壤溶液法、また溶媒抽出法間では水抽出<硝安抽出≦酢安抽出<EDTA抽出<塩酸抽出であった。

ヘチマ導管液および土壤溶液中のカドミウム濃度は、水稻栽培時の水管理法の差異を反映し、常時湛水処理すると幼穂形成期以降落水処理したものより低かったが、溶媒抽出法で得られたカドミウム濃度には、いずれの溶媒であっても水管理法の差異はほとんど反映されなかった。土壤中のカドミウムを溶媒で抽出する際には土壤の風乾が求められ、また抽出操作自体は還元的に行なわれるため、土壤採取時の土壤水分（酸化還元電位）に基づくカドミウムの吸収性を反映した値を得ることは困難である。

常時湛水区では、栽培期間が後になるほど上記カドミウム濃度が低くなる傾向にあった。湛水期間の長期化により土壤の還元が進行したためと考えられる。

● 導管液法、土壤溶液法、溶媒抽出法により得られるカドミウム濃度と玄米中カドミウム濃度との関係

表記の各カドミウム濃度と玄米中カドミウム濃度との関係を、異なる水管理ごとに見れば、いずれも正比例し、相関係数は 0.6 以上を示すことが多かった。ところが常時湛水処理と幼穂形成期以降落水処理のデータを合すると、相関係数はほとんどの場合低下した。しかしながら、幼穂形成期の導管液法で得られたカドミウム濃度と玄米中カドミウム濃度との間には、常時湛水処理と幼穂形成期以降落水処理のデータを合しても高い正の相関（ $r=0.92$ ）が認められた（下表太枠内）。いま、ある方法で玄米中のカドミウム濃度を予測できるのならば、土壤条件にかかわらず、玄米中カドミウム濃度とその方法により得られたカドミウム濃度との関係式が等しく、その推定誤差も小さくなるはずである。水管理法の差異にかかわらず、幼穂形成期の導管液法で得られたカドミウム濃度と玄米中カドミウム濃度間の相関係数が大きいことはそれを示している。したがって、幼穂形成期の土壤から導管液法によりカドミウムを抽出しその濃度を測定することにより、カドミウム汚染米産出の有無を判定し得ると考えられる。

● まとめ

幼穂形成期の水稻株周囲にヘチマ幼植物を栽植し、得られるヘチマ導管液のカドミウム濃度から、カドミウム汚染米産出の有無の判定が可能であると考えられる。

本研究では、高濃度のカドミウム汚染米を産出するような条件を与えたので、さらに低濃度条件での導管液法適用の有用性を確認している。

表 導管液法、土壤溶液法、溶媒抽出法により得られるカドミウム濃度と玄米中カドミウム濃度間の相関係数

	相関係数 計算時に 使用した データ	導管液法	土壤溶液法	抽出法				
				水	硝安	酢安	EDTA	塩酸
苗移植時 ¹⁾		- ³⁾	0.733	0.545	0.618	0.629	0.627	0.624
幼穂形成期	湛 ²⁾	0.952	0.172	0.657	0.783	0.769	0.876	0.776
	落 ²⁾	0.893	0.942	0.432	0.685	0.757	0.668	0.681
	湛+落 ²⁾	0.924	0.723	0.517	0.632	0.656	0.611	0.621
出穂期	湛	-0.619	0.814	0.912	0.823	0.867	0.877	0.805
	落	0.965	0.905	0.148	0.675	0.620	0.690	0.675
	湛+落	0.497	0.726	0.545	0.623	0.635	0.631	0.602

¹⁾苗移植時は全て湛水処理。

²⁾湛=常時湛水処理のデータのみ、落=幼穂形成期以降落水処理のデータのみ、湛+落=左記両データ合算

³⁾苗移植時に水稻株脇で栽植したヘチマ幼植物の生育が不良であったため、必要量の導管液を収集できなかった。幼穂形成期、出穂期には栽培法を改良した。

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 12 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 山谷 吉 樹



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"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	わが国における愛玩動物における受動喫煙の現状把握	
3 研究目的	ヒトにおける受動喫煙に対する認識が高まる中、われわれ獣医師が対象としている動物への影響、すなわち動物に関する事象は知られていない。そこで、この研究ではわが国における愛玩動物の受動喫煙の状況を把握し、環境汚染、飼主の生活状態、動物の健康状態を把握し、動物の生活環境を改善し、人間と動物が関わる福祉の改善へ貢献・寄与することが目的である。	
4 研究概要	タバコのニコチンは体内に入ると代謝され、いくつかの代謝産物となり尿中に排泄される。その中で主要な代謝物がコチニンであり、ニコチンに比べ体内に長く存在することから、ヒトの喫煙マーカーとして利用されている。この研究では、これと同じ測定系を利用して動物について調査する。	
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：山谷吉樹

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

図1は下部呼吸疾患を有するイヌ64頭、ネコ18頭について血清中コチニン濃度を測定した結果である。

血清中コチニン濃度により受動喫煙が成立していないI群（G1）、わずかに受動喫煙が生じているレベルII群（GII）、ヒトでは循環・呼吸器などに何らかの影響が生じるレベルIII群（GIII）、ヒトのヘビースモーカーと同等のレベルIV群（GIV）に分けて比較すると、約4割のイヌもしくはネコに受動喫煙が成立しており、ヒトのヘビースモーカーと同等な状況（GIV）にある動物が3頭（3.7%）、存在した。

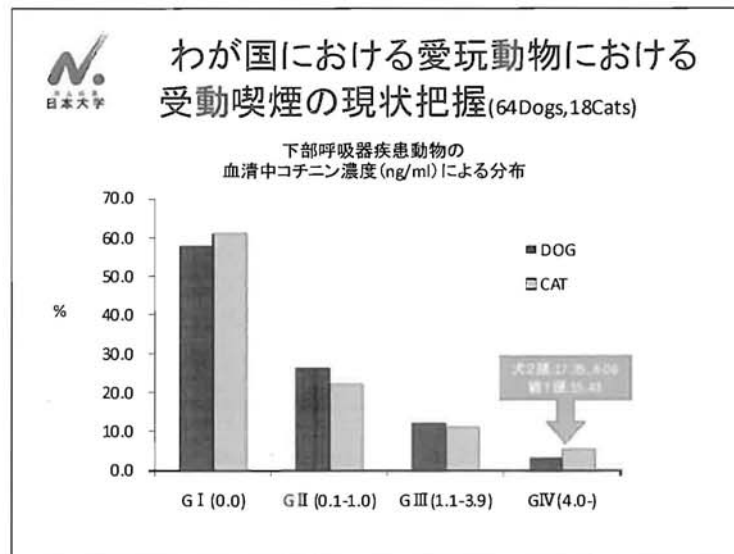


図1. 下部呼吸器疾患動物の血清中コチニン濃度による分布

図2は受動喫煙が成立しているGIIからGIV（イヌ27頭、ネコ7頭）について、細菌性肺炎、間質性肺炎、慢性気管支疾患、腫瘍性肺炎の疾患別に分類し検討した結果である。

イヌおよびネコともに慢性気管支疾患の発症率が高いことが示された。またGIVのイヌおよびネコはすべて腫瘍性肺炎疾患を有する結果となった。

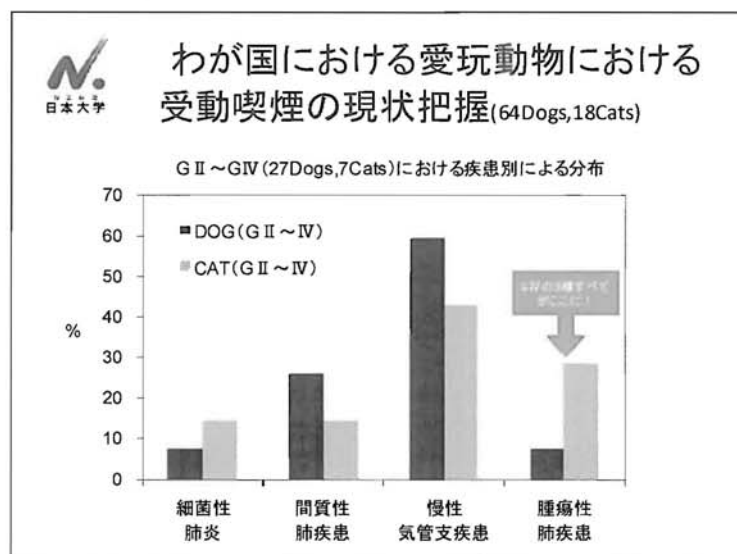


図2. G II ~ G IVにおける疾患別による分布

部科校名：生物資源科学部

氏名：山谷吉樹

研究結果（つづき）

図3はG Iを対照群としてオッズ比をもとめ、受動喫煙のレベルと疾患の関係を統計学的に検討した結果である。

イヌでは受動喫煙のレベルにより特異的な疾患を引き起こすことはないが、ネコでは受動喫煙が成立することで約10倍の確率で慢性気管支疾患や腫瘍性肺疾患を引き起こす可能性が高くなることが統計学的に示された。

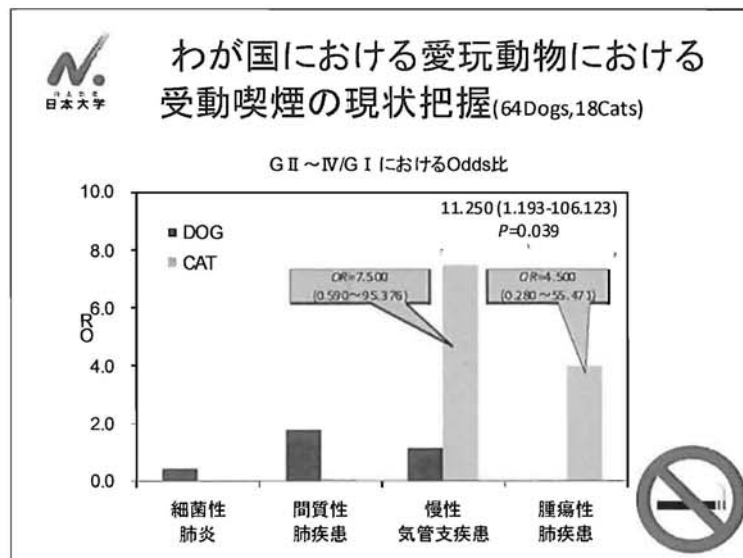


図3. GII～IV/GIにおけるオッズ比

以上の結果をふまえ今後はさらに検討・考察を加えて学会などに公表する予定である。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 27 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 加納 暉



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"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	牛乳房炎の原因菌であるプロトテカの疫学調査	
3 研究目的	<i>Prototheca zopfii</i> による牛の乳房炎は、同一牛舎内での集団感染がしばしばおこり、発症すると効果的な治療法が無いため、対策として淘汰処分しかなく酪農家にとって致命的な疾患である。今まで感染経路として、牛舎環境中からの感染が推測されているが、明らかになっておらず、効果的な予防法が確立されていない。そのため、本疾患の感染源および感染経路の解明を行うため疫学調査を愛知 NOSAI の協力のもと実施した。	
4 研究概要	今回、愛知 NOSAI と共同研究のもと、 <i>P. zopfii</i> 感染牛および飼育環境中から菌分離を行い、Genotype の同定を行い、病原株と Genotype との関係や、感染源の特定を行う。次に病原株の薬剤感受性試験を行い効果的な予防法の検討を行う。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・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：生物資源科学部

氏名：加納 暉

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

P. zopfii の遺伝子タイピング1) *Prototheca* 属菌株

愛知県の農場でプロトテカ乳房炎と診断し、症例を異にする慢性乳房炎乳汁由来 10 株、農場を異にする牛舎環境由来株 11 株を無作為に抽出し、被験株とした。

2) 形態観察、炭素源資化試験

Prototheca isolation medium (PIM) 上で培養 (37°C、48 時間) した単一集落を釣菌、ラクトフェノールコットンブルー染色後、光学鏡検 (×400) した。同定検査として、Glucose、Galactose、D (-) fructose、1-propanol、Trehalose、Ethanol、Glycerol に対する資化試験を行った。

3) *P. zopfii* 遺伝子型の解析

18S ribosomal DNA 領域特異的プローブおよび方法 (Roesler ら、2006) に従い、被験株の遺伝子型を比較、検討した。

4) 26S ribosomal DNA D1/D2 領域系統学的解析

Prototheca 属菌に特異的な D1/D2 domains of the 26S ribosomal DNA プライマーを作製した。被験株の抽出 DNA について PCR を施し、塩基配列から系統樹を作製、比較した。

被験株は、無莢膜楕円形で、直径 8.5 μm 以上の Dauer cell を含有する構造を呈し、形態的に *P. zopfii* と一致した。資化試験の結果、牛舎環境由来の 1 株 (*P. blaschkeae*) 以外 *P. zopfii* と一致した。乳汁由来 10 株は、全て *P. zopfii* genotype 2 であった。環境由来株は全て *P. zopfii* genotype 1 であった。資化試験での *P. blaschkeae* 疑診株は、18S ribosomal DNA 領域における遺伝子型解析でも同定不能であった。塩基配列 (26S ribosomal DNA D1/D2 領域) に基づく系統樹作製の結果、被験株は、genotype 2 (乳房炎由来株 10 株)、genotype 1 (環境由来株 10 株) および未定型 (遺伝子型不定の 1 株と *P. blaschkeae* の標準株) の三クラスターに分かれた。

P. zopfii 分離株の病原決定法に、26S ribosomal DNA D1/D2 領域の系統解析は有用と考える。また、病原株の乳汁由来株のみに偏在する傾向は、本菌種による牛乳房炎の発生経路に関し、人為的伝播の可能性も視野に入れた疫学的調査の必要性を示唆すると考えた。今回の調査では、従来環境中から感染すると考えられていたが、環境中に存在するプロトテカと乳房炎由来株は、明らかに遺伝子型が異なることから、牛に常在するプロトテカが乳房炎に日和見感染すると考えられた。本疾患の防除法を確立するためには、さらに感染源および感染機構の解明が必要である。

以上の結果については、学術雑誌 Journal of Veterinary Medical Science. 2010. 72:123-126. にて発表を行った。

部科枝名：生物資源科学部

氏名：加納 壘

研究結果（つづき）

P. zopfii の薬剤感受性試験

上記の遺伝子タイピングで使用した慢性乳房炎乳汁由来 10 株 (genotype 2)、農場を異にする牛舎環境由来株 10 株 (genotype 1) をそれぞれ、簡易薬剤感受性試験法である E-test を用いてプロトテカに抗菌活性が報告されている、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、イトラコナゾール (ITZ) に対する発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

その結果、牛舎環境由来株 10 株の薬剤に対する平均 MIC は、GM: 2.2 $\mu\text{g/ml}$ (1-4 $\mu\text{g/ml}$)、KM: 14 $\mu\text{g/ml}$ (2-32 $\mu\text{g/ml}$)、ITZ: >14.4 $\mu\text{g/ml}$ (1->32 $\mu\text{g/ml}$) であった。

慢性乳房炎乳汁由来 10 株の薬剤に対する平均 MIC は、GM: 10 $\mu\text{g/ml}$ (4-16 $\mu\text{g/ml}$)、KM: 22.7 $\mu\text{g/ml}$ (8-32 $\mu\text{g/ml}$)、ITZ: >17.3 $\mu\text{g/ml}$ (1->32 $\mu\text{g/ml}$) であった。

このことから、慢性乳房炎乳汁由来株 (genotype 2) は、牛舎環境由来株 10 株 (genotype 1) に比べて、薬剤感受性が低く、これが乳房炎治療を困難にしている原因の一つと考えられた。今回が初めて遺伝子型による薬剤感受性試験を行ったところ、明らかに薬剤感受性に差があることが判明し、遺伝子タイピングが本疾患の防除および治療に対して重要であることが示唆された。

薬剤感受性試験については、国際学会 The 17 th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (IHSAM 2009) 2009 年 5 月 25-29 日、新宿にて発表を行った。さらに学術雑誌へ投稿準備中である。


今後、遺伝子タイピングを応用しながら、本邦におけるプロトテカ乳房炎の疫学調査を全国的に行い、本疾患の感染機構の解明と防除法の確立を目指して研究を続ける予定である。さらに、治療法も確立するために、慢性乳房炎乳汁由来株 (genotype 2) に対する効果的な治療薬の検索を行い、本邦の畜産業の発展に寄与していきたいと思う。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年4月20日

日本大学 総長 殿

氏 名 松本 淳  印

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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	近交系マウスモデルを用いたエキノコックス症の病態解析と宿主抵抗性遺伝子特定の試み	
3 研究目的	エキノコックス症は、世界的規模で深刻な被害をもたらしている人獣共通寄生虫症である。本症では、幼虫期のエキノコックスが人体の肝組織内で増殖することにより、人や動物に致死的な病害をもたらす。本研究の目的は、遺伝的背景が明らかな近交系マウスを用いたエキノコックス症実験動物モデルにおける感染後の病態を経時的に比較観察し、得られた結果を遺伝学的に解析することにより、同症に対する宿主抵抗性に関わる遺伝子座を明らかにすることである。本研究の成果をもとに、エキノコックス感染に対する防御に機能する宿主側のファクターについて考察するとともに、エキノコックス感染に高感受性を示す遺伝的ハイリスクグループの特定につながる基礎知見を集積することを目指す。	
4 研究概要	人体エキノコックス症の実験動物モデルとして、4種類の近交系マウスに対してエキノコックス幼虫を実験感染させ、その後の虫体発育と宿主抗体応答を経時的に観察した。その結果、DBA/2 マウス体内では虫体発育が活発であったのに対して、C57BL/10 マウスにおける虫体発育は抑制されていた。一方、エキノコックス由来分子5種の組換え抗原に対する抗体応答を観察した結果、マウス系統間に差がみられた。特にDBA/2 マウスは他の3系統とは異なる抗体応答を示し、エキノコックス感染に対する感受性との関連が示唆された。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 ・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： 松本 淳

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

1. エキノコックス症マウスモデルにおける病態解析と抵抗性因子の遺伝学的解析

遺伝的背景の異なる 4 種類の近交系マウス (DBA/2、AKR/N、C57BL/6、C57BL/10) に対して、エキノコックスを人工感染させ、宿主体内における虫体の定着と増殖を感染後 16 週目まで経時的に比較観察した。感染には、各マウスに虫卵 200 個ずつを経口投与した。虫卵投与後 4 週間目に、感染マウスを剖検して宿主マウスの肝臓における虫体定着率を算出した結果、DBA/2 マウス (71.0%) で最も高く、次いで AKR/N マウス (45.1%)、C57BL/10 マウス (31.6%)、C57BL/6 マウス (19.7%) の順となった。

次に、感染後 16 週目のマウス体内におけるエキノコックス幼虫の発育を組織学的に観察した。DBA/2 マウス由来虫体では、幼虫の体内に多数の成熟原頭節が形成されており、中間宿主体内における発育が完了した成熟虫体の状態であった。原頭節は、幼虫が終宿主動物に摂食された際に成虫へと発育していく重要な構造である。一方、AKR/N マウス由来虫体では、形成途中の未熟な原頭節がまばらに存在する状態であった。また、C57BL/10 マウスおよび C57BL/6 マウス由来虫体では、原頭節の形成がまったく認められなかった。以上のように、各近交系マウス体内におけるエキノコックス幼虫の定着と発育には、系統間で明らかな違いが認められ、DBA/2 マウスはエキノコックス感染に対して高感受性系統、C57BL/6 マウスおよび C57BL/10 マウスは抵抗性系統であることが明らかとなった。

以上の結果をふまえ、DBA/2 マウスおよび C57BL/10 マウスを交配して得られた F1、およびこの F1 を DBA/2 マウスに交配して得られたバッククロスマウスを用いて、上記と同様の感染実験を実施し、虫体の定着と発育を観察した。現在、マウス肝臓における虫体の定着率、および虫体内に形成された原頭節の数を指標として遺伝学的解析 (QTL 解析) を進め、虫体の定着と発育に対する抵抗性に関わる責任遺伝子 (群) の特定を目指している。

2. エキノコックス感染に対する抵抗性と主要抗原に対する抗体応答の比較解析

上記感染実験により得られたマウス血清を用いて、種々のエキノコックス抗原に対する宿主抗体応答の経時変化を調べた。はじめに、エキノコックス幼虫から作製した虫体可溶性抗原に対する IgG および IgM 抗体価を測定した。その結果、いずれの系統のマウスもほぼ同様の推移を示し、虫卵投与後 9 週目以降に明らかな抗体価上昇を示した。そこで、エキノコックス幼虫からクローニングされた 5 種類の主要な分子 (EM95、14-3-3、EMY162、II/3、AgB1) の組換えタンパクを作製し、これらに対する抗体価の推移を観察した。その結果、各組換えタンパクに対する抗体価の推移は、マウス系統ごとに明らかに異なる動態を示した。特に、エキノコックス感染に対して高感受性を示した DBA/2 マウスでは、14-3-3 を除く 4 種の組換え抗原に対して顕著な IgG 応答を示したのに対して、同じ組換え抗原に対する IgM 抗体価は虫卵投与後 16 週目でもきわめて低いレベルのまま推移した。一方、抵抗性系統である C57BL/6 マウスおよび C57BL/10 マウスでは、IgG 抗体応答よりも IgM 抗体応答の方が優位であった。以上の結果から、エキノコックス感染に対する抵抗性と、主要な虫体分子に対する抗体応答には何らかの関連があることが示唆された。

本研究で得られた知見をもとに、エキノコックス感染に対する宿主の抵抗性と感受性を決定するファクターについて、遺伝学的および免疫学的アプローチによる解析をさらに進め、エキノコックス感染に対する新たな制御法の開発に結びつけたい。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年04月23日

日本大学 総長 殿

氏 名 _____ 佐野 忠士



所属・資格 _____ 生物資源科学部・助教

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	麻酔薬の生体免疫機能に及ぼす影響に関する臨床的研究	
3 研究目的	実際の小動物臨床の現場において実施される各種検査時および治療時における麻酔法が生体に及ぼす様々な影響について炎症性サイトカインなどの変動を中心に検討し、麻酔管理が疾病を有する動物の長期予後に及ぼす影響についての基礎的データを取得する。	
4 研究概要	日本大学動物病院 (Animal Medical Center; ANMEC) に来院し全身麻酔管理下において各種検査および手術をはじめとする各種治療を実施した臨床例より経時的に採血 (静脈) を行い、血中コルチゾール濃度、IL-6 濃度および酸化ストレス値を測定し、検査内容および治療法が患者生体におよぼす影響についての基礎的データを取得する。	
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：佐野 忠士

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

対象症例としては手術症例 15 例、検査・治療 (CT/MRI/抗がん剤投与) 症例 7 例であった。いずれの症例も橈側皮静脈に留置針を設置し、薬剤および輸液剤の投与を行った。測定のための採血は左右頸静脈より行い、採血直後に遠心分離により血漿に分離し-80℃で測定まで凍結保存した。

採血時間は麻酔前、麻酔開始 1 および 2 時間後、麻酔/手術終了時 (抜管時)、手術終了 6、12、24、48、96 時間後とし、それぞれの時点における酸化ストレス度 (%)、血中コルチゾール濃度および血中 IL-6 濃度の測定を行った。

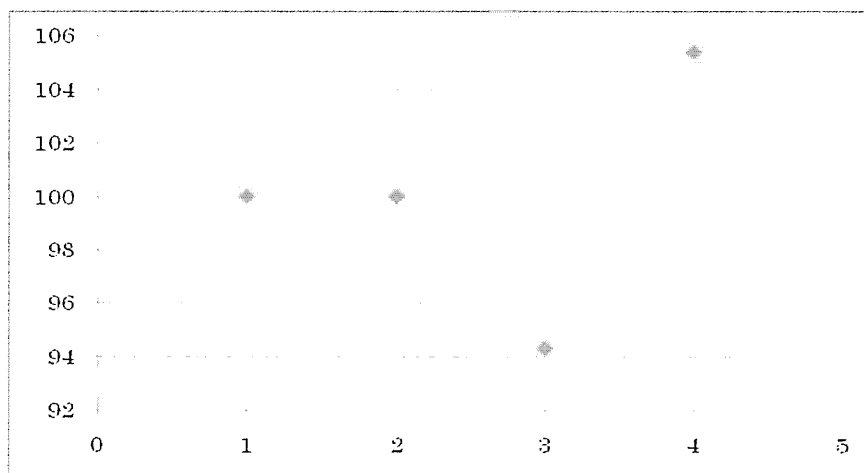
検査・治療症例においては、いずれの測定項目も検査前と検査後の値に変化は認められず麻酔・処置が今回の測定項目に及ぼす影響は最小であると考えられた (図 1)

手術症例においては、いずれの測定項目も類似の変動をとり、手術前と比較して手術・麻酔中は低値を示し、手術・麻酔終了直後より上昇が認められたのち時間経過に伴い減少する傾向が認められた (図 2~4)。しかし酸化ストレス度 (図 4) については、手術終了後、時間の経過に伴い上昇する傾向が認められ、手術・麻酔が生体へ及ぼす「ストレス」において独自の項目を反映している可能性が示唆された。

今後は、さらに症例数を増やしデータの精度を高めるとともに独自の変動を示す可能性が示唆された酸化ストレス度についてより詳細に検討し、麻酔・手術に伴う動物の「ストレス」を最小限にすべく小動物臨床における広角的な麻酔・疼痛管理について検討していく予定である。

図 1 ; 検査・処置症例における酸化ストレス値の変動

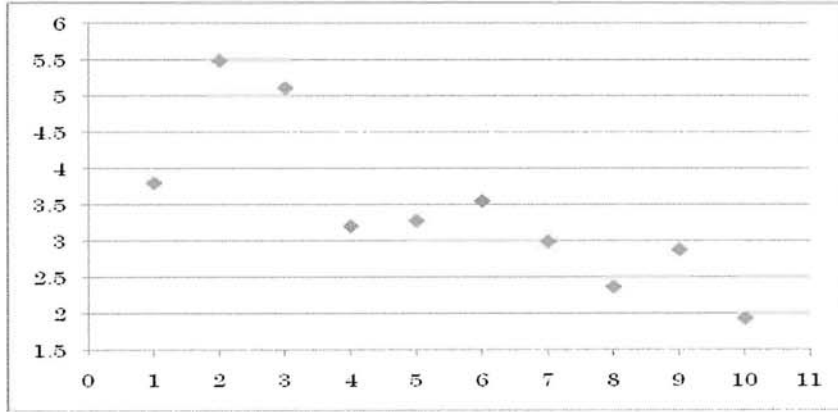
麻酔前の値を 100% とし、処置後における変動率で表示してある



- 1 ; 処置・治療前
- 2 ; 処置・治療中
- 3 ; 処置・治療終了直後
- 4 ; 処置・治療終了 2 時間後

研究結果（つづき）

図 2；手術症例におけるコルチゾール濃度の変動



- 1；麻酔前
- 2；麻酔開始1時間
- 3；麻酔開始2時間
- 4；麻酔・手術終了時
(抜管時)
- 5；手術終了6時間後
- 6；手術終了12時間後
- 7；手術終了24時間後
- 8；手術終了48時間後
- 9；手術終了72時間後
- 10；手術終了96時間後
- 11；手術終了120時間後

図 3；手術症例における IL-6 濃度の変動

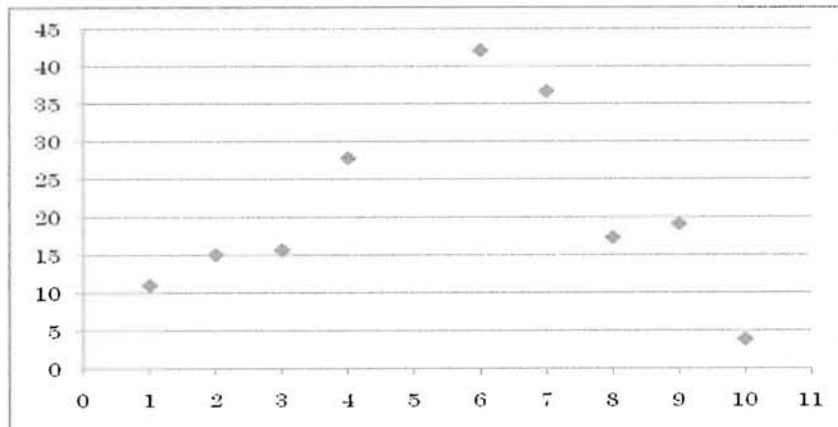
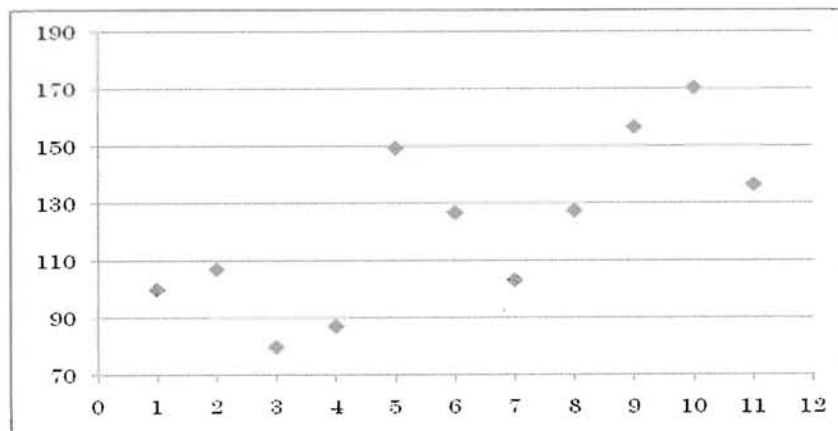


図 4；手術症例における酸化ストレス値の変動

麻酔前の値を100%とし、麻酔・手術後における変動率で表示してある



注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 23 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 須永 豊



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) / 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	クラシックブルースに存続する西アフリカの哲学的伝統“nommo”について	
3 研究目的	本研究の目的は、ジャズの一つの源泉であるクラシックブルースに見られる西アフリカの哲学的伝統を明らかにし、究極的にはアフリカに遡る口承文化伝統の中にジャズを位置づけることである。また、アフリカ系アメリカ文化におけるジャズの重要性や、その歴史において軽視されがちである女性がいかに重要な貢献をしているかをより明らかにしたい。	
4 研究概要	命名、言及などの行為にまつわる言葉の魔力“nommo”が、アフリカの哲学に照らしてどのような意義を持つのかを明確にし、それが“Countin' the Blues”等の歌詞やMa Raineyらによるパフォーマンスにどのように活かされているかを分析したい。そうすることで、クラシックブルースにアフリカの哲学的伝統がどのように存続しているかを明らかにし、その意義を考える。	
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：須永 豊

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

研究計画当初は“nommo”というアフリカ哲学の一概念を説明した上で、それがブルース楽曲に活かされている具体例を同一論文中で検討することを考えていた。しかしながら、アフリカの哲学・世界観を西洋のそれと対比する先行研究 Jahn (1961) を検討した結果、アフリカ文化を外部の世界観や価値観によって一面的に判断することや、一部のみに焦点を絞りそれを抽出することは「全体の構造を麻痺させてしまう」ことにつながる危険があること、また、特定の文化的要素を異文化の言語で記述し考察するには、予想以上に慎重さを必要とすることがわかった。

従って、当助成金の直接的研究成果としての論文においては、アフリカ哲学をより慎重に扱い、その概略的全体像を得た上でそこに“nommo”を見出し、位置づけることに主眼を置くべきであり、ブルース楽曲の具体例を詳細に検討するには、稿を改めたほうが良いという結論に至った。

上記の判断にもとづいて、現在、論文を執筆中であるが、その論拠として重要な役割をすることになると思われる引用（原文）のいくつかを示す。

- In modern times, God even has no place in scientific thinking. This was impossible to the Yorubas since from the Olodumare an architectonic of knowledge was built in which the finger of God is manifest in the most rudimentary elements of nature. Philosophy, theology, politics, social theory, land law, medicine, psychology, birth and burial, all find themselves logically concatenated in a system so tight that to subtract one item from the whole is to paralyse the structure of the whole. (Adesanya quoted in Jahn 1961, 97.)
- Everything there is must necessarily belong to one of these four categories and must be conceived of not as substance but as force. Man is a force, all things are forces, place and time are forces and the ‘modalities’ are forces. Man and woman (category Muntu), dog and stone (category Kintu), east and yesterday (category Hantu), beauty and laughter (category Kuntu) are forces and as such are all related to one another. The relationship of these forces is expressed in their very *names*, for if we remove the determinative the stem NTU is the same for all the categories. (Jahn 100.)
- NTU expresses, not the effect of these forces, but their being. But the forces act continuously, and are constantly effective. Only if one could call a halt to the whole universe, if life suddenly stood still, would NTU be revealed. The driving power, however, that gives life and efficacy to all things is Nommo, the ‘word’... (Jahn 101.)
- When a child is born to one of the living, he gives thanks to his ancestors, to whose helpful influence he owes the child. In this process the physical birth arises from the union of body and shadow, but spiritual birth from the magara-principle, the union of body and Nommo. Thus the force that goes on existing in the ancestors become active again in a living person. (Jahn 110.)

部科校名：生物資源科学部

氏名：須永 豊

研究結果（つづき）

- Naming issues that pose a threat to the physical or psychological wellbeing of individual is a central function of the blues. Indeed, the musical genre is called the “blues” not only because it employs a musical scale containing “blue notes” but also because it names, in myriad ways, the social and psychic afflictions and aspirations of African Americans. The blues preserve and transform the West African philosophical centrality of the naming process. In the Dogon, Yoruba, and other West African cultural traditions, the process of nommo—naming things, forces, and modes—is a means of establishing magical (or, in the case of the blues, aesthetic) control over the object of the naming process. Through the blues, menacing problems are ferreted out from the isolated individual experience and restructured as problems shared by the community. As shared problems, threats can be met and addressed within a public and collective context. (Davis 1998, 33)

これらの論拠をもとに、アフリカ文化・哲学の概略的全体像をまとめた上で、“nommo”がブルースに活かされている意義を考察することになるが、当研究で中心的に用いた Jahn (1961) が提示するアフリカ哲学は、アフリカにおける一つの調和としての哲学であり、その調和とは、正に調和 (“unity”) を何よりも重んじるものである、ということがわかった。アフリカ哲学は西洋のそれとは極めて異なる独特の個性、際立つ特異性を持ちながら、それにもかかわらず他と通じる側面も持つ。“nommo” という概念は、ブルース文化において極めて重要であるだけでなく、アフリカ文化の特異性に寄与しながらも、同時に異文化との接点に繋がる要素なのかもしれない。この意味で “nommo” は極めて重要なものであると思われる。

以上が現時点における「研究結果」である。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22年 3月 31日

日本大学 総長 殿

氏 名 益子 崇



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	<input checked="" type="checkbox"/> 一般研究(個人研究) / <input type="checkbox"/> 一般研究(共同研究) / <input type="checkbox"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	アミロライド誘導体による神経細胞保護効果	
3 研究目的	脳虚血時には脳脊髄液のアシドーシスや興奮性アミノ酸の細胞外遊離が起こり、酸感受性イオンチャンネル(ASIC1)や <i>N</i> -methyl-D-aspartate(NMDA)受容体を介して大量の Ca^{2+} が神経細胞内に流入し、神経細胞死が誘発される。アミロライド及びアミロライド誘導体の ASIC1 や NMDA 受容体活性に対する影響及び神経細胞保護効果の有無について検討した。	
4 研究概要	<i>Xenopus</i> 発現系を用いて、ASIC1 や NMDA 受容体活性に対するアミロライドやアミロライド誘導体の影響について二電極膜電位固定法で検討した。また、これらの受容体に顕著な阻害作用を有するアミロライド誘導体については、 <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> の脳虚血実験モデルを用いて、アミロライド誘導体の神経細胞保護効果についても検討した。	
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 ・研究分担者 (役割分担) なし	

※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： 益 子 崇

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

脳虚血状態では脳組織への酸素やグルコース供給が低下することで、アストロサイトからの過剰な興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の細胞外放出が起こる。さらに細胞外に放出された過剰なグルタミン酸は NMDA 受容体を異常に活性化することで神経細胞死を誘発する。また、脳虚血時には脳脊髄液のアシドーシスにより ASIC1 を介した過剰な Ca^{2+} の細胞内流入が神経細胞死を誘発することも報告されている。さらに、NMDA 受容体を介した Ca^{2+} 流入は CaM II kinase を活性化させ、CaM II kinase が ASIC1 または ASIC1 結合蛋白質をリン酸化することで、ASIC1 活性を増強することが示されていることから、NMDA 受容体及び ASIC1 の両受容体活性を抑制する化合物は、脳虚血時の症状悪化をより顕著に抑えることが期待される。そこで、ASIC1 及び NMDA 受容体 cRNA を *Xenopus* 卵母細胞の細胞質内にマイクロインジェクションし、数日間 19°C で培養した。細胞膜上に ASIC1 または NMDA 受容体を発現させた卵母細胞を用いた二電極膜電固定法により、アミロライド及びアミロライド誘導体の両受容体活性に及ぼす影響について検討した。その結果、アミロライド誘導体の中でも、アミロライドのグアニジル基の芳香環を付加した構造を有する benzamil ($\text{IC}_{50}=4\mu\text{M}$) や phenamil ($\text{IC}_{50}=5\mu\text{M}$) は ASIC1 活性を顕著に抑制した。その阻害作用は、アミロライド ($\text{IC}_{50}=22\mu\text{M}$) と比較して数倍強かった。また、アミロライド ($\text{IC}_{50}=117\mu\text{M}$) は NMDA 受容体活性に弱い阻害しか示さなかったが、benzamil ($\text{IC}_{50}=6\mu\text{M}$) や phenamil ($\text{IC}_{50}=15\mu\text{M}$) は顕著な阻害作用を有していた。さらに、これらのアミロライド誘導体の ASIC1 や NMDA 受容体に対する阻害作用には電位依存性が認められたことから、これらの化合物は受容体のチャンネル・ポア内部に作用するオープン・チャンネル・ブロッカーとして働くことが示された。次に、*in vitro* 及び *in vivo* 脳虚血実験モデルを用いて、アミロライド、benzamil 及び phenamil の神経細胞保護効果について検討した。ラット海馬初代培養を作製し、*in vitro* の脳虚血実験モデルと考えられている酸素/グルコース不含培地での培養 (OGD 処理) で誘発される神経細胞死に対するアミロライド及びアミロライド誘導体の神経細胞保護効果を LDH-細胞毒性テスト (Wako) を用いた LDH 放出を指標に検討した。OGD 処理により誘発される神経細胞死は、カルシウム・キレート剤である BAPTA-AM を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑えることで顕著に抑制された。この実験系で誘発される神経細胞死は、benzamil や phenamil を添加することで有意に抑制された。さらに、マウスの中大脳動脈の血流を 1 時間遮断し (MCAO 処理)、24 時間後に脳梗塞領域を TTC 染色法を用いて定量化する実験方法により、アミロライド、benzamil 及び phenamil の神経細胞保護効果について検討した。その結果、MCAO 処理 30 分前にアミロライド (10mg/kg) を前投与することでコントロール群と比較して、梗塞体積の減少傾向が認められた。また、benzamil (10mg/kg) 及び phenamil を腹腔内投与することで、脳梗塞領域が有意に減少した。これらの結果から、アミロライド誘導体である benzamil 及び phenamil は ASIC1 及び NMDA 受容体活性を抑制することで、神経細胞保護効果を示すことが考えられた。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年4月16日

日本大学総長 殿

氏名 石毛久美子



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	GR103691 の細胞死保護作用に関する研究	
3 研究目的	マウス海馬神経細胞由来の HT22 細胞において、現在、ドパミン D3 受容体アンタゴニストとして市販されている GR103691 (GR) が、虚血-再灌流障害の in vitro モデルである低酸素-再酸素化 (H/R) 誘発細胞死を抑制することを見出したが、その作用メカニズムなどについては不明なままであった。そこで、本課題においては、HT22 細胞における GR の細胞死保護作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。	
4 研究概要	HT22 細胞において、まず、GR の誘発細胞死抑制作用について、現在、脳保護薬として、我が国で臨床応用されているエダラボンと比較検討した。次に、虚血-再灌流障害には、活性酸素種 (ROS) の上昇が関与することが示唆されていることから、H/R 負荷に伴う ROS の動態を検討するとともに、GR およびエダラボンの影響について検討した。さらに、GR が H/R 誘発細胞死以外の細胞死に対して保護作用を示すか否かを明らかにするため、4-ヒドロキシノネナルまたはツニカマイシン誘発細胞死を抑制するか否かについて検討した。	
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 (☑・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：石毛久美子

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

HT22 細胞を脱酸素剤（アネロパックケンキ for cell[®]）とのインキュベートにより、18 時間低酸素処置後、再酸素化し、LDH アッセイを行ったところ、再酸素化 12 時間までは、LDH 遊離量に有意な変化は認められなかったが、再酸素化 18 時間および 24 時間後には、LDH 遊離量が有意に上昇した。また、18 時間低酸素負荷 24 時間再酸素化（H18/R24）後においては、propidium iodide (PI) 陽性細胞が認められた。これらより、HT22 細胞において、低酸素負荷（18 時間）だけでは細胞死は誘発されず、その後の再酸素化の時間に依存して誘発されることが明らかになった。そこで、この細胞死に対する GR の作用をエダラボンと比較した。GR（0.01 μM ~10 μM ）を再酸素化直前に、窒素置換したチャンバー内で低酸素状態を保ちながら添加したところ、H18/R24 による LDH 遊離量の増加は、濃度依存的に抑制され、抑制効果は、3 μM でほぼ最大となった。また、エダラボン（0.01 μM ~10 μM ）の再酸素化直前の添加によっても、LDH 遊離量の増加は、濃度依存的に抑制され、GR がエダラボンと同程度の細胞死抑制作用を示すことが明らかとなった。一方、GR と同様に D3 アンタゴニストとして市販されている nafadotoride は H18/R24 による LDH 遊離量の増加に影響を及ぼさなかった。Nafadotoride の D3 受容体に対する親和性が GR と同程度であると報告されていることと本結果より、GR の細胞死保護作用は、ドパミン D3 受容体を介したものではないと考えられた。

次に、本実験系においても、H/R 負荷により細胞内 ROS 濃度に変化が認められるか否かを検討した。細胞内 ROS の濃度を dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA)により評価したところ、低酸素 18 時間負荷後、3 時間の再酸素化により、細胞内 ROS 濃度の顕著な増加が認められた。なお、再酸素化直後には、 H_2DCFDA 陽性細胞は認められなかった。また、再酸素化 6 時間後においても、細胞内 ROS 濃度の上昇が認められたが、その濃度は、3 時間後よりは減少しており、12 時間後には H_2DCFDA 陽性細胞はほとんど認められなくなった。そこで、この ROS 上昇に及ぼす GR とエダラボンの影響を検討したところ、両薬物ともに、細胞死を顕著に抑制した 3 μM を再酸素化直後に添加すると、再酸素化 3 時間後の ROS 上昇をほぼ完全に抑制した。これらより、本実験系において、再酸素化後、細胞死が認められる前に ROS が一過性に上昇すること、および、GR は、この ROS 上昇を抑制して H/R 誘発細胞死を抑制していることが明らかとなった。

最後に、GR が H/R 誘発細胞死以外の細胞死に対しても抑制作用を持つか否かについて検討した。この検討においては、まず、HT22 細胞においては、受容体を介さずグルタチオンを枯渇させ ROS を上昇させて細胞死を誘発することが明らかになっているグルタミン酸による細胞死に及ぼす影響を調べたところ、GR は、グルタミン酸誘発細胞死を濃度依存的に抑制することが明らかになった。これに対し、膜脂質過酸化により生じるアルデヒドである 4-ヒドロキシノネナールによる細胞死に対しては、GR は、H/R 誘発細胞死をほぼ完全に抑制した 10 μM を用いても顕著な影響を及ぼさなかった。また、小胞体ストレス誘導薬のツニカマイシンにより誘発した細胞死に対しても、10 μM の GR はほとんど影響を及ぼさなかった。

以上より、GR は、HT22 細胞において、H/R およびグルタミン酸誘発細胞死を抑制すること、およびその細胞死抑制作用には、受容体は関与せず、細胞死の過程で上昇する ROS の消去作用が深く関与することが明らかとなった。

現在、虚血-再灌流障害からの脳保護薬は、有用な薬物が少ない。我が国では、エダラボンが使用されているが、有効ではない症例も多く、新規薬物の開発が望まれている。本研究結果をさらに発展させるため、現在、GR の作用を脳虚血-再灌流障害の *in vivo* モデルで検討中であるが、*in vivo* モデルにおいても抑制作用が認められている。したがって、今後、さらに、GR およびその関連化合物の細胞死抑制作用について詳細に検討を重ねることで、新規脳保護薬の開発に貢献できると考えている。

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 16 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 小菅 康弘



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	小胞体ストレス関連因子 CHOP の発現調節機構の解明とその制御による治療法の開発	
3 研究目的	アルツハイマー病などの神経変性疾患では、疾患により特定の神経細胞が傷害されることが知られている。しかし、なぜ特定の神経細胞が選択的に障害されるのかについては不明な点が多い。そこで、本研究は、細胞死に関与する転写因子の1つである C/EBP homologous protein (CHOP) に着目し、組織や細胞の種類による転写制御系およびタンパク質分解系の変化を解析することで、細胞内の CHOP タンパク質の発現調節においてカギとなる制御機構や分子を明らかにすることを目的とする。	
4 研究概要	細胞死に関与する転写因子の1つである CHOP タンパク質の発現調節機構について検討を行った。SK-N-SH (SK)と SH-SY5Y (SH)において、Tunicamycin (TM)処置による CHOP タンパク質の発現量の変化を検討したところ、SH では一過性の増加が認められたが、SK では顕著な変化は認められなかった。しかし、TM 処置による CHOP mRNA レベルの増加は両細胞において認められた。そこで、proteasome 阻害薬の1つである MG132 を処置したところ、両細胞における CHOP の発現量は顕著に増加した。特に、SK で認められる変化は顕著であった。以上の結果より、細胞により CHOP の発現量が異なる要因として、proteasome 活性の違いが重要な役割を演じていることが示唆された。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 ・ 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：小菅 康弘

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

はじめに、ヒト神経芽腫細胞である SK-N-SH (SK) とそのサブクローンである SH-SY5Y (SH) を用い、小胞体ストレス誘発薬の 1 つである Tunicamycin (TM) 処置による CHOP タンパク質の発現レベルについて検討した。両細胞において同程度の細胞死を誘発する濃度である $1 \mu\text{g/mL}$ の TM を曝露したところ、SH では、処置 6 および 12 時間後において CHOP タンパク質の発現誘導が認められたが、SK では、いずれの時間においても有意な発現上昇は認められなかった。これまで *chop* 遺伝子の発現は、小胞体ストレスセンサーとしても知られている activating transcription factor 6 (ATF6)、PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、inositol-requiring kinase 1 (Ire-1) の 3 つの分子により調節されている事が報告されている。そこで、両細胞におけるこれらのストレスセンサーの発現量について検討を行ったところ、内在性 Ire-1 の発現量は両細胞で際立った差は認められなかった。しかし、SH の内在性 ATF-6 および内在性 PERK の発現量は、SK と比較して、有意な増加が認められた。次に、両細胞における CHOP mRNA の発現変化について、Real Time-PCR 法を用いて検討を行った。TM を 8 時間処置した後の mRNA 量は、両細胞ともに顕著に増加しており、SK では無処置のコントロール群と比較して 8.7 倍、SH では 10.6 倍の増加を示した。このように、SK と SH では、mRNA 量には顕著な変化が認められないことから、両細胞間で認められる CHOP タンパク質の発現レベルの差は転写レベルで調節されているのではないことが示唆される。そこで、タンパク質の分解機構についての検討を試みた。主として、細胞内のタンパク質分解機構には、リソソーム・オートファジー系、カルパイン系、ユビキチン・プロテアソーム系などがある。そこで、TM 処置による CHOP タンパク質の誘導に、プロテアソーム阻害薬である MG132 処置が及ぼす影響を検討した。TM 単独処置による CHOP タンパク質の発現上昇が認められなかった SK では、MG132 の併用により、処置 6 時間後から顕著な発現上昇が認められ、その増加は、48 時間後まで持続した。一方、TM 曝露により CHOP タンパク質の発現上昇が生じた SH では、SK で認められたような MG132 併用による影響は処置 12 時間後まで認められなかった。しかし、24 および 48 時間後では、MG132 の併用により CHOP の分解が抑制されていることが確認された。同様に、カルパイン阻害薬であるカルペプチンが TM 処置による CHOP 誘導に及ぼす影響を検討したが、顕著な影響は認められなかった。以上の結果より、SH と SK において TM 処置による CHOP タンパク質の発現レベルが異なる原因として、プロテアソームによる CHOP の分解能の差が関与していることが示唆された。さらに、近年、Cisplatin などの抗腫瘍活性に CHOP の発現上昇が重要な影響を及ぼすことが知られている。そこで、Cisplatin が SH および SK の生存率に及ぼす影響を検討した。その結果、プロテアソームによる CHOP の分解能が高いことが示唆された SK では、分解能が低い SH と比較して、cisplatin に対する感受性が低かった。これらの結果は、細胞によるプロテアソーム活性の違いが cisplatin の抗腫瘍活性に影響を及ぼすことを示しており、cisplatin 抵抗性のメカニズムに CHOP の分解能の変化が関与することを示唆している。

神経変性疾患では、それぞれの疾患により特定の神経細胞が傷害されることが知られている。なかでも、記憶・学習に重要な部位であると考えられている海馬は、アルツハイマー病における初期の病変部位として知られているばかりでなく、脳虚血などでも障害を受けやすいことが明らかにされている。そこで、一過性前脳虚血モデルマウスを作成し、

海馬における CHOP タンパク質の経時変化を検討したところ、脳虚血・再灌流負荷 24 時間後において一過性の発現上昇が認められた。そこで、免疫組織化学手法を用いて、CHOP 発現部位について検討を行ったところ、神経細胞において高発現していることが明らかとなった (Fig. 1)。

一方、グリア細胞では CHOP の発現は認められ

なかった。このように、脳虚血障害における神経細胞の脆弱性にも、CHOP の発現変化関与している可能性が示唆された。しかし、この神経細胞とグリア細胞の CHOP タンパク質の発現レベルの差にプロテアソーム活性の違いが関与しているかについては、今後、詳細に検討する予定である。

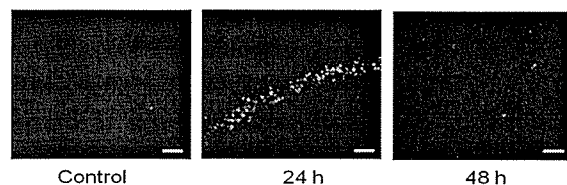


Fig.1 一過性前脳虚血モデルマウス海馬における CHOP 発現変化 (免疫組織化学手法)。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年3月31日

日本大学 総長 殿

氏 名 井手口直子



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	<input checked="" type="checkbox"/> 一般研究(個人研究) / <input type="checkbox"/> 一般研究(共同研究) / <input type="checkbox"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	小児患者、保護者と薬剤師の携帯電話を用いたコミュニケーションシステムの構築と評価	
3 研究目的：	本研究の目的は、携帯電話を利用して患者／薬剤師間の双方向コミュニケーションを確立し、小児の服薬指導における問題点を抽出するとともにその解決法を検討することである。現状の保険薬局のシステムでは薬局薬剤師は薬を交付して患者が帰宅してしまえばその後の症状の変化や出来事、服薬状況は次回再び患者が処方せんを持って来局し、薬剤師の求めに応じて患者自らが話してくれるまで、薬剤師は知ることができない。小児の急性疾患においては、短期間で症状の変化が大きく服薬管理を保護者が行うため、服用時に起きる様々な出来事に対して次の来局時では対応が後手になりがちである。患者が持つ携帯電話と、薬局側のPCで情報のやりとりができるシステム開発と実証実験を行い、インタラクティブなシステムは患者薬剤師のどのような関係性を変化させ患者ケアの向上につながるものであるのか考察した。	
4 研究概要：	第一段階として30名のモニターを募り、患者側の指定した服薬服薬時刻に「お知らせメール」を送付した。またお薬手帳機能として処方内容がわかるようにした。その他自由に質問や相談ができるフリーメッセージ機能をつけたものを試用してもらい、試用前後にアンケートに協力してもらった。第段階は5名の慢性疾患患者の保護者をモニターとして募り、指定時刻に1日1回メールを送信し、それに返信する形で保護者が小児の症状と、服薬状況、及びフリーコメントが書き込めるようにした。モニターには研究の主旨を説明し了解を得て手行った。(日本大学薬学部倫理委員会承認)返信内容は自動的に一覧表となるようにし、患者に来局時にそれを渡しながさらには話を聞くようにした。試用期間は6カ月、期間終了後に保護者全員と、担当薬剤師にインタビューを行い、ツールの使いやすさ、システムを通じた薬剤師(患者)とのコミュニケーションについて、今後の希望、その他感じたこと等を聞きだし、質的に検討する。同時にフリーコメントの患者と薬剤師のやりとりも分析し、何が起きていたのか、コメントのやりとりの中で双方の関係性の変化やキーとなるものを検討した。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 井手口直子 ・研究分担者 (役割分担) 個人研究のためなし	

※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：井手口直子

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

第1段階の結果

① お薬手帳機能について

「お薬手帳」は患者が個別にもつ、処方内容が記載された手帳である。現状では紙媒体で普及し、薬局ではそれに記入することで保険点数が算定できる。しかし紙媒体の手帳は自宅に置き忘れてしまう場合も多い。今回のモニターの事前アンケートでも、お薬手帳を忘れて受診することが“よくある”、36%、“ある”22%で、合わせ58%となった。今回のお薬手帳機能については活用した保護者が61%でそのうちの83%が“どこでも確認できて便利だった”と回答した。活用しなかった39%の理由は“紙媒体の手帳があるので日梅雨お客様生を感じなかった”が55%、“特に見ようと思わなかった”が36%であった。

お薬お知らせメールには小児患者の服薬への関心を高める目的で、アニメーションのキャラクターが、「おくすりをのをむ時間だよ!」と動き、患者側が「飲んだよ」と送ると「やったね!」キャラクターがほめるような動作場面を制作した。使用后アンケートでは、72%に薬の飲み忘れの改善が見られた。薬剤師へのフリーメッセージ機能については35%のモニターが活用するにとどまったが、活用者の全員がフリーメッセージ機能は役立ったと回答した。また、フリーメッセージ機能を活用しなかった保護者のうち25%が、今回は使わなかったがすぐに連絡できると思うと心強かったと回答した。最終的に80%の保護者が今後も本システムを継続したいと回答した。

次にフリーメッセージの内容を分析した。フリーメッセージには「最近歯磨きをするようになり、気になったんですが...シロップのお薬は結構甘いけど、薬が虫歯の原因になったりするんですか?」といった「質問や相談」と、「お気に入りのコップで飲ませようとしたら、薬が入ってるのがバレて嫌がりました。子供の方が一歩上手でした。」「今朝は鼻水が止まったので薬を飲ませるのをやめました」といった、「報告」が多く含まれた。「報告」は患者からの電話問い合わせでは得にくい情報であり、フリーメッセージ機能特有で得られたものであった。

さらに患者と薬剤師との双方向のコミュニケーションにおける影響を分析したところ、薬剤師が返信するコメントで「共感+アドバイス+連絡」の形をとったものは受け取った患者側に大きな安心感を与え、薬剤師のアドバイスを実践した旨を「報告」することに繋がった。その連続により患者側からより詳細な「報告」(または「相談」)が得られるようになったことから、患者側は自分の思いを薬剤師と更に共有したいという思いが強くなっていったことが観察できた。つまり、モニターの次回フリーコメント利用につながるキーは薬剤師のコメントの質に依存すると考えられた。今回のモニターの感想の中には「いつも行っている薬局の薬剤師さんからコメントをもらえてよかった」という記載もあり、顔を合わせたコミュニケーションに加え、今回のような顔の見えないコミュニケーションでも薬剤師が適切な情報提供と共感的かかわりをする事でケアの質は向上し、信頼も高まると考えられる。また薬剤師がそれに返信することで、会話の内容が深くなっていく現象が見られた。本システムモニターの感想を抜粋すると、「子供にとって今回のお薬は、苦かったようだがうさぎちゃんのために頑張っていた。」「電話はどきどきするけど、メールなら気軽に質問できる。」「フリーメッセージで気軽に聞いてよかった。」といった声があった。また「食事の後は忙しく、メールの返信に気が回らなかった。」「親の手の空いたときに返信等を行うので子供の興味が薄れていった。」「毎日3回は少々面倒」「外出などで食事の時間が遅れると配信メールが先に来てしまい返信を忘れそうになった。」などの問題もあった⁵⁾

部科校名：薬学部

氏名：井手口 直子

研究結果（つづき）

第2段階の結果

慢性疾患患者保護者へ約5カ月の継続試用を依頼し、その後にインタビューを行った

継続状況は、ほぼ毎日コメントを送ってくる保護者と、最初の1か月でほとんどコメントを返さなくなった保護者がいた。事後のインタビューでは以下のようにことを中心に聞いた

- ・ 1日1回の返信について

「症状があったときには、そうだ、こういう風に言ったら、どんな風に答えてくれるのかしらという、自分が聞きたいという気持ちがあるので、面倒ということは一切ないんですけども、全然調子の良い時もちょっとあったんで、そういうときには、ちょっと、面倒だなんていうときもありました。」等、症状が不安定であったり、気になることがあるときは大変有用であるが、状態が安定しているときは面倒であるとする保護者と、「自分では、状態が安定していても、会話したかったので、思いつく事を打って送っていました。何でもいいですと書いてあったので、気になる事とか、思いついた事を打って送ったり、という風に友達とメールをする感覚でやっていたので、負担は全くなかったです。」等常に負担なく感じるという保護者の意見があった。

- ・ 子供への影響については

メールがくると「飲みました！」と携帯に向かって叫ぶ患児や、保護者の疑問に「携帯にきいてみれば？」という患児があるなど、しくみを知ることでより参画意識をもつことがわかった

- ・ 薬剤師へのイメージの変化

モニター全員が、今回の試用で薬剤師をより親しみやすく感じていた。いつでもメールで気軽に質問ができるという環境をつくることで、来局時にも内容のある会話になると回答した

- ・ システムへの意見

何も変化がない場合「変化なし」の1クリックですますことができれば楽という意見があった

- ・ 薬局や薬剤師への要望

もっと薬局はカウンセリング機能をアピールすべきという意見、医療費の中間報告や高額になりそうなおきのアナウンス、領収書の一括発行などがあるといいという意見があった

- ・ 記録のプリントアウトを渡すことについて

すべてのモニターが、過ぎ去ったプロセスであり、特に見なおしたりすることはなく、必要ないと回答した

- ・ 電話と携帯電話の違いについて

電話をするのは相手の都合も自分の都合もある、深刻な場合にはもう受診するなりの行動をとるので電話はつかいたくないと全員が一致した

- ・ 薬剤師の振り返り

試用した薬剤師からは窓口対応では決してわからない患者の様子やプロセスが非常によく見え、次回のアドバイスに役立つ、メールの内容によって早い対応ができるというメリット、一方で、多忙な時には返答が遅くなってしまうこと、メールという文章で正確に伝えることができるだろうかという不安が語られた。

考察と結語

患者側は症状の変化等で疑問や不安にさらされるとき、電話を選ばずに携帯メールが最も気軽なツールである。それを活用することで来局していない間を埋め、来局時にもよりきめ細かいケアと信頼の構築が可能である、一方で、最初から信頼があることも重要で「顔が見える」関係があることですべてのツールは生きてくる。

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 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 31 日

日本大学 総長 殿

氏 名 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	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	血液脳関門におけるアミノ酸輸送に及ぼす脳虚血/再灌流障害の影響	
3 研究目的	血液脳関門 (BBB) は、物質輸送機能を有する脳毛細血管内皮細胞同士の密着結合 (TJ) により形成され、循環血液と中枢神経系間の物質移行を厳密に制御している。脳虚血/再灌流 (I/R) は、活性酸素・フリーラジカルなどの産生により内皮細胞の損傷を引き起こされ、BBB における物質透過性を亢進させる。I/R 後に生じる BBB 透過性の変化は、虚血時間によって規定される TJ の開口だけでなく、エンドサイトーシスやトランスポーター介在輸送などの諸変動に起因するものと考えられる。特に、グルコースやアミノ酸のような栄養物質のトランスポーター介在輸送が、I/R 障害後にどのような影響を受けるかについて把握することは、超急性期脳梗塞治療ひいては新規脳梗塞治療薬の開発に大きな進展をもたらすことが期待される。本研究では、I/R 障害後にアミノ酸トランスポーターの BBB 輸送機能がどのように変動するのかを明らかにすることを目的としている。	
4 研究概要	マウス I/R モデルは、血管閉塞用栓糸を中大脳動脈まで挿入することで一定時間虚血を行い、栓糸を引き抜くことで再灌流を行うことにより作製した。TJ の integrity に及ぼす I/R の影響は、BBB における細胞間隙輸送の指標である Sodium Fluorescein (SF) の脳内移行量を定量化し、Fluorescein Isothiocyanate とゼラチンの混合 (FITC-ゼラチン) 溶液による脳微小血管分布像を共焦点レーザー顕微鏡により視覚化することによって評価した。フェニルアラニン(Phe)の脳内取り込み輸送は、I/R 後にマウス脳灌流を用いて測定した。ラット脳微小血管内皮細胞 (RBMVEC) への Phe の取り込み輸送に及ぼす I/R の影響は、37°C における [³ H] Phe の細胞内取り込み量を指標とした。このとき、RBMVEC の細胞培養液を一定時間リン酸緩衝生理食塩液に置換することで虚血状態とし、その後再び元の培養条件に戻すことにより再灌流の状態とした。さらに、L 型中性アミノ酸トランスポーター1 (LAT-1) のタンパク発現量と mRNA 量は、Western blot 法および RT-PCR 法により評価した。	
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 ・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。)

TJの integrity に及ぼす I/R 時間の影響: SFの脳内移行量は、虚血 0.5 から 0.75 時間までの間、対照 (Control) 群と比較して変化が認められなかった。これに対して、虚血 1 時間後においては SF の脳内移行量が約 4 倍に増大したことから、虚血 0.75 時間までは TJ の開口は認められず、BBB の破綻が生じていないことが示唆された。虚血 0.75 時間後、再灌流 0.5 時間と 2 時間では、FITC-ゼラチン溶液が血管内に留まっていることが確認できたが、再灌流 4 時間後ではその顕著な血管外漏出が認められた (Fig. 1)。これらのことから、虚血 0.75 時間後、再灌流 0.5 時間という I/R 条件では、TJ の integrity が保持されていることが明らかとなった。

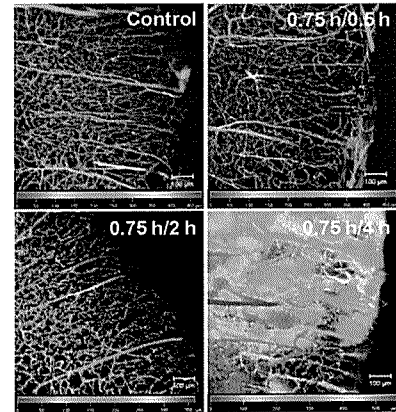


Fig.1 Images of FITC/gelatin distribution in the brain after reperfusion following ischemia for 0.75 h
Three-dimensional images were reconstructed with a LSM-510.

Phe の脳内取り込み輸送に及ぼす I/R の影響: 虚血 0.75 時間後、再灌流 0.5 時間 (I/R 群) の生理学的パラメーター、局所脳血流速度および脳血管内容積は、Control 群と同等な値であった。両群の [^3H] Phe 脳内取り込み輸送は、灌流液中の Phe 濃度 (0.1 - 100 μM) に依存して飽和性が認められた。速度論的な解析の結果、I/R 群におけるミカエリス定数 (K_m) および最大輸送速度 (J_{max}) は、Control 群と比較して両者とも 42%減少した。しかしながら、その時の LAT-1 のタンパク発現量と mRNA 量は両群間で変化が認められなかった。

Phe の細胞内取り込み輸送に及ぼす I/R の影響: [^3H] Phe の細胞内取り込みは、LAT-1 の選択的阻害剤によって有意に阻害されたことから、RBMVEC における Phe の取り込みには LAT-1 が介在していることが示唆された。 [^3H] Phe の細胞内取り込み速度の Eadie-Hofstee プロットより、I/R 群の K_m 値と J_{max} 値は、Control 群に対してそれぞれ約 30%および約 50%低下し、輸送効率を示す J_{max}/K_m 値は約 30%低下することが示唆された (Fig.2)。

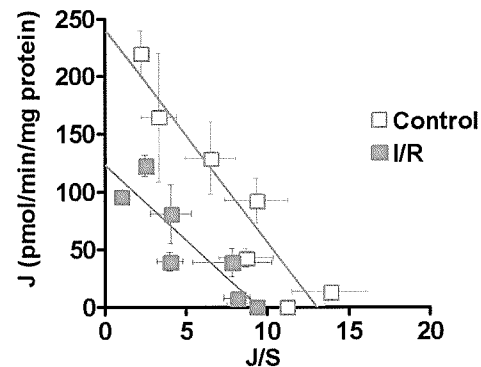


Fig.2 Eadie-Hofstee plots of [^3H] Phe uptake into the cells
Each point represents the mean \pm S.E. (n=3-5).

結語

本研究は、フェニルアラニン(Phe)の BBB 取り込み輸送に及ぼす I/R の影響を *in vivo* ならびに *in vitro* で明らかにした。本研究で作製したマウス I/R モデルが脳梗塞発症の再現性に優れ、Phe の BBB 取り込み輸送変動を評価するための I/R モデルとして有用であることがわかった。I/R 時においては、細胞間隙輸送および経細胞輸送が促進されており、0.75 時間の虚血後、再灌流 0.5 時間までは TJ の integrity が保持されていることが明らかとなった。TJ が維持されている I/R 時間において、Phe の最大輸送速度は低下するものの、LAT-1 に対する親和性が增大することにより、見かけ上、正常時と同様な輸送効率が維持されることが示唆された。*In vitro* RBMVEC における Phe の最大輸送速度は I/R により低下し、LAT-1 に対する親和性は増大することを明らかにし、その輸送効率は約 30%低下することが示唆された。

これらのことは、脳血管障害だけではなく他の中枢神経系疾患時においても BBB 取り込み輸送が変動する可能性を示唆しており、今後、個々の患者の病態に応じた薬物体内動態を予測することが可能になれば、最適な薬物治療につながることを期待される。

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 14 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 宮本 葵



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	新規電解化学発光物質の基礎検討	
3 研究目的	従来、電解化学発光法においてルテニウム(Ru)錯体の誘導体化合物が様々な化合物の検出試薬として汎用されてきた。しかし、これらは十分な発光強度を得られない事があるため、本研究では電解化学発光法の高感度化を目的として新規電解化学発光物質である 9,10-diphenylanthracene-2-sulfonate (DPAS)を用いたフロー系分析法の検討を行った。DPAS は電解化学発光の特性を持つと報告され(<i>Anal.Chem.</i> , 1995, 67, 3140-3147)、Ru 錯体と比べて約 17 倍の蛍光量子収率があり、分析法の高感度化が期待できる。	
4 研究概要	フロー系分析法を検討するにあたり、フローインジェクション分析(FIA)装置を構築し、DPAS 溶液を用いた測定条件の最適化を行った。その後、Ru 錯体で検出可能であった物質について DPAS でも検出できるかスクリーニングを行い、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 否 いずれかを○で囲んでください。否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：薬学部

氏名：宮本 葵

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

● FIA 装置の構築

構築した FIA 装置を Fig.1 に示す。初めに、測定するサンプルの基準物質として Tri-*n*-propylamine (TPrA)を用い、測定条件の最適化を行った。最適化を行った条件は、Carrier (Acetonitrile)の流速、DPAS solution の流速、DPAS 及び支持電解質(Tetrabutylammonium perchlorate, TBAP)濃度、電解化学発光検出器の酸化電流である。最適化の結果、条件を以下の様に設定した。

- Carrier の流速：0.1 mL/min
- DPAS solution の流速：0.4 mL/min
- DPAS 濃度：10 μ M
- TBAP 濃度：60 mM
- 酸化電流：200 μ A

最適条件下、本測定系の精度を求めた結果、
検出下限：2 nmol/ μ L (S/N = 3)

相関係数：0.967 (2~20 nmol/20 μ L)

再現性 (RSD)：1.1% (4 nmol/20 μ L, n = 5)

と良好な値が得られた。

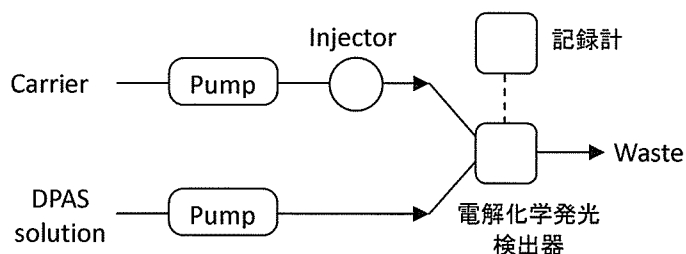


Fig.1 FIA 装置概略図

● サンプルのスクリーニング

構築した FIA 装置を用いて、Ru 錯体で検出可能であるアミン類、インドール類及びジケトン類について測定を行った。測定結果を Fig.2 に示す。

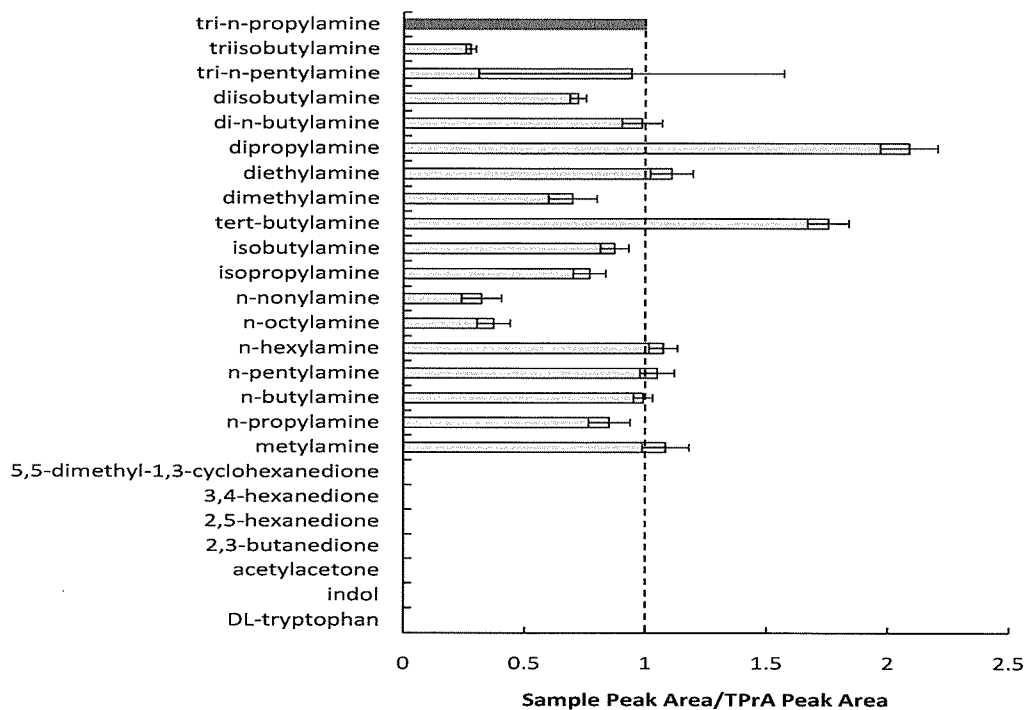


Fig.2 サンプル発光強度の比較

部科校名：薬学部

氏名：宮本 葵

研究結果（つづき）

Fig.2は基準物質として20 mM TPrAを測定した場合の発光強度を「1」として、同濃度のサンプルをそれぞれ測定し、相対発光強度を算出した結果である。

Ru錯体を用いた場合、サンプルの発光強度は第3級アミン>第2級アミン>第1級アミンの順番になる。これに対して、DPASで測定した場合は、第1級～第3級アミンまでほぼ同じ発光強度を示した。また、Ru錯体ではインドール類及びジケトン類をサンプルに用いた場合に発光を示すが、DPASを用いた場合には発光を示さず検出することができなかった。

以上の事から、DPASはRu錯体よりも高感度化を実現できる物質として考えてきたが、Ru錯体と異なる選択性も示した。従って、Ru錯体で検出できなかった物質も測定できる可能性がある。この結果については日本薬学会第130年会で発表済みである。

これまでにDPASを用いたフロー系分析法の構築及び系統的なサンプルスクリーニングは報告されておらず今回が初めての試みであり、興味深い結果が得られた。

また、助成いただいた期間内では、DPASの発光スペクトルや発光の持続時間などのデータを得ることはできなかったため、今後、測定する予定である。

課題番号

個09-130

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 15 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 小 山 由 美



所属・資格 薬学部・助手

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	リスク／ベネフィットバランスに基づいたホルモン補充療法のための基礎的研究	
3 研究目的	本研究は、ホルモン補充療法のリスクをタンパク質非結合型(遊離型)のステロイドホルモン(特に女性ホルモン)濃度を指標として推定しようとするものである。唾液には、低濃度ではあるものの遊離型ホルモンのみが含まれるとされることから、本研究ではまず唾液中ホルモン濃度測定法を確立し、次いで結合型を多く含む血液のホルモン濃度との相関性を精査することを目的とする。	
4 研究概要	ホルモン補充療法による血中ホルモン濃度の変化と副作用の関係を解析するため、非侵襲的に採取可能な唾液を試料とし、ラジオイムノアッセイ法により唾液中のホルモンを定量した。唾液中のプロゲステロンやコルチゾールは血漿中ホルモン量と高い相関性が認められているものの、エストラジオールは血中濃度が低く、相関性を示す報告が少ない。本研究は唾液中のエストラジオール測定法の確立を目指すものである。	
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 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：小山由美

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1 唾液の採取

血液中エストラジオールは遊離型ホルモンとして唾液中に分泌されるとされ、唾液腺の違い、月経周期による血中濃度の変化の影響を考慮し、唾液は舌下腺刺激および咀嚼による全唾液の二種類を採取した。採取は、唾液採取用の容器とスポンジを使用し、遠心分離後 -20°C にて凍結保存した。

2 エストラジオール二抗体法による唾液中エストラジオールの測定

ラジオイムノアッセイ法により測定可能なエストラジオール濃度の限界を検討した。

エストラジオール標準試薬を調整し、標準抗原濃度-結合量（結合量/全結合量）曲線を作成した。 5 pg/ml 以下ではばらつきがみられ、測定方法に改善が必要であることがわかった。閉経前の女性血漿サンプルであれば測定に問題はないことが推測された。

採取した唾液を測定した結果、ほとんどのサンプルが 5 pg/ml 以下であることから、唾液の濃縮が必要であることがわかった。

また、エストラジオール標準試薬を希釈する Assay Buffer についても人口唾液などを作成することが望ましいと考えられた。

3 唾液の濃縮

唾液中のエストラジオール濃度を 5 pg/ml 以上にするため、濃縮をおこなった。唾液（ 1 mL ）サンプルは有機溶媒にて抽出し分離し、これを二回繰り返して水で洗ったのち濃縮乾固させた。Assay Bufferにて溶解後測定した。

濃縮の結果、唾液中エストラジオールは二倍に濃縮された。しかしながら、濃縮後の測定値から唾液中ホルモン量の微量な変化を捉えるまでには至らなかった。

4 今後

女性の卵巣機能の低下は女性ホルモンの急激な減少をもたらし、骨粗鬆症や脂質代謝異常を引き起こす原因となる。ホルモン補充療法（HRT）は更年期障害や骨粗鬆症等の予防に有効であるものの、乳がんや血栓症などのリスクを伴うことからその利用は敬遠されており、安全な使用方法の確立が求められている。ホルモン濃度の急激な低下が様々な機能低下の原因となることから、その低下を定期的に知ることはHRTの必要量、開始時期を判断することに有効である。

唾液は非侵襲的な採取が可能であり簡便に検査できることから、今後さらに唾液中ホルモンの測定方法を検討していく計画である。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22年 4月 22日
日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 真野 一雄



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	<input type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	英国 15 世紀書簡集 Paston Letters における言語の統語的研究	
3 研究目的	中期英語から現代英語初期への過渡的状況を英国 15 世紀の歴史・言語資料であるノーフォーク州の豪族であるパストン家書簡集によって考察する。この時代は中期英語末の時代であり、英語は大きな変化を受けようとしていた。パストン家の人たち、特に第3世代の兄弟たちはロンドンともつながりがありロンドンの新しい言葉を取り入れている。手紙という性質上、記述年代も特定できて言語の移り変わりの時期も明確にすることができる。そういう資料によって古い語法・新しい語法がどの程度見られるのか明らかにしたい。	
4 研究概要	これまでに非人称動詞・再帰動詞・動名詞・動詞語尾・Do・関係代名詞・不定詞付き対格構文等について中期英語から現代英語初期への過渡的状況をパストン家書簡集（実質3世代にわたる書簡集）によって考察した。今回は今までと同様に現在分詞を対象に、世代ごとの使用頻度・用法・特徴等を比較検討する。	
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：通信教育部

氏名：真野一雄

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

中英語から現代英語初期への過渡的状況を英国 15 世紀の歴史・言語資料であるノーフォーク州の豪族であるパストン家書簡集によって考察している。この時代は中英語末期の時代であり、英語は大きな変化を受けようとしていた。パストン家の人たち、手紙という性質上、記述年代も特定できて言語の移り変わりの時期も明確にすることができる。そういう資料によって古い語法・新しい語法がどの程度見られるのか考察中である。

過去に非人称動詞・再帰動詞・動名詞・動詞語尾・Do・関係代名詞・不定詞付き対格構文等について中期英語から現代英語初期への過渡的状況をパストン家書簡集（実質 3 世代にわたる書簡集）によって考察した。今回は今までと同様に現在分詞を対象に、世代ごとの使用頻度・用法・特徴等を比較検討している。

現在、序で 15 世紀の一般的状況を記し、そして本論の部分となる Paston Letters における該当例を各個人・核世代ごとに収集、考察を加えている最中である。今後さらに考察を深め、平成 23 年 3 月発行予定の日本大学通信教育部研究紀要第 24 巻に発表する予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 8 日

日本大学 総長 殿

氏 名 猪野恵也



通信教育部

所属・資格 英文学専攻 准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	James Joyce の作品群における間テキスト性について	
3 研究目的	James Joyce の作品は引用のモザイクで成り立っているといつてよい。Ulysses、Finnegans Wake に特に焦点をあて、ジャンルなど物語とは何かを探求する。	
4 研究概要	英文学研究の基本と特性は「精読」である。Ulyssesでは第13挿話を精読し、そしてFinnegans Wakeは早稲田大学で主催されている読書会に参加し、レポーター役を務めたりしている。すでにUlyssesでは第13挿話についてはその研究の成果の一部を日本大学英文学会年次大会にて発表し、通信教育部の「研究紀要」第二十三号にその発表を英語で論文化した。	
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：通信教育部

氏名：猪野恵也

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

Ulysses では第13挿話を精読し、前半部の語りの語り手が女性主人公ガーティの言葉使いを真似していることを考察した。その言葉使いには20世紀前半における女性向けの数種類の雑誌（実際に入手し読んでみた）、ダブリンのポピュラーカルチャー、ヴィクトリア朝の無名の小説、*The Lamplighter* の文体が混交していることを指摘し、さらには差異の効果が生じていないと結論づけた。これは日本大学英文学会年次大会にて発表し、通信教育部の「研究紀要」第二十三号にその発表を英語で論文化した。そして *Finngans Wake* は自分でも読んでいたが、早稲田大学で一ヶ月に一度主催されている読書会に参加し、レポーター役を務めたりしている。二十一年度はALPの章について二回発表した。この作品は英語をベースにしているが、四十カ国語以上の言語が混交している。一文につき五、六種類の解釈が可能である夢言語の世界であるが、我々はまずプレインリーディングから始めなければならない。つまり表層的なテーマ及び文の意味をとらなければならない。発表では二種類程度の読み方を提示し、ある程度の評価を得た。

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年5月21日

日本大学 総長 殿

氏 名 Philippe ORSINI



所属・資格 日本大学大学院グローバル・ビジネス研究科 准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	Globalization, Regional Communities and Food Business: Distribution Channels of Locally Grown Produce in Japan, the United States, and France	
3 研究目的	In a context of globalization and commoditization, what are the remaining (or emerging) differences in food production, consumption and distribution (trade, retail, food service) between regional communities?	
4 研究概要	This research was the first step to a cross-national comparative analysis, including some of the following countries or regions: Japan, European countries, United States, and emerging countries, such as the BRICs. It started with both a country-level review of the existing main channel for FFV distribution (the large retailing chains), and a Japanese case, in the Narita region (Chiba Prefecture). Results should allow businesses, but also governments or consumer associations, to understand the peculiarities of their own national or regional practices, and to benchmark them against other regional communities' practices.	
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 日本大学大学院グローバル・ビジネス研究科准教授 Philippe ORSINI ・ 研究分担者 (役割分担) なし 	

※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：日本大学大学院グロー バル・ビジネス研究科	氏名： Philippe ORSINI
-------------------------------	---------------------

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

Results of the research are two-fold. The first group of results concerns the retail aspect, with a focus on the French case, at national level. The second group of results concerns the production aspect, and was focused on a case study in the Narita region (Chiba Prefecture).

Retail in France

Results of the research have been first proposed at an academic conference:
学会発表「フランスの食料品小売業界：構造と新展開」(The changing landscape of grocery retailing in France), 2009.6.21, 学会名称:日本フード・システム学会 (2009年度大会)

Then presented in a paper:

ORSINI Philippe (2010) "Global Convergence in Grocery Retail: A Comparative Study of New Store Formats in France", Nihon University Business Research, Vol. 7, March 2010 / フィリップ・オルシニ (2010) 食料品小売のグローバルコンバージェンス：フランスにおける店舗新業態のケース、日本大学ビジネス・リサーチ、第7巻、2010年3月 (英語)

Production in the Narita region

A series of interviews were conducted in the Narita region between the 10th and the 12th of February 2010.

On the 10th, I interviewed Mr NEG (13h-23h00) off record, on his farmland, and Mr TAK (18h00-23h00) recorded, at his farm. On the 11th, I interviewed Mr YAN (from 13h) recorded, at his farm, Mr KOJ (until 16h30) recorded, at the NA Research Center, and Mr et Mme KAJ (18h00-23h30), off record. On the 12th, I interviewed Ms NEG (12h03-12h54) off record.

All of them produce FFV (fresh fruits and vegetables) in the Narita region, but they can be divided into two groups: the "new" farmers (the Neg, the Kaj and Mr Koj), and the long established ones (Tak and Yan). All these "new" farmers have undergone training at the NA Research Center established by Narita Airport to exploit farmland bought by the airport in prevision of possible future expansion of the airstrips. Rather than leaving these farmlands unused, and in order to improve its local social capital (with the local farmers that opposed the establishment of the airport), Narita Airport has created a structure (the Research Center) where "wannabe" farmers can receive training and advice from local farmers. Most of the "new" farmers are willing to produce organic FFV.

部科校名：日本大学大学院グロー バル・ビジネス研究科

氏名： Philippe ORSINI

研究結果 (つづき)

Interviews lead to the broad following conclusion: “established” farmers exercise strong power over the “new” farmers, leading to ambivalent feelings from the “new” farmers towards the “established” farmers. For instance, “new” farmers’ crops are sold through trade associations controlled by the local farmers and “established” farmers have a strong awareness of their position as “teachers”, not willingly accepting changes or newness in their practices and view of agriculture (both from technical and ideological points of view). Hence, the development of innovative distribution channels is impeded by the “established” farmers, and “new” farmers leave the region to escape their influence. However, for those attached to this peculiar region (family owning farmland), this is not an option, and the exploration of new distribution channels is locally confronted to a dead end.

The presented research results should be followed by more case studies in Japan, in order to reach more general conclusions, and by comparative case studies in the USA, France, or UK, were many initiatives in FFV production comparable to the Narita case do exist and are leading to changes in the distribution channels of FFV, especially of organic type.

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 23 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏名 外廣 善和



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	<input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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	蛋白質療法に用いる細胞膜透過性有用蛋白質発現系の確立とその分解抑制機構の開発	
3 研究目的	現在、癌は日本人の死因の1位であり、その割合は4割弱である。また、アトピーやリウマチ等のアレルギー性疾患患者も多い。本研究では、これらの難治性疾患の改善を行なうには、これらの疾患に深く関わる分子を利用した蛋白質療法が有効ではないかと考えた。まず、癌や白血病に対しては p53, SOCS-3, RAR α を、アレルギー性疾患に関しては SOCS-3, TIPE2 を標的蛋白質として考えた。そこで、これらの蛋白質に細胞膜透過性タグを融合した大腸菌発現系の開発を試みる。また、それぞれの蛋白質には我々が独自に開発した分解抑制領域(Stabilon)の付加を行い、分解耐性の蛋白質開発を試みる。	
4 研究概要	本研究では、癌や免疫疾患の改善を行なう蛋白質療法に用いる細胞膜透過性有用蛋白質 (p53, RAR α , SOCS-3, TIPE2) 発現系の開発を試みた。p53, RAR α , SOCS-3 については、既にこれまでの研究で発現・精製・細胞導入系はほぼ確立していたが、更に細胞内への導入後の機能解析を進めた。また、我々が新規に見出した分解抑制領域(Stabilon)の付加を行い、分解耐性の蛋白質開発を試みた。また、TIPE2 については発現・精製・細胞導入系を確立した。	
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：舩廣 善和

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究では、癌や免疫疾患の改善を行なう蛋白質療法に用いる細胞膜透過性有用蛋白質（p53, RAR α , SOCS-3, TIPE2）発現系の開発を試みた。

p53 発現系について

細胞膜透過性 p53 が細胞内に導入後どの程度転写活性を持つかを調べる目的で、その転写転写活性可能測定可能な p21(p53 が結合し正に調節される遺伝子) promoter-Luciferase レポーターを作成した。HEK 293 細胞において、細胞膜透過性 p53 の転写活性を測定した所、有為な転写活性は測定されなかった。これは HEK 293 細胞では内因性 p53 の発現がある程度あり、細胞膜透過性 p53 の転写活性が十分に測定出来ない結果であると考えられた。今後、p53 発現のない Saos2 細胞や HEK 293 細胞に p53 siRNA を導入する系での測定系の確立を試みる。

また、蛋白質安定化モチーフ Stabilon 融合細胞膜透過性 p53 の発現系を構築した。この蛋白質の大腸菌での発現量は既存の融合細胞膜透過性 p53 とほぼ同じであった。また、リフォールディング効率も同じであったことから、細胞内での安定化が上昇するようであれば、非常に有効な蛋白質になると考えられる。

また現在、本融合細胞膜透過性 p53 を *in vivo* で効果を測定する目的で p53 ノックアウトメダカの導入を試みているが、本発現系はこの実験に十分な発現量を示している。

RAR α 発現系について

本発現系では、既にこれまでの研究で十分な発現量、細胞膜透過性、白血病細胞を分化した顆粒球へ導く分化能を確認し、十分な成果を得ていた。しかし、導入細胞内での転写活性化能を測定していなかった。平成21年度の研究では、この点を重点的に行なった。その結果、HEK 293 細胞を用いた Luciferase で細胞膜透過性 RAR α 導入時に ATRA (RAR α のリガンド；活性型レチノイン酸) 依存的な転写活性化能を測定することに成功した。また、白血病患者由来の NB4 細胞に細胞膜透過性 RAR α を導入し、ATRA 添加/無添加時の標的遺伝子 (HOXA1, CYP26A1) の発現変化を RT-PCR にて測定した所、ATRA 添加時に有為に発現上昇することを確認した。これにより、目的とする全データを得たことから、現在論文を仕上げている、半年以内に投稿する予定である。

SOCS-3 発現系について

本発現系では、既にこれまでの研究で十分な発現量、細胞膜透過性、細胞内導入後の JAK-STAT 抑制能を保持することを示していた。しかし、透析時のリフォールディング効率が悪く、*in vivo* での実験に不向きであることが問題であった。そこで、リフォールディング効率の上昇と細胞内での安定化を目的に、Stabilon 融合細胞膜透過性 SOCS-3 発現系を構築した。そこで、本蛋白質の発現量、リフォールディング効率を測定したが、既存の細胞膜透過性 SOCS-3 とほぼ同等の結果となりいずれの面においても改善は見られなかった。よって *In vivo* の系 (マウス) での使用は難しいと考えられる。現在、様々な Buffer 条件下での透析によるリフォールディング効率の上昇条件の検討を行なっている。可溶化度が高まり、マウスでの使用が可能であれば、他研究者との共同研究により、マウスでの効果をj確認する予定である。

部科校名：生物資源科学部

氏名：舩廣 善和

研究結果 (つづき)

TIPE2 発現系について

本発現系では、これまで発現系がなかったことから、新規に発現・精製・導入細胞系を確立した。細胞膜透過性 TIPE2 は高発現し、リフォールディング効率も良かった。また、十分な細胞膜透過性を示した。本細胞膜透過性 TIPE2 を RAW 細胞に導入し、LPS シグナルに対する抑制活性を p38 と I κ B のリン酸化度を指標に測定したところ、十分な抑制活性を示した。また、既知論文では、TIPE2 が Caspase-8 と相互作用することを示していたことから、本細胞膜透過性 TIPE2 と Caspase-8 との相互作用を調べたところ、相互作用が確認出来た。以上の結果より、本発現系はマウスレベルでの実験にも十分に使用可能と判断した。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

課題番号	高個09-001
------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年5月8日

日本大学 総長 殿

氏 名 松崎 祐介



所属・資格 豊山女子高等学校 教諭

下記のとおり報告いたします。

1	種目 <input checked="" type="radio"/> 一般研究(個人研究) / <input type="radio"/> 一般研究(共同研究) / <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 ① 認知の程度と言語形式：英語の補文形式におけるモノ的な表現とコト的な表現の間の段階的連続性 ② 認知の程度と言語形式：英語のING動名詞・分詞使用の認知的基盤 ※当初②の課題のみであったが、学会で①の研究成果を高く評価していただき、両者を並行して研究した。	
3	研究目的 上記①・②のいずれの研究も、人間の行動・認識様式と言語が密接に関わっているという言語の本質に迫ることを目標に行った。すなわち両者の間のアイコン的關係を確認した。英語学の領域としては新しい理論を援用し、<モノ>と<コト>の対比、認知的距離感といった術後がキーワードとなった。 特に①は英語補文化現象の全容解明を含む研究であり、その成果は学術的価値が大きく、また英語学の分野で今後のパラダイムとなるようなものがある程度確立できたと考える。	
4	研究概要 ①の研究においては、TO不定詞・原形不定詞・ING動名詞・分詞・FOR-TOパターン・THAT節（すなわち英語の補文形式すべて）を研究対象とし、非定形補部ほどモノ的、定形補部ほどコト的意味合いを帯びるというプロトタイプを設定し、その間の段階的な推移の様子を考察した。 ②の研究においては、英語のING動名詞・分詞の中でも特に感覚動詞が選択するING形に注目し、主に[NP-V-NP-do]と[NP-V-NP-doing]のそれぞれが持つ意味機能の違いについて、従来の定説では説明不可能な用例について新たな見解を示した。概略、定説を完全否定するのではなく、いわゆる「単純知覚」とでもよべる知覚行為事象については定説で、「解釈付けを含む知覚行為事象」については新たな見解で説明されるという理論に至った。こちらの研究は今後脳科学の観点も取り入れてさらに発展させていきたい。	
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：豊山女子高等学校

氏名：松崎 祐介

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

- ※ 平成 21 年度内の成果発表：(a)日本大学英文学会主催の英語学シンポジウム（平成 21 年 10 月 10 日開催）に於いて「Accusative with Infinitive 再考 — 意味からの視点」という題目で口頭発表、(b)豊山女子高等学校発行の『教育・研究紀要』（平成 22 年 3 月 31 日発行）に「認知の程度と言語形式」という題目で論文出版。
- ※ 平成 22 年度の成果発表予定：学外の学会で口頭発表および論文出版を予定している。当初予定していた英語の ING 動名詞・分詞に研究対象を限定したものよりも、補文化現象全般を網羅的に扱った論文の方が学会で高く評価され、またそれは言語の本質に迫る研究に直結すると考えられ、両者を並行して研究した。前者の研究成果を英語語法文法学会に於いて、後者を日本認知言語学会で発表したいと考えている。（いずれも平成 22 年度内の発表を考えているが、日程的に不可能であれば一方を平成 23 年度に回す予定である）。

以下が日本認知言語学会に公募した研究要旨である。

認知の程度と言語形式

—英語の補文形式におけるモノ的な表現とコト的な表現の間の段階的連続性—

英語の補文化現象を研究対象とし、統語論・意味論基盤の認知言語学的分析を試みる。すなわち、「形式」、「意味」、「認知の程度」の三部門の相互関係（アイコン的關係）を明らかにする。

具体的に、話者もしくは主節主語がモノの意味合いを表そうと動機付けられるかコトの意味合いを表そうと動機付けられるかによって、英語の補文形式選択が決定されると提案したい。非定形補部（ING 動名詞・分詞・原形不定詞・TO 不定詞・FOR-TO パターン）はモノの意味合いを、定形補部（THAT 節）はコトの意味合いを表すことを示す。さらにその非定形補部については一様にモノ的というわけではなく、ING 動名詞・分詞・原形不定詞から TO 不定詞を経て FOR-TO パターン・THAT 節へモノからコトへと段階的に推移する様子が見られる。

議論は補文選択動詞を意味上二つのカテゴリー、「拘束動詞」と「認識様態動詞」に二分して進める。拘束動詞とは *make, force, persuade, want* など、主節が補部で表される出来事に対して何らかの関与を表す意味タイプ、認識様態動詞とは *believe, find, know, think* など、補部で表される出来事・状態が認識の対象であることを表す意味タイプである。さしあたりここでは前者の意味タイプの動詞を取り上げてみると、モノからコトへと以下のような段階的推移を示す。

- (1) a. I made him leave on time.
 b. I persuaded him to fight it out.
 c. I want him to start over again.
 d. I hope for him to come back without any accident.
 e. I wish that he would go with me.

上部の補文標識を伴わない、あるいは最小限しか伴わない形式ほどモノ的、下部の補文標識 THAT によって導かれる定形節、あるいは非定形節でも余分な補文標識を多く伴う形式ほどコト的という傾向が見られる。たとえば(1b)は、動作主 *I* というモノに注目し、そのモノによって引き起こされる出来事が語順と並行して叙述された表現である。一方(1e)の *I* は心の中の思いを述べる主体であり、客体（補部で表される事態）の一部ではない。前者の *persuade* の主語 *I* は客体（行為・事態）の一部であるからそれを省略することはできないが、後者の *wish* の主語 *I* は客体から一歩抜け出しており、したがってそれを省略して全体的状況（コト）の中に埋没させることが可能である。

- (2) I wish that he would go with me.

≡ If only he would go with me.

議論の中で特に問題になるのが、連続体の中でモノからコトへの移行部分に属す(1e)のような願

部科校名：豊山女子高等学校

氏名：松崎 祐介

研究結果 (つづき)

望・希求動詞が選択する TO 不定詞の意味づけである。この意味タイプの動詞がとる TO 不定詞補部 (補部全体[NP-to-VP]) は、実現を望まれる内容を表す項に該当し、一見 THAT 節および FOR-TO パターンのようなコトの表現に近いと思われるが、しかしながらコトよりもモノの側にあり、実現に向けてすでに動き出している段階で使用され、(1b)のような *persuade* がとる TO 不定詞同様にモノ的表現 (出来事そのもの) に限りなく近いと提案したい。

この認知言語学的理論の妥当性を統語・意味、さらに語用論的なコンテキストに立証させる。たとえば以下はコンテキストから示したものである。

(3) They had an argument:

a. he wanted her to quit smoking,

b. ?he wished that she would quit smoking,

but she said she wouldn't.

(Givón(1993: 12)から用例のみ借用)

(4) He left a week earlier. Now, sitting there all alone,

a. ?she wanted him to come back.

b. she wished that he would come back.

(Givón(1993: 12)から用例のみ借用)

(3a)の TO 不定詞は、主節主語 NP が補部の NP に対して拘束的にはたらきかけ、当該補部で表される出来事実現へ向かってすでに動き出しているという含みのある文脈で使用されているが、一方(4b)の THAT 節は、「次第にそのような気持ちになる」というような、主節主語が全体的状況を把握し、その中に埋没できる立場に置かれている場面で使用されていることがわかる。その証拠として(4b)は心の中のつぶやきという読みができる。(主語 *she* が *I* であれば(2)同様に明示的な言語化の必要はない)。ここから TO 不定詞はコトからモノへの転換装置であり、すなわち THAT というコトの中からモノを取り出して主節の側に引き寄せるためのものと考えられる。

さらにこれが統語・意味を伴律することを示すのが本研究の目的となる。

主要参考文献

- Givón T. (1980) "The binding hierarchy and the typology of complements". *Studies in Language* 4. 333-377.
- Givón T. (1985) "Iconicity, isomorphism and non-arbitrary coding in syntax". In: Haiman ed. (1985). 187-219.
- Givón T. (1993) *English Grammar: A Function-Based Introduction II*. Amsterdam: John Benjamins.
- Haiman J. ed. (1985) *Iconicity in Syntax*. Amsterdam: John Benjamins.
- Horie K. ed. (2000) *Complementation: cognitive and functional perspectives*. Amsterdam, Philadelphia: John Benjamins.
- Horie K. (2001) "Complement clauses". In: M. Haspelmath ed. *Sprachtypologie und sprachliche Universalien*. Berlin: Walter de Gruyter. 979-993.
- 池上 嘉彦 (1981) 『「する」と「なる」の言語学 — 言語と文化のタイポロジーへの試論』。東京: 大修館。
- 池上 嘉彦 (2002) 「〈モノ〉と〈コト〉, そして〈トコロ〉 — 日本語における〈主観性〉をめぐって」。『言語』31(13). 72-83.
- 池上 嘉彦 (2003, 2004) 「言語における〈主観性〉と〈主観性〉の言語的指標」。『認知言語学論考』3, 4. 東京: ひつじ書房. 3: 1-49, 4: 1-60.
- 池上 嘉彦 (2007) 『日本語と日本語論』。東京: 筑摩書房。
- Langacker R. W. (1991a) *Foundations of Cognitive Grammar Vol. 2: Descriptive Application*. Stanford: Stanford University Press.
- Langacker R. W. (1991b) *Concept, Image, and Symbol*. Berlin: Mouton de Gruyter.

注: 必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：豊山女子高等学校

氏名：松崎 祐介

研究結果 (つづき)

- Langacker R. W. (1999) *Grammar and Conceptualization*. Berlin: Mouton de Gruyter.
- Langacker R. W. (2009) *Cognitive grammar: a basic introduction*. Oxford: Oxford University Press.
- 松崎 祐介 (2007) 「TO 不定詞構文選択の認知的基盤とそのスキーマ的意味」. 『英文学論叢』 55. 日本大学英文学会. 181-200.
- 松崎 祐介 (2008) 「英語動詞の定形補部と非定形補部選択の認知的基盤」. 『英文学論叢』 56. 日本大学英文学会. 93-109.
- Verspoor M. (1990) *Semantic criteria in complement selection*. Unpublished Ph. D. dissertation. University of Leiden, The Netherlands.
- Verspoor M. (1998) "To infinitives". In: L. de Stadler ed. *Issues in Cognitive Linguistics*. Berlin: Mouton de Gruyter. 505-526.
- Verspoor M. (2000) "Iconicity in English complement constructions — Conceptual distance and cognitive processing levels". In: Horie K. ed. (2000) 199-225.