

福井大学 助成研究成果集 2012

—明日への挑戦—

創造力、実践力。

国立大学法人



福井大学

UNIVERSITY OF FUKUI

目 次

No.	部 局	講座・専攻・領域	職	研究代表者	研究 課 題	目次
■平成23年度福井大学研究育成経費						
【競争的資金獲得を目指す研究】						
1	教育地域科学部	社会系教育	准教授	橋本 康弘	社会科と道徳との「融合可能性」に関する研究	6～ 7
2	医学部医学科	分子生理学	助教	岩本 真幸	非対称脂質二重膜を用いた膜タンパク質機能に対する脂質効果の解析	8～ 9
3	医学部医学科	分子遺伝学	准教授	黒岡 尚徳	酸化ストレス応答における転写調節因子Idの役割	10～ 11
4	医学部医学科	分子生体情報学	准教授	水谷 哲也	ステロイド産生を司る新規遺伝子の同定とその転写制御機構の解明	12～ 13
5	医学部医学科	内科学(2)	教授	中本 安成	肝発がんモデルのマイクロRNAダイナミズムに基づいた分子創薬	14～ 15
6	医学部医学科	小児科学	教授	大嶋 勇成	食物アレルギーの耐性獲得機序の解明と新規治療法の開発	16～ 17
7	医学部医学科	精神医学	講師	小俣 直人	亜鉛欠乏によるうつ状態におけるノルエピネフリンの関与に関する基礎的研究	18～ 19
8	医学部看護学科	生命基礎科学	准教授	飯田 礼子	酸化ストレス防御におけるヒト新規転写抑制因子Rhith(ZNF205)の役割	20～ 21
9	工学研究科	機械工学	教授	服部 修次	原子カプラント安全稼働のための配管液滴衝撃エロージョン予測法の確立	22～ 23
10	工学研究科	電気・電子工学	教授	勝山 俊夫	超小型レーザディスプレイのための3原色光合波器の研究	24～ 25
11	工学研究科	材料開発工学	准教授	内村 智博	新規試料導入法に関するフィージビリティスタディ	26～ 27
12	工学研究科	材料開発工学	准教授	阪口 壽一	イオン液体との相互作用を利用した二酸化炭素選択的透過高分子膜の開発	28～ 29
13	工学研究科	材料開発工学	教授	徳永 雄次	分子そろばんの合成：刺激に対し多段階応答する多進法デバイス素子の創出	30～ 31
14	工学研究科	生物応用化学	准教授	吉見 泰治	光反応による高機能ペプチドの創出	32～ 33
15	工学研究科	知能システム工学	准教授	小西 慶幸	チュプリンアミノ酸付加を介した軸索機能の維持システムとその破綻による神経老化の分子機構	34～ 35
16	工学研究科	ファイバーアミニティ工学	准教授	久田 研次	高圧電子線グラフト重合法によるレアメタル微粒子吸着材の開発	36～ 37
17	工学研究科	原子力・エネルギー安全工学	教授	仁木 秀明	レーザー同位体分離研究の推進	38～ 39
18	高エネルギー医学研究センター		教授	清野 泰	戦略的分子標的照射治療のための薬剤開発基盤の構築	40～ 41
19	生命科学複合研究教育センター		特命講師	齋藤 大輔	触覚刺激の学習における、脳の可塑的変化に関わる神経基盤に迫る	42～ 43
【特に大型の競争的資金獲得を目指す研究】						
1	医学部医学科	分子生体情報学	教授	宮本 薫	新規卵成熟因子C-typeナトリウム利尿ペプチドを利用した新たな不妊症診断・治療戦略	44～ 45
2	工学研究科	電気・電子工学	教授	葛原 正明	窒化物半導体を用いた低損失パワーエレクトロニクス技術の研究開発	46～ 47
3	遠赤外線開発研究センター		教授	斉藤 輝雄	核融合プラズマ計測への適用のための遠赤外ジャイロトロン飛躍的高出力化	48～ 49
【若手研究者による今後の進展が期待できる研究】						
1	教育地域科学部	附属地域共生プロジェクトセンター	助教	栗原 知子	「いえ型保育空間」における異年齢保育の集団形成に関する調査研究	50～ 51
2	医学部医学科	分子生理学	特命助教	炭竈 享司	K ⁺ チャンネルでのゲーティングの微視的機構の解明	52～ 53
3	医学部医学科	腫瘍病理学	特命助教	Andriana B. Bintang	Comparative Study of Raman micro spectroscopy and FTIR in Colorectal Tumor Model	54～ 55
4	医学部医学科	薬理学	助教	宇和田 淳介	(発がん剤誘発大腸がん組織に対するラマン顕微分光とフーリエ変換赤外(FT-IR)顕微分光スペクトル変化と組織化学的形態変化との相互関係の検証)	56～ 57
5	医学部医学科	薬理学	学内講師	西宗 敦史	脳特異的新規SUMO化基質としてのスカッフオールドタンパク質GISPとSUMO化の神経活動依存性について	58～ 59
6	医学部看護学科	精神看護学	助教	川口 めぐみ	退院後に統合失調症患者を自宅で介護している親の介護負担感の影響要因	60～ 61
7	医学部附属病院	検査部	助教	糟野 健司	腎臓領域におけるレドックス制御機構の解明と臨床展開	62～ 63
8	医学系研究科	附属子どもの発達研究センター	特命講師	岡 雄一郎	マウス大脳皮質長連合線維の選択的標識と特異的プロモータの同定	64～ 65
9	工学研究科	機械工学	助教	酒井 康行	反応性流体シミュレーションのための炭化水素燃料簡略化反応モデルの構築	66～ 67
10	工学研究科	ファイバーアミニティ工学	准教授	藤田 聡	ナノファイバー基材を用いた極限微生物の培養技術の探索	68～ 69
11	工学研究科	ファイバーアミニティ工学	助教	廣垣 和正	高耐久性金属複合化導電繊維の創出ー超臨界二酸化炭素を用いた金属複合化デポジションシステムの構築とその応用ー	70～ 71
12	遠赤外線開発研究センター		准教授	山本 晃司	金属表面プラズモンによる電磁波の超集束効果を用いた、微量液体測定用テラヘルツ波プローブの研究開発	72～ 73
13	生命科学複合研究教育センター		特命助教	駒田 致和	大脳皮質発生におけるintermediate progenitorの意義	74～ 75

No.	部局	講座・専攻・領域	職	研究代表者	研究課題	目次
14	生命科学複合研究教育センター		特命助教	武澤 友広	高機能発達障害児における成功経験の想起が行動制御に及ぼす効能の検証	76～ 77

■福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業

【脳発達プロジェクト研究】

1	医学部医学科	薬理学	学内講師	西宗 敦史	神経細胞内M ₁ 受容体量を指標とした幼若マウス中枢神経系の拘束ストレス応答の解析	80～ 81
2	医学部看護学科	母子看護学・助産学	准教授	佐々木 綾子	児童虐待防止のための親性育成看護介入プログラムの開発ー脳科学を基盤とした効果検証ー	82～ 83
3	医学系研究科	附属子どもの発達研究センター	教授	友田 明美	fMRIを用いた注意欠陥多動性障害(ADHD)における報酬系の神経基盤に関する検討	84～ 85
4	工学研究科	知能システム工学	准教授	小西 慶幸	神経回路形成における細胞周期制御因子の新しい機能	86～ 87

【学内共同研究等】

1	医学部医学科	人体解剖学・神経科学	助教	伊藤 哲史	in vitroおよびin vivoイメージングを用いて聴覚神経回路における聴覚情報の統合の仕組みを探る	88～ 89
2	医学部医学科	組織細胞形態学・神経科学	助教	謝 敏珏	PSD 95 関連分子による AMPA 受容体制御について	90～ 91
3	医学部医学科	微生物学	准教授	千原 一泰	アダプター蛋白質3BP2のB細胞における生理機能に関する研究	92～ 93
4	医学部医学科 教育地域科学部	分子生命化学 理数教育	教授 准教授	藤井 豊 浅原 雅浩	SNI 結合分子の探索と溶血性連鎖球菌特異的抗生剤の開発	94～ 95
5	医学部医学科	分子生体情報学	学内講師	矢澤 隆志	生殖腺体細胞の性差構築の分子機構の解析	96～ 97
6	工学研究科	生物応用化学	准教授	沖 昌也	異分野融合による多方面からのエピジェネティクスの解明	98～ 99
7	工学研究科	生物応用化学	講師	里村 武範	D-アミノ酸アッセイ系構築を目指したセンサー用素子の機能開発	100～ 101
8	工学研究科	知能システム工学	教授	池田 弘	亜鉛による痛覚調節機構の解明	102～ 103
9	工学研究科	ファイバーアメリ ティ工学	准教授	藤田 聡	ナノファイバーを用いたバイオハイブリッド材料の創製と幹細胞の微小環境制御	104～ 105

■福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費

【重点プロジェクト研究】

1	医学部医学科	外科学(2)	助教	池田 岳史	ヒト気管支における、ムスカリン受容体、アドレナリン受容体の同定と喫煙の影響	108～ 109
---	--------	--------	----	-------	---------------------------------------	----------

【学内共同研究等】

1	医学部医学科	耳鼻咽喉科・頭頸部外科学	医員	扇 和弘	難聴者に対する脳波計測に基づく客観的聴力評価	110～ 111
2	医学部医学科	耳鼻咽喉科・頭頸部外科学	医員	意元 義政	アレルギー性鼻炎患者におけるバイオマーカーの検討	112～ 113
3	医学部医学科	内科学(3)	准教授	此下 忠志	生活習慣病、腎尿路系疾患におけるIRAP/AT4のマーカータ	114～ 115
4	医学部医学科	泌尿器科学	教授	横山 修	しての臨床応用	
5	医学部看護学科	基礎看護学	准教授	上原 佳子	舌苔を有する高齢者へのアクチニジン含有洗口液による口腔清拭の効果	116～ 117
6	医学部医学科	微生物学	教授	定 清直	嚥下障害患者に対する嚥下造影検査自動解析ソフトウェアの開発(継続)	118～ 119
7	医学部医学科	耳鼻咽喉科・頭頸部外科学	助教	成田 憲彦	小児気管支喘息患者の病型診断用バイオマーカーの開発	120～ 121
8	医学部看護学科	小児科学	教授	大嶋 勇成		
9	医学部附属病院 医学部附属病院 医学部附属病院 医学部医学科	検査部 集中治療部 集中治療部 麻酔・蘇生学	助教 助教 講師 教授	糟野 健司 信川 泰成 安田 善一 重見 研司	EBNに基づく分娩後のシャワー浴および入浴開始時期に関する研究 急性腎障害(AKI)に対する酸化ストレス特異的迅速レドックス診断法の開発についての研究	122～ 123 124～ 125
10	医学部医学科	内科学(1)	助教	岸 慎治	解毒酵素GSTM1遺伝子多型とvincristineの薬動力学、効果・副作用との関連	126～ 127
11	医学部医学科	内科学(2)	講師	濱野 忠則	葉酸・ビタミンB ₁₂ 欠乏症による認知症発症機序の解明	128～ 129

■福井大学産学官連携本部平成23年度実用化研究助成(FUNTECフォーラム 福井大学研究シーズ紹介ポスター発表)

【知財創出研究】

1	工学研究科	材料開発工学	教授	橋本 保	化学分解・生分解可能な汎用リサイクル性材料	132
2	工学研究科	生物応用化学	准教授	寺田 聡	新しい細胞培養の添加因子	133
3	工学研究科	ファイバーアメリ ティ工学	准教授	藤田 聡	In vitro modeling of metastasis of cancer cells using nanofibers ナノファイバー基材を用いた癌細胞の浸潤性の定量	134

【知財育成研究】

1	医学部		助教	伊保 澄子	腫瘍細胞傷害活性を有する形質細胞様樹状細胞の誘導技術の確立とがん治療への応用	135
2	工学研究科	機械工学	准教授	伊藤 隆基	多軸負荷を考慮した疲労強度評価手法による設計支援解析ツールの開発	136
3	工学研究科	機械工学	准教授	新谷 真功	長周期波を含む南海地震から美術品を守る小型3次元免震装置の改良	137

No.	部 局	講座・専攻・領域	職	研究代表者	研 究 課 題	目次
【復興支援・防災技術開発】						
1	工学研究科	建築建設工学	准教授	磯 雅人	繊維補強吹付モルタルを用いた袖壁増設による補修・耐震補強技術の開発	138
2	工学研究科	建築建設工学	研究員	寺崎 寛章	効率的な除塩技術開発に向けた塩集積／析出予測モデルの構築	139
3	工学研究科	建築建設工学	研究員	藤本 明宏	パイプライン熱と地中蓄熱による農業用ビニールハウスの高度化に関する研究	140

※所属・職については平成23年度時点の表記としています

**平成 23 年度
福井大学研究育成経費**

平成 23 年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
社会科と道徳との「融合可能性」に関する研究

研究代表者： 橋本 康弘（教育地域科学部・准教授）

共同研究者： 野坂 佳生（金沢大学法務研究科・教授）

概 要	<p>新学習指導要領では、「各教科と道徳教育との関連を図る」とされており、「道徳教育の充実」が重要な課題である。本研究では、社会科と道徳が「連携」する場合にどのような教育内容（方法）が考えられるのかについて検討することを目的としている。このような発想に至った理由は、社会的価値と道徳的価値は同一視できる内容を含んでいるからであり、例えば、社会科や道徳では同じ「正義」や「公正」などを扱っている。このように共通に含まれる内容について道徳と社会科で扱う内容の「差別化」を図るとともにその「融合可能性」について検討した。その結果、従来の道徳と社会科における「正義」「公正」を扱った授業にはそれぞれ特徴（課題）があり、その課題を「法」を用いたアプローチを採用することで克服することが出来ることが明らかになった。</p>
関連キーワード	<p>新学習指導要領、道徳教育、社会科教育、「法教育」、教科間連携</p>

研究の背景および目的

新学習指導要領では「思考力・判断力・表現力」「言語活動の充実」「伝統・文化の尊重」などが注目されているが、一方で教育基本法の改正に伴い従前以上に「道徳教育の充実」が重要な課題であることは言うまでもない。各教科等の新学習指導要領本文には、新たに「学校教育における道徳教育は（中略）各教科に属する科目、総合的な学習の時間及び特別活動のそれぞれの特質に応じて、適切な指導を行わなければならない」（各教科等の新学習指導要領の 3 総則関連事項）と記述され、この意味するところは、文字通り、数学や地理歴史科、国語等、様々な教科で道徳教育との「関連付け」を学校現場に求めているということである。しかし、この分野の研究は、前述のような注目されている項目とは異なり、ほとんど研究されていないのが現状である。その理由としては、学校現場サイドの視点で考えてみると「道徳」の授業が既に行われており（道徳教育は現在行われている内容で十分であると考えられており）、他教科は他教科の内容を教えることで手一杯であり、道徳教育との「関連付け」まで手が回らないといったこと、新学習指導要領では前述の注目されている項目への対応に力が注がれており、「道徳教育の充実」まで手が回らないということが推測される。

一方で研究者サイドの視点からその理由を考えると、特に社会科、これまで社会科教育研究は中等教育（中学校・高等学校）段階では科学的な社会認識形成に関わる授業開発・カリキュラム研究が、初等教育段階では「子どもの学び」から捉える社会認識形成に関わる授業開発・カリキュラム研究が重視される傾向にあり、道徳教育と関連する可能性のある社会的価値観形成は「合意形

成」「合理的意思決定」という言葉で評されて研究が行われてきたが、道徳教育が目指す道徳的価値観形成は戦前の「修身」に対する反省から、また社会科の「教科固有性」を主張する立場から社会的価値観形成と道徳的価値観形成を結び付けて考察すること自体から距離を置くのが至極当然のように考えられてきたからではないかと想像される（科学的な社会認識形成を主張する研究者は社会科での「価値観」形成それ自体から距離を置くべきだとの主張をこれまで行ってきたのが好例）。

このような状況の中で本研究では、あえて社会科と道徳が「連携」する場合にどのような教育内容（方法）が考えられるのかについて検討することを目的としている。即ち、「社会科ではどのような道徳教育が可能なのか」について明らかにすることである。このような発想に至った理由は、社会的価値と道徳的価値は同一視できる内容を含んでいるからであり、例えば、社会科や道徳では同じ「正義」や「公正」などを扱っている。このように共通に含まれる内容について道徳と社会科で扱う内容の「差別化」を図ると同時にその「融合可能性」について検討する。そうすることで、新学習指導要領がその狙いとしている各教科（社会科）と道徳との関連付けができ、また、日々多忙な学校の先生方に社会科と道徳との間の関連付けの在り方（研究成果）について情報提供することで、学校の先生方の日々の実践の改善につながる。また教員免許更新講習などの教員研修の場に情報提供することができる。将来的には社会科並びに道徳がその育成に寄与する「公共性」を育むことを目的とする新教科のカリキュラムの提案を可能にするだろう。

研究の内容および成果

●これまで道徳教育や社会科教育では「正義」「公正」といった価値についてどのような授業がこれまで展開されてきたのか、その代表的な具体例を取り上げて、分析する（研究代表者：橋本担当）
→道徳教育における「正義」「公正」（「公平」）を扱った授業として、ジレンマ資料「誰にたくさんあげようかな」（諸富祥彦『道徳授業の革新—『価値の明確化』で生きる力を育てる』明治図書、1997、pp.183-188）を取り上げた。この授業を分析した結果、一般的に道徳教育の特徴とされている「徳目主義」「心情主義」「注入主義」「当為判断主義」に該当する授業であると判断でき、またこの授業では「価値判断基準」として徳目を与え、徳目に基づく「価値判断」は、心情的にならざるを得ないといった特徴を導出した。一方で社会科教育における「正義」「公正」を扱った授業として「長崎新幹線建設問題」（田本正一「状況論的アプローチによる社会科論争問題授業の開発」『社会科研究』第69号、2008、pp.11-20）を取り上げた。社会科授業が持つ特徴として一般的には「社会認識主義」「価値判断吟味型」「価値判断決定型」が想定できるが、本授業は、「価値判断決定型」に相当し、「価値判断基準」を生徒に吟味させ、追究させる、またその際の「価値判断」は生徒同士による吟味・討議を行う型になっていた。

●これまでの道徳教育や社会科教育で行われていた「正義」「公正」を扱った授業の特徴（課題）をそれぞれ明らかにする（研究代表者：橋本担当）
→道徳教育に関する授業については、「価値判断基準」が徳目であり、「価値判断」が心情的になることで、結果として、社会的現実的な判断とは「距離」がある判断を求める場合があるし、それが道徳教育の特徴であった。一方で社会科教育に関する授業については、「価値判断基準」を生徒同士で

討議・吟味させるだけで十分なのか。討議・吟味させる場合には確固とした「判断基準」があるのではないか、生徒は「判断基準」を踏まえないで判断することは社会的現実的な判断になりえない場合があるのではないかと、といった特徴（課題）が想定できる。

●道徳教育や社会科教育で扱う「正義」「公正」の二つの授業をどう融合するのかについて法の「手続きモデル」と「原理モデル」や法学教育論争等を参考に検討する（研究分担者：野坂担当）
→これまでの道徳教育における「徳目」は、「法原理」と類似性を持つ、一方で、社会科教育における「手続き主義」は、法における「手続き主義モデル」と位置付けることが可能になる。即ち、「法」は、道徳教育と社会科教育における「価値判断基準」「価値判断」と関連付けることが出来る。例えば、「赤ちゃんポストに賛成か反対か」といったことを授業として取り上げる場合、従来の道徳教育では、「人命尊重」といった徳目を踏まえた心情的な判断になりえるだろう。一方社会科教育では、どのような「価値判断」をするのか、「赤ちゃんポスト」に賛成・反対の意見を踏まえ、生徒同士で議論していくことになる。しかし、「法」的なアプローチを採れば、「人命尊重」といった「徳目」も社会的に是認される「法原理」として位置付け、「法原理」を参照して判断をすることが可能になる。

一方、「価値判断基準」として「個の人権原理」の「価値の優劣」を用いれば、社会的（法的）な「価値判断基準」を提示し、議論することが可能になる。いずれにしても、「法」的なアプローチを採ることが、従来の道徳教育や社会科教育での「正義」「公正」授業が抱える特徴を克服し、課題を解決することにつながる。

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

「主な発表論文等」

- (1) 橋本康弘・野坂佳生「『正義』『公正』の社会科教育論—社会科と道徳の『融合可能性』—」第60回全国社会科教育学会全国研究大会自由研究発表、平成23年10月
- (2) 橋本康弘「リーガルシティズンシップを育成するための内容確定—『基礎法学』的領域の場合—」第37回日本教科教育学会自由研究発表、平成23年11月
- (3) 橋本康弘・桑原敏典・吉村功太郎・中原朋生・野坂佳生・井上毅・後藤正邦「中等法関連教育の教材開発（Ⅲ）—「対立と合意」「効率と公正」の習得の場合—」第23回社会系教科教育学会自由研究発表、平成24年2月 他1件

「特記事項」

法テラス・法務省・最高裁・日弁連他主催「平

成23年度法教育シンポジウム in 福井」平成24年3月3日福井商工会議所コンベンションホールにて、基調講演・パネリストを務める。その内容は、平成24年3月福井新聞に詳報掲載、他2件（in 香川：四国新聞に詳報掲載・in 山梨：山梨日々新聞に詳報掲載）においても、前述と同役を務める。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金基盤研究（B）（一般）、平成24年度～平成26年度、代表、採択、13,100千円、法・心理・教育研究者の協同による小学生の発達段階に対応する法教育プログラムの開発

財団法人文教協会研究助成、平成23年度、代表、採択、600千円、中等教育における「司法及び法に関する学習」の充実のための教材開発研究

他、同財団よりシンポジウム開催経費を別途助成して頂く（479千円）

平成 23 年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
**非対称脂質二重膜を用いた膜タンパク質機能に対する
 脂質効果の解析**

研究代表者： 岩本 真幸（医学部・助教）

概 要	
細胞膜上に存在する膜タンパク質の機能は、周囲の脂質分子との相互作用によって影響されることが知られている。本研究では、膜タンパク質機能に対する細胞膜脂質の効果について、一分子機能計測が可能なイオンチャネルタンパク質を用い、詳細な解析を試みた。用いた KcsA カリウムチャネルは、フォスファチジルグリセロール (PG) がイオン輸送活性に必要なことが明らかにされている。今回、膜の両側の組成が異なる様々な非対称脂質二重膜を作成し、そこに KcsA チャネルを埋め込んで単一チャネル電流を計測した。PG の存在により KcsA チャネルの開確率が著しく上昇すること、さらに、これまでの有力仮説に反し、PG は膜の細胞質面から KcsA に作用していることが明らかになった。今後、脂質作用部位の特定を進め、脂質効果の具体的なメカニズムを明らかにしたい。	
関連キーワード	細胞膜、脂質、チャネル、電気生理、一分子計測

研究の背景および目的

我々の細胞は脂質二重膜からなる細胞膜に包まれているが、膜を構成する脂質組成は細胞種ごとに大きく異なる。そして、細胞膜に埋め込まれた膜タンパク質は、周囲の脂質環境によって機能や活性が調節されることが知られている。膜タンパク質は情報伝達や恒常性の維持など細胞にとって根源的な機能を司っており、細胞膜脂質はその機能を補う重要な役割を担っていると言える。しかし、膜タンパク質が脂質から受ける定性的な影響は認識されているが、具体的な作用メカニズムについては、現在においてもほとんど明らかにされていない。以前は困難であった膜タンパク質の結晶構造解析が急速に進み、構造と機能を関連させる研究が主流となりつつある。だがその多くの場合、細胞膜脂質効果の考慮が不十分、または全く取り入れられていないのが現状である。

本研究では、膜タンパク質の構造 - 機能連関を

正しく理解するには、細胞膜脂質効果の具体的なメカニズムを明らかにする必要があると考えた。そこで、最も普遍的に存在する膜タンパク質、イオンチャネルタンパク質を用い、効果の実態を詳細に解析することを目的とした。イオンチャネルは、細胞膜を介して電荷を持ったイオンを輸送するという機能上の特徴から、電流計測によって一分子レベルで機能の状態を観測することが可能である。また、様々な脂質組成を持った人工細胞膜の作成法もこれまでに確立されている。本研究では特に、膜の両側の脂質組成が異なる非対称脂質二重膜も用い、イオンチャネル周囲の脂質環境をきめ細かく制御し、機能への影響を評価する。さらに、イオンチャネルに対する網羅的な解析を通じ、本研究結果を他の膜タンパク質に対しても適用する可能性を探りたい。

研究の内容および成果

①方法

1. 試料調製 本研究では KcsA カリウムチャネルを測定試料とした。KcsA チャネルはイオンチャネルに共通したコア構造のみを持つ構造解析の最も進んだチャネルで、構造 - 機能連関の研究対象として、これまでに多数の研究手法がこのチャネルに投入されてきた。まず pQE82 ベクター (Qiagen 社) に組み込んだ KcsA チャネル遺伝子を大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し、IPTG による発現誘導を行った。大腸菌細胞膜分画を調製し、界面活性剤ドデシルマルトシドによる可溶化後、アフィニティーカラム精製によって高純度 KcsA チャネル試料を得た。単一チャネル電流測定には、精製後の KcsA チャネル試料を透析法によって各種リン脂質

のプロテオリポソームに組み込んで用いた。

2. 単一チャネル電流計測 脂質平面膜法により単一 KcsA チャネル電流を測定した。脂質平面膜は、測定チャンバーを 2 つに仕切るテフロンシートの小孔 (直径約 100 μm) に作成した。膜の両側が同一のリン脂質から成る対称膜 (図 1 左側) はベントニング法、両側のリン脂質組成が異なる非対称膜 (図 1 右側) は張り合わせ法で作成した。一方のチャンバーに KcsA を組み込んだプロテオリポソーム溶液を少量添加して攪拌し、膜融合によって KcsA チャネルを脂質平面膜に移行させた。KcsA チャネルは細胞質側 pH の低下で活性化するため (pKa 約 5)、一方のチャンバーの溶液の pH を 4.0、他方を 7.5 とし、常に一方に配向したチャネル

のみから選択的にシグナルが得られるようにした。

②結果

1. 単一KcsA チャンネル電流のリン脂質依存性 KcsA チャンネルのイオン輸送活性には、陰イオン性リン脂質のフォスファチジルグリセロール (PG) が必要であることが明らかにされている。そこで、対称膜中での単一チャンネル電流を指標に、リン脂質の効果を検討した。その結果、KcsA チャンネルは PG のみならず、他の陰イオン性リン脂質 (PS や PA) 膜においても、90% 程度の高い開確率を示した。一方、電気的に中性の PC 膜、陽イオン性の EPC 膜中では、開確率が 10 分の 1 以下に大きく低下した。これらの膜中ではコンダクタンス (開チャンネル内のイオンの通り易さ) も減少したが、その度合いは開確率の減少程ではなかった。よって、陰イオン性リン脂質の主要な効果は開確率の上昇、つまり、チャンネルの開閉遷移に伴う構造変化に直接関わるものであった。

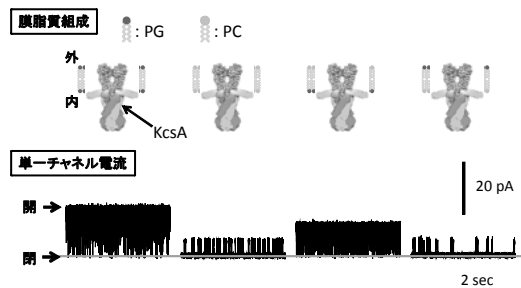


図 1. 様々な膜における KcsA 単一チャンネル電流

2. 非対称脂質二重膜を用いたリン脂質作用部位の模索 結晶構造解析によって、KcsA チャンネル膜貫通部位の細胞外側寄り (二重膜の外葉部分) に結合した PG が見つかっており (図 2)、この PG が脂質効果に関与すると考えられている。この仮説を検証し、陰イオン性リン脂質の KcsA チャンネルに対

する具体的な作用メカニズムを明らかにするため、様々な非対称脂質二重膜中で単一チャンネル電流を解析した。その結果、驚くべきことに、KcsA チャンネルは脂質二重膜の外葉が PG であっても、内葉が PC であれば低い開確率しか示さなかった。逆に、内葉が PG であれば、外葉が PC でも高い開確率を示した (図 1)。これらの結果は、これまで有力とされてきた仮説では全く説明できないものであった。

③まとめ

- KcsA チャンネル活性に対する脂質効果を単一チャンネル電流レベルで解析した。
- 陰イオン性リン脂質の存在がチャンネル開確率を著しく上昇させることを明らかにした。
- 陰イオン性リン脂質は、これまでの仮説に反し、内葉で KcsA チャンネルに作用していることを、非対称脂質二重膜の実験から突き止めた (図 2)。

④今後の展望

本研究結果は、KcsA チャンネルに対する脂質の作用メカニズムの新たな仮説を提唱するものであった (図 2)。今後、作用部位をさらに精度良く解明すべく、部位特異的にアミノ酸置換した KcsA チャンネルを用いて網羅的に解析を行っていきたい。

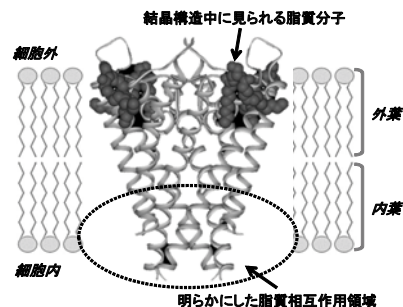


図 2. 新たにわかった KcsA の脂質感受領域

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

「主な発表論文等」

1. “Counting ion and water molecules in a streaming file through the open-filter structure of the K channel”
M. Iwamoto and S. Oiki, *J. Neurosci.* **31** (2011) 12180-8
2. “The Asymmetric Lipid Bilayer Revealed Sidedness of the Effective Phospholipids on the Single-Channel Properties of the KcsA Potassium Channel”
M. Iwamoto and S. Oiki, *Biophys. J.* **102** (2012) 537a
3. “Oriented reconstitution of a membrane protein in a giant unilamellar vesicle:

Experimental verification with the potassium channel KcsA”

M. Yanagisawa, M. Iwamoto, A. Kato, K. Yoshikawa and S. Oiki, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 11774-9

「特記事項」

関連研究成果 (上記発表論文 1) がメディア (福井新聞、中日新聞、日刊県民福井) で紹介された。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

申請予定の研究費

- 科研費・挑戦的萌芽研究・平成 25~26 年度
- 科研費・基盤研究 (C)・平成 25~27 年度

平成 23 年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
酸化ストレス応答における転写調節因子 Id の役割

研究代表者： 黒岡 尚徳（医学部・准教授）

概 要	酸化ストレスは、細胞傷害や細胞死を引き起こす一方で、様々なシグナルを活性化し、細胞の分化や増殖に重要な働きをしている。また、酸化還元（レドックス）反応の制御破綻は、細胞の腫瘍化と密接に関連していると考えられるが、その分子基盤はよくわかっていない。bHLH 型転写因子の機能阻害因子であり、発癌との関連が指摘されている転写調節因子 Id は、酸化ストレスによってホモ二量体～多量体を形成するが、最近、発癌関連分子（bZip 型転写因子 ATF3 及び p53）と酸化ストレス依存的に結合することを見出した。本研究でさらに解析を行い、Id と ATF3 や p53 の結合には Id の多量体化が重要であること、そして Id1 は、酸化ストレスによる ATF3 のホモ二量体化を阻害し、p53 の DNA 結合領域と相互作用することなどを明らかにし、Id による細胞癌化の一因となる可能性を示した。
関連キーワード	酸化ストレス、レドックス、Id、ATF3、p53

研究の背景および目的

酸化ストレスは、DNA やタンパク質・脂質などの生体高分子を損傷し、細胞傷害や細胞死を引き起こす一方で、生体内で様々なシグナルを活性化（または不活性化）し、細胞の分化や増殖に重要な働きをすることが近年示されている。また発癌過程における酸化ストレスは、生じる時期や場所に応じて適切な細胞死を誘導する点で正常な分化に必須であり、さらに、酸化ストレスに応答して起きる酸化還元（レドックス）反応の制御破綻は、細胞の腫瘍化に密接に関連していると予想され、いくつかの癌細胞で実際に酸化ストレスの亢進が報告されている。従って、レドックス反応制御の分子基盤や、制御を受ける分子の実体を明らかにすることは、細胞の分化や増殖だけでなく、発癌の分子機構を理解するのに不可欠であると考えられる。生体内においてレドックス制御を受け、レドックスシグナルを中継する代表的な分子として遺伝子発現を調節する転写因子が挙げられるが、これまでの解析は Nrf2 などの一部の分子を中心に行われ、全体像の解明には至っていない。

代表者はこれまで、bHLH 型転写因子の機能を阻害し、細胞の分化抑制及び増殖促進作用を示す転写調節因子 Id の解析を行い、その活性（主に細胞内局在）制御機構について明らかにしてきた（Kurooka and Yokota, J Biol Chem, 2005, Makita, Kurooka et al, FEBS Lett, 2006）。一方で Id は、腫瘍化した細胞や組織の多くで発現の亢

進が報告されており、発癌との関連が指摘されているものの（Fong et al, Trends Mol Med, 2004）、その分子機構についてはよくわかっていない。

Id 分子は、他の bHLH 型転写因子とヘテロ二量体を形成し、ホモ二量体は形成しないものと従来考えられていたが、細胞内では酸化ストレス刺激（過酸化水素水処理）により、ホモ二量体～多量体を形成することが示された（第 33 回日本分子生物学会年会／第 83 回日本生化学会大会合同大会「酸化ストレスにより形成される HLH タンパク質の分子間ジスルフィド結合」）。形成されたホモ二量体～多量体は、還元剤の処理で単量体に戻ることから、システイン残基を介したジスルフィド結合が、Id 分子間で形成されることがわかった。このことは、酸化ストレス応答において Id が何らかの働きをしていることを示唆するものである。

本研究では、レドックス制御を受けた Id 分子が、レドックスシグナルが関与する生体内の様々な事象において、どのような役割を果たすのか明らかにすることを目的とする。代表者は最近、Id が bHLH 型転写因子以外に、酸化ストレスに依存して、発癌に関与する分子（bZip 型転写因子 ATF3、及び癌抑制タンパク質 p53）に結合することを見出したことから、これらについての解析を行った。本研究により、Id の発癌への関与が分子レベルで明らかになると予想され、Id を標的とした癌治療につながると期待される。

研究の内容および成果

(1) 酸化ストレスによる Id と ATF3 の結合

HEK293T 細胞において、3×FLAG-Id1~Id3、及び GAL4-ATF3 を一過性に発現させた後、回収した細胞抽出液を用いて、FLAG 抗体による免疫沈降を行った。その結果、Id1~Id3 ともに酸化スト

レスに依存して ATF3 と結合することが示されたが、他の bZip 型転写因子で、内在性に発現する ATF2 とは結合しないことが明らかになった（図 1）。また酸化ストレス刺激に伴って、細胞内における様々なリン酸化酵素が活性化することから、

種々の阻害剤を用いて Id1 と ATF3 の結合に与える影響について検討したが、いずれも顕著な変動はみられなかった。一方で、マウス Id1 は5つのシステイン残基を持つが、セリンに置換した変異体と ATF3 の結合を調べたところ、酸化ストレスによる Id1 のホモ多量体形成能と相関が認められた。Id1 と ATF3 の分子間には、ジスルフィド結合が生じないことから、酸化ストレスによってジスルフィド結合を介して形成された Id1 のホモ多量体が ATF3 に結合するものと推測される。さらに、酸化ストレスは ATF3 のホモ二量体形成を促進するが、Id1 は、この二量体化を有意に阻害することが判明した。ATF3 は、様々な刺激によって発現が誘導される転写因子であり、炎症反応の抑制といった免疫系における作用以外に、細胞の増殖抑制や、細胞死誘導活性を示し、癌抑制タンパク質として機能することが知られている。このことから、酸化ストレスによる Id と ATF3 の結合が、ATF3 分子の機能低下を引き起こし、細胞の癌化の一因となる可能性が考えられる。

(2) 酸化ストレスによる Id と p53 の結合

HEK293T 細胞において、3×FLAG-Id1~Id3、及び HA-p53 を一過性に発現させた後、ATF3 の場合と同様に免疫沈降を行った。その結果、Id1~Id3 とともに酸化ストレスに依存して p53 との結合が増強されることが明らかになった (図2)。一方で、bHLH 型転写因子 E タンパク質は、酸化ストレス刺激による p53 との結合が認められなかったが、MyoD は p53 と結合することが示された。また、Id1 のシステイン変異体と p53 との結合について検討した結果、やはり酸化ストレスによる Id1 のホモ多量体形成能と相関があることがわかった。さらに Id1 は、p53 の中央に位置する DNA 結合領域と相互作用することが判明し、その活性を (おそらく負に) 制御すると予想されることから、酸化ストレスによる Id と p53 の結合が、細胞の癌化の一因となる可能性が考えられる。

(3) 酸化ストレスによる Id と E タンパク質の結合

Id と E タンパク質の結合に及ぼす酸化ストレスの効果を調べたところ、両者の間でジスルフィド結合が形成されることが判明した。しかし、ジスルフィド結合を形成しない変異体でも結合の強さは変わらないことから、Id と E タンパク質の結合には、酸化ストレスは影響しないと考えられる。

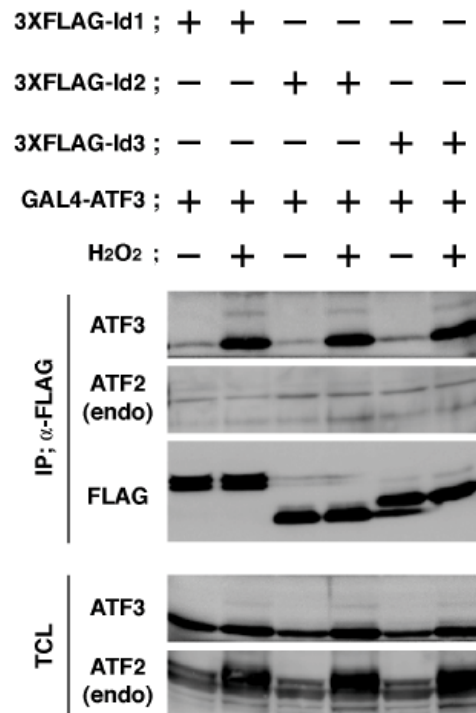


図1. Id と ATF3 の酸化ストレス依存的結合

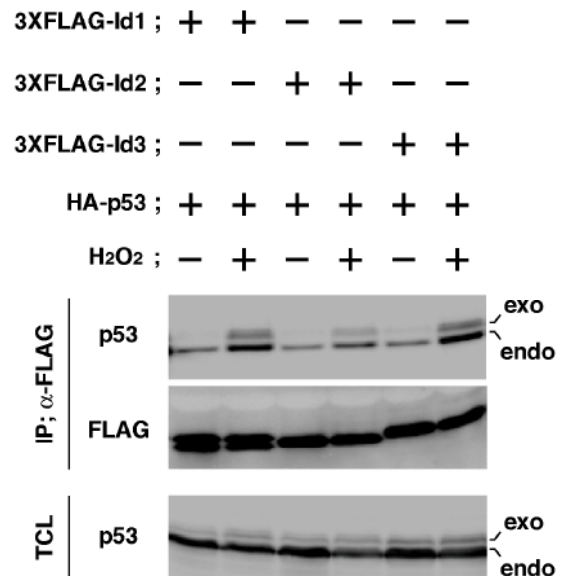


図2. Id と p53 の酸化ストレス依存的結合

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

「主な発表論文等」

Hisanori Kurooka, Takeshi Nakahiro, Kentaro Mori, Kazuo Sano, and Yoshifumi Yokota
BMP signaling is responsible for serum-induced Id2 expression.
Biochem. Biophys. Res. Commun., in press.

「特記事項」

特になし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科研費補助金・挑戦的萌芽・H24~26・「HLH タンパク質 Id による酸化ストレス応答制御と発癌分子機構の解析」・代表・申請中

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」 ステロイド産生を司る新規遺伝子の同定とその転写制御機構の解明

研究代表者：水谷 哲也（医学部・准教授）

概 要
<p>転写因子 SF-1 はステロイド関連遺伝子の発現に重要であると共に性腺や副腎の発生・分化に必須の転写因子であり、その機能解析はステロイド産生細胞への分化制御メカニズムの解明に極めて重要である。本研究では、DNA マイクロアレイと ChIP-on-Chip 法を併用したゲノムワイドな解析より、新たな SF-1 標的遺伝子の同定を試みた。その結果、今まで SF-1 の標的遺伝子とは考えられていなかった 10 の遺伝子を同定した。その中で P450 ファミリーへのヘム供給に関与する ALAS1 と電子伝達を担う FDX1、FDXR が SF-1 によって発現誘導されることで、P450 ファミリーに属するステロイド代謝酵素の活性化に関与していることが示された。さらに GSTA3 が SF-1 依存的に発現調節され、ステロイド代謝に関与する重要な因子であることが明らかとなった。</p>
関連キーワード
SF-1, SF-1 標的遺伝子、ステロイドホルモン産生

研究の背景および目的

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

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

ホルモン産生を増強する細胞の創出に成功している。この成果は同じ原基から派生する性腺と副腎の分化メカニズムの解明や、ステロイド産生疾患に対する新たな再生医療法の開発につながると考えられる。本研究では、この分化誘導系を用いて DNA マイクロアレイと ChIP-on-Chip 法を併用したゲノムワイドな解析より、新たな SF-1 標的遺伝子の同定を試みた。その結果、今まで SF-1 の標的遺伝子とは考えられていなかった 10 の遺伝子を同定した。その中には、グルタチオントランスフェラーゼ A3 (GSTA3)、5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) およびフェレドキシンリダクターゼ (FDXR) が含まれていた。そこで、これら因子の SF-1 による転写制御メカニズムおよびステロイド産生に対する役割の解明を試みた。

研究の内容および成果

新たな SF-1 標的遺伝子を同定するために、DNA マイクロアレイと ChIP-on-Chip 法を併用したゲノムワイドな解析を行った。Flag タグ付 SF-1 を恒常的に発現させた幹細胞を用いて Promoter tiling array (ChIP-on-Chip) 法により転写開始点近傍に SF-1 がリクルートされる遺伝子を検索したところ、2,986 遺伝子が単離された。さらに幹細胞に GFP (コントロール) または SF-1 を、アデノウィルスを用いて導入し SF-1 によって 4 倍以上発現量が変化する遺伝子を DNA マイクロアレイにより検索したところ、461 遺伝子が単離された。Promoter tiling array と DNA マイクロアレイで重複した 78 の遺伝子を個別に解析した結果、最終的に 14 の SF-1 標的遺伝子を同定した。この中には、今まで SF-1 の標的遺伝子とは考えられていなかった 10 の遺伝子が含まれていた (ALAS1, CLU, GSTA3, KCNK3, FDXR, PHF10, RALGDS, ADAMTSL1, TAGLN, UPP1)。

興味深いことに、この中には SF-1 によって発現が抑制される遺伝子 (ADAMTSL1, TAGLN, UPP1) も含まれており、SF-1 による新たな転写調節 (抑制) 機構が示唆された。

(1) ALAS1、FDX1 および FDXR の転写制御メカニズムとステロイド産生に対する役割

ヘム合成律速因子 ALAS1 は様々な組織で発現が認められるが、特に副腎、性腺といったステロイド産生細胞や肝で発現が高い。そこでステロイド産生細胞における ALAS1 の転写調節メカニズムについて検討したところ、転写開始点上流 3.5 kb に SF-1 が結合することで活性化され、さらにこの領域を介した転写の活性化には組織特異性があることが明らかとなった。

一方、ミトコンドリア内の P450 の電子伝達に関与する FDX1 (FDX1 は上記の方法では単離されなかったが、個別の解析により SF-1 の標的遺伝子であ

りながら、SF-1 以外の転写因子も同時に要求されることを見いだした) および FDXR はそれぞれ転写開始点近傍に存在する SF-1 結合領域を介して、転写が活性化されることを明らかにした。また FDX1 の転写には SF-1 のみならず cAMP responsive element binding protein と協調して転写調節されていることを見いだした (図)。

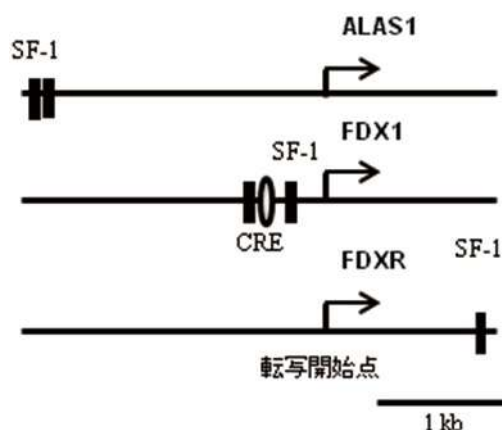


図 ALAS1, FDX1 および FDXR の転写調節領域の概略図

以上の結果から、P450 ファミリーへのヘム供給に関与する ALAS1 と電子伝達を担う FDX1、FDXR が SF-1 によって発現誘導されることで、P450 ファミリーに属するステロイド代謝酵素の活性化に関与していることが示された。

(2) GSTA3 の転写制御メカニズムとステロイド産生に対する役割

SF-1 による GSTA3 の転写調節を ChIP アッセイ、ルシフェラーゼアッセイおよび RT-PCR 法により解析した。その結果、プロモーター近傍に SF-1 結合領域を同定し、その領域への SF-1 の結合が転写の活性化に重要であることを明らかにした。さらに内在性に SF-1 が発現する H295R 細胞を用いて GSTA3 の発現を検討したところ、発現していた GSTA3 が SF-1 のノックダウンによりその発現が消失した。これらの結果から、GSTA3 の発現は SF-1 依存的であることが示された。次に GSTA3 が細胞内でステロイド合成に関与するかどうかを明らかにするために、卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞を用いて検討した。KGN 細胞にアデノウィルスを用いて GSTA3 を強制発現させたところ、プロゲステロン (基質としてプレグネロンを添加) およびアンドロステンジオン (基質として DHEA を添加) の増加が認められた。以上の結果から、GSTA3 が SF-1 の新たな標的遺伝子として、ステロイド合成において機能的にも重要な因子であることが示された。

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

「主な発表論文等」

Yazawa, T., Kawabe, S., Inaoka, Y., Okada, R., **Mizutani, T.**, Imamichi, Y., Ju, Y., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 127-132 (2011)

Hatanaka, A., Chen, B., Sun, J.Q., Mano, Y., Funakoshi, M., Kobayashi, H., Ju, Y., **Mizutani, T.**, Shinmyozu, K., Nakayama, J., Miyamoto, K., Uchida, H., Oki, M.: Fub1p, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. *Genes Genet. Syst.* 86, 305-314 (2011)

水谷哲也, 宮本 薫: クロマチン高次構造変換解析による転写調節領域の同定. *日本生殖内分泌学会雑誌* 16, 27-29 (2011)

水谷哲也, 宮本 薫: ステロイド合成律速因子であるコレステロール輸送タンパク質 StAR の新たな転写調節機構. *生化学* 83, 388-391 (2011)

Miyamoto, K., Yazawa, T., **Mizutani, T.**, Imamichi, Y., Kawabe, S., Ju, Y., Umezawa, A.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol. Cell. Endocrinol.*

336, 123-126 (2011)

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

「特記事項」

シンポジウム:

卵巣におけるクロマチン構造変換を介した転写調節機構. 第 16 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2011, 11.

国際学会発表

Transcriptional regulation of steroidogenic-related genes by SF-1 through its dependent alternations of chromatin structure. *Experimental Biology* 2011. 4.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

若手研究 (B)・卵巣分化における新たなエピジェネティック制御機構の解明・代表・採択
神澤医学研究振興財団・卵のクオリティを評価する新たなバイオマーカーの開発と良質な卵の発育メカニズムの解明・代表・採択

武田科学振興財団・C-type ナトリウム利尿ペプチドを用いた新たな不妊症治療の開発・代表・採択

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」 肝発がんモデルのマイクロRNAダイナミズムに基づいた分子創薬

研究代表者： 中本 安成（医学部・教授）

概 要
慢性ウイルス肝炎からの発がんを誘導する責任遺伝子を同定することを目的に、マウスモデルにおいて発がん率の異なる肝組織の遺伝子発現プロファイルと比較した。このモデルの経時的観察において、移植 8 カ月後には肝細胞の異型性が出現し、17 カ月後にはすべてのマウスに肝がんが発症した。炎症性発がん過程の初期段階に相当する時期（肝炎 6～9 ヶ月目）に変動する 157 個の遺伝子（シグナル伝達 26 個、細胞増殖 23 個、代謝 23 個、転写・分化 15 個、その他）を明らかにした。がん組織のマイクロRNA（miRNA）分子について網羅的にスクリーニングしたところ、発現の亢進を示す 8 個の miRNA 遺伝子が明らかとなった。これより、肝臓における前がん状態で悪性転化を制御する分子病態および miRNA 分子（oncomiR）が示唆された。
関連キーワード
癌、遺伝子、マイクロアレイ、動物、内科

研究の背景および目的

我が国には慢性肝炎患者（B 型、C 型）が 200 万人以上存在し、毎年 3 万 5 千人が肝細胞がん（肝がん）により死亡している。肝がんの制御が困難である最大の要因は、慢性肝炎における炎症反応が発がんポテンシャルを亢進しており（炎症性発がん）、この活性を特異的に低下させる治療法が確立していないことである。

そこで、炎症性発がんの病態に基づいて独自に構築した慢性肝炎マウスモデルを用いて、肝炎か

ら発がんに至る過程（前がん状態）で特異的に変動する分子病態を検討した。分子病態の検討においては、包括的解析として DNA チップおよび Real-time 定量的 RT-PCR 法を用いるとともに、酸化ストレスに関連する細胞内シグナルの変化に注目して肝細胞の動態と併せて検討した。さらに、これらの分子病態を制御するマイクロ RNA（miRNA）分子をスクリーニングして機能的に検討した。

研究の内容および成果

慢性肝炎モデルの作成は、B 型肝炎ウイルス（HBV）トランスジェニックマウス（系統 107-5D；遺伝学的背景 H-2^d）に対して、胸腺摘除術、放射線照射（900 cGy）の後に野生型 B10D2（H-2^d）マウスの骨髄と脾細胞を順次移植した。移植 8 カ月後には肝細胞の異型性が出現し、17 カ月後にはすべてのマウスに肝がんが発症した。このモデルの経時的な検討に基づいて、以下の成果が得られた。

（1）発現遺伝子プロファイル解析（図 1）：

炎症性発がん過程の初期段階に相当する時期（肝炎 6～9 ヶ月目）の発現プロファイルを明らかにした。この時期に特異的に変動する 157 個の遺伝子（シグナル伝達 26 個、細胞増殖 23 個、代謝 23 個、転写・分化 15 個、その他）を明らかにした。これらは肝炎の急性期や肝がん組織にみられる遺伝子群とはほとんど重複を認めない特徴的なものであった。また、組織学的に前がん結節

（preneoplastic foci）と呼ばれるがん化に向かう細胞集団が出現する時期（前がん状態）に先行していることが分かった。

（2）酸化的 DNA 障害：

（1）と同時期の肝細胞には、慢性炎症の結果として誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の活性化が起り、酸化（8-OHdG）およびニトロ化 DNA 損傷塩基（8-ニトログアニン）の蓄積が認められた。

（3）miRNA 分子の分離、検出（図 2）：

マイクロアレイ法を用いて、がん組織において特異的に変動している遺伝子について網羅的にスクリーニングしたところ、発現の亢進を示す 8 個の miRNA 遺伝子が明らかとなった。このうち 6 つは既報の患者肝組織での検討結果と一致しており発がん病態への関与が強く示唆された。

（4）miRNA 分子の機能解析：

8 個の miRNA について in vitro 機能解析を実施したところ、2 つの miRNA において肝がん細胞株

での細胞増殖作用とコロニー形成能を亢進させた。これらの結果より、肝臓における前がん状態で悪性転化を制御する分子病態および miRNA 分子

(oncomiR) が示唆された。さらに、これらは肝臓の炎症性がんにおけるがん化のポテンシャルを制御する標的分子となる可能性が示された。

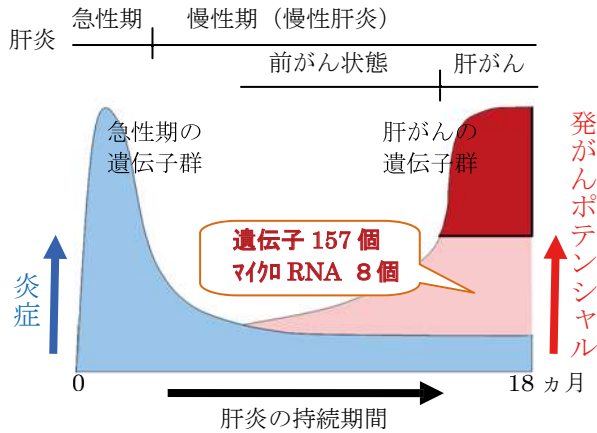


図 1. マウスモデルの発がん病態

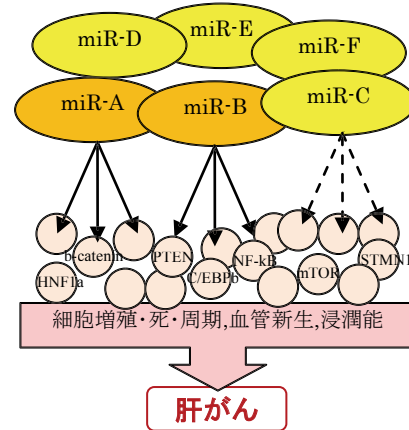


図 2. マイクロ RNA のがん化過程

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

「主な発表論文等」

- 1) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 163: 165-177.
- 2) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S: Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 53: 1206-1216.
- 3) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S: Hokuriku Liver Study Group: Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 141: 128-140.
- 4) Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Arihara F, Kitahara M, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S: Frequency of CD45RO+ subset in CD4+CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2011; 307: 165-173.
- 5) Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 2011; 81: 281-290.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

文部科学省；新学術領域研究（研究領域提案型）；公募研究（H24～H25）；課題名：慢性炎症が生み出すウイルスと宿主ゲノムの協調による新たな腫瘍遺伝学の創成；代表；申請中；19,700千円

平成 23 年度福井大学研究育成経費 「競争的資金獲得を目指す研究」
食物アレルギーの耐性獲得機序の解明と新規治療法の開発

研究代表者： 大嶋 勇成（医学部・教授）

共同研究者： 安富 素子（医学部・助教）、林 仁幸子（医学部附属病院・医員）

河北 亜希子（医学部附属病院・医員）

概 要	オボアルブミン（OVA）の経口投与で即時型アレルギー性下痢症状を呈する食物アレルギー動物モデルを用い、抗原感作成立状態から免疫寛容を誘導する方法を検討した。オリゴマンノースを結合させたリポゾームに OVA を封入（OVA-OML）し、鼻腔粘膜投与を行うと、経口チャレンジにより惹起される即時型下痢症状は抑制された。症状抑制には、腸間膜リンパ節 CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞と CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞、OVA 特異的分泌型 IgA の誘導、OVA 特異的 IgE 産生抑制の関与が示唆された。また、SINGR1、CR3 が OVA-OML が作用する上で重要と考えられた。一方、OVA をビタミン D3 とデキサメサゾンと共に混合し皮膚塗布する方法では、むしろ誘発症状が増悪された。OML 経鼻粘膜投与法は、食物アレルギーの新規治療法となる可能性が示唆されたが、皮膚塗布による免疫療法はアジュバントを検討する必要があると考えられた。
関連キーワード	食物アレルギー、経口免疫寛容、制御性 T 細胞

研究の背景および目的

食物アレルギーの患者は近年増加傾向にあり社会的問題となっている。食物アレルギーの治療は原因食物の除去が基本となるが、食物除去は患者とその家族に身体的・精神的・経済的負担となり、誤食時に重篤な症状が誘発される危険がつきまとう。そこで、原因食物を摂取しても症状が惹起されないよう原因食物に対する耐性獲得を誘導する方法の確立が求められている。

現在、幾つかの施設で原因食物を少量ずつ摂取して耐性獲得をめざす経口免疫療法が検討されているが、耐性獲得までに長期間を要し、自然経過で耐性が成立しただけの可能性も指摘されている。また、治療中に重篤な副作用が誘発される危険性が高いことが問題となっている。

従来の免疫寛容を誘導する方法の多くは、抗原感作が成立前に介入する手法がとられて来た。しかし、臨床現場では抗原感作が成立している患者に、免疫寛容を誘導することが求められる。我々はこれまでに、抗原特異的 IgE 存在下でも、クローン除去・アナジー、制御性 T 細胞の誘導により経口免疫寛容が誘導されること（J Allergy Clin Immunol 2005）、抗原感作マウス脾臓中に即時型アレルギー症状を抑制する調節性 CD8 陽性 T 細胞

が存在することを明らかにした（J Allergy Clin Immunol 2009）。これらの結果に基づき抗原特異的制御性 T 細胞を誘導することで経口免疫寛容を誘導させる食物アレルギーの新規治療法の開発を目的とした。

食物抗原のような外来性抗原に対し CD8 陽性 T 細胞が反応するためには、抗原提示細胞のクロスプレゼンテーション機能により食物抗原が提示される必要がある。クロスプレゼンテーションの機序は不明な点が多いが、マンノースレセプターを介して抗原が取り込まれるとクロスプレゼンテーションが生じやすいとの報告があることから、オリゴマンノースを結合させたリポゾームを利用して抗原投与を行う方法の有用性を検討した。また、表皮中のランゲルハンス細胞はクロスプレゼンテーションにより CD8 陽性 T 細胞を活性化しうること、ビタミン D3 とデキサメサゾン刺激により活性化された CD4 陽性 T 細胞から制御性 T 細胞が誘導されることが報告されている。そこで、ビタミン D3 とデキサメサゾンと共に OVA を皮膚に 5 日間連続塗布する方法が免疫療法として有効か否かを検討した。

研究の内容および成果

1) オリゴマンノース標識リポゾーム（OML）の鼻腔粘膜投与による免疫療法

昨年度までの研究（福井大学平成 22 年度重点研究）で、あらかじめ OVA で腹腔感作したマウスの鼻粘膜にオリゴマンノース結合リポゾームに OVA を封入させたもの（OVA-OML）を 5 日間投与する

免疫療法を行うと、OVA 経口チャレンジにより惹起される即時型下痢症状が抑制されることを明らかにした。この時、OML による免疫療法により OVA 特異的分泌型 IgA の誘導、OVA 特異的 IgE 産生抑制が生じ、腸間膜リンパ節中に CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞と CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞が

増加することが観察された。そこで、免疫療法を行ったマウスの腸間膜リンパ節 CD8 陽性 CD28 陽性 T 細胞と CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞をフローサイトメーターにより分離し、それぞれ別の OVA 感作マウスに輸注して経口チャレンジを行ったところ、CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞が即時型下痢症状を抑制する機能を持つことが明らかとなった。

食食細胞の OML 取り込みは SINGR1、CR3 を介することが報告されている。OVA-OML を点鼻投与する前に抗 SINGR1 抗体や抗 CR3 抗体を投与しておくこと、OVA-OML による症状抑制効果が減弱したことより、OML 点鼻による免疫療法には SINGR1 と CR3 が重要な役割を持つことが考えられた。

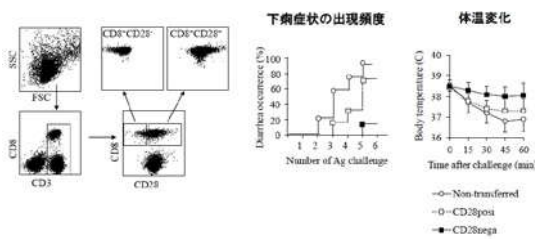


図 1. 腸間膜リンパ節 CD28-CD8+ T 細胞輸注によるアレルギー性下痢症状の抑制効果

2) ビタミン D3(VitD3)とデキサメサゾン(Dex)含有クリームを用いた経皮免疫療法

VitD3 と Dex 含有クリームに OVA を混合し、OVA 感作マウスの耳介に塗布する方法で免疫療法を行った。その結果、VitD3 と OVA 混合塗布群と VitD3 と Dex, OVA 混合塗布群は VitD3 単独塗布群よりも OVA 特異的 IgE 産生が増強し、OVA 経

口投与で誘発される症状はより重篤化した。

最近、牛乳アレルギーの治療として脱脂粉乳の皮膚への塗布による epicutaneous immunization が試みられているが、アジュバントの設定によっては、epicutaneous immunization はむしろ食物アレルギーを悪化させる危険があることが示唆された。

3) 抗原経皮感作により発症する新規食物アレルギーモデル作成への応用

抗原感作を全く行っていないマウスの耳介に VitD3 と OVA を混合塗布し、OVA 特異的 IgE を測定した。その結果、VitD3 と OVA の混合塗布により OVA 特異的 IgE 産生が誘導され、OVA 経口投与により即時型下痢症状が生じるモデルが作成できた。本モデルは社会問題になっている経皮感作により発症する食物アレルギーの新規モデルとして、その発症機序の解明および、治療法の開発に応用することが期待される。

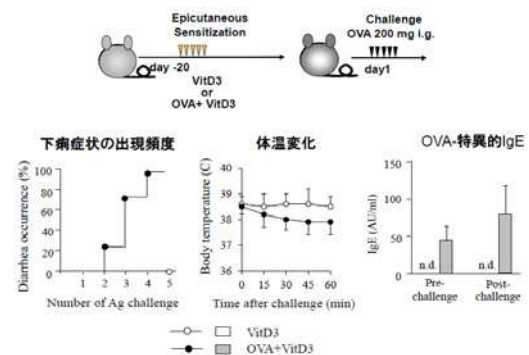


図 2. VitD3 と抗原混合塗布による経皮感作誘導

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

「主な発表論文等」

- 1) Immunotherapy with oligomannose-coated liposomes ameliorates allergic symptoms in a murine food allergy model. *Allergy* 67:371-379 (2012)
- 2) 抗原感作とアレルギー疾患発症予防 アレルギー・免疫 19:9-10 (2012)
- 3) アレルギー疾患の病態：免疫細胞の関与 小児内科 43:1825-29 (2011)
- 4) 周産期の環境と小児アレルギー疾患発症のリスク 免疫反応の発達 周産期医学 41:605-607(2011)
- 5) アレルギー疾患発症に関わる免疫システム アレルギーの臨床 31:381-385 (2011)
- 6) Roles of regulatory T cells in oral tolerance and food allergy. In "Regulatory T cells" ed by Hayashi RS (2011)

「特記事項」

本研究の内容は以下の国際学会の Mini symposium で発表した
Immunotherapy with oligomannose-coated liposomes ameliorates allergic symptoms in a murine food allergy model The 16th Asian Pacific Association of Pediatric Allergy Respirology and Immunology 2011.10.28-30 Fukuoka

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
厚生労働科学研究費 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 食物アレルギーの発症要因の解明および耐性化に関する研究 (代表：海老澤元宏) 分担 平成 23 年度配分経費 100 万円

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」 亜鉛欠乏によるうつ状態におけるノルエピネフリンの関与に関する 基礎的研究

研究代表者：小俣 直人（医学部・講師）

共同研究者：村田 哲人（医学系研究科附属こどもの発達研究センター・客員教授）

清野 泰（高エネルギー医学研究センター・教授）

概 要
近年、情動発達障害の一因として、亜鉛欠乏が指摘されている。一方、情動発達には発育環境が重大な影響を及ぼすことが知られている。本研究では、亜鉛欠乏が実験動物に対する離乳後社会的隔離（post-weaning social isolation: PWSI）による情動変化に与える影響を評価した。また、これに対するノルエピネフリン（norepinephrine, NE）作動性神経系の関与を検討した。高架式十字迷路試験を施行したところ、コントロール群と比べてPWSI+亜鉛欠乏群では不安様行動が減少していた。また、PWSI+亜鉛欠乏群ではNE作動性神経系の活動性が上昇する一方、青斑核などにおけるNEトランスポーターの発現が低下していた。以上より、PWSI+亜鉛欠乏により不安様行動が減少し、その作用機序としてNE作動性神経系が関与することが推定された。
関連キーワード
亜鉛欠乏、離乳後社会的隔離、不安、うつ、ノルエピネフリン

研究の背景および目的

亜鉛は、精子形成、胎発生、小児の成長など生体の発達に関する酵素を中心とした多くの酵素活性に関与している。人体に入る亜鉛はすべて食品に由来する。厚生労働省「日本人の食事摂取基準（2010年版）」によれば、日本人が1日に必要とする亜鉛の摂取量はおよそ男性11mg、女性10mgとされているが、2009年の国民健康・栄養調査によれば、日本人の1日当たりの亜鉛摂取量は男性が8.8mg、女性が7.3mgであり、日本人の半数以上は亜鉛不足である確率が高いことが分かっている。精神科領域においても、亜鉛欠乏がうつ状態などにつながる情動発達の障害の原因として注目されている。

一方、生体の発達段階では様々な点で発育環境が重要となるが、2005年版のOECD社会指標によると、劣悪な発育環境の一つである社会的孤立の度

合いが、日本人は世界一高いと評価されてしまった。発達段階における社会的孤立は精神疾患の発症にも重大な影響を及ぼし、実験動物に対する離乳後社会的隔離（post-weaning social isolation: PWSI）を幼若期ストレスモデルとして、うつ状態の出現など情動への様々な影響が検討されている。

これらのことを鑑みると、社会的孤立に亜鉛欠乏が加わると、情動発達はさらに悪影響を受ける可能性が考えられる。本研究では実験動物を用いて、亜鉛欠乏がPWSIによる情動変化に与える影響を様々な行動実験を用いて評価した。また、情動や意欲を担っているノルエピネフリン（norepinephrine, NE）作動性神経の活動性や、NEトランスポーター発現の評価を通して、亜鉛欠乏がPWSIによる情動変化に与える影響の機序解明を試みた。

研究の内容および成果

離乳直後である3週齢のラットを購入してPWSIを開始し、1週間後に（4週齢）亜鉛欠乏食を2週間投与して亜鉛欠乏動物を作成した（6週齢）。

*実験動物の飼育条件

グループ飼育・普通食 (control)	グループ飼育・亜鉛欠乏食 (Zn(-))
隔離飼育・普通食 (PWSI)	隔離飼育・亜鉛欠乏食 (PWSI+Zn(-))

1. 不安様行動の評価

高架式十字迷路試験を施行し、不安様行動の評価を行った。床面より高い位置で壁に囲まれた走路（クローズドアーム）と壁のない走路（オープンアーム）とで構成された高架式の十字迷路に実験動物を5分間置き、オープンアーム滞在時間の短縮を不安増強の指標とした。コントロール群と比べてPWSI+亜鉛欠乏群では、オープンアームでの滞在時間の割合が有意に増加（不安が減弱）したが、その他に有意な差は認められなかった（図1）。なお、総移動距離、各アームへの侵入回数に関しては、各群間に有意な差はなかった。

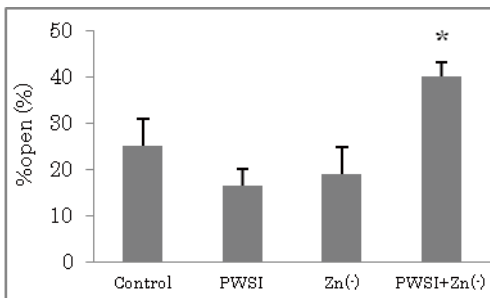


図1. 高架式十字迷路試験の結果

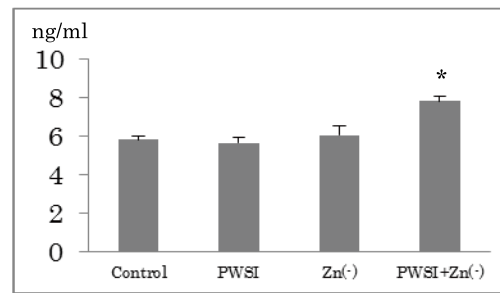


図3. 血中 MHPG 濃度

2. うつ様行動の評価

強制水泳試験を施行し、うつ様行動の評価を行った。実験動物を深い水槽に5分間入れ、水面上に動かないで浮いている時間（無動時間）の延長をうつ様行動の指標とした。コントロール群と比べて PWSI 群および Zn(-) 群では、有意ではなかったものの、無動時間が延長（うつが增強）する傾向となった。そのような傾向は、PWSI+亜鉛欠乏群には認められなかった（図2）。

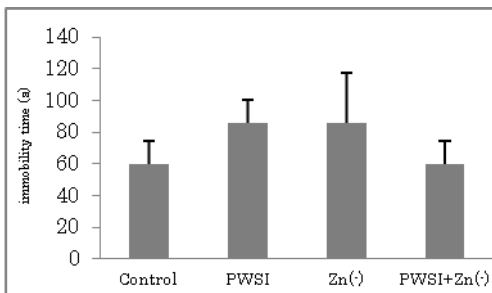


図2. 強制水泳試験の結果

3. NE 作動性神経系の活動性の評価

実験動物より血液サンプルを採取し、NE の代謝産物であり、NE 作動性神経系の活動性を反映する血中の 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) 濃度を測定した。コントロール群と比べて PWSI+亜鉛欠乏群では血中 MHPG 濃度が上昇していたが、その他に有意な差は認められなかった（図3）。

4. NE トランスポーター発現変化の評価

共同研究者である本学・高エネルギー医学研究センター清野教授のもと、NE トランスポーターの放射性リガンドである (SS)-[⁷⁷Br]BPBM を合成し、オートラジオグラフィーを施行した。実験動物に (SS)-[⁷⁷Br]BPBM を静脈投与してから3時間後、脳組織を取り出して 20 μm 厚の脳切片を作成した。脳切片を X 線フィルムに感光させ、画像解析装置 (FLA-7000、富士フイルム社製) で読み取り、同社製ソフトウェアの Multi Gauge Ver3.0 を用いて解析した。PWSI+亜鉛欠乏群ではコントロール群と比べて、青斑核などにおける NE トランスポーターの発現が低下していた（図4）。

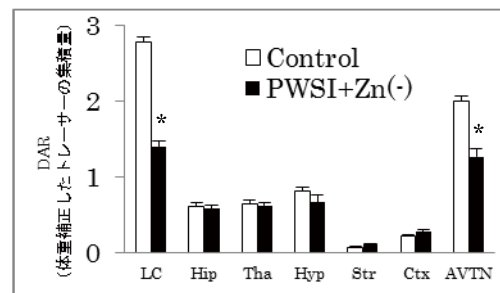


図4. NE トランスポーターの発現

LC: Locus coeruleus, Hip: Hippocampus, Tha: Thalamus, Hyp: Hypothalamus, Str: Striatum, Ctx: Cortex, AVTN: Anteroventricular thalamic nucleus

以上より、PWSI+亜鉛欠乏により不安様行動が減少し、その作用機序として NE 作動性神経系が関与することが推定された。

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

「主な発表論文等」

- Omata N, Murata T, Narita K, Maruoka N, Mitsuya H, Mita K, Nishimoto T, Sato M, Wada Y: Effects of antidepressants and mood stabilizers on serum levels of adiponectin. *Neuro Endocrinol Lett.* (in press)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 文部科学省科学研究費補助金基盤研究(C)・

2012年4月～2015年3月・亜鉛欠乏による情動変化のメカニズム解明に関する研究・代表・申請中

- 公益財団法人三島海雲記念財団学術研究奨励金・平成24年度・亜鉛欠乏がノルエピネフリン作動性神経系や脳糖代謝の変化を介してうつ病に与える影響・代表・申請中

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
酸化ストレス防御における
ヒト新規転写抑制因子 RhitH (ZNF205) の役割

研究代表者： 飯田 礼子 (医学部・准教授)

共同研究者： 安田 年博 (医学部・教授)、植木 美鈴 (医学部・助手)

概要	Mpv17-like protein (M-LP) は酸化ストレスとの関わりが示唆されるマウスの新規タンパク質である。我々は最近、M-LP 遺伝子の発現に関わる転写因子 Rhit (regulator of heat-induced transcription) を同定した。本研究では、酸化ストレスによる生活習慣病や老年疾患の発症予防に資することを目指して、これらのヒトホモログである M-LPH および RhitH (ZNF205) について解析を行った。RhitH 遺伝子をノックダウンすると M-LPH 遺伝子の発現が促進されたことから、M-LPH 遺伝子は転写抑制因子 RhitH の標的遺伝子であることを確認した。また、RhitH 遺伝子の転写調節領域の解析から、RhitH の発現調節には転写抑制因子 FOXD3 および転写促進因子 GABP が関わっていることが明らかとなった。一方、RhitH や M-LPH の発現を抑制/促進させたのち、電子伝達系の阻害処理を施した細胞では、対照に比べて細胞内活性酸素の濃度上昇が抑えられ、ミトコンドリア膜電位の低下が緩和されていた。これらの結果から、RhitH/M-LPH は酸化ストレスやアポトーシスに対する細胞の防御機構に関わるものと考えられた。
関連キーワード	活性酸素、酸化ストレス、転写因子、ミトコンドリア機能不全、

研究の背景および目的

老化や各種の炎症性疾患、糖尿病、ガン、動脈硬化、神経疾患などの発症に活性酸素種 (ROS) が関わることはよく知られている。また、ROS は、細胞内シグナル伝達物質としてアポトーシスを含む種々の現象に関与している。生体内では、常時 ROS が生成されているが、スーパーオキシドジスムターゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素や低分子抗酸化物質による消去系が働いて ROS 生成と消去のバランスが維持されている。

我々は、従前のマウスの年齢依存性発現生体分子検索の過程で、新規転写抑制因子 Rhit およびその標的遺伝子である M-LP を見出した。解析の結果、これらの分子は ROS の代謝調節機構に関与す

る可能性が示された。そこで、酸化ストレスによる生活習慣病や老年疾患の発症予防に資することを目指して、研究対象をヒトに展開し、Rhit と M-LP のヒトホモログである転写因子 RhitH (ZNF205) および M-LPH の酸化ストレス防御機構における役割を明らかにすることを目的として以下の3点についての解析を実施した。

1. M-LPH 発現における RhitH の転写抑制因子としての機能の検証
2. RhitH 遺伝子の発現調節機構の解析
3. RhitH や M-LPH 発現の抑制/促進がミトコンドリア機能に及ぼす効果の解析

研究の内容および成果

(1) ZNF205 全長 cDNA のクローニング

マウスの転写因子 Rhit のアミノ酸配列を用いてヒトのデータベースを検索すると、Rhit のヒトホモログ候補として ZNF205 が見出された (69% identity, 75% similarity)。そこで、MCF-7 細胞 (乳癌細胞) 由来の RNA を材料として RACE 法 (rapid amplification of cDNA ends method) による全長 cDNA のクローニングを行った。得られた cDNA は、554 アミノ酸をコードする 1,665 bp の open reading frame を含む 2,362 bp で構成されていた。データベースに登録された ZNF205 の配列 (GenBank ID: BC002810) と比較すると、5' 側と 3' 側にそれぞれ 19 bp および 268 bp の余分な塩基を有するものの、コードするタンパク質の

アミノ酸配列は完全に一致していた。そこで、このタンパク質を新たに RhitH と命名し、得られた cDNA 塩基配列をデータベースに登録した (GenBank ID: AB672633)。

(2) M-LPH 発現における RhitH の転写抑制因子としての機能の検証

MCF-7 細胞の RhitH 遺伝子をノックダウンすると M-LPH 遺伝子の発現が促進された (図 1)。さらに、胎児および成人の脾臓における RhitH および M-LPH の mRNA 量の測定により、両者の発現は逆相関関係にあることが示された。これらの結果から、M-LPH 遺伝子は転写抑制因子 RhitH の標的遺伝子であると考えられた。

(3) RhitH 遺伝子の発現調節機構の解析

RhitH 遺伝子の転写調節領域のプロモータ活性の解析により、転写開始点の 1513~1633 bp 上流に転写抑制因子が、また、23~193 bp 上流に転写促進因子が結合することが予測された (図 2)。そこで TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) および ChIP-Seq (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) による転写因子結合配列の検索を実施し、-1633~-1513 に forkhead box D3 (FOXD3)、また、-193~-23 には GA binding protein (GABP) の結合配列をそれぞれ見出した。Gel Shift assay や ChIP assay などによる詳細な解析の結果、RhitH 遺伝子の発現にはこれらの転写因子が抑制因子 (FOXD3) および促進因子 (GABP) として働くことが示された。

(4) RhitH や M-LPH 発現の抑制/促進がミトコンドリア機能に及ぼす効果の解析

ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤 Antimycin A (AMA) は、活性酸素の産生やミトコンドリア膜の脱分極を誘発し、アポトーシスを誘導する作用をもつ。そこで、RhitH 遺伝子のノックダウンあるいは M-LPH 遺伝子の過剰発現が、AMA 処理によるミトコンドリア機能の低下に及ぼす影響について解析を行った。RhitH や M-LPH を抑制/発現させた上で AMA 処理を施した MCF-7 細胞では、対照細胞に比べて細胞内過酸化水素の濃度の上昇が抑えられ (図 3)、ミトコンドリア膜電位の低下が緩和されていた (図 4)。これらの結果から、RhitH/M-LPH は酸化ストレスやアポトーシスに対する細胞の防御機構に関わることが示唆された。

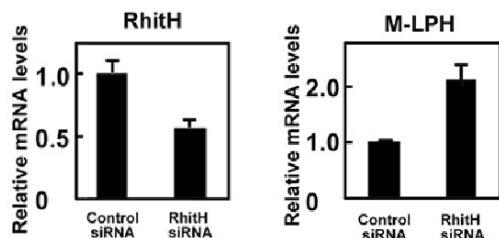


図 1. RhitH (ZNF205) ノックダウンによる M-LPH 発現誘導

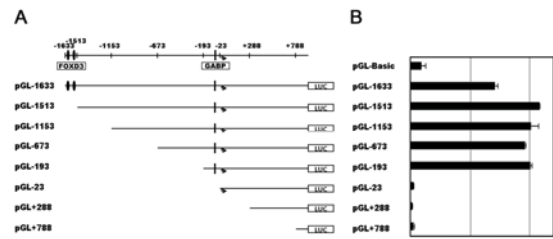


図 2. RhitH 遺伝子のプロモータアッセイ

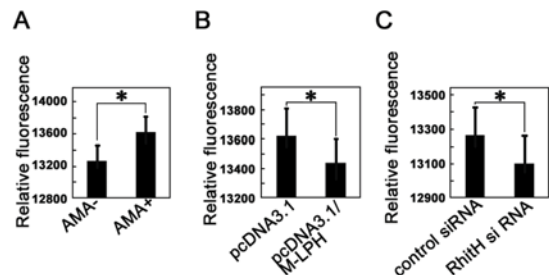


図 3. RhitH や M-LPH 発現の抑制/促進が呼吸鎖阻害剤 AMA 処理による細胞内 H₂O₂ の産生に及ぼす効果

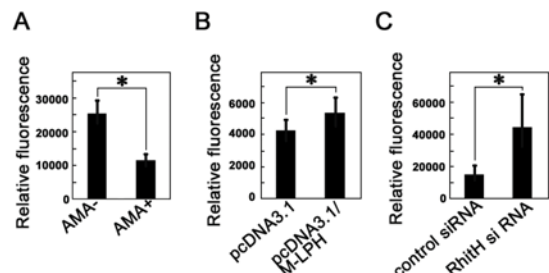


図 4. RhitH や M-LPH 発現の抑制/促進が呼吸鎖阻害剤 AMA 処理によるミトコンドリア膜電位変化に及ぼす効果

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

「主な発表論文等」

R. Iida, M. Ueki, T. Yasuda; Identification of RhitH as a novel transcriptional repressor of human Mpv17-like protein with a mitigating effect on mitochondrial dysfunction, and its transcriptional regulation by FOXD3 and GABP. *Free Rad. Biol. Med.*, 52, 1413-1422, 2012.

「特記事項」

本研究の成果は第 84 回日本生化学会大会 (Sep, 2011, 京都) において発表した。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 文部科学省・科学研究費・基盤 B・平成 21-25 年、年齢依存性発現生体分子の網羅的検索・同定と法医学的年齢推定への展開・代表・採択・平成 23 年度研究経費：2,600 千円
2. 公益財団法人ひと・健康・未来研究財団・平成 23 年度研究助成・平成 23 年・酸化ストレス制御における新規年齢依存性発現分子 M-LPH/ZNF205 の役割・代表・採択・1,000 千円

平成 23 年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
**原子力プラント安全稼働のための
 配管液滴衝撃エロージョン予測法の確立**

研究代表者： 服部 修次（工学研究科・教授）

概 要	液滴衝撃エロージョンの衝突角度依存性の研究では、配管材料の炭素鋼やオーステナイト系ステンレス鋼の研究はほとんど行われていない。また、液滴衝撃エロージョンの評価方法では、損傷深さを測定しているものはほとんどない。本研究では、スプレーノズルを用いて、純アルミニウム及び S15C の液滴衝撃エロージョンに及ぼす衝突角度の影響に関する材料依存性について検討した。純アルミニウムの液滴衝撃エロージョンにおいて、液滴が成長しない環境下では、衝突角度依存性は最も安全側の値として $V=V_0\sin\theta$ (V_0 : 流速, θ : 衝突角度) で評価できる。S15C の最大エロージョン速度の衝突角度依存性は $V\sin\theta$ で評価でき、 $V\sin\theta$ の 8.2 乗に比例する。また、S15C の 下限流速は、衝突角度の減少とともに大きく増加する。
関連キーワード	液滴, エロージョン, 衝突角度, 扇形ノズル

研究の背景および目的

原子力プラントの安全性については、福井県民をはじめ日本国民にとって重要な社会的関心事になっている。福井県は原子炉 14 基を保有しており、原子力プラントの高経年化に伴う配管の減肉は、特に高温液体を取扱う原子力施設において、非常に重要な問題である。研究代表者は、液滴衝撃エロージョン（液滴の衝突による配管壁面の減肉現象）の流速依存性及び液滴径依存性についてはその成果を既に報告している（機械学会論文集 A 編, 76 巻, 772 号, 2010-12, 機械学会論文集 A 編, 77 巻, 782 号, 2011-10）。

一方、液滴衝撃エロージョンに及ぼす衝突角度の影響に関する研究は、ガラス、セラミックス、

強化プラスチック、13Cr 鋼等の研究が主で、配管材料の炭素鋼やオーステナイト系ステンレス鋼の研究はほとんど行われていなかった。また、損傷量としては、質量減少速度やMDPR(平均壊食速度) で評価しており、配管減肉で問題となる最大深さの変化を取扱っている研究は報告されていない。

本研究では、スプレーノズルを用いて純アルミニウム及び配管相当材料の S15C の液滴衝撃エロージョンに及ぼす衝突角度の影響について検討した。また、液滴衝撃エロージョンに及ぼす衝突角度の影響を、材料によってどのように変化するか検討した。

研究の内容および成果

試験方法及び供試材料

試験装置

液滴衝撃エロージョン試験装置には、ASTM G134-95 に基づくキャピテーション噴流試験装置を使用した。図 1 に試験水槽の概略図を示す。本試験装置は、ノズル入り口の圧力（上流圧）及び、ノズル出口の圧力（大気圧）差により、水流の噴出直後の流速を決定した。

試験液には水道水を用い、水温が 19℃となるように制御した。上流圧は、10.0~35.0MPa の範囲で変化させた。

試験は、スプレーノズル（いけうち製高圧均等扇形ノズル 1/8MVNP2525S303）を用い、ノズル出口と試験面との間隔であるスタンドオフ距離（Standoff distance）を、最もエロージョンが発生しやすい 30mm に設定して行った。所定の試験時間毎に試験片の質量、表面形状を計測し、試験時間に対し最大エロージョン深さ（MaxDE）をブ

ロット、これより最大エロージョン深さ速度（MaxDER）を求めた。

供試材料

本試験では、試験面が 90°、75°、60°、45° になるように加工した純アルミニウム及び S15C 試験片を用いた。表 1 に各種試験材料の化学成分、表 2 に物理的性質及び機械的性質を示す。図 2 に試験片の形状を示す。試験結果は、所定時間毎に

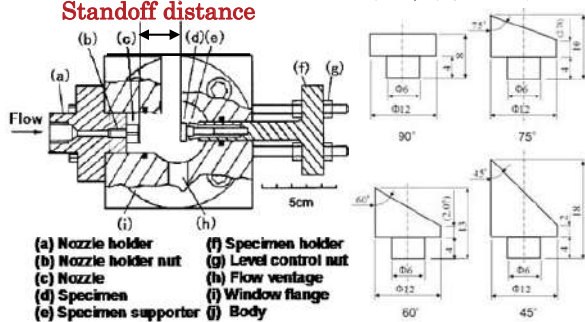


Table1 Chemical composition of test materials

Material	C	Si	Mn	V	P	S	Cu	Ni	Mo	Cr	Al	Fe	Ti
Al	-	0.06	-	0.01	-	-	0.01	-	-	-	Bal	0.12	0.01
S15C	0.16	0.21	0.45	-	0.01	0.016	0.01	0.02	-	0.05	-	Bal	-

Table 2 Mechanical properties of test materials

Material	Density kg/m ³	Tensile strength MPa	Vickers hardness HV0.2
Al	2.71 × 10 ³	95	38
S15C	7.81 × 10 ³	441	145

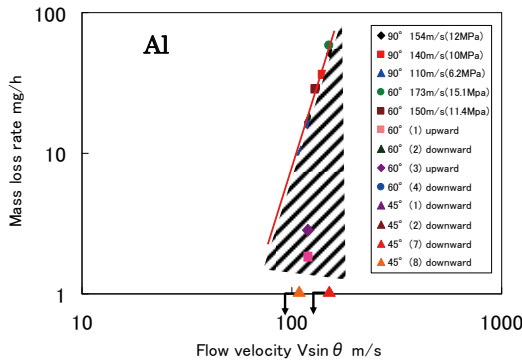


Fig.3 Relation between flow velocity $V_0\sin\theta$ and mass loss rate

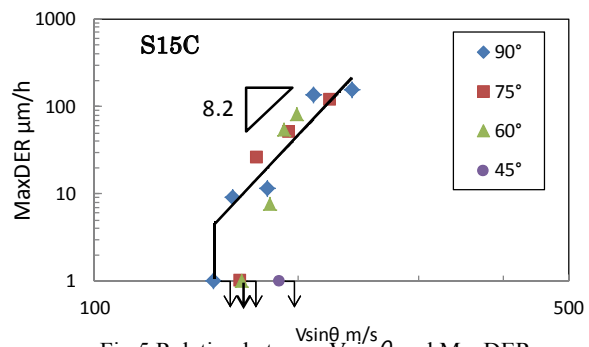


Fig.5 Relation between $V\sin\theta$ and MaxDER

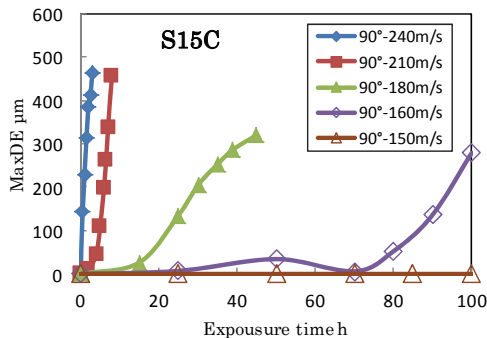


Fig.4 MaxDE curve

試験片をアセトン中で超音波洗浄した後、精密天秤（感度 0.01mg）で質量を測定したものと、二次元レーザー粗さ計により試験片の表面形状を計測したものをを用いた。

試験結果及び考察

図 3 は、Al 試験から単位時間当たりの質量減少量を求め、ある流速における質量減少速度の試験結果と比較したものである。衝突角度 60° において、試験面下向きの結果は、流速を変化させた試験結果と質量減少速度がほぼ同じであり、試験面上向きの結果は、流速を変化させた試験結果より質量減少速度が小さくなるのがわかる。衝突角度 45° の場合、試験面上向きの結果が特殊であるため、試験面下向きの結果のみ記載している。衝

突角度 45° では、衝突角度 60° における試験面上向きの結果よりもさらに質量減少速度が小さくなる。衝突角度が小さくなるほど質量減少速度は小さくなり、質量減少速度は図 3 における斜線部の領域内におさまる。したがって、液滴が成長しない環境下では、衝突角度依存性は最も安全側の値として $V = V_0\sin\theta$ (V_0 : 流速, θ : 衝突角度) で評価できる。

図 4 に S15C の衝突角度 90° の MaxDE 曲線を示す。明瞭な潜伏期および最大速度期があり、最大速度期で急激にエロージョンが進行していることが観察できる。また、流速が大きいほど損傷速度が大きく、潜伏期は短くなるという傾向が明瞭に表れている。流速 150m/s でエロージョンがほとんど進行しない下限流速となっていることが観察できる。

図 5 は、衝突角度 90°, 75°, 60°, 45° の試験結果を流速 V 、衝突角度 θ を用いて、試験面に対する流速の垂直成分 $V\sin\theta$ で同一平面上にプロットしたものである。図 5 の直線は衝突角度 90° の下限流速である 150m/s を除いた 3 点より求めたものであり、流速の 8.2 乗に比例している。衝突角度 75°, 60° 試験のエロージョンが発生したものについてみれば、すべてこの直線上に値が集まっている。以上により、最大エロージョン深さ速度は、 $V\sin\theta$ の 8.2 乗に比例することを見出した。

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

「主な発表論文等」

・服部ほか，“液滴衝撃エロージョンに及ぼす衝突角度の影響”，機械学会第 16 回動エネシンポ（2011）317-320. 日本機械学会論文集（A 編）に掲載決定。

・服部ほか，“S15C 炭素鋼の液滴衝撃エロージョンに及ぼす衝突角度の影響” 機械学会第 17 回動エネシンポ（2012）にて発表予定。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
競争的資金への申請を検討中

平成 2 3 年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
超小型レーザディスプレイのための 3 原色光合波器の研究

研究代表者： 勝山 俊夫（工学研究科・教授）

概 要	超小型のレーザディスプレイは、携帯型レーザプロジェクターや、めがね型網膜走査ディスプレイに代表されるように、次世代のディスプレイとして期待されている。このようなディスプレイの実現には、3原色のレーザビームを合波する超小型の合波器の実現が必須である。 このため、光導波路を用いる構造を基本とし、「方向性結合器」と呼ばれる構造を用いた3原色合波器を検討した。その結果、青色光を伝搬する導波路の2つの「方向性結合器」の間に、赤色光の導波路の「方向性結合器」を置くという新しいアイデアにより、赤、緑、青の光の合波効率を、それぞれ 100、97、92%と極めて高くできることが分かった。この合波器の大きさは $0.06 \times 6 \text{ mm}$ と、従来に比べて大幅に小型化され、かつ集積化されているため、経時変化が少なく、超小型レーザディスプレイ実現の鍵技術になると期待される。
関連キーワード	光合波器、レーザディスプレイ、光導波路、3原色、方向性結合器

研究の背景および目的

近年、ディスプレイ分野の発展は著しく、FPD（フラット・パネル・ディスプレイ）画像プロジェクター等、様々なディスプレイが用いられるようになってきている。このような中で、超小型のレーザディスプレイは、とくに今後の発展が期待されている。例として、携帯電話に組み込んだレーザディスプレイ（携帯型レーザプロジェクター）は、壁などに画像を投射することによって、どこでも誰でも簡単に、拡大された画像を見ることができる。また、めがね型網膜走査ディスプレイは、網膜に直接画像を走査するためスクリーンが必要が無く、超大型の画面もバーチャルに見ることができ、次世代のディスプレイとして期待されている。

しかしながら、これらの超小型レーザディスプレイは、赤、青、緑の3原色レーザビームを、光合波器を用いて1本のビームにし、走査投影する必要があるが、これらの光合波器は、ミラー等の光学部品を組み合わせて作製しているため、超小型化の点で難点がある。

このため、我々は、光導波路を用いた集積光回路で、この光合波器を作製する検討を開始した。従来、このような導波路型光合波器は、光通信に様々な形が実現しているが、3原色のレーザ光は、それぞれの波長が大幅に異なっており、波長間隔の小さい従来の光通信合波器の考え方を転用することができない。このため、様々なアイデアを検討し、それらの構造の光伝搬の様子をシミュレーションによって解析することにより、合波効率がよく、かつ小型化が可能な3原色の合波ができる構造を見出すことができた。

このような超小型の高性能3原色合波器は、超小型レーザディスプレイの重要な鍵技術であり、この合波器を用いて、超小型レーザディスプレイの実現が大幅に早まることが予測できる。その結果、新たなディスプレイの出現によって、コミュニケーションを含む社会生活の様態が一変し、より安心で安全な社会を実現することができると考えられる。

研究の内容および成果

1. 合波器の基本構造

3原色合波器として、光導波路を用いる構造を基本とし、合波効率がよく、合波器のサイズが小さくできる構造として、導波路から別の導波路へ光を乗り移らせる機能をもつ「方向性結合器」と呼ばれる構造を用いることとした。

2. 導波路構造

検討した導波路の断面構造は、横方向、縦方向共にシングルモード条件を満たす必要があるため、図1に示す埋め込み型導波路を採用した。

クラッド層は、基板と同じ SiO_2 で、コア層は

SiO_2 に Ge をドーピングしたものを想定している。また、コア層の高さを横幅と同じに設定した。



図 1. 赤、緑、青の光導波路断面構造

3. 具体的な合波器構造と特性

図2に示すように、青色光を伝搬する導波路の2つの「方向性結合器」の間に、青色光の導波路の「方向性結合器」を置くという新しいアイデアに基づき、構造の設計を行った。

その結果、赤色光、緑色光、青色光の合波効率が、それぞれ100、97、92%という極めて高い合波効率が得られることが分かった。図2は、それぞれの光が、導波路をどのように伝搬しているかを示したもので、下側から入射した3色のそれぞれの光が、上側の中心の1本の導波路に合波されていることが分かる。

このように、方向性結合器型と呼ばれる構造を基本とすることによって、高性能で超小型の合波器ができることの結論を得ることができた。検討の結果、従来の合波器のサイズが数センチメートルのオーダーに対して、今回の合波器のサイズは、縦横のサイズが 6×0.06 mm程度と、2桁程度的大幅なサイズダウンができることが示された。また合波効率が平均で96%と見積もられ、合波のときの光損失も少なくできることが示された。このように、今回検討した合波器は、従来に比べて大幅に小型化されており、かつ集積化されているため、経時的な特性の変化がないという特長を有する。

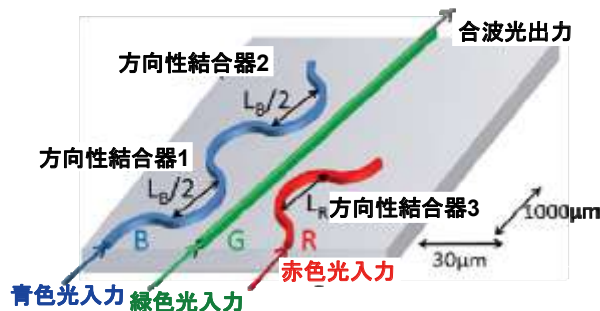


図2. 光導波路からなる3原色合波器

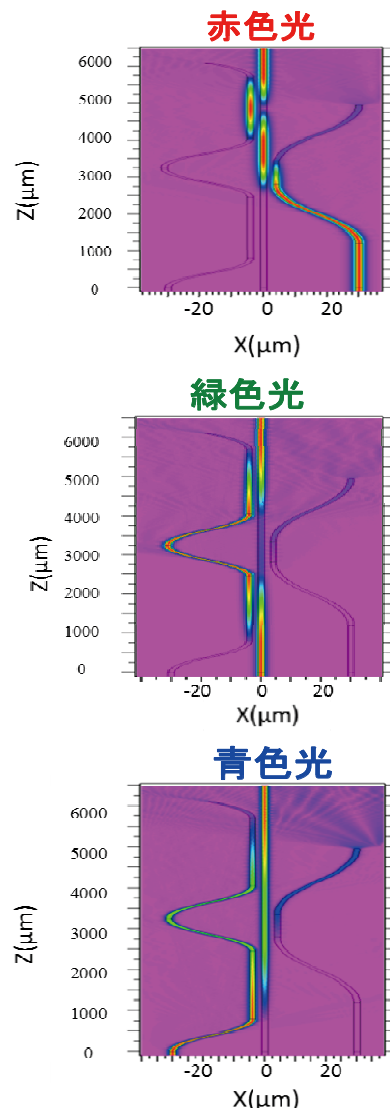


図3. 赤、緑、青色光のそれぞれの光伝搬の様子

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

「主な発表論文等」

- 1) Ryuji Morimoto, Yoshiaki Kakinoki, Yuya Kato, and Toshio Katsuyama, "Compact red-green-blue multiplexer with a waveguide structure", 17th Microoptics Conference (MOC' 11), Sendai, Japan, H-69 (2011)
- 2) 加藤裕侑也, 柿木良明, 森本竜治, 勝山俊夫, "Whispering Gallery Modeを用いた三原色対応合波器の提案", 平成23年度応用物理学会北陸・信越支部学術講演会, 金沢歌劇座, 18p-E-08, 2011-11
- 3) 柿木良明, 加藤裕侑也, 森本竜治, 勝山俊夫, "三原色対応 Y 分岐光導波路の高性能化", 平成23年度応用物理学会北陸・信越支部学術講演会, 金沢歌劇座, 18p-E-09, 2011-11
- 4) 森本竜治, 加藤裕侑也, 柿木良明, 勝山俊夫, "レーザーディスプレイ用導波路型 RGB コンバイナー", 第12回レーザー学会「レーザーディスプレイ技術」専門員会, 大阪大学待兼山会館, 2012-01
- 5) Ryuji Morimoto, Yoshiaki Kakinoki, Yuya Kato, and Toshio Katsuyama, "Compact red-green-blue beam combiner with a waveguide structure", The 1st Laser Display Conference (LDC' 12), Yokohama, Japan, LDCp7-12 (2012)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
NEDO、JST 関連の研究助成を申請準備中。

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」 新規試料導入法に関するフィージビリティスタディ

研究代表者： 内村 智博（工学研究科・准教授）

概要	
	本研究では、多光子イオン化／飛行時間型質量分析法の高感度化のための試料導入法として開発されたオンライン濃縮レーザー脱離試料導入法について、更なる研究の進展を目的として、オンライン濃縮レーザー脱離イオン化法の創生、および反応機構解明手法の開発に関するフィージビリティスタディを実施した。前者については、脱離レーザーとイオン化レーザーを照射して得られるイオン信号について、両レーザーの発振タイミングを変化させて、カラム先端部近傍でのガスパルス継続時間を測定した。後者については、脱離時の試料分子の噴出速度を精度よく測定するための手法、および脱離レーザー照射時の試料分子の温度について評価する手法を検討した。
関連キーワード	多光子イオン化法、質量分析法、オンラインコールド法、反応機構

研究の背景および目的

芳香族化合物などの高選択的な分析手法の一つとして、共鳴増強多光子イオン化／飛行時間型質量分析法 (Resonance-enhanced multiphoton ionization/time-of-flight mass spectrometry; REMPI/TOFMS)がある。これまでに、塩素系芳香族炭化水素や食品中の農薬分析などに応用されている。

近年、本手法の新しい試料導入法として、オンライン濃縮レーザー脱離試料導入法 (Online concentration by analyte adsorption/laser desorption; Online COLD)が開発された。この試料導入法は、ガスクロマトグラフと飛行時間型質量分析計のインターフェイスに求められる、①死容積が存在しない、②高温で使用できる、③耐久性が良好である、④試料の利用効率が低い、という要件を同時に満たしている。さらに、⑤世界最小の試料ガスパルス、⑥超高速繰返し速度での駆動、を実現し、⑦超音速分子ジェットとして試料を導入できるなど、他に類がない性能を有している。

本研究では、このオンライン濃縮レーザー脱離試料導入法の研究をさらに進展させるため、以下の項目に関するフィージビリティスタディを実施した。

(1) オンライン濃縮レーザー脱離イオン化法の創生

試料を可能な限り濃縮した状態でイオン化することが可能な新規試料導入法として「オンライン濃縮レーザー脱離イオン化法」に関する基礎研究を実施した。試料導入カラムの先端、及びその近傍で生成するイオンについて、その経時変化を観測した。

(2) 新たな反応機構解明手法の開発

共鳴多光子イオン化飛行時間型質量分析法を用い、新たな反応過程の追跡や制御に繋げるための手法について検討した。反応に関する諸条件について基礎的知見を得ることを目的とし、新たな反応中間体や生成物を観測する手法について検討した。

研究の内容および成果

実験装置を図1に示す。質量分析計には直線型の飛行時間型質量分析計を用いた。この質量分析計に、先端の内径を約 50 μm に細く加工したキャピラリーカラムを接続した。試料には *p*-クロロフェノールを用い、空気とともに真空チャンバー内に導入した。キャピラリーカラム先端に凝着した試料分子は脱離レーザーによりパルス状に導入され、イオン化レーザーによりイオン化された。脱離レーザーには Nd:YAG レーザーの第二高調波(波長 532 nm、繰返し周波数 10 Hz)を用いた。またイオン化レーザーには Nd:YAG レーザーの第四高調波(波長 266 nm、繰返し周波数 10 Hz)を用

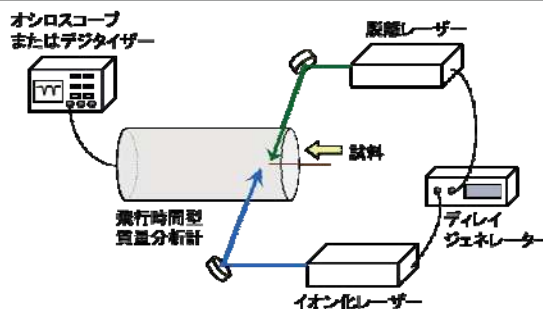


図1 実験装置図

いた。これら2台のレーザーの同期をとるために、ディレイパルスジェネレーターを用いた。イオン化された試料分子は、リペラー電極、および抽出電極により2段階加速され、飛行管内を通過し、マイクロチャンネルプレート検出器に到達する。このイオン信号は、デジタルフォスファースコープ、またはデジタイザーで検出・記録された。

(1) オンライン濃縮レーザー脱離イオン化法の創生

オンライン濃縮レーザー脱離イオン化法に関する予備実験として、脱離レーザーとイオン化レーザーを照射して得られるイオン信号について、両レーザーの発振タイミングを変化させて測定した。その際、イオン化レーザーをノズル先端部、および500 μm ずつ離して測定し、各位置におけるガスパルス継続時間を計測した。ノズル先端部に両レーザーを照射して得られた結果を図1に示す。この図より、脱離レーザーにより試料分子が脱離する際、数100 ns程度の時間が必要であることがわかった。また、イオン化レーザーをノズル先端部から0.5 mm離れた場合、得られるガスパルス継続時間の半値全幅は1.5 μs であった。この値は、これまでに報告されている機械的なパルスバルブで得られたガスパルス継続時間よりも短い。従って、試料分子が極限まで濃縮された状態でイオン化部に導入されていることがわかった。

また本研究では、脱離直後の試料分子の速さについても測定した。ノズル先端部近傍での平均の速さを求めたところ、約530 m/sであった。この値は超音速分子ジェットとして噴出する分子の速さとほぼ同等であった。以上の結果から、脱離した試料分子が1 mm前後の試料群(図3)を形成して飛行していることがわかった。

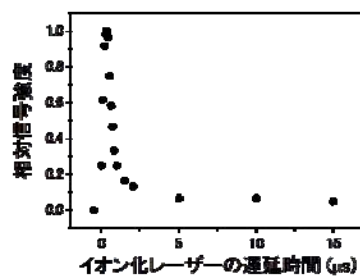


図2 信号強度の遅延時間依存性

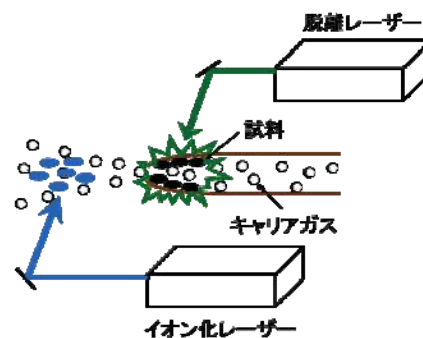


図3 脱離・イオン化の挙動について

(2) 新たな反応機構説明手法の開発

本研究では、上述のガスパルス継続時間に関連して、脱離時の試料分子の噴出速度を精度よく測定するための手法について検討した。また、脱離レーザー照射時の試料分子の温度について評価する手法を検討した。現在のところ、その値について再現性は得られていないが、今後、脱離レーザーの照射面積等を最適化して測定する予定である。一方、いくつかの有機化合物について、脱離レーザーを照射した際に得られるピーク信号について検討を行った。

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

「発表論文」

“An ultrashort-duration, high-repetition-rate pulse source for laser ionization/mass spectrometry”
T. Uchimura, N. Nakamura, T. Imasaka
Rev. Sci. Instrum., 83(1), 014101 (2012).

上記以外にも論文発表を予定している。

「学会・セミナー発表」

“多光子イオン化質量分析法のためのレーザー脱離試料導入法の性能評価”
内村智博, 中村奈未, 今坂藤太郎
日本分析化学会第60年会 (2011).

“レーザーによる化学計測－質量分析と蛍光寿命イ

メージング”

内村智博
福井大学化学研究会 第329回化学セミナー (2011).

上記以外にも学会発表を予定している。

「特記事項」

“反応状態分析方法及び装置”
内村智博, 特願2012-101913.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

H24, 25年度, 科研費, 挑戦的萌芽研究
“高感度・高選択的質量分析法の開発と反応機構説明手法の展開”

平成 23 年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
**イオン液体との相互作用を利用した
 二酸化炭素選択的透過高分子膜の開発**

研究代表者： 阪口 壽一（工学研究科・准教授）

概要	数段階の有機反応を経てアセチレンモノマーを合成し、新規に得られたアセチレンモノマーを金属触媒を用いて重合することにより非常に分子量の高いアセチレンポリマーを合成することができた。イオン液体の特性をポリマーへ付与するためイミダゾールとアセチレンポリマーの反応を検討した。反応前後のポリマー膜の IR スペクトルを比較すると、反応後の膜にイミダゾール由来の吸収が観測できたことから、反応の進行が確認できた。反応前のアセチレンポリマー膜の二酸化炭素と窒素の透過係数比 CO_2/N_2 は 11~16 であったが、イオン液体の特性を付与した新規アセチレンポリマー膜の CO_2/N_2 は 33~44 まで向上した。この結果より、ポリマー膜へのイミダゾール付加が二酸化炭素分離能の向上に大きな効果があると実証できた。
関連キーワード	高分子膜、気体分離膜、二酸化炭素分離、イオン液体、ポリアセチレン

研究の背景および目的

二酸化炭素分離は世界的に重要な課題であり、欧米では特に活発に研究されている。 CO_2 を選択的に液体に吸収させて取り出す物理吸収法は、混合ガスから CO_2 だけを取り除く方法として優れているが、作業コストや液体再生の問題により大規模での実用化には至っていない。一方、膜分離法は簡便な装置と低コスト運転が実施できるため期待されている分離技術である。しかしながら、現状の高分子材料では分離性能の高い膜が得られていないため実用化には至っていない。

我々は今までに多数の新規ポリ置換アセチレン膜を合成してきた中で、エチレングリコール鎖やスルホン酸など CO_2 と強い相互作用をもつ官能基を含むポリ置換アセチレン膜が現存する最高レベルの分離性能を示すことを見出した。この高い CO_2 の選択的透過性はポリマー膜が CO_2 と強い親和性

をもつため優先的に CO_2 がポリマー膜内部へ侵入してくることによるものである。このように、ポリマー膜と CO_2 の親和性を挙げることによって CO_2 分離膜の分離能を向上させることができる。

物理吸収法に使用されるイオン液体は CO_2 を吸収するが N_2 は吸収しないため、この特性を利用した新規高分子膜材料は優れた CO_2 分離性能を示すことが期待できる。高性能 CO_2 分離膜が開発できれば、工業的に排出される比較的高濃度の CO_2 を含むガスから CO_2 分離・回収へ応用することが可能になると考えられる。そこで、新しい CO_2 の選択的透過膜の開発を目的として、代表的なイオン液体であるイミダゾリウム塩を結合させたポリ置換アセチレンの合成方法を確立する。合成した高分子膜の CO_2 分離性能を評価し、結果を今後の分子設計にフィードバックする。

研究の内容および成果

・モノマーの合成

2 種類の置換アセチレンモノマーを図 1 のスキームに従い合成した。

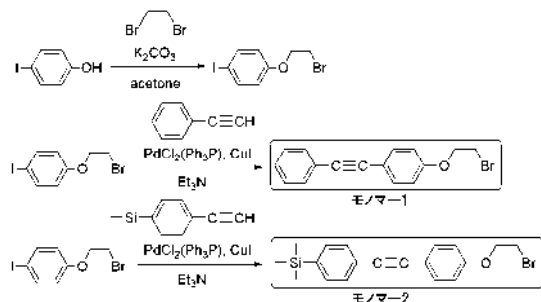


図 1. 置換アセチレンモノマーの合成スキーム

まず、1,2-ジブロモエタンと *p*-ヨードフェノールを反応させ、*p*-(2-ブロモエトキシ)ヨードベンゼンを得た。この化合物とエチニルベンゼンまたは *p*-トリメチルシリルエチニルベンゼンをカップリングさせることによって、2 種類の二置換アセチレンモノマーがいずれも約 50% の収率で得られた。

・ポリマー合成

合成した 2 種類のアセチレンモノマーのメタセシス重合触媒には五塩化タンタルとテトラブチルスズの混合物を用いた。重合反応は窒素雰囲気下、トルエン溶媒中で 80°C の条件に設定し 24 時間行った。2 種類の置換アセチレンモノマーはいずれも同様の重合性を示し、収率が約 70% でポリマーを与えた。得られたポリマーの数平均分子量は 40 万以上であり、非常に高分子量のポリマーであった(表 1)。

表 1. モノマーの重合結果

	収率	M_n	M_w/M_n
モノマー1	69	404,000	2.41
モノマー2	66	425,000	2.62

得られたポリアセチレンはいずれも黄色であり、トルエン、クロロホルム、テトラヒドロフランなどの一般的な有機溶媒に可溶であった。

・イミダゾリウム塩の形成反応

イオン液体の特性をポリマーへ付与するためのキー反応であるイミダゾールとアセチレンポリマーの反応を検討した(図 2)。

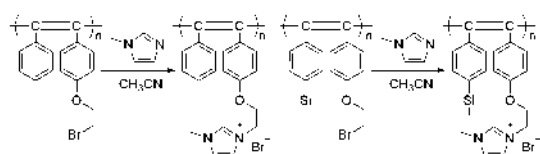


図 2. イミダゾリウム塩形成反応スキーム

まず、トリメチルシリル基を含まないポリマーをジメチルアセトアミドに溶解させ、そのポリマー溶液に *N*-メチルイミダゾールを加え、90°C で 48 時間反応させた。トリメチルシリル基を含むポリマーは溶媒をジメチルホルムアミドに変更して同様に反応を行った。反応前後のポリマー膜の IR スペクトルを比較すると、反応後の膜にイミダゾール由来の吸収が観測できたことから、膜状態であっても反応の進行が確認できた。しかしながら、反応後に得られたポリマーは不溶不融であったため、製膜することができなかった。

そこで、ポリマー膜を作製した後に膜状態でイミダゾリウム塩の形成反応を検討した。反応溶媒にはポリマー膜が溶解しないアセトニトリルを用い、アセトニトリル中へポリマー膜と *N*-メチルイミダゾールを加えて加熱して反応させた。反応前後のポリマー膜の IR スペクトルを図 3 に示す。反応後の IR スペクトルには、いずれのポリマー膜においても 1550 cm^{-1} 付近にイミダゾール基の C=N 結合に由来する吸収が見られており、反応が進行しイミダゾリウム塩の形成が確認できた。

それぞれのポリマー膜のイミダゾリウム塩の含有率を調べるため、反応後のポリマー膜の窒素含有

率の分析を行った。トリメチルシリル基を含まないポリマーでは、窒素原子の含有率が 2.4% であり繰り返し単位 3 つに 1 つの割合でイミダゾリウム塩が形成されていることがわかった。一方、トリメチルシリル基を含むポリマーでは、窒素原子の含有率は 4.9% と高く、繰り返し単位 5 つに 4 つの割合でイミダゾリウム塩が形成されていることがわかった。かさ高いトリメチルシリル基を含むことによるポリマー膜の高い自由体積分率と反応溶媒によるポリマー膜の膨潤の程度の差によって置換度に違いが見られたと考えられる。

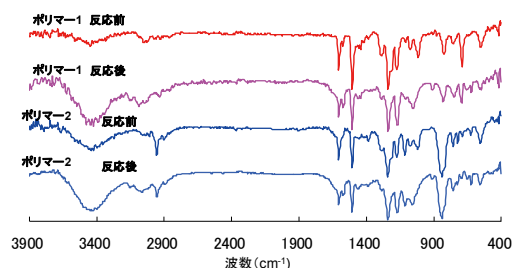


図 3. 反応前後の IR スペクトル

・ポリマー膜の二酸化炭素透過性

図 4 にポリマー膜の二酸化炭素透過係数と二酸化炭素/窒素の透過係数比をプロットした。反応前のアセチレンポリマー膜の二酸化炭素と窒素の透過係数比 CO_2/N_2 はそれぞれ 11 と 16 であったが、イオン液体の特性を付与した新規アセチレンポリマー膜の CO_2/N_2 はそれぞれ 33 と 44 まで増加した。この結果より、ポリマー膜へのイミダゾール付加が二酸化炭素分離能の向上に大きな効果があることが実証された。今後、さらに高い分離性能を達成するためには反応率の向上が課題である。

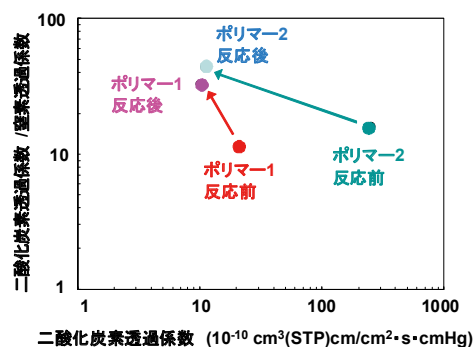


図 4. ポリマー膜の二酸化炭素透過特性

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

「主な発表論文等」

- ・伊藤飛生馬, 阪口壽一, 橋本保, 「イミダゾリウム塩含有ポリ(ジフェニルアセチレン)類の合成およびその気体透過性」, 第 61 回高分子学会年次大会, 2012 年 5 月 29 日, 横浜
- ・2012 年 9 月 高分子学会 第 61 回討論会にて

発表予定

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- ・科学研究費補助金(若手 B)、二酸化炭素分離膜材料に関する研究、研究代表者として申請予定
- ・その他の財団の研究助成も研究代表者として申請予定

平成 23 年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
**分子そろばんの合成：刺激に対し多段階応答する
 多進法デバイス素子の創出**

研究代表者： 徳永 雄次（工学研究科・教授）

概 要	
	<p>ナノデバイスの新規開拓を目的に、外部刺激に応答したそろばん型分子スイッチの設計と合成に関する基礎研究を実施した。分子そろばんをデバイス素子として利用するには、外部刺激（インプット）に対しアウトプット信号を容易に検出できることが不可欠であり、また超小型デバイスとしての利用を鑑みるとその信号は、低濃度で検出でなければならない。そこで、高感度な吸収・発光スペクトルの変化を期待し、色素や蛍光発光部を有する分子そろばんを合成したところ、刺激に応答した玉の移動等に伴うスペクトル変化を観測しアウトプット信号の増強に成功した。また、刺激の強弱に対し多段階に変化する分子そろばんの合成にも着手し、ある程度の選択性で 5 段階に変化することに成功し、5 進法でアウトプット可能な分子スイッチの可能性を見出した。</p>
関連キーワード	分子スイッチ、分子そろばん、外部応答、デバイス素子

研究の背景および目的

ナノ分野の進歩に伴い、デバイス等の軽量化・小型化が実現しつつあるが、更なる軽量化・小型化が求められている。この課題を解決する方策として、分子レベル（数ナノスケール以下）での配列や動的挙動を外部刺激によってコントロールすることで、デバイス機能を付与する検討も実施されている。しかしながら、これらの研究は理論上可能であるものの、分子レベルでは刺激に対するアウトプット信号が小さく、多くの分子を一つのユニットとして用いることで信号量を増強させる必要があるため、実質的なデバイスの小型化には今のところあまり貢献していない。よりコンパクトなデバイス素子創製を実現するためには、

1. アウトプット信号を増強する
2. デバイス 1 ユニットあたりの信号パターンを多くする（2 進法ではなく多進法）

ことが必要となる。そこで、第一にアウトプット信号の増強に関しては、簡便かつ高感度で信号を観測できるように、可視光吸収の大きな色素類や蛍光発光する部位を分子そろばんの軸部に導入し、‘玉’の移動によって吸収・発光スペクトル変化を与え実現する（図 1 a）。特に、吸収・発光スペクトルの変化をそれぞれの状態変化によって誘起させるため、2 成分間に相互作用を持たせる分子設計を施す。

第二に、多進法を実現するため、複数の玉を有する分子そろばんを合成し、外部からの刺激によって機械的な結合（そろばんの玉と軸のような関係の結合）をスライドさせ、1 分子で複数の状態変化を可逆的に行なう分子システムを構築する（図 1 b）ことで、‘玉’の移動によって吸収・発光スペクトル変化を与え複数の状態変化を観測可能な分子システムとする。

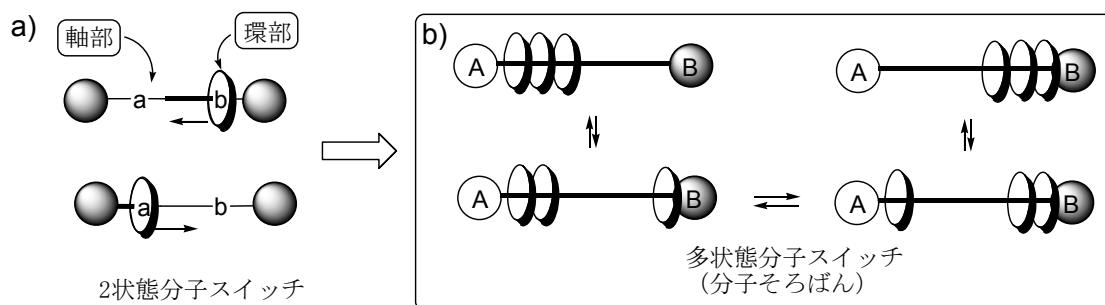


図 1. a) 分子そろばんによる 2 状態スイッチ（二進法）の模式図. b) 多状態スイッチ（多進法）の模式図. 吸収・発光部を B 部に導入し、‘玉’に相当する環部との相互作用により吸収・発光スペクトル変化を与える。

研究の内容および成果

○**研究の成果**：上述した目的に伴い、アウトプット信号の増強、アウトプットの多進法化に関する検討を行った。

1. **アウトプット信号の増強**：我々が開発した酸性・中性・塩基性の3状態に応答するそろばん型分子スイッチ(そろばんの玉を1個持つ分子：図2a参照)を基軸に検出部として、①色素と②蛍光発光部位を導入した2種の化合物(1, 2)を合成した。液性変化に伴い、それぞれ極大吸収波長が異なるなどの相違が見られ、また吸光度が従来の化合物に比較し、最大で10倍程度増強されることが見出され、3状態を簡便に検出可能なデバイス素子の合成を達成した(図2b)。

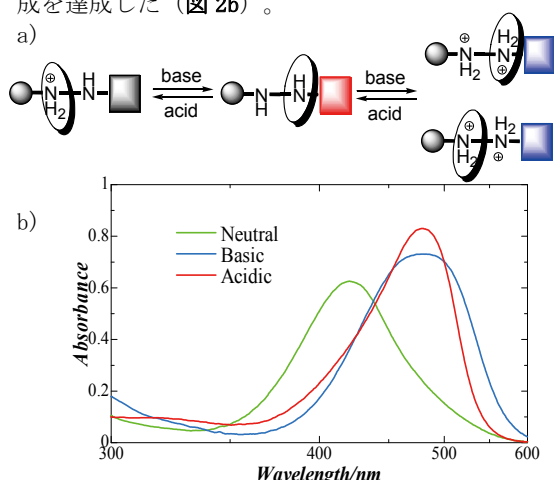


図2. a) 分子そろばん1及び2の液性変化に伴うスイッチング. b) 液性変化に伴う分子そろばん1の吸収スペクトル変化.

2. **アウトプットの多進法化**：以下2法検討した。

①**混合法による多状態システム(2分子システム)**：上記2種のスイッチの混合による多状態システムの基礎検討を行った。特に、上記1と2においては、そろばんの軸と玉の部位間の相互作用を変えるため、異なる玉を用いる分子設計とした。様々な強さの塩基を加え、それぞれの化合物に対するスイッチングの解析を行ったところ、分子スイッチ1ではあまりスイッチングが進行しなかった弱塩基性条件において、2では高い確率でスイッチする可能性を見出した。本結果は、スイッチ1と2が異なる液性でそれぞれ変化できたことになり、2種の分子スイッチを混合させた系においては、液性変化に伴い(塩基性酸性の強弱によって)4段階以上の異なるアウトプットが実現できる可能性を示したことになる。

②**複数の玉を持つシステム(1分子システム：(図3))**：玉を複数持つ分子そろばんを数種合成した。まず、スイッチ部を3個導入した化合物に関しては、刺激の強弱に応じた段階的なスイッチングが効果的に観測されず、現在まで3状態変化を検出できるに留まっている。他の分子そろばん(玉が2個)に関しては4種合成し、そのうち1種に関しては、塩基添加によって段階的にスイッチする化合物を見出した。本結果は、塩基の当量に応じた2段階のアウトプットを達成したことになる。また他の1種では、類似構造を持つものの確率論的による2段階のスイッチングが認められた。これらの相違は、立体構造に基づく電子的な要因に由来しているものと考えられる。

以上、アウトプット信号の増強と多進法化に関する検討し、色素を導入した分子そろばん1及で信号の増強を確認した。また複数の玉を持つ分子そろばんにおいて、ある程度の選択性で多段階にスイッチングするシステムを開拓した。

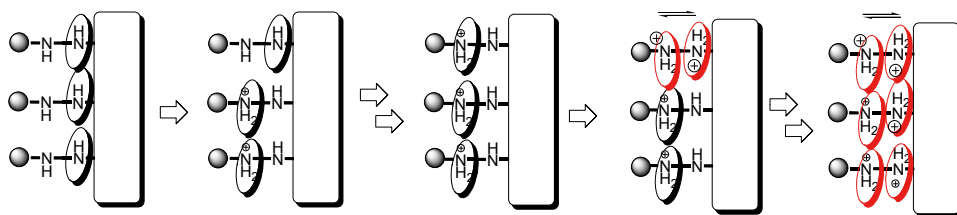


図3. 複数の玉を持つ分子そろばんとインプットの強弱に対する複数のアウトプットに関する模式図.

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

「主な発表論文等」

学会発表：平成23年度有機合成化学協会北陸セミナー：4件、平成23年度日本化学会北陸地区講演会と研究発表会：4件、論文については、今後作成する予定。

「特記事項」

○招待講演2件(東京理科大学、有機合成薬学シ

ンポジウム(徳島大))

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

○科学研究費補助金・基盤研究(C)・平成24年度ー平成26年度・代表者：徳永雄次 採択

○公益財団法人マツダ財団・第27回マツダ研究助成・平成24年度・代表者：徳永雄次 不採択

○今後財団等の申請も行う予定である。

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
光反応による高機能ペプチドの創出

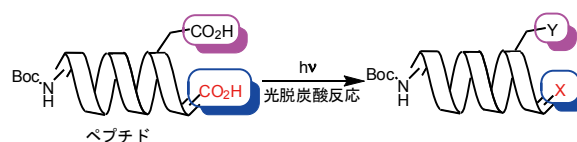
研究代表者： 吉見 泰治（工学研究科・准教授）

概要	
概要	ペプチドとはアミノ酸の集合体であり、我々の体の中で様々な役割を果たしている。さらに、現在では、このような生理活性に対する機能だけでなく、ペプチドがナノファイバーやナノチューブ、ナノシートのような集合体を形成することがわかり、新規なナノマテリアルの素材としても注目を浴びている。しかし、それらペプチドのより高度な機能の発現を目指した、直接的な化学構造変換反応は、ほとんど知られていない。本研究では、申請者が見出した有機光反応を用いて、ペプチドの直接的な化学変換を検討した。その結果、様々なアミノ酸残基を持つペプチドに、この光反応が適応でき、ペプチド同士のカップリング反応にも応用できることがわかった。つまり、この光反応を用いることで、直接的にペプチドの化学変換が可能になり、高機能なペプチドを容易に合成することができることを明らかにした。
関連キーワード	ペプチド、高機能ペプチド、光反応、光脱炭酸反応、直接的な化学変換

研究の背景および目的

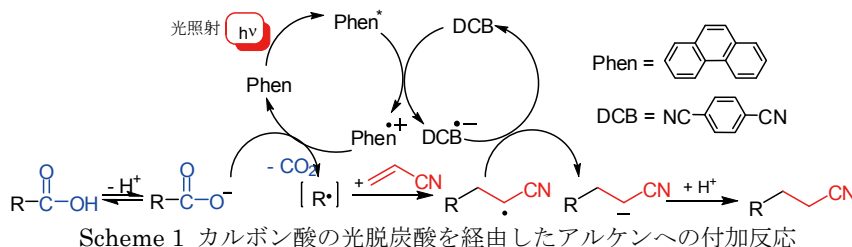
自然界には少なくとも 1000 を超える生理活性ペプチドが存在し、記憶、睡眠、免疫等の調節や抗菌・抗ウイルス、酵素阻害など幅広い機能を有している。さらに、現在では、このような生理活性に対する役割だけでなく、ペプチドがナノファイバーやナノチューブ、ナノシートのような集合体を形成することがわかり、新規なナノマテリアルの素材としても注目を浴びている。しかし、それらペプチドのより高度な機能の発現を目指した、直接的な化学構造変換反応は、ほとんど知られていない。それは、通常の化学反応では金属や加熱、強い塩基などを必要とするため、温度や金属、pH などの影響を強く受けるペプチドへ応用することができないためである。これらに対して、申請者はカルボキシ基を有する化合物（カルボン酸）から、芳香族のラジカルカチオンとの電子移動、続く脱炭酸反応により、炭素ラジカルを生成させ、不飽和結合に対する付加や還元反応などの様々な反応の進行により、直接的に官能基を変えることに成功した。その反応機構を、Scheme 1 に示す。この反応機構を見ればわかるようにフェナントレ

ン(Phen)や 1,4-ジシアノベンゼン(DCB)は光エネルギーを駆動力とする有機分子触媒であり、それぞれ触媒量(5 mol%)の存在で反応が進行する。この反応では、加熱や金属・強塩基や強酸の使用が必要ないので、アミノ酸や単純なペプチドに応用が可能である。また、様々な有機溶媒も使用できる一般性の高い反応である。



Scheme 2 光脱炭酸反応による直接的なペプチドの化学変換

このような背景のもと、本研究では、申請者が見出したこの光脱炭酸反応を用いて、ペプチドの直接的な化学変換やペプチド間の炭素—炭素結合をつくり、新たな生理活性や機能の高いペプチドの合成方法の確立を目的とする(Scheme 2)。



Scheme 1 カルボン酸の光脱炭酸を経由したアルケンへの付加反応

研究の内容および成果

ペプチドは様々な官能基を有するアミノ酸の集合体である。そこで、初めに、この光反応をペプ

チドに適用できるか、さらにこの光反応がどのようなアミノ酸の官能基に影響されるのかを検討す

るために、基質に様々な官能基を有したトリペプチド **1** を用いた光脱炭酸を経由したアルケンへの付加反応を行った。

アセトニトリル:水=9:1中にバリンとバリンの間に様々なアミノ酸残基を有するトリペプチド **1** とアクリロニトリル **2**、Phen、DCB をそれぞれ 20 mM ずつ溶かし、アルゴン雰囲気下 100 W の高圧水銀灯を用い、パイレックスフィルターを通して光照射(313 nm)を 6 時間行ったところ、目的の付加体 **3** が 68–95 % の収率で得られた(Table 1)。単純なアルキル基(バリン)、フェニル基(フェニルアラニン)、ヒドロキシ基(セリン)、チオエテル基(メチオニン)、アミド基(グルタミン)や保護したチオール基(システイン)、アミン基(リジン)、カルボキシ基(グルタミン酸)では効率よく反応が進行した(Entries 1-8)。しかしながら、チロシンやトリプトファンを含むトリペプチドでは光反応は進行せず、**1** が回収された(Entries 9-10)。これは、電子豊富な芳香環であるフェノールやインドールが、Phen のラジカルカチオンを消光するため、反応が阻害されると考えられる。しかし、これらアミノ酸の側鎖を Boc 基で保護すれば、光反応の阻害を回避できる(Entries 11-12)。このように、適切な保護基を導入することで、様々なアミノ酸残基を有するペプチドにこの光反応が応用できることを明らかにした。

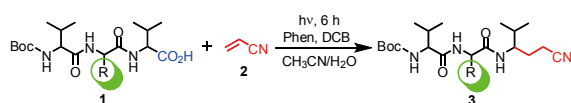
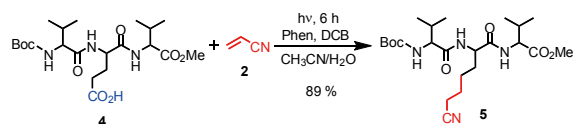


Table 1

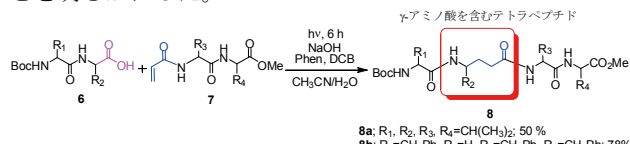
Entry	R	Yield of 3 (%)	Entry	R	Yield of 3 (%)
1		77	8		86
2		95	9		0
3		88	10		0
4		92	11		99
5		78	12		42
6		68			
7		87			

さらに、側鎖にフリーのカルボン酸を有するトリペプチド **4** を基質に用いて、アクリロニトリルへの付加反応を検討した(Scheme 3)。その結果、目的の付加体 **5** が 89 % の高収率で得られた。これは、この光脱炭酸反応を用いれば、ペプチドの主鎖だけでなく側鎖も直接かつ自由に官能基変換できることを示している。このように光脱炭酸は、様々な官能基を有するペプチドでも、適用可能であることが分かった。



Scheme 3 側鎖カルボキシ基の光脱炭酸経由のアルケンへの付加反応

また、*N*末端を Boc 基で保護し、*C*末端がカルボキシ基であるジペプチド **6** と *N*末端がアクリルアミドで *C*末端がエステル基であるジペプチド **7** を用いて光照射することで、 γ -アミノ酸を結合部位に有するテトラペプチド **8** の合成に成功した(Scheme 4)。バリンのジペプチドである **6a** では 50%で **8a** が、フェニルアラニン-グリシンのジペプチドである **6b** では 78%で、**8b** が得られた。つまり、この光反応により、様々なペプチド同士を結びつけ、新たなペプチドを容易に合成できることを明らかにした。



Scheme 4 光脱炭酸経由のペプチドカップリング反応

これらの結果、様々なアミノ酸残基を持つペプチドにこの光反応が適応でき、ペプチド同士のカップリング反応にも応用できることがわかった。つまり、この光反応を用いることで、直接的にペプチドの化学変換ができ、高機能なペプチドが容易に合成することが可能になった。

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

「主な発表論文等」

1. **Y. Yoshimi**,* S. Hayashi, K. Nishikawa, Y. Okita, K. Maeda, T. Morita, T. Itou
“Decarboxylative Radical Addition of *N*-Boc Amino Acids to Acrylonitrile using 1,4-Dicyanonaphthalene via Photoinduced Electron Transfer”
Research on Chemical Intermediates, in press.
2. H. Maeda, S. Nashihara, H. Mukae, **Y. Yoshimi**, K. Mizuno

“Improved Efficiency and Product Selectivity in the Photo-Claisen Type Rearrangement of an Aryl Naphthylmethyl Ether Using a Microreactor/Flow System”
Research on Chemical Intermediates, in press.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
科研費若手(B)、新学術領域に代表研究者として申請中。民間の財団である高橋産業経済研究財団の研究助成に採択された。

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
**チュブリンアミノ酸付加を介した軸索機能の維持システムと
 その破綻による神経老化の分子機構**

研究代表者：小西 慶幸（工学研究科・准教授）

概 要	
<p>神経細胞は細胞体とシナプス間で軸索を介して構造、機能的に連絡し、軸索輸送により細胞内の代謝物のバランスを調整する。能動的な軸索輸送の異常と神経老化との関連が報告されてきたが、体系的な理解はなされていない。これまでの研究により、神経細胞が突起を形成する過程において、微小管を構成するチュブリンの翻訳後修飾は細胞内の物質輸送の制御を介して軸索形態形成に関わることが示唆された。本研究では、さらに後期の神経細胞において、チュブリンの翻訳後修飾を介した軸索輸送の異常と神経細胞の形態や機能の維持との関連を明らかにし、神経老化に関わる新しい機構を理解することを目的とした。</p>	
関連キーワード	神経、軸索、老化、チュブリン、翻訳後修飾

研究の背景および目的

背景) 近年の研究により、脳神経発生を制御する分子機構についての理解が飛躍的に進んでいる。一方で、発生過程で構築された神経回路が長期にわたり維持されるシステムについては比較的理解が進んでいない。神経細胞は細胞体とシナプス間で軸索を介して構造、機能的に連絡し、軸索輸送により細胞内の代謝物のバランスを調整する。特に高等動物ではこの距離は細胞の大きさと比較して格段に大きくなるため、能動的な軸索輸送の制御は健全な脳機能を保つうえで重大な要因であると考えられる。これまでに、能動的な軸索輸送の異常と神経老化との関連についての研究がなされてきたが、体系的な理解には至っていない。

申請者はこれまで、神経細胞の生存維持機構 (*Mol Cell* 2002, *J Neurosci* 2003, *Science* 2008)、形態制御機構 (*Science* 2004, *Neuron* 2004, *Neuron* 2008, *J Neurosci* 2008) を研究し、神経機能を調節する分子ネットワークを発見してきた。興味深いことに、同定された分子ネットワークの幾つかは特定の神経突起の形態を制御することが明らかとなった。研究の過程で、軸索を認識する細胞内

機構が存在すると考え、細胞骨格に着目して研究した結果、微小管を構成するチュブリンのアミノ酸付加の1つ、チロシン化の割合が、軸索と樹状突起で異なり、これにより軸索輸送を介して軸索の形成が制御されることを明らかにした (*Nat Neurosci* 2009)。また、この修飾部位は加齢にともなう酸化を受けることから、上記の機構が生体の神経老化の過程において老化ストレスの標的となる可能性が考えられる。

目的) 本研究課題では軸索輸送異常を介した神経老化の新しい機構の解明を目的とする。神経細胞の構成分子がターンオーバーされながら方向性を持った形態が保持されるためには、細胞内における位置情報が維持される必要がある。そこで細胞構造の維持に必須な微小管上に存在する修飾を介した軸索輸送の方向決定機構が神経回路の維持に関わることを証明する。これらの研究成果は、複数の老化要因がネットワークを形成し慢性的に進行する神経老化の包括的理解につながり、神経老化の防御につながると考えられる。

研究の内容および成果

本研究課題では、微小管を構成するチュブリンのアミノ酸付加修飾が軸索の維持に関わることを証明し、これを介した細胞内輸送の方向制御の破綻が、神経老化の新しい機構となることを示す。以下に現在までに具体的に行った研究内容と得られた成果を示す。

1) 軸索形態・機能維持におけるチュブリンアミノ酸付加の機能。

これまで海馬錐体細胞による初代培養の系で、神経細胞が軸索を形成し極性を確立する際に、微小管のアミノ酸付加修飾が神経細胞の形態制御に関わることを観察してきた。この機構が成熟した

神経細胞や別の種類の神経細胞にも存在するかは不明であった。そこで早期に極性を確立する小脳顆粒細胞を用いて解析を行った。

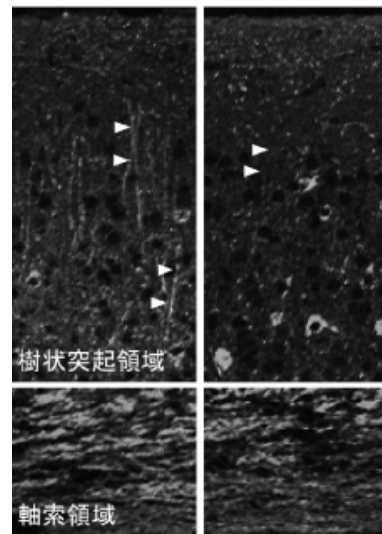
微小管のモーター分子であるキネシンには軸索を特異的に認識する機構があることが報告されている。成熟した小脳顆粒細胞において蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質を細胞内に発現させると、予想通り、軸索の先端に蛍光シグナルが検出された。このときチュプリンの翻訳後修飾、チロシン化を担う修飾酵素である TTL の発現を RNA 干渉法により抑制した。この神経細胞では軸索のみに観察された GFP のシグナルが樹状突起にも検出されるようになった。

このことからチュプリンのチロシン化による翻訳後修飾は、海馬錐体神経細胞のみならず、小脳顆粒細胞においてもキネシンの輸送方向の制御を介して軸索への特異的な物質輸送に寄与していることが示唆された。チュプリンの翻訳後修飾を抑制した神経細胞では細胞内における生体物質の正しい分配が維持できなくなる可能性が示された。

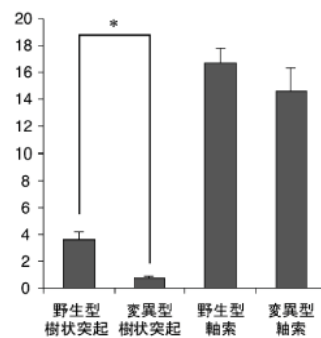
2) 成獣マウス脳におけるチュプリン翻訳後修飾の機能解析。

別のアミノ酸付加修飾に関わる酵素を失った変異（ノックアウト）マウスの脳組織の詳細な解析を行った。その結果、大脳皮質における神経細胞の構造の異常が見いだされた。ニューロフィラメントは神経細胞の形態維持に必要な細胞骨格分子であり、微小管に依存して軸索および樹状突起に輸送されることが知られている。これに異常が生じると、神経回路の構造が正常に保てなくなると考えられる。これまでの解析により、チュプリンの翻訳後修飾に異常を持つマウスの神経細胞では、ニューロフィラメントの樹状突起への分配が正しく出来ないことが示された（図1）。

野生型マウス脳 変異型マウス脳



ニューロフィラメント数 / μm^2



(図1) チュプリンの翻訳修飾が阻害された成獣マウス脳組織における異常

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

「主な発表論文等」

Yang H, Sugiura Y, Ikegami K, Konishi Y, Setou M. Axonal gradient of arachidonic acid-containing phosphatidylcholine. *J Biol Chem*. 287(8):5290-300 (2012)

「特記事項」

(学会発表) 小西慶幸. 軸索形態制御に関わる翻訳後修飾を介した細胞内分子機構: 軸索伸長および軸索識別についての研究. 第54回日本神経化学会大会 2011 9/26-28 石川

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

内藤記念科学奨励金・平成23年度・代表・採択・3,000千円
 稲盛財団研究助成・平成24年度・代表・採択・1,000千円
 科学研究費補助事業新学術領域研究(公募研究)・平成24-25年度・代表・申請中
 科学研究費補助事業 基盤研究(B)平成24-25年度・分担・申請中

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」 高圧電子線グラフト重合によるレアメタル微粒子吸着材の開発

研究代表者： 久田 研次（工学研究科・准教授）

概 要	新たな標的物質に適用可能になるように、グラフト鎖の高分子性に基づく浸透圧を動作原理に組み込んだ吸着材を開発した。このために、不織布表面に準希薄ブラシに相当するグラフト鎖を形成する加工条件を検討した。電子線照射したポリプロピレン繊維への1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジルの化学吸着量により求めたグラフト反応可能な開始点量は4-7 $\mu\text{mol/g}$ であった。また、グラフト重合を高圧下（100-500 MPa）で行うと、反応収率の向上するだけでなく高分子量のグラフト鎖分率を高めるのに効果的であった。開始点量と繊維表面に形成されたグラフト鎖の重量から、グラフト鎖の平均分子量 (MW_{AVG}) を求めた。 MW_{AVG} が 3×10^5 程度になるグラフト加工が、水中から疎水性分子を吸着・回収するために最適であることを明らかにした。
関連キーワード	電子線グラフト重合、吸着材、高圧重合、不織布、グラフト鎖長

研究の背景および目的

放射線グラフト重合は繊維や粒子、膜などの既存の素材の形状や力学特性を損なわずに新しい機能を付与する手法として優れている。例えば、放射線グラフト重合により向上させられるフィルター機能としては、1) グラフト鎖による細孔サイズの制御によるふるい効果（物理的濾過分離機能）と2) フィルターの細孔にイオン吸着機能の導入（化学的吸着分離機能）の二つが検討されてきた。これに対して本研究では、グラフト鎖の高分子性を活用して疎水性粒子の吸着特性を向上する表面加工を目指した。疎水性の分子や微粒子を回収するための吸着材としては、既に活性炭等の無機多孔体が利用されている。ただし、粉体であるこれらの吸着材は、圧着もしくは不織布間に挟んで組織化した後にフィルターとして利用されている。このような組織体は大容量の流体が通過する際の圧力に弱く、圧損の少ない繊維吸着材による疎水性粒子の吸着性を高めることが必要である。

大容量の流体を処理可能な母材として、繊維吸着材が使用されている。研究代表者らは、この母材の表面を均一に活性化し、グラフト重合を開始する手法として、光や熱に比べて均一かつ迅速に加工可能な電子線照射について検討してきた。平成23年3月まで文部科学省の都市エリア産学官連携事業において、繊維加工工場の排水中に残存する疎水性分子 1,2,5,6,9,10-ヘキサプロモシクロドデカンを回収するフィルターを開発してきた。その際、繊維表面の活性化のために照射する電子線の吸収線量、ならびにグラフト重合を行う圧力

によって、繊維上に形成されるグラフト鎖の重量を多様に変化させられることを明らかにした（図1）。ここで、開始点量を決める吸収線量はグラフト鎖の密度を、重合速度に影響する重合圧力はグラフト鎖の分子量をそれぞれ変調可能である。

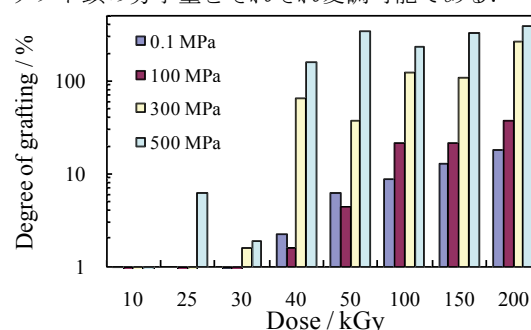


図1. ポリプロピレン繊維吸着母材へのアクリル酸メチルの高圧電子線グラフト重合。

異なる重合圧力で加工した繊維吸着材による水中に分散させた疎水性の赤色分散染料を吸着させた。このとき重合圧力が増加すると、吸着速度ならびに平衡吸着量がともに増加した。これまで、グラフト重合による繊維吸着剤の改質では、イオン交換性の官能基やキレート化合物となる極性基が導入されてきた。本研究では、レアメタル微粒子のような新たな標的物質に適用可能になるように、グラフト鎖の高分子性に基づく浸透圧を動作原理に組み込んだ吸着材を開発した。

研究の内容および成果

基板表面で開始するリビングラジカル重合により、グラフト鎖の密度と吸着・摩擦特性の関係について詳細な研究がある。グラフト鎖は、鎖間の

干渉の程度によって図2にまとめた3種に分類されている。このなかで、グラフト鎖間で弱く干渉する準希薄ブラシが形成されると、繊維が接する

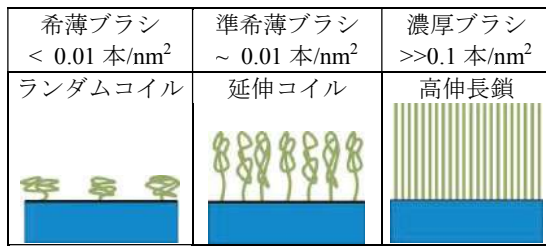


図2. グラフト重合で形成される高分子鎖の分類

外部環境から水や疎水性分子を効率的に吸着可能な高性能の繊維吸着材となると想定し、純希薄ブラシによる表面加工を試みた。

1. グラフト鎖のキャラクタリゼーション

開始点密度の低い放射線グラフト重合において、上述の準希薄ブラシを実現するためには、各グラフト鎖の分子量を高くする必要がある。そこで、1) 繊維状に形成されるモノマーと反応可能な遊離基量の定量と 2) グラフト鎖と同時に生成する未固定高分子の分子量分布測定を行い、グラフト鎖の特性化を行った。

電子線照射したポリプロピレン繊維への 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジルの化学吸着量により、50-200 kGy の吸収線量において、4-7 μmol/g のグラフト反応可能な開始点が存在することを求めた。開始点量と繊維表面に形成されたグラフト鎖の重量から、グラフト鎖の平均分子量 (MW_{AVG}) を求めた。この線量範囲では、開始点となる遊離基量が線量にわずかしか依存しなかったことから、図1に示したグラフト率の増加が平均分子量の増加によることを示した。

また、未固定高分子の分子量分布測定から、未反応の単量体以外に、電子線照射直後に成長した高分子と高圧での後重合で成長する高分子の二種類が存在していることを示した (図3)。重合圧力の増大に伴い、後重合で成長する分子量 100 万以上の分子鎖の割合が高くなった。大気圧重合では、希薄ブラシになるような開始点密度の低い照射条件であったとしても、高分子量のグラフト鎖が多

くなることで、同じ開始点密度であるにもかかわらず、分子鎖間で干渉することが可能な準希薄ブラシになったと考えている。

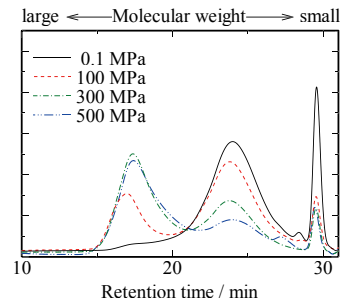


図3. ポリプロピレン不織布への電子線照射により生成した未固定高分子の GPC 曲線。

2. グラフト鎖の平均分子量に依存した分子吸着

0.1-500 MPa の重合圧力で加工し、同じグラフト鎖密度でグラフト鎖長が異なる加工繊維を調製した。これらの繊維による分散染料の吸着速度ならびに平衡吸着量を評価したところ、照射線量よりも MW_{AVG} が鍵パラメーターであった。MW_{AVG} が 3×10⁵ になるまでは、吸着速度・平衡吸着量ともに増大しその後飽和した。加工費用を考慮すると MW_{AVG} が 3×10⁵ 程度になるグラフト加工が水中から疎水性分子を吸着・回収するために最適な加工条件である (図4)。

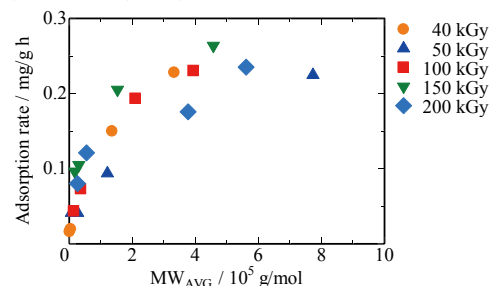


図4. 電子線グラフト加工した繊維吸着材による分散染料の吸着速度。

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

「主な学会発表等」

“アクリル酸エステルの高圧電子線グラフト共重合による繊維吸着剤の表面修飾”, 宮城宏臣, 松岡美咲, 久田研次, 堀 照夫, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月。

“電子線グラフト重合における高圧印加技術の利用と繊維吸着剤の高機能化”, 第 47 回 UV/EB 研究会, 久田研次, 2011 年 6 月。

“高圧電子線グラフト共重合したポリプロピレン不織布の吸着特性”, 平成 23 年度繊維学会年次大会, 松岡美咲, 宮城宏臣, 吉田由希, 田畑 功, 廣垣和正, 久田研次, 堀 照夫, 2011 年 6 月。

“電子線グラフト重合における高圧印加技術の利

用と繊維吸着材の高機能化”, 久田研次, 松岡美咲, 宮城宏臣, 田畑功, 廣垣和正, 堀照夫, 平成 23 年度繊維学会秋季研究発表会, 2011 年 9 月。

“ポリアクリル酸メチルにより修飾した PP 不織布による疎水性分子の回収”, 松岡美咲, 宮城宏臣, 久田研次, 堀照夫, 第 60 回高分子学会北陸支部研究発表会, 2011 年 11 月。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

(独) 科学技術振興機構・研究成果最適展開支援プログラム・FS ステージ シーズ頭在化タイプ・平成 24 年・疎水性グラフト鎖積層技術による希少金属捕集構造体の開発・分担・申請予定

平成 23 年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
レーザー同位体分離研究の推進

研究代表者： 仁木 秀明（工学研究科・教授）

概 要	<p>特定の同位体成分を濃縮あるいは除去することにより、多くの元素において今までにない新しい機能、性能を持った材料を作り出すことができるため、さまざまな分野で分離技術の開発が期待されているが、レーザー法は同位体の選択性が極めて高いことから大きな可能性を秘めている。本研究では特に、長寿命核種の消滅処理に関連したジルコニウム (^{93}Zr) およびニュートリノに関連する二重ベータ崩壊実験で切望されているカルシウム (^{48}Ca) のレーザー分離技術の開発を進めている。手法は、元素の物理的、分光学的性質によって一様でない。Zr については、波長可変パルスレーザーによる選択的多段階、あるいは多光子イオン化法により、Ca については、弱い連続発振波長可変レーザーによる、原子ビーム偏向法により、それぞれ研究を進めている。</p>
関連キーワード	レーザー、同位体分離、ジルコニウム、カルシウム、長寿命核種、二重ベータ崩壊

研究の背景および目的

ウラン濃縮に代表される同位体分離技術として、現在、遠心分離法やガス拡散法が広く用いられている。これら従来法に比べ、レーザー法は1段の分離過程における同位体濃縮度が極めて高く、原理的にどの同位体に対しても濃縮可能であるということから、将来極めて有用な手法となりうる。本研究では、以下の2つの同位体分離について焦点を絞り分光学的基礎データの取得をし、分離性能を検討する。

1. ジルコニウム(Zr)

核燃料サイクルにおいて、長寿命核分裂生成物の処理が問題となる。特に、Zr 等では長寿命の Zr-93 以外にも同位体が生成されるため、Zr-93 を分離する技術が廃棄物処理の観点から極めて重要な技術となり、分離の方法としてはレーザー法以外に考えられない。また、高速炉を中心とした廃棄物を出さない（原子炉内で長寿命核種を消滅処

理）原子カシステムが検討されており、レーザー分離法の成否が、この原子カシステムの成否となると考えられている。

2. カルシウム(Ca)

現在、素粒子物理の分野で、ニュートリノを出さない二重ベータ崩壊の観測を目指した実験が世界各国で行われている。これにより、この宇宙は反物質ではなく物質の存在が支配的であることの説明ができるとされている。わが国では、本学の小川泉准教授が実験の取りまとめ役となって、Ca を用いた実験を神岡で進めている。しかし必要な同位体は Ca-48 で、その天然存在比は 0.2% と極めて小さいため、これを濃縮することが望まれている。これも、ガス状の化合物がなく、従来法は適用できない。濃縮 Ca を用いることができれば、世界をリードすることになる。

研究の内容および成果

1. ジルコニウム(Zr)

核分裂反応で生成される Zr は、7 種類の同位体を含み、その中で ^{93}Zr および ^{95}Zr は天然には存在しない放射性同位元素である。 ^{95}Zr は半減期が 0.18 年と短いのであまり問題とはならないが、 ^{93}Zr の半減期は 160 万年と長く、これが消滅処理の対象であり、 ^{93}Zr の生成割合は Zr 全体の 15% と小さいので、消滅処理前の同位体分離の対象となる。

本研究では Zr については奇数同位体の分離を目指しレーザーの偏光特性を利用した選択的イオン化の手法の研究を行っている。同位体選択性の得られる 2 波長多光子イオン化遷移を利用して、共鳴波長に同調したパルス発振色素レーザー 2 台を用いて Zr 原子蒸気ビームへの照射実験を行い、レーザー光の偏向角、2 台のレーザーパルスの時間間

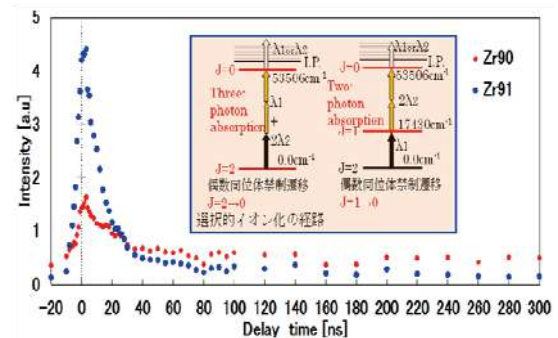


図 1 レーザー照射タイミングと生成 Zr イオン信号強度

隔を変化させて、濃縮特性を調べた。結果の一部を図 1 に示す。同時パルス照射の場合、イオン化割合のみならず、同位体選択性も同時に向上することがわかった。

2. カルシウム(Ca)

Ca については、レーザーの輻射圧により、特定の同位体を原子ビームから偏向させる手法の研究を進めている。図 2 に示すエネルギー準位の模式図を見ればわかるように、波長 422.7nm における $1P_1 - 1S_0$ (基底準位) 間の遷移確率が他に比べて極めて大きいため、この波長のレーザー光を連続的に照射することにより、Ca 原子はこの 2 準位間を往復することにより、光子の吸収、放出を多数回繰り返すことになる。この際、自然放出光の放出方向はランダムであるのでレーザー光の伝搬方向に運動量が与えられる。したがって、 ^{48}Ca に同調

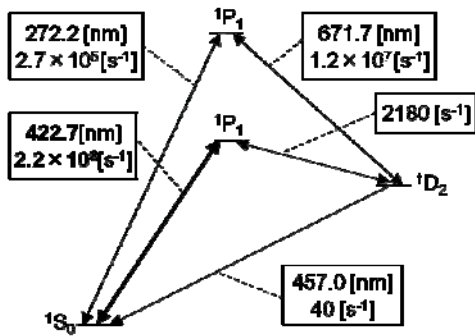


図 2 Ca 原子のエネルギー準位の模式図

したレーザー光を Ca 原子ビームに直交するように照射すれば、原理的に ^{48}Ca 同位体を選択的に偏向させることができる。図 3 には z 軸上を正の向きに進む、十分にコリメートされた原子ビームに直角方向から、 ^{48}Ca に波長を同調した飽和パワー (59.9mW/cm 2) のレーザーを x 軸に平行に左から照射した場合について、予想される同位体の軌跡を示す。天然存在比の大きい ^{40}Ca および ^{44}Ca と ^{48}Ca の同位体シフトはそれぞれ 1.5GHz および 0.7GHz であり Ca の自然幅およびパワー広がりを考えて

もスペクトル幅は数 10MHz 程度であるので、十分にコリメートした原子ビームを用いれば選択励起は可能である。

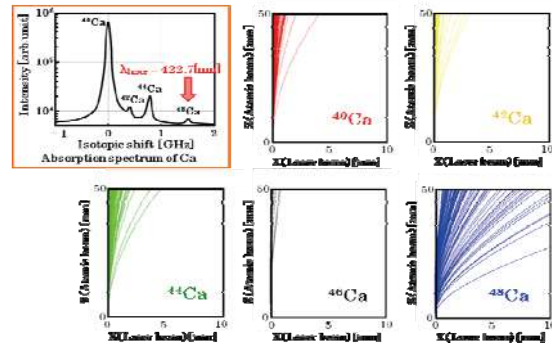


図 3 レーザー照射時の Ca 同位体の軌跡

数値計算シミュレーションによる予測からは、十分にコリメートされた原子ビームを用いれば、高濃度の ^{48}Ca (天然存在比は 0.18%) を、高い効率で原子ビームから回収することができるが、わかった。

シミュレーションの妥当性を確認するために、原子蒸気発生装置、質量分析用レーザーイオン化系+時間分解イオン検出器、ならびに偏向用波長可変半導体レーザー光源を準備した。現在動作確認テストを実施する。図 4 には、真空容器中で発生させた Ca 蒸気に左方から共鳴レーザー光を照射したときの様子を示す。

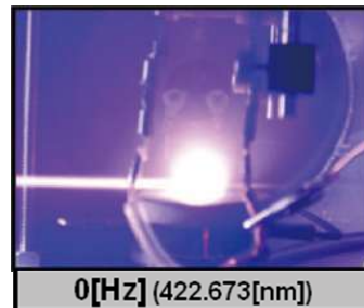


図 4 Ca ビームからのレーザー誘起蛍光

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

「主な発表論文等」

発表論文：

「レーザー同位体分離技術」仁木, レーザー研究, 40(2012)177.

招待講演/依頼講演：

"Laser Isotope Separation for Nuclear Engineering and Neutrino Physics", H.Niki, 1st Workshop of the Laser Research in Nuclear Field, Jeju, Korea, 2011.

「原子力およびニュートリノ物理学におけるレーザー同位体分離技術」仁木, H23 年度日本分光

学会中部支部北陸ブロック第 1 回講演会

発表予定：

"LASER ISOTOPE SEPARATION FOR NUCLEAR ENGINEERING AND NEUTRINO PHYSICS", 12th Workshop on Separation Phenomena in Liquids and Gases, Paris, France 2012.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

「二重ベータ崩壊研究のための、レーザーによる Ca の同位体分離」科研費・基盤研究 (C)・3 年間・代表・申請中・5,000 千円

平成 23 年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
戦略的分子標的照射治療のための薬剤開発基盤の構築

研究代表者： 清野 泰（高エネルギー医学研究センター・教授）

共同研究者： 森 哲也（高エネルギー医学研究センター・助教）

概 要	<p>内照射治療とは、放射性同位元素（RI）を導入した薬剤を体内に投与し、その放射線により癌細胞を殺傷する治療法である。本研究では、飛程が数 mm のβ線と飛程が 10 nm 程度のオージェ電子を放出する RI を導入した放射性薬剤を合成し、腫瘍細胞に対する内照射効果（殺細胞効果）を検討することを目的とする。本年度は、核、細胞実質、細胞膜を標的とするオージェ電子放出内照射治療薬剤の作製に着手した。核を標的とした内照射治療薬剤は、DNA に組み込まれオージェ電子を放出することにより細胞増殖を抑制することが明らかとなった。細胞膜を標的とした治療薬剤では、細胞増殖抑制ではなく、細胞自体を殺傷していることが明らかとなり、新しいタイプの内照射治療薬剤開発の可能性が示された。</p>
関連キーワード	分子標的照射治療、がん、薬剤開発、オージェ電子

研究の背景および目的

癌は 1981 年より日本人の死因の第 1 位であり、最近では総死亡の約 3 割を占めるに至っている。メガファーマと呼ばれる国内外の大手製薬会社が多額の研究開発費を投じて新薬の開発を行っているにもかかわらず死亡率が増加している現状を考えると、抗癌剤とは全く異なる視点で開発された薬剤の重要性がこれから増してくると考えられる。その中で、抗癌剤と比較するとこれまであまり研究がされていないが、特定の癌に対して非常に効果的な内照射治療は魅力的な治療法の 1 つである。内照射治療とは、放射性同位元素（RI）を導入した薬剤を体内に投与し、その放射線により癌細胞を殺傷する治療法である。β線を放出する I-131 による甲状腺癌治療（Thyroid 2009; 19: 1381-91）や I-131 標識 MIBG による神経内分泌腫瘍の治療（Semin Nucl Med 2010; 40: 153-63）が広く行われている。さらに最近、Y-90 標識ゼヴァリンが CD20 陽性の再発または難治性の低悪性度 B 細胞性非ホジキンリンパ腫やマントル細胞リンパ腫の新しい治療法として保険適用され、大きな成果を出しつつある（Ann Oncol 2009; 20: 709-14）。しかし、内照射治療用薬剤が未だに数種類しか開発されていないことが、内照射治療の普及が遅れている一因となっている。その大きな要因として、内照射用薬剤を細胞の何処に到達させ、どのような放射線で標的部位を攻撃するのかに関して総合的な研究がなされていないことが考えられる。

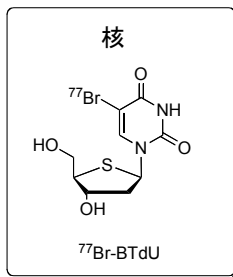
本研究は、飛程の異なる放射線を放出する様々な内照射治療薬剤を作製し、最適な放射線と治療部位の組合せを多角的に検討することにより、戦略的分子標的照射治療という新しい癌治療法を

提案し、内照射治療薬剤を開発する基盤を構築することを目的とする。

内照射治療を考えたときには、放射線の中でも物質との相互作用の大きい荷電粒子線を利用するのが妥当である。荷電粒子線は、それを放出する RI によって様々な飛程（元素から飛び出してきた電子などの粒子が物質中で到達できる距離）を持っており、その幅は数 nm から数 mm である。例えば、飛程が数 nm の RI を核酸誘導体に導入すれば、その核酸誘導体に取り込まれた細胞の DNA だけを破壊することが可能であり、増殖能の高いがん細胞を選択的に攻撃することが可能となる。また、飛程が数 mm の RI を導入した薬剤の標的を細胞実質のタンパクに設定すれば、そのタンパク自身と周囲の細胞も破壊することが可能となる。一方で、周囲に正常な細胞が存在すれば、正常細胞にも損傷を与えてしまい副作用という問題が発生する。このような標的と放射線との関係について総合的な研究は行われていない。

そこで本研究では、飛程が数 mm のβ線と飛程が 10 nm 程度のオージェ電子を放出する RI を導入した放射性薬剤を合成し、腫瘍細胞に対する内照射効果（殺細胞効果）を検討する。放射性薬剤の攻撃対象としては、細胞機能を維持するためには、核酸、細胞実質中のタンパクそして細胞膜がそれぞれ機能することが重要であると考え、核、細胞実質、そして細胞膜の 3 カ所を標的とする。それぞれの標的への内照射効果の高い放射線を見つけ出すことにより、どの線質の放射線で、細胞のどの部位を攻撃するのが有効であるかを明らかにしていくことで、戦略的分子標的照射治療を実施するための基盤を構築していく。

研究の内容および成果



本年度は、核、細胞実質、細胞膜を標的とするオージェ電子放出内照射治療薬剤の作製に着手した。左に核を標的とするチミジン誘導体である⁷⁷Br-BTduの構造を示す。細胞実質を標的とする薬剤として神経内分泌腫瘍の細胞膜に発現するノル

エピネフリン・トランスポータ（NET）で細胞内に輸送される⁷⁷Br-MBBGを、細胞膜を標的とする薬剤としては、NETに結合する⁷⁷Br-BPBMを設計した（これら2つの薬剤の構造は特許出願を目指しているので構造および正式名称は省略する）。⁷⁷Br-BTduおよび⁷⁷Br-BPBMに関しては、Br-77を導入した薬剤の合成法を確立した。⁷⁷Br-MBBGに関しては、現在Br-77の導入法を検討中である。そのため、オージェ電子による治療効果に関する検討は、核および細胞膜の2カ所を標的として行った。

まず、核を標的とする⁷⁷Br-BTduの評価を行った。⁷⁷Br-BTduの細胞内での分布を検討したところ、⁷⁷Br-BTduはDNA画分に分布することが確認された。次いで様々な放射能の⁷⁷Br-BTduを細胞に添加し、その内照射治療効果を検討した。その結果、1850 Bq/wellからコントロール群に比べて有意に細胞の増殖を抑制することが明らかとなった（図1）。⁷⁷Br-BTduの代わりに⁷⁷Brイオンを用いた検討では、どの放射能でも細胞増殖抑制は認められなかった。以上の結果より、⁷⁷Br-BTduがDNAに組み込まれ、オージェ電子を放出することにより治療効果を発現していることが示唆された。さらに、担癌マウスを用いた治療実験では、

⁷⁷Br-BTdu投与3日目でコントロール群に比べて、有意に腫瘍体積の増大を抑制することが観察された。これらの結果は、増殖能の高い腫瘍を対象とするオージェ電子治療が可能であることを示唆している。

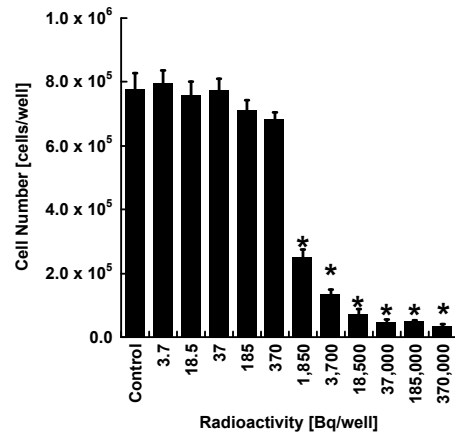


図1. 様々な放射能の⁷⁷Br-BTduを添加した時の細胞数の変化

次に、細胞膜を標的とする⁷⁷Br-BPBMの評価を行った。3次元培養を行ったPC-12細胞に、⁷⁷Br-BPBMを添加したところ、185 Bq/wellからコントロール群に比べて有意な生細胞数の減少が観察された。また、死細胞数は、18,500および37,000 Bq/wellで有意に増加していた。この結果は、オージェ電子によって細胞膜を標的とする治療が可能であることを示唆しており、これまで核を標的とする薬剤設計が主流を占めているオージェ電子内照射治療薬剤の開発に、新しいコンセプトを提供できると考える。

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

「主な学会発表」

清野 泰「放射性臭素標識プローブの開発：診断から治療へ」 震災復興分子イメージング化学シンポジウム 2012年3月 仙台

清野 泰、池田 理絵、森 哲也、吉井 幸恵、浅井 竜哉、藤林 靖久、岡沢 秀彦「5-[⁷⁷Br]bromo-4'-thio-2'-deoxyuridineの内照射治療薬剤としての評価」 日本分子イメージング学会 2012年5月 浜松（発表予定）

Kiyono Y., Ikeda R., Mori T., Yoshii Y., Asai T., Fujibayashi Y., Okazawa H. Evaluation of 5-[⁷⁷Br]bromo-4'-thio-2'-deoxyuridine as a radiopharmaceutical for DNA targeted nanoirradiation therapy. Society of Nuclear Medicine 2012 Annual Meeting 2012, June, Florida USA（発表予定）

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

医用原子力技術研究振興財団・医用原子力技術に関する研究助成・H23年度・内照射治療薬剤開発のための内照射標的と放射線の関係の解明・代表・採択・1,000千円

日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究(B)・H24～H26年度・放射線選択型分子標的の内照射治療における戦略的治療薬剤創製基盤の構築・代表・申請中

武田科学振興財団・2012年度薬学系研究奨励・H24～H27年度・効率的な内照射治療を目的とする内照射標的と放射線の関係の解明・代表・申請中

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」
**触覚刺激の学習における、
 脳の可塑的变化に関わる神経基盤に迫る**

研究代表者： 齋藤 大輔（生命科学複合研究教育センター・特命講師）
 共同研究者： 岡沢 秀彦（高エネルギー医学研究センター・教授）
 藤井 猛（医学系研究科附属子どもの発達研究センター・特命講師）
 小坂 浩隆（医学系研究科附属子どもの発達研究センター・特命准教授）
 谷中 久和（生命科学複合研究教育センター・特命助教）

概要	触覚刺激の学習における、脳の可塑的变化に関わる神経基盤に迫る。ヒトの脳が持つ可塑性は、成人後には見られなくなると考えられているが、近年の脳機能研究により新たな知見が得られている。これまでに、成人後においても学習により脳機能が可塑的に変化する事を明らかにした (Saito et al., 2006) が、この可塑的变化は、1) 解剖学的に視覚野であるが、機能的に視覚野の活動なのか、2) 可塑的变化が脳のネットワークにどのような影響を与えるのか、3) 可塑的变化には、どの位の期間の訓練や学習が必要になるのか、などの点が不明である。統制群と可塑的な変化を起こしている実験群を比較した結果、成人においてトレーニングにより視覚野及び頭頂葉後部にて、脳機能・脳構造・脳容積・神経ネットワークが変化する事が明らかになった。
関連キーワード	脳機能イメージング、可塑性、fMRI、触覚弁別、ネットワーク

研究の背景および目的

これまでの研究により、ヒトの脳は考えられていた以上に可塑性を持つことが明らかになってきた。このヒトの脳における可塑的变化は、成人後には見られなくなるといことが古くから考えられて来たが、近年の非侵襲的な手法を用いたヒトの脳機能の研究により新たな知見が得られてきている。申請者はこれまで、触覚や視覚の感覚情報の脳内の処理について研究を行ってきており、その過程で学習により成人後においても脳の基本構造である機能局在性が可塑的に変化する事を明らか

にした (Saito et al., 2006)。しかし、この可塑的变化はどの位の期間の学習で起こるか、どういった場所で起こるか、どのような脳のネットワークに影響を与えて起こるのか、といったメカニズムについてはまだ明らかにされていない。そこで、これらの変化を起こすメカニズムを調べることにより、学習が脳機能に与える影響についての知見を得ることや、失われた機能を取り戻すためのリハビリテーション療法への脳科学的な寄与が出来るものとする。

研究の内容および成果

脳機能の可塑的变化は、1) 解剖学的に視覚野と考えられる領域で可塑的变化が見られたが、個人にとっての視覚野の活動であるのか、また、どの段階の視覚処理を行う領域なのか、2) 脳の可塑的变化が起こった際に、すでに構築されている脳の神経ネットワークにどのような影響を与え、どのような経路に回路の再配線が行われるのか、3) 脳が可塑的变化を起こすにあたり、どの位の期間の訓練や学習が必要になるのか、などの不明な点があり、それらを明らかにする為に、健康成人男性22名(実験群10名、統制群12名)に対してMRI実験を行った。実験群の被験者は、長期にわたる触覚トレーニングを積み、実験課題(麻雀の盲牌)の正答率が85%以上の者を用い、統制群被験者は、実験課題に馴染みのない者(麻雀を知らない)を用い

た。MRI 実験においては、1) 課題遂行中の脳血流画像(点字・麻雀牌を用いた触覚刺激)、活動の領域を機能的に同定する Retinotopy mapping、脳領域の大きさを計測するための T1 強調画像、脳神経の走行を調べるための拡散強調画像を撮影した。実験群と対照群の脳活動・脳容積・神経走行を条件間・群間で比較し、統計評価を行った。

【結果】

触覚課題遂行中の脳血流：課題遂行中の脳血流の比較を行ったところ、実験刺激(麻雀牌)において、実験群と統制群の間に有意な差が見られた。その領域は、鳥距溝に近い両側の一次視覚野周辺であった(図1)。

視覚野の機能的マッピング：Retinotopic

Mapping を用い、脳内で表象される網膜部位の再現を観測し、可塑的变化を起こした領域が視覚野の何処に相当するか機能的に特定した。使用した視覚刺激は、チェッカーボード模様のリング形状の物で、一次・二次・三次視覚野に相当する脳領域や、中心視野から周辺視野までを機能的に描出した。触覚課題での脳活動と視覚野マッピングの脳活動を重ね合わせた所、一次視覚野かつ周辺視野の領域に可塑的变化を示す脳活動が観察された(図2)。

神経ネットワークの変化: ある領域の神経活動が、その他の領域にどのような影響を与えるかを Dynamic Causal Modeling (Friston et al., 2003) を用いて、解析を行った。この手法により、異なる脳部位の活動間の情報伝達についてどのような関係があるのかを知ることができ、可塑的变化が起こった際に、ネットワークの伝達経路がどう変化したかを明らかにすることができる。触覚処理に関与すると考えられている脳領域及び、可塑的变化が見られた領域に関心領域を設定し、それぞれの領域の関係を調べた結果、実験群において頭頂間溝と一次視覚野の間に、統制群との間に差が見られた(図3)。

脳領域の容積の違い: 群間の脳容積の違いを見るため、T1 強調画像を灰白質、白質、脳脊髄液に分割し、解剖学的標準化、平滑化を行い、様々な脳領域の群間差について解析を行った。実験群と統制群で容積の異なる領域が、楔部、舌状回、中側頭回等に見られた。これらの領域は、実験群において統制群よりも容積が増加していた(図4)。また、容積が増加した白質の領域についても、神経線維束画像(Tractography)を用いて、走行の変化の調査を行っている(図5)。

学習の期間: 可塑的な変化を起こした部位の神経活動の量に対して、被験者の学習の期間・開始時期・課題の正答率との相関関係を調べた。その結果、一次視覚野の活動とトレーニングの開始年齢に相関が見られた。

これらの結果により、健常な成人においても、トレーニングにより脳機能・脳構造が変化する事が明らかになり、特に触覚のトレーニングにより、視覚野及び頭頂葉後部に可塑的な変化が起こるこ

とが明らかになった。

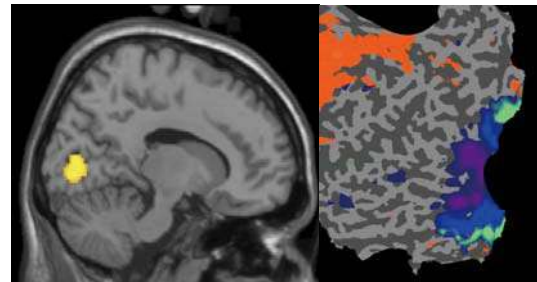


図1(左). 触覚課題遂行中の脳血流

図2(右). 周辺視野の領域に観察された脳活動

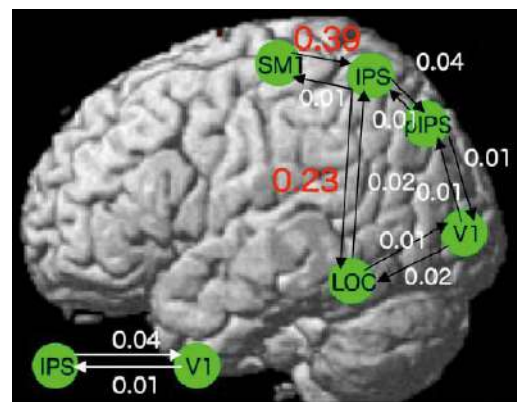


図3. 神経ネットワークの変化

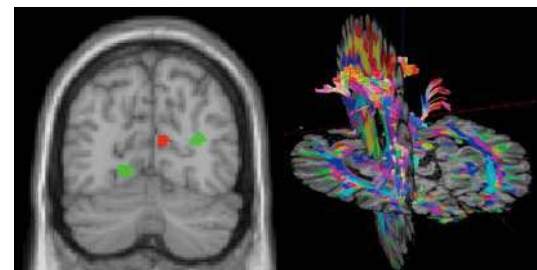


図4(左). 脳領域の容積の違い

図5(右). 神経線維束画像

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

「主な発表論文等」

現在、学会発表のための準備及び、学術雑誌(英語)へ投稿のため、論文原稿作成中である。

学術振興会 学術研究助成基金助成金(基盤研究C)へ、同様の研究テーマで研究代表として申請予定である。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

本助成により明らかになった可塑的变化のメカニズムをより詳細に調べるために、来年度の日本

平成 23 年度福井大学研究育成経費「特に大型の競争的資金獲得を目指す研究」
**新規卵成熟因子 C-type ナトリウム利尿ペプチドを利用した
 新たな不妊症診断・治療戦略**

研究代表者： 宮本 薫（医学部・教授）
 共同研究者： 折坂 誠（医学部・講師）、
 南野 直人（国立循環器病センター研究所・部長）

概 要	体外受精の成功には良質の卵子を用いることが必須であるが、これまで良質の卵子であることを判断できる良いマーカーが存在していなかった。私どもは、卵子を採取する際に同時に得られる卵泡液に含まれる極微量 CNP の高感度測定法を開発し、卵子の質を判断するためのマーカーとして利用可能であることを明らかにした。本研究ではヒト卵泡液中の CNP 濃度が体外受精の成功率と良い相関を示すことを明らかにした。また現在の高感度 CNP 測定法は放射性同位元素を用いるため、一般施設でも測定可能な放射性同位元素を用いない高感度 CNP 測定法を開発を試みている。本研究では、新たな人工抗体作製技術を用いて、様々な抗原認識部位を持つ人工抗体クローンを作製した。それらの中から抗原認識部位の異なる 2 種類の抗 CNP 抗体を利用し、高感度 ELISA(酵素結合免疫吸着)測定法による体外受精のための鑑別診断法の開発に繋げる。
関連キーワード	CNP、卵泡液、体外受精、RIA、ELISA

研究の背景および目的

日本では現在、7 組に 1 組のカップルが不妊と言われており、近年の晩婚化に伴いその割合はますます増加している。体外受精による出産も今や出生児 50 人に 1 人の割合に達しているが、体外受精による異常な受精・着床が問題となることに加え、多胎妊娠を避けるため体外受精時に利用できる初期胚が原則 1 つに制限されていることから、妊娠に至る可能性の高い良質の卵子の判別方法の開発が渴望されている。しかし体外受精時の卵子の質をモニターできる生化学的マーカーはこれまで全く知られていない。ナトリウム利尿ペプチドは構造が類似した ANP、BNP、CNP の 3 種のペプチドから構成され、いずれも国立循環器病センター・松尾壽之・寒川賢治博士のグループにより発見された。このうち ANP、BNP はその生体内での役割の解明が進み、それぞれ急性心不全治療薬、心不全診断薬として広く臨床応用されている。一

方、CNP の役割は永く不明であったが、最近軟骨形成および不妊と関連することが示された。CNP は卵胞発育時における卵の減数分裂休止の維持に必須であり、良質な卵の発育に不可欠であることが示された。CNP は卵巣 mural granulosa 細胞で作られたのち卵泡液中に分泌され、cumulus 細胞上に発現する CNP 受容体に作用すると考えられており、卵泡液中の CNP 濃度を測定することで卵子の状態を判別できると予想される。

一方、生理活性ペプチドの生体内濃度は極めて低く、卵泡液中の CNP 濃度の測定には高感度の RIA 等の測定系が必須となる。本研究では、体外受精の際に採取される卵泡液中の CNP 濃度を測定し、その後の受精率・妊娠率との相関を明らかにすることで、卵の質を評価し得る新たな判別法を確立することが目的である。

研究の内容および成果

①ナトリウム利尿ペプチドのうち ANP、BNP に関しては大変研究が進み、現在心臓病の診断薬、治療薬として広く臨床応用されている。一方 CNP は生体内での役割がはっきりしなかったため、その応用も遅れている。私どもは世界で唯一極めて高感度の CNP の radio-immunoassay 系（放射性同位元素を利用した抗原-抗体反応による測定法）を開発し、ヒト卵泡液中に CNP が微量ではあるが（400-800pg/ml）存在していることを世界で初めて証明した（図 1）。本研究により、CNP が卵子

の成熟に重要であることが示され、CNP の臨床応用への路が拓かれた。特に、体外受精時に採取した卵泡液中に CNP が存在していることを高感度の RIA により証明したことは、CNP 測定による体外受精の鑑別診断（図 2 に概略を示す）につながる重要な成果である。

②将来の体外受精への応用のためには、RI を用いない高感度の CNP 測定が求められるが、本研究では、サンドイッチ法による高感度 CNP の ELISA 測定を目指して、遺伝子工学を用いた一本鎖抗

CNP 抗体を多数作製した。これらの抗体を組み合わせることで、高感度の CNP 測定が可能になり、実用化に繋げることができる。

③CNP 及び CNP 受容体遺伝子発現の調節機構を解析し、卵巣では CNP 受容体遺伝子発現の変動は見られなかったが、CNP は排卵前卵胞への分化誘導時に強く発現誘導され、排卵関連遺伝子群と同様の発現調節を受けていることが示唆された。

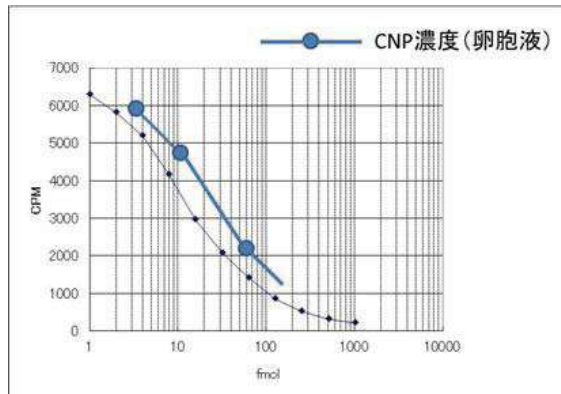


図1 卵胞液中の CNP 濃度の RIA による測定

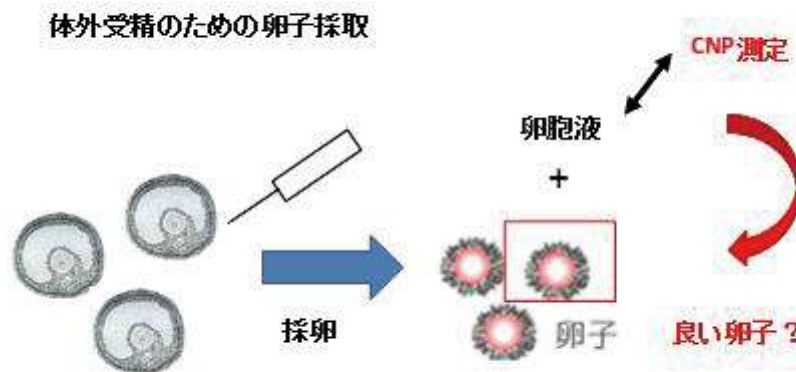


図2 採卵の際に同時得られる卵胞液中の CNP 濃度を測定し、卵子の質を判定する

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

「主な発表論文等」

1. Soneda, S., Yazawa, T., Fukami, M., Adachi, M., Mizota, M., Fujieda, K., **Miyamoto, K.**, Ogata, T.: Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: Identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding sites. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(11), 1881-1887, 2011.
2. Hatanaka, A., Chen, B., Sun, J.Q., Mano, Y., Funakoshi, M., Kobayashi, H., Ju, Y., Mizutani, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., **Miyamoto, K.**, Uchida, H., Oki, M.: Fub1p, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. *Genes & Genetic Systems* 86, 305-314, 2011.
3. 水谷哲也, **宮本 薫**: ステロイド合成律速因子であるコレステロール輸送タンパク質 StAR の新たな転写調節機構. *生化学.* 83(5), 388-391, 2011.
4. 水谷哲也, **宮本 薫**: クロマチン高次構造変換解析による転写調節領域の同定. *日本生殖内分泌学会雑誌.* 16, 27-29, 2011.
5. 矢澤隆志, 梅澤明弘, **宮本 薫**: 卵巣におけるス

テロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の転写調節機構. *日本生殖内分泌学会雑誌.* 16, 5-8, 2011.

6. **宮本 薫**: 卵胞発育とエピジェネティクス—StAR 遺伝子を中心として—. 特集 卵と卵胞の発育・成熟, 卵胞の発育と成熟(4). *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY.* 18(4), 55-60, 2011.
7. 矢澤隆志, **宮本 薫**: 万能細胞由来のステロイドホルモン産生細胞の創出. *医学のあゆみ.* 239(14), 1445-1450, 2011.

「特記事項」

特許申請: 特願 2011-284430

出願日: 2011 年 12 月 26 日

発明の名称: 体外受精におけるヒト成熟卵マーカー及びその使用

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

JST 平成 24 年度知財活用促進ハイウェイ
 大学特許価値向上支援試験研究費/技術遺伝調査費
 研究代表者: 宮本薫 (申請中) 300 万円
 新たな高感度 CNP 測定による体外受精のための鑑別診断法の開発

平成23年度福井大学研究育成経費「特に大型の競争的資金獲得を目指す研究」 窒化物半導体を用いた低損失パワーエレクトロニクス技術の研究開発

研究代表者： 葛原 正明（工学研究科・教授）

共同研究者： 山本 嵩勇（工学研究科・教授）、杉本 英彦（工学研究科・特命教授）
徳田 博邦（工学研究科・特命助教）

概 要	Ⅲ族窒化物半導体は、0.7～6.2eVの間で禁制帯幅を変化でき、高速性と高耐圧性に優れた半導体として広く知られる。本学は、窒化物半導体を用いたデバイス研究で15年以上の長い経験を持ち、太陽電池や電子デバイスの研究開発の推進を通して研究拠点を構築してきた。今年度は、Ptを用いた触媒援用MOCVD法において、InNエピ層の低温成長にて、電子移動度1200cm ² /Vsの良好な結晶品質を確認した。トランジスタ開発では、最大4インチ径基板まで対応できるデバイス・スループロセスを構築し、一方、電子線露光技術を使用すると、最少線幅0.25μmのゲート電極をもつ高周波対応トランジスタの試作が可能となった。また、厚膜電極の検討をすすめ、最大4Aまでの電流駆動が可能なAlGaIn/GaN HEMTの試作に成功した。高耐圧化技術では、複数の電界制御電極（フィールドプレート）をもつHEMTを試作し、400V級の耐圧をもつ新規構造の開発に成功した。
関連キーワード	窒化物半導体、トランジスタ、太陽電池、高耐圧、パワーエレクトロニクス

研究の背景および目的

地球温暖化の抑制と省エネ社会の実現には革新技術の創造とその実用化が重要である。照明関係では、LED照明による省エネ化が進展している。自動車関連では、ハイブリッド化による省エネ化が進んでいる。同様に、パワーエレクトロニクス分野でも、省エネ技術の開発が重要であり、その新規技術として、窒化物半導体デバイスが注目を集めている。窒化物半導体を用いれば、従来半導体より、高電圧を低損失でスイッチ制御できるため、広範囲の家電機器や電子機器の小型電源として期待されている。しかし、この材料系の良質な結晶成長は困難であり、実用化に成功した材料はGaInなど一部の材料に限られる。また、窒化物半導体の長所を活用したデバイス構造の研究も重要であり、世界各所で検討が進んでいる。

福井大では、窒化物半導体の結晶成長・トランジスタ技術・パワーエレクトロニクス回路技術において、NEDOプロジェクトや科研費特定領域研究などから大型の外部資金を獲得してきた。世界に先駆けて良質なInN、InAlN薄膜の結晶成長技術を開発し、独自構造のタンデム型太陽電池を提案してきた。また、結晶の高品質化に関する提案や特許出願を行ってきた。結晶技術関連で、これま

でNEDO、科研費特定領域研究から外部資金を導入し、薄膜成長装置や赤外SNOMなど大型設備を導入した。トランジスタ関連でも、NEDOプログラムに参画し、デバイス作製・評価に必要な研究設備を導入した。また、阪大GCOEの協力校としても窒化物デバイス研究を推進中である。

本研究では、窒化物半導体結晶成長と高耐圧かつ低損失なトランジスタ技術を核として、低損失パワエレ回路技術の実証を目的とする。特に、デバイス構造の設計において、InNを活性領域に含む本学独自のデバイス構造を提案し、デバイス試作を通して世界最高の低損失性と高出力性の実証を目指す。デバイス試作に必要なプロセス技術の高度化と新規プロセスの創出も重要な課題である。さらに、エネルギー関連技術において、主導的に活躍できる優れた人材の育成と、世界から人材と情報が集まる研究開発拠点の構築を図ることも目的の一つである。

東日本大震災を機に、国内では発電と電力供給網に関する社会インフラが議論されるようになったが、本研究で提案する省エネ技術は、その中核技術として位置づけられ、本研究の推進は時宜に合ったものといえる。

研究の内容および成果

1) 窒化物半導体結晶成長技術

GaNやInNなど窒化物半導体のMOCVD法による結晶成長では、窒素の原料ガスとしてNH₃が広く用いられるが、その熱分解には600℃程度の高温が必要である。一方、600℃以上の高温で熱分解を起こすInNの結晶成長や、InN層の上のGaNの結晶成長では、InNの熱分解と高品質な結晶成長の間にジレンマが生じていた。この問題を解決

するため、本学ではPt触媒を用いた独自の結晶成長法（触媒援用MOCVD）を考案し、高品質なInN結晶の成長を検討している。今年度はInN結晶の成長温度を575℃とし、Pt触媒のみの温度を600℃から1000℃まで変化してInNのX線回折強度半値幅を調べたところ、800℃以上の触媒温度で、大幅な高品質化を確認した（図1）。

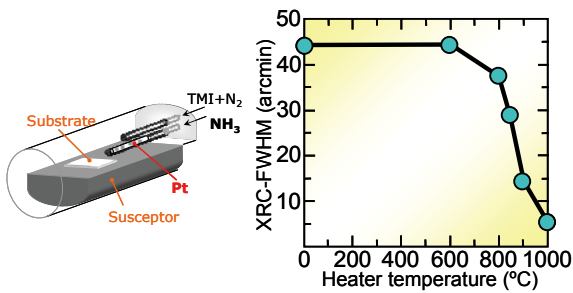


図1 触媒援用 MOCVD 装置と InN 結晶品質の触媒温度依存性

2) AlGaIn/GaN HEMT の高耐圧化技術

HEMT の高耐圧化技術として、フィールドプレート (FP) 技術が知られる。ゲート電極端での電界集中を緩和するため、通常はゲートドレイン間に一つの FP 電極を設けるが、今回は、電子線露光法を用いて複数の FP 電極をもつ HEMT を試作した (図 2)。FP 電極数の増加とともに耐圧の向上が確認され、さらに FP 電極に電圧を印加することにより耐圧が 290V (未印加) から 360V (電圧印加) まで改善できることを確認した。

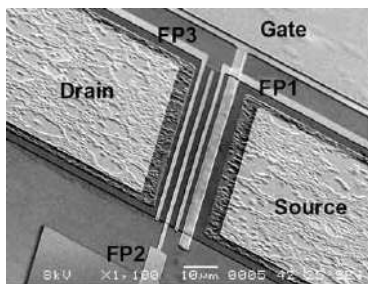


図2 複数 FP をもつ HEMT の表面写真

3) アンペア級ドレイン電流技術

試作した HEMT を実用的なパワーエレクトロニクス回路に応用するためには、アンペア級のドレ

イン電流が必要である。しかし、単純にゲート幅を拡大すると、寄生ソース抵抗の増加と発熱効果のため、ドレイン電流はゲート幅に比例しない。そこで、今回はオーミック電極 (ソースとドレイン) の幅とそのパッド電極厚を変化させ、ドレイン電流密度に与える影響について検討した。オーミック電極幅が 10 μm では、パッド電極厚依存性が大きいですが、幅 20 μm 以上では電極幅依存性が無視できる程度に減少した。また、パッド電極厚を 1000nm 程度としたとき、得られるドレイン電流密度が一定となることもわかった。オーミック電極幅 20 μm 、パッド電極厚 1000nm のとき、ゲート幅 10mm の素子は最大 4.1A の電流を示した。

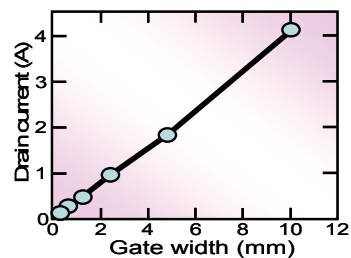


図3 ドレイン電流のゲート幅依存性

4) 大口径ウェハプロセスの構築

今年度は、大口径対応の短時間熱処理装置をクリーンルームに導入し、4インチ口径までの半導体ウェハを扱えるデバイスプロセスが完成した。2インチ自立 GaN 基板上や 4インチサファイア基板上の HEMT 試作が可能となった。

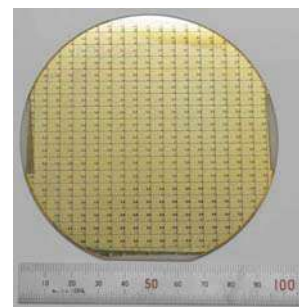


図4 4インチ基板上 HEMT 試作例

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

「主な発表論文等」

- [1] Md. T. Hasan, H. Tokuda and M. Kuzuhara, "Surface barrier height lowering at above 540K in AlInN/AlN/GaN heterostructures," *Appl. Phys. Lett.*, 99, 132102 (2011).
- [2] N. Yafune, S. Hashimoto, K. Akita, Y. Yamamoto and M. Kuzuhara, "Low-Resistive Ohmic Contacts for AlGaIn Channel High-Electron-Mobility Transistors Using Zr/Al/Mo/Au," *Jpn J. Appl. Phys.*, 50, 100202 (2011).
- [3] K. Sugita, M. Tanaka, K. Sasamoto, A. G. Bhuiyan, A. Hashimoto, A. Yamamoto, "MOVPE growth of InAlN/InGaIn heterostructures with an intermediate range of In content," *J. Cryst. Growth*, 318, 505 (2011).
- [5] K. Sasamoto, K. Sugita, A. Hashimoto, A.

Yamamoto, "Platinum-catalyst-assisted metalorganic vapor phase epitaxy of InN", *J. Cryst. Growth*, 314, 62 (2011). その他 8 編

「特記事項」

本研究内容に関して、海外招待講演 3 件 (欧 2 件、米 1 件)、国内招待講演 4 件、国際会議発表 12 件、総説 3 件、特許出願 3 件など。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

NEDO ナノテク・プログラムにおいて、H24 年度の延長申請が採択され (代表者: 葛原) 予算 25 百万円 (福井大分) の配分が決まった。その他、H23 年度 JST-ALCA が採択され (代表者: 葛原) 予算 5 百万円が配分された。

平成23年度福井大学研究育成経費「特に大型の競争的資金獲得を目指す研究」
核融合プラズマ計測への適用のための
遠赤外ジャイロトロンの飛躍的高出力化

研究代表者： 斉藤 輝雄（遠赤外領域開発研究センター・教授）
 研究分担者： 小川 勇（遠赤外領域開発研究センター・教授）、立松 芳典（遠赤外領域開発研究センター・准教授）、池田 亮介（重点研究高度化推進本部・特命助教）、山口 裕資（遠赤外領域開発研究センター・機関研究員）

概要	超高密度核融合プラズマのイオン温度の新計測法開発に必要な100 kW級高出力遠赤外ジャイロトロンの実現が強く求められている。この際、超伝導マグネットで制約されない2次高調波発振が望ましい。研究代表者のグループは、強磁場下でも速度分散の小さい電子銃の開発と高出力発振に適したモードの探索等により、周波数約0.4 THzのサブテラヘルツ帯において、ジャイロトロン <small>の</small> 2次高調波発振として世界最高出力50 kW以上を達成している。本研究では、基本波とモード競合することなく一層の高出力が期待できる最適発振モードの探索、このモードに適合する新規電子銃の国際共同研究による設計、さらにはジャイロトロンに印加する電圧の高電圧化・高電流化による運転領域の拡大等により、これまでの出力記録を大きく更新する83 kWの達成に成功した。また、この結果を学問的基盤として、科研費基盤研究（A）に申請した。
関連キーワード	高出力遠赤外光源、ジャイロトロン、2次高調波、核融合プラズマ計測、モード競合

研究の背景および目的

1. 研究の全体像

遠赤外ジャイロトロンの応用展開が進んでいるなかで、強い期待のある核融合プラズマ計測への適用を実現するためには、遠赤外ジャイロトロンの飛躍的な高出力化が必須である（例えば、プラズマ・核融合学会誌84, No. 12, (2008)に掲載の特集記事、Y. Tatematsu et al., IAEA Fusion Energy Conference (2010)）。ジャイロトロンの高出力発振では通常、周波数が電子サイクロトロン周波数に等しい基本波発振が用いられる。この関係を遠赤外領域（sub THzからTHz帯）に当てはめると、実現困難な20 Tから30 Tを超える超強磁場マグネットが必要になる。一方、高次高調波発振を用いると、必要な磁場強度が大きく軽減される。

本研究では、現実的な15 T以下のマグネットを用いて、遠赤外領域で高出力が実現できる2次高調波の高出力発振を実証する。さらに、3次高調波発振によるジャイロトロンの高周波化においても、最近、国際共同研究により、高次高調波によるテラヘルツ発振に適したモードを発見して、kWレベルの高出力発振の理論的可能性を見いだし

(M. Y. Glyavin, T. Saito et al., Radiophys. Quantum Electronics, **52**, 500 (2009))、実験的検証を計画中である。

これらの結果により、当センターを中心とする国際共同研究によってなされた理論的予測に対して、実験的裏付けを与え、遠赤外ジャイロトロンの飛躍的高出力化のための基盤とする。

2. 23年度の計画

研究代表者のグループは、これまでに採択されている科研費基盤研究（B）等による研究によって、新規設計の電子銃を開発し、周波数約0.4 THzのサブテラヘルツ帯において、ジャイロトロンの2次高調波発振として世界最高出力50 kW以上を達成している（2009年に物理学分野でもっとも権威のあるPhysical Review Letters誌に発表）。23年度は、さらに改良した電子銃をジャイロトロンに装着して、0.4 THz帯において100 kW級の発振を実証する。これにより、科研費基盤研究（A）以上の大型研究費に申請するための確固とした学問的基盤を得る。

研究の内容および成果

1. 23年度の研究経緯

遠赤外ジャイロトロンの高出力化のためには、電子加速電圧の高電圧化が必要である。しかし、これまでは現在の設備で危険無く運転できる最高値60 kVが実験の制約要因となり、出力記録の更新や

新設計電子銃の性能を十分発揮する実験が進展しなかった。23年度は、高耐圧半導体スイッチを新規導入して装置上の制約を解消し、実験パラメータ範囲を大幅に拡大した。この半導体スイッチの導入に本経費を使用した。

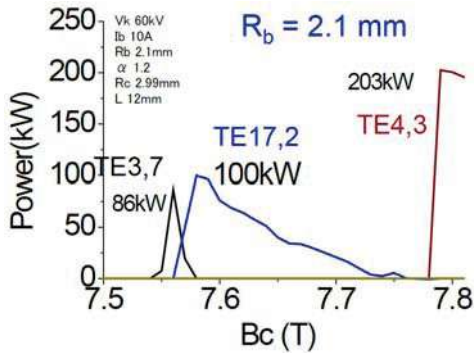


図 1. モード競合計算コードによる出力予測

高電圧化の他に、高次高調波発振による高出力化には最適発振モードの探索が必要である。図 1 はモード競合計算コードによる出力予測を示す。発振モードの候補である TE17,2 モードに対して、出力 100 kW 単独発振が期待できることを確認した。また、モード競合の恐れのある基本波 TE4,3 モードの発振磁場領域が十分離れていることも確認した。このモードに整合する電子銃の改良設計は外国人客員教授との国際共同研究として実施済みであり、科研費基盤研究 (B) により整備した新規電子銃をジャイロトロンに装着して実験を行った。

2. 23 年度に得られた結果

図 2 に結果を示す。この図は、2 次高調波発振サブテラヘルツ帯ジャイロトロンの出力記録を周波数に対してプロットしたものである。遠赤センタ

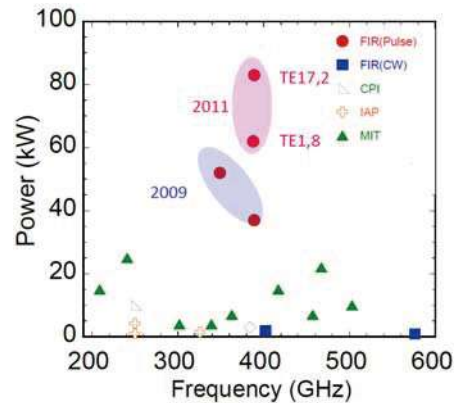


図 2. サブテラヘルツ帯 2 次高調波ジャイロトロンの出力記録

ー (FIR FU) 以外の結果は文献値であり、これまでは 20 kW 程度の出力が最大であった。我々は 21 年度に、新しい発振モードを用いて 50 kW を超える出力が可能であることを実証している。本研究では、新しい TE1,8 モードにより 60 kW を超える出力を示した後、新規電子銃を用いて TE17,2 モードによる高出力化実験を行った。その結果、このモードが基本波と競合することなく、最高 83 kW で発振することを示した。これにより、サブテラヘルツ帯において 2 次高調波による 100 kW 級の発振可能性を実証した。

以上の結果を学問的基盤とし、長パルス安定発振を課題とし、科研費基盤研究 (A) に申請した。

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

「主な発表論文等」

学術論文 (3 編発表、1 編投稿)

1. T. Saito et al., "New Power Records of Sub-Terahertz Gyrotron with Second-Harmonic Oscillation," Plasma Fusion Res. 7, 1206003 (2012).
2. Y. Yamaguchi, T. Saito et al., "Formation of Laminar Electron Flow for a High-Power Sub-THz Gyrotron," Plasma Fusion Res. 7, 1205004 (2012).
3. Y. Tatematsu, T. Saito et al., "Development of a kW Level-200 GHz Gyrotron FU CW GI with an Internal Quasi-optical Mode Converter," J Infrared Milli. Terahertz Waves 33, 292-305 (2012).
4. T. Saito, Y. Tatematsu et al., "Generation of High Power Sub-THz Radiation from a Gyrotron with Second Harmonic Oscillation," to be published in Physics of Plasmas

国際会議招待論文 (5 件)

1. T. Saito et al., "Development of high power gyrotrons in the sub terahertz region for application to CTS measurement," 8th Int. Workshop "Strong Microwaves and Terahertz Waves, Nizhny Novgorod, Russia. July 9-16, 2011.
2. T. Saito, Y. Tatematsu et al., "Development of high power sub terahertz power source with a gyrotron for application to CTS measurement," 15th LAPD, Jeju, Korea, October 9-13, 2011.

3. T. Saito et al., "Proof of High Power Oscillation of a Sub Terahertz Gyrotron for Application to Collective Thomson Scattering Experiment on LHD," Plasma Conference 2011, Kanazawa, Japan, November 22-25, 2011.

4. 他 2 件 発表者は斉藤以外

国際会議 一般講演件 4 件、国内会議発表 2 件 「特記事項」

平成 24 年 3 月 7 日-9 日開催の国際ワークショップ IW-FIRT 2012 において本成果は高く評価された。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 科学研究費補助金・基盤研究 (B)・H21-23・協同トムソン散乱計測用テラヘルツ帯高出力パルスジャイロトロンの実証管開発・代表・採択・直接経費総計 13,800 千円
2. 学術研究助成基金助成金・挑戦的萌芽研究・H23-24・有限電荷効果を抑制したテラヘルツ帯ジャイロトロン用小型大電流電子銃の開発・代表・採択・直接経費総計 3,000 千円
3. 科学研究費補助金・基盤研究 (A)・H24-26・サブテラヘルツ帯高出力ジャイロトロンにおけるモード競合の抑制と長パルス発振の実証・代表・申請・直接経費総計 49,970 千円

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」
**「いえ型保育空間」における
 異年齢保育の集団形成に関する調査研究**

研究代表者： 栗原 知子（教育地域科学部・助教）

共同研究者： 櫻井 康宏（工学研究科・教授）、松村 正希（株式会社莫設計同人・代表取締役）、小山 逸子（K 保育園・園長）

概 要	子どもが1日の大半を過ごす保育施設は単なる通所施設ではなく、子どもの発達を保障する家庭的要素を軸とした生活施設であるべきである。現代の一般的な住宅と同じように「居間」「寝室」「食堂」などの各居室によって構成された「いえ型保育空間」において、1～5歳児混合の「きょうだい保育」を実施する全国初の保育園を対象に、より豊かな子どもの生活環境を提案するべく、保育室内での調理員常駐・調理実験を試験的に実施し、前後の子どもの生活実態の把握を行った。その結果、保育室内の居室利用は、概ね「寝室」>「居間」≧「食堂」>「ユーティリティ」の順に多く、園児が体験する集団の7割以上が「異年齢集団」であり、特に、食事・着替え・午睡などの生活にかかわる行為での異年齢の関わりが顕著であった。また、実験による子どもの居場所及び集団構成に大きな変化は見られなかったが、個人追跡調査の結果では、子どもが調理員のもとへ自分のタイミングで向かう姿が多く見られ、保育士との関わり方とは違う新たな関係づくりが見られた。
関連キーワード	保育園、子ども、集団、異年齢保育、調理員常駐実験

研究の背景および目的

「いえ型保育空間」とは、従来の食寝同室の保育空間とは違い、普通の住宅と同じように「居間」「食堂」「寝室」などの各居室によって構成された「家」のような保育空間の事を言う。日本の保育園の多くは、同年齢同士の「年齢別保育」をワンルーム型保育空間の中で一斉に行うことが主流であった。近年、子どもの意思を尊重した「自由保育」や子ども同士の育ち合いを目的とした「異年齢保育」が注目を集めている。しかしながら、「異年齢保育」を実施する園の多くは、年齢や発達段階の違いを考慮し、1日の保育生活の中でも食事や午睡といった生活行為を中心とした、ごく限られた条件付きのものとなっている。3～5歳児や4～5歳児のみの交流だけでなく、本来の一般家庭のように1、2歳児も含めた「きょうだい保育」は、新たな異年齢保育のあり方として期待されている。

本研究は、学内外の共同研究者と共に、「1～5歳

児混合の異年齢保育」というソフトの仕掛けと「いえ型保育空間」というハードの仕掛けを導入して「きょうだい保育」を実践する全国初の保育園において、以下の3点を明らかにすることを目的としている。

- ①「いえ型保育空間」における子どもの居場所と、「異年齢保育」における集団形成の実態を把握する
- ②「いえ型保育空間」において一般家庭のように「保育室内における食事づくり」を試み、この実践を通して、子どもや調理員の生活がどのように変化するかを明らかにする
- ③保育施設を「家」と捉え、子ども個人の意思を尊重する保育を行う北欧の保育スタイルと間取りの歴史の変遷を調査し、次年度の海外調査にむけて資料・文献調査を行う

研究の内容および成果

調査対象は滋賀県のK保育園（2004年開設認可保育園）である。K保育園は、「きょうだい保育」を実施する3クラスの保育室と0歳児保育室の4保育室から成り、各保育室は、「居間」「対面式キッチン付の食堂」「寝室（畳敷き）」「ユーティリティ（玄関、着替えスペース、トイレ）」の4つの機能分節型の保育空間となっている。調査対象児はTpクラス、Ksクラスの各約25名（1～5歳児各5名程度で構成されている）である。「きょうだい保育」の実践において、より家庭的な保育環境を実現するために、保育室内調理を可能と

する空間設定となっていたものの、経済的理由や職員配置の問題から、対面式キッチンの利用や食堂の利用が少なかった。よって、本研究では昨年までに実施した以下の3種の調査及び実験（表1）を用い、精緻に比較分析することで、集団構成及び利用者の行動軌跡把握を行う。

- I. 居場所調査：2クラスの全園児の居場所を5分毎（9時～16時）に図面上にプロット→各年齢別の居室利用実態と集団形態（一人、異年齢、同年齢、規模など）の把握
- II. 個人行動観察調査：各クラス1～5歳児1名ずつ

つ及び調理員を対象に保育室内での移動軌跡を記入→より精緻な集団形態の把握と各室への移動経路の把握

Ⅲ. 保育室内調理員常駐実験：Tp クラスを対象に6ヵ月間の調理員常駐（9時～16時）・保育室内調理の実施→実験前（11時から1時間昼食の温め、配膳のみを保育室内で行う）・開始直後（2週間）・3か月後、5か月後、半年後の5過程の中での調理員と子どもの集団形成、各室への移動経路の変化を把握

保育室内での子どもの居場所と集団構成

各室の利用状況は、各クラスの保育内容や方針によって多少の違いは見られるものの、概ね「寝室」40%弱>「その他（保育室外）」20%≧「居間」20%弱≧「食堂」20%弱>「ユーティリティ」8%であり、低年齢ほど「寝室」「ユーティリティ」、高年齢ほど「居間」「食堂」での滞在が多い。一日を通して、各子どもが「異年齢集団」に属する割合は7割を超えており、特に「寝室」「食堂」で形成されていることがわかった。食事や着替えなどの生活時間と自由遊び時間では、生活時間での「異年齢集団」形成が多いのに対し、「同年齢集団」は自由遊び時に比較的多く形成されており、特に5歳児は「同年齢」で遊ぶ機会が多い。「異年齢集団」の年齢構成は、生活時間時に多様な年齢で構成され、遊び時間では1歳違いの2階層年齢での集団構成が多くみられる。

調理員常駐調理実験による変化

調理員常駐実験による子どもの集団形成や居場所は、実験半年後>実験開始直後>実験1年前の順に「寝室」「食堂」利用が高く、異年齢集団形成割合も多かったが、実験対象外のKsクラスとの比較から、1月と6月の保育方法の違いによる5歳児の午睡の有無に起因すると考えられる。しかし、活動の合間に台所へ立ち寄る子どもの増加や調理員を含めた集団は、「3か月後」を境に増加しており、個人追跡調査から調理員との関わり方に個人差が認められた。また、調理員自身の行動（図1）も食堂・台所を拠点に徐々に「居間」「寝室」へと広がり、「居間」「寝室」間の移動の増加や遊び時間での集団参加も見られるようになった。子どもの行動例（図2）をみると、活動日によって行動パターンは異なるものの、常に台所で作業を行う調理員のもとへ、子ども個人が自分のタイミングで向かう場面が多くみられるようになった。

表1. 本研究にかかわる調査の概要

NO	調査	期間	対象	時間	方法
I	基本調査	2008年1月～2月のべ10日間	Tpクラス:26名 Ksクラス:25名	9時～16時 5分間隔84時点	各保育室の図面上に5分間隔で子どもの居場所・年齢・グループ構成・活動内容を目視によってプロット
II	調理員常駐調理実験調査	2009年12月～2010年6月 ①12月:実験前 ②1月:実験開始直後 ③3月:実験3か月後 ④5月:実験5か月後 ⑤6月:実験半年後 ※実験はTpクラスのみで、Ksクラスは比較分析のため調査を実施	◆行動観察調査 Tpクラス:25名 Ksクラス:25名 調理員2名 ◆個人追跡調査 Tpクラス、Ksクラス各クラスの1～5歳児各1名、調理員各1名	①～⑤各2日ずつ 9時～16時 5分間隔84時点	各保育室の図面上に5分間隔で子どもの居場所・年齢・グループ構成・活動内容を目視によってプロット
III	海外調査のためのプロ調査	2010年9月～10月	フィンランドの保育園4園	①～⑤各1日ずつ 9時～16時 5分間隔84時点	9～16時の対象園児の行動軌跡を目標によって図面上に記入し、5分間隔84時点の居場所・年齢・グループ構成・活動内容を記録
IV	海外調査のための情報収集	2011年7月	IPA国際会議		1980年代に建設された保育園を中心に、保育方針・産生体制・異年齢保育の様子・利用居室の働き取り及び保育園の図面採取
V	海外調査のための情報収集	2011年7月	IPA国際会議		調査分析の発表及び他国の保育園児の生活について情報収集

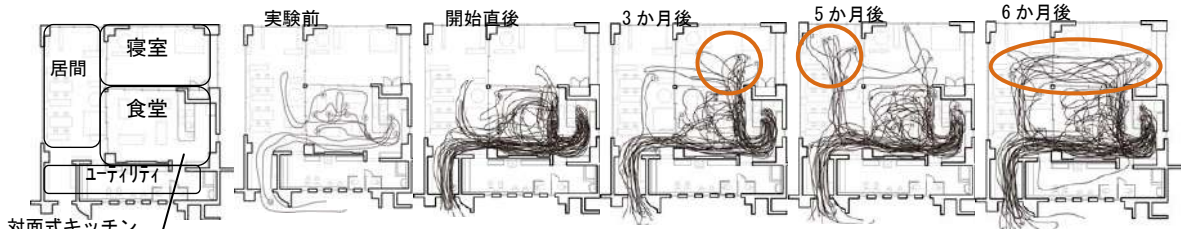


図1. 調理員常駐実験における調理員の行動軌跡の変化

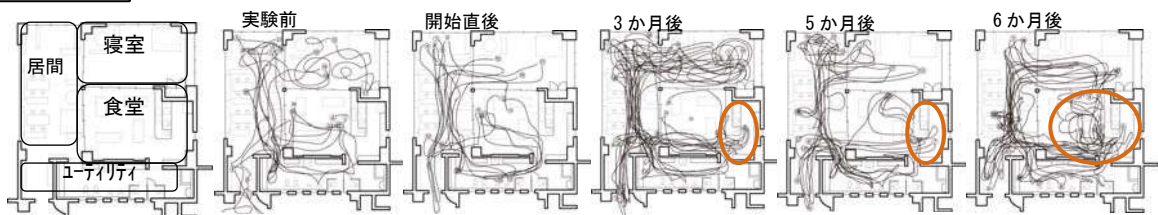


図2. 調理員常駐実験における3歳児の行動軌跡の変化

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

「主な発表論文等」

発表論文：「障害時と健常児と一緒に生活できるフィンランドの保育環境」, こども環境学研究, Vol.7, No.1, p48, 2011年8月
国際会議発表：「The Effects of Children in Nurseries Introducing Multi-aged Grouping Child Care」, 18th International Play

Association World Conference 2011, 2011年7月（ウェールズ）

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

内藤記念科学奨励金・若手ステップアップ研究助成・2013年4月から3年間・北欧「いえ型保育空間」における異年齢保育の実態と園児の集団形成に関する調査研究・代表・申請予定

平成 23 年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 K⁺チャネルでのゲーティングの微視的機構の解明

研究代表者： 炭竈 享司 (医学部・特命助教)

概 要	
	<p>これまで、開状態の K⁺チャネル(KcsA)において、pH センサードメインがどのような構造を取っているのかは実験的には分かっていない。そこで本研究では、分子動力学法を用いたコンピュータシミュレーションにより、KcsA の開構造、特に pH センサードメイン近傍の構造の解明を試みた。その結果、これまで報告されている KcsA の開状態の X 線結晶構造では欠損している pH センサードメインの構造を予測することができ、それは細胞質側に大きく開いた構造を取ることが分かった。実際、イオン透過の様子をシミュレートしたところ、その大きな孔を通りイオンは輸送され、イオン透過の濃度依存性は実験と対応するものであった。また、原子間力顕微鏡による測定との比較も行っており、その結果、pH センサードメインは定まった構造を取らず、大きく揺らいでいることを解明した。</p>
関連キーワード	イオンチャネル、KcsA、ゲーティング、イオン輸送、分子動力学、原子間力顕微鏡

研究の背景および目的

イオンチャネルとは、神経細胞において活動電位を発生させ、シグナル伝達を行うタンパク質である。すなわち、生体での神経伝達を司る分子である。活動電位の発生はイオンの輸送によって行われるが、それは受動輸送であるため、イオンは電気化学的勾配に従って輸送される。したがって、イオンチャネルが開構造であれば、イオンはネルンスト電位に至るまで流出し続けてしまう。そこで、イオンチャネルがイオンの輸送を制御するためには、構造変化によりその開閉を行う必要があり、これをゲーティングと呼ぶ。このように、ゲーティングはイオンチャネルの根幹的機能の 1 つである。

イオンチャネルの研究の 1 つの転換点は、1998 年の MacKinnon らによる K⁺チャネル(KcsA)の X 線結晶構造の解明である。KcsA の構造が解かれたことにより、イオンチャネルの機能であるイオンの透過・選択性・ゲーティングの微視的機構を原子レベルから解明する糸口が与えられ、その功績により MacKinnon は 2003 年のノーベル化学賞を受賞している。しかし、MacKinnon らの解いた KcsA の構造では、細胞質に突き出す α ヘリックスが束を形成して絞り込みを作っており、イオンが通れるような孔は見つからなかった。つまり、解明された KcsA の構造は閉状態であり、そのためイオンの透過の全貌は明らかにならなかった。一方、

その構造からは、ヘリックス束による絞り込みを解消するような構造変化によりゲーティングが起きると予想された。実際、KcsA は細胞内 pH の変化を感知して閉構造から開構造へ構造変化するが、絞り込みを形成しているヘリックス束上に pH センサードメインが見つかる。その後、2010 年に Perozo らにより、KcsA の開構造がようやく解明された。ところが、その構造は pH センサードメインを含んでおらず、イオンがどのような大きさ・形の孔を通して透過しているのかは不明のままである。

これまで当研究室では、KcsA がゲーティングする際にねじれ運動を起こすことを Diffracted X-ray Tracking(DXT)法により解明しているが、KcsA の原子配置に関する詳細な知見は得られておらず、開構造での pH センサードメインの構造は分かっていない。そこで、本研究の目的は、細胞質内ドメインを切った KcsA について、分子動力学(Molecular Dynamics; MD)法を用いたコンピュータシミュレーションにより、ゲーティングに重要な役割を果たすと考えられている pH センサー周辺の原子レベルでの構造を解明することとする。また、得られた構造が実際にチャネルとしての役割を担えるのか、すなわち、イオンを透過させることができるのか? も解明する。

研究の内容および成果

MD 法によるコンピュータシミュレーションとは、Newton の運動方程式を解くことにより、時々刻々の原子の座標・速度を求める方法である。MD シミュレーションでの時間・空間解像度は、それぞれフェムト秒(1 フェムト秒 = 1×10^{-15} 秒)、サブ Å (= 1×10^{-10} m)であり、要するに超高性能の顕微

鏡で観察するようなものである。また、MD 法では仮想的な力を原子に加えることもでき、構造変化を観測することも出来る。本研究の目的は、KcsA の原子レベルでの開構造の決定であり、したがって、MD 法は適切な研究手法と言える。

前述したように、MacKinnon らの構造は pH セ

ンサードメインを含んでいるが、閉構造である。一方、Perozo らの構造は開構造であるが、pH センサードメインを含まない。そこで、MacKinnon らの構造を Perozo らの構造に向けて構造変化するよう、Ca²⁺に力を加えた MD 計算を行った。その際、pH センサードメインには力を加えず、自由に動けるようにして、どのような構造に至るかを調べた。

まず、図1に X 線結晶構造解析で判明している KcsA の開構造について白で示した。pH センサードメインはそれより細胞質側に位置しており、この構造では欠損している。本研究の MD 法によるシミュレーションによって、Perozo らの X 線結晶構造よりさらに先の構造が得られ、pH センサードメインは大きく開いた構造（図1の黒色）を取るようになった。構造が大きく開いていることは、それが開構造であり、イオン透過が可能であることを示唆している。

そこで、この構造が実際にイオンを透過させることができるのか？を調べるため、MD シミュレーションによりイオンの透過の様子を観測した。その結果、イオンは大きく開いた孔を通過して、細胞質側から細胞外側に輸送された。KcsA を通るイオンの透過速度は、高濃度でも飽和することなく、イオン濃度にほぼ比例することが実験的に知られているが、本研究でのコンピュータシミュレーションによっても同様の振る舞いが観測されている。したがって、本研究により得られた構造は、開構造と結論される。

さらに、本研究の構造が実験による観測とどの程度対応しているのかを調べるため、名古屋工業大学の出羽グループでの原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscope: AFM）による観測とも比較している。AFM では、結晶構造より長く見えるものの、MD 計算で得られた構造よりは短かった。これは、シミュレーション中の開構造の pH センサードメインは閉状態では見られない大きな運動をしている様子が観測されており、したがって、揺らぎの大きな pH センサードメインを AFM では完全に観測することが難しかったと考えられる。同様に、それらの領域は、大きな揺らぎにより低温でも結晶の構造を取ることが出来ず、したがって X 線結

晶構造解析においても欠損していたと考えられる。

本研究は、このように KcsA の pH センサードメインの構造を解明し、開状態においてはそれが大きく揺らいで運動していることを解明した。本研究で得られた構造は、十分に広い孔を持っているため、イオン透過が可能であり、実験と同様の濃度依存性を示すことが分かった。今後の展望として、今回は計算に含まなかった細胞質ドメインを含んだ開状態の構造の解明がある。また、閉状態から開状態への構造変化の機構についても解明する必要があり、チャンネル病の分子的原因や麻酔の作用機序の基礎的な知見を与え得ると考えられる。



図1. コンピュータシミュレーションによって得られた細胞質内ドメインを切った KcsA の開構造。紙面上が細胞外、下が細胞内である。白く示したのは Perozo らが解明した KcsA の X 線結晶構造であり、コンピュータシミュレーションでは、さらに pH センサードメインを含む黒色の部位までを得ている。この構造は大きく広がった孔の形をしており、イオンはその中を通過して透過する。

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

「主な発表論文等」

“Role of Central Cavity in Ion Permeation through the Kv1.2 Channel” Takashi Sumikama, Shinji Saito, and Shigetoshi Oiki, *Biophys. J.* **102**, 333a (2012).

“Ion Entryway of the Membrane-Embedded KcsA Potassium Channel Viewed from the Cytoplasmic Side” Ayumi Sumino, Takashi Sumikama, Masayuki Iwamoto, Takehisa Dewa, and Shigetoshi Oiki (投稿予定)

「計算機シミュレーションで見るイオンチャンネルにおけるイオン透過」炭竈享司、老木成稔 日本生理学会雑誌 第74巻 第2号 65頁 (2012)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費助成事業 若手研究 B 平成 24-25 年
「カリウムチャンネルにおける pH 変化によるゲーティング機構とその生理学的意義の解明」
代表 申請中 500 万円

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」
**Comparative Study of Raman micro spectroscopy and FTIR
 in Colorectal Tumor Model**

研究代表者： Andriana B. Bintang (医学部・特命助教)

研究分担者： Norio Miyoshi (医学部・助教)

概 要	FTIR spectroscopy and Raman micro-spectroscopy were used to differentiate between grade levels of non clinic samples, colorectal tumor models at 4 different grades; normal, grade 1, grade 2 and grade 3. Detailed investigation of the spectra in the fingerprint region (4000–500 cm^{-1}) revealed some distinct peaks and shoulders, most of which were assignable to wave numbers that shown to represent biochemical changing within the tissue. Differences in peak heights and peak ratios indicated differences in biochemical composition of cancer from different grade level. It was possible to distinguish between their grades. However, all collected colorectal tumor model at different peak was distinguishable using Raman micro-spectroscopy and FTIR clearly. The nucleus information (grouping in PCR) of H-E (hematoxylin-eosin) staining image is very nice correlation with P=O component. Antisym. P=O component (stretch. vib.) has higher correlation with antisym stretch. of CH_2 and C=O component at 5°C compared with sym. P=O component. (FTIR data). Sym. P=O component has higher correlation with antisym. stretch. of CH_2 and C=O component at -5°C compared with antisym. P=O component. (FTIR data). Raman data has the same results with FTIR data.
関連キーワード	FTIR, Raman Spectroscopy, colorectal tumor, Antisymmetric Phosphate

研究の背景および目的

Application of H-E staining in histopathology has had a play role in diagnosing the tissue. However, several researchers report that some biochemical content may be removed due to some chemical that are used during the H-E staining process. Therefore, we proposed the progressed a FTIR Microscope and Raman micro-spectroscopy for observation the fresh tissue. The different temperature of sample holder will be used for testing whether there will be temperature dependency or not during the measurement. We emphasized to antisymmetric and symmetric P=O stretch. vib. due to suggest

an alteration of their content in the nucleic acids in the malignant tissues.³

Starting the last decade, FT-IR micro-spectroscopy has already increased in capabilities to visual a molecular component for unstained tissue.¹ IR spectroscopy is used to excite the vibrational motion of covalently bonded moieties by direct absorption of the photon.² Raman micro-spectroscopy is a non-invasive method by which information regarding molecules and crystallization on the surface of cryo-sectioned tissue can be obtained at room temperature.⁴

研究の内容および成果

Colorectal tumor model (CTM) were established by intra-peritoneally administrated of Azoxymethane to the Balb/c mouse. Samples were directly harvested after 12 weeks and continuing for frozen section. The first of serial transversal section ($\pm 6 \mu\text{m}$ in the thickness size) was mounted onto a slide glass, and stained with hematoxylin and eosin; the second serial transversal section ($\pm 8 \mu\text{m}$) was for FT-IR 3000M observation through attaching the sectioned sample on the BaF_2 plate gently and directly kept them under -21°C . The third was for Raman micro-spectroscopy observation.

Result and Discussion

Figure 1A showing the grouping of H-E section and transmitted picture (1B) where

consist of N (normal group), G1 (group 1), G2 (group 2) and G3 (group 3). Grouping was as non clinical diagnosing for decision of malignancy and based on nucleus phenomena, including the differences in size and color of cells. Therefore, the determined groups are as a temporary grouping.

Using PCR method, the peak intensity of antisymmetric and symmetric P=O stretch. vib. show some differences. The different temperature treatment make some distinct to both of phosphodiester (Fig. 2). Fig. 2A and 2D showing the 3 dimension of antisymmetric P=O stretch. vib. which is clearly similar with the high peak intensity of 2 dimension (Fig 2B & 2E).

Fig. 2C & 2F, showing the superimpose of FTIR observation for antisymmetric P=O stretch. vib. that detected as the intensity of reddish color at 5°C & -5°C. The application of Raman spectroscopy and FTIR demonstrated the similar result where both of devices detect that antisymmetric P=O stretch. vib. is more higher than symmetric P=O stretch vib. at temperature more than 5°C. In focusing to the mapping image, it looks that antisym. P=O stretch. vib. reflection is higher in reddish color compared with the mapping imaging of sym. P=O stretch. vib.. The implication of it that Antisym. P=O stretch. vib. have a higher accumulation within CTM. Table 1 describe both of the mean-peak Raman intensity and FTIR reveal the higher peak intensity of Antisymmetric P=O stretch. vib. in the normal group. While in the group-2, symmetric P=O stretch. vib. depict oppositely.

Acknowledgement: we would like to thank to The Fukui University and JST foundation for their foundation support this research.

References:

1. T. Yamada, N. Miyoshi, T. Ogawa, K. Akao, M. Fukuda, T. Ogasawara, Y. Kitagawa, K. Sano, *Clinical Cancer Research*, **8**, 2010-2014, 2002.
2. L. Chiliboga, P. Xie, H. Yee, D. Zarou, D. Zakim, M. Diem, *Cell Mol. Biol.* **44**, 219-229, 1998.
3. WT. Cheng, MT. Liu, HN. Liu, SY. Lin, *Mic. Res. Tech.* **68**, 75- 79, 2005.
4. Viehoveer AR, Anderson D, Jansen D, *et al.* *Photochem Photobiol*, **78**(5), 517-24, 2003.

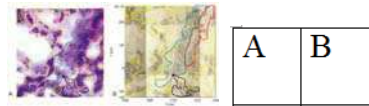


Fig 1. Grouping based on H-E staining (A) transmit picture (B).

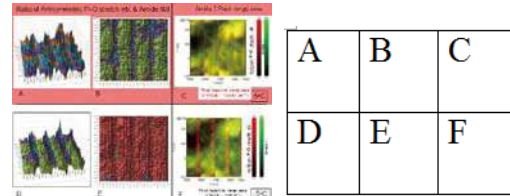


Fig.2. Demonstrating the reconstruction of 3 dimension (A & D) and 2 dimension (B & E), and the superimpose of FTIR observation (C & F).

A		Phosphor diester group	
Classification	Antisymmetric P=O Stretch. Vib. (1223 cm ⁻¹)	Symmetric P=O Stretch Vib. (1078 cm ⁻¹)	
Normal-group (normal cells)	0.023	0.026	
G2-group (Aderoma)	0.017	0.047	

B		Phosphor diester group	
Classification	Antisymmetric P=O Stretch. Vib. (1223 cm ⁻¹)	Symmetric P=O Stretch Vib. (1078 cm ⁻¹)	
Normal-group (normal cells)	0.26	0.28	
G2-group (Aderoma)	0.12	0.18	

Table 1. The comparative of the mean-peak of Raman intensity (A) and FTIR (B) for phosphordiester group within CTM.

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

「主な発表論文等」

- [1] A. B. Bibin, Miyoshi N, Maruyama A., Asakura T, Kurohmaru M., and Sato H. One chapter in Symposium Book of “PACIFICHEM 2010” Entitled by N. Miyoshi and R. H. Pottier, “In hope of going over the present Clinical PD & PDT-A” pp 97-112, (2011).
- [2] A. B. Bibin, Fukunaga Y., and Miyoshi N*. The 4th Nanoscience & Nanotechnology Symposium, in Bali, Indonesia, pp: 55-58, September 23-25, (2011).
- [3] Miyoshi N*, Fukunaga Y., Ito S., and A. B. Bibin. The 4th Nanoscience & Nanotechnology Symposium, in Bali, Indonesia, pp: 21-23, September 23-25, (2011).
- [4] Miyoshi N., A. B. Bibin, Ito S., Fukunaga Y., Tsutumi K., Kume K., and Hisazumi H. *The 11th Annual Congress of the Korean Photodynamic Association and The 3rd*

- symposium of the Asian Photodynamic Association, Korea, August 20, (2011).*
- [5] Miyoshi N, Kume K., Tsutumi K., Fukunaga Y., Ito S., Imamura Y, A. B. Bibin: *13th IPA World Congress. International Photodynamic Association.* Innsbruck, Austria. May 10-14, (2011).
- [6] Miyoshi N, Kume K, Tsutumi K, Fukunaga Y, Ito S, Yoshiaki Imamura, and A. B. Bibin “*Aminolevulinic Acid-Sci., Tech. & Appl. in Agricul. & healthcare*” Edited by I. Okura and T. Tanaka, Published from SBI ALApromo, Ltd. Co., Tokyo, Japan, (2012).

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
JSPS Grants-in-Aid for Scientific Research, Scientific Research C, 2012-2013, under application.

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 細胞内局在性ムスカリン受容体の中枢神経系における機能の解明

研究代表者： 宇和田 淳介（医学部・助教）

共同研究者： アニスツザマン・アブサイド・モハメド（医学部・特任助教）

概 要	
	ムスカリン受容体は、神経終末から細胞外に遊離されたアセチルコリンをリガンドとする G タンパク質共役型受容体である。これまで、ムスカリン受容体は細胞の表面に存在することで機能していると考えられてきた。しかし今回、我々はラットの大脳皮質、海馬において細胞膜だけでなく、細胞内にもムスカリン受容体が存在することを明らかにした。5つのムスカリン受容体サブタイプのうち、細胞内局在を示すのは M1 サブタイプのみであった。in vitro の機能解析では、この細胞内 M1 受容体がリガンド刺激に応じて Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) の活性化を示すことが分かり、細胞膜上の M1 受容体とは異なるシグナル経路を惹起することが明らかになった。
関連キーワード	ムスカリン受容体、G タンパク質共役型受容体、アセチルコリン

研究の背景および目的

ムスカリン受容体は7回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である。一般的に GPCR は遺伝子から転写・翻訳された後、小胞体からゴルジ体を経て細胞膜上へと輸送される。GPCR が活性化して細胞内でのシグナル経路を惹起するには神経終末から細胞外へと放出される神経伝達物質と結合する必要がある。その為、GPCR が機能するのは細胞膜まで輸送された後であり、細胞内にある GPCR は細胞膜に移行する途上、あるいは分解される前の一時的な副産物に過ぎないと考えられてきた。しかし近年、代謝型グルタミン受容体 mGluR5、2型カンナビノイド受容体など一部の GPCR は、細胞内にも機能的な状態で存在し得ることが報告されてきている (YJ Jong, *J Biol Chem*, 2009; FS den Boon, *PNAS*, 2012)。更に、Robben らは、腎尿崩症の原因の一種であるバソプレシン V2 受容体の変異体に関する報告で、細胞内 GPCR が薬物治療のターゲットとなりうることを示している (JH Robben, *PNAS*, 2009)。この変異型 V2 受容体は細胞膜へと移行できず、細胞内に滞留するが、内因性のアゴニストであるバソプレシンは細胞膜を通過できない為にこの細胞内 V2 受容体を刺激できない。一方、細胞膜を通過できる性質の薬物を投与すると細胞内で変異型 V2 受容体が活性化され、細胞膜にある受容体と同じような反応を惹起するため、症状の改善を促すと考えられている。つまり、細胞膜の透過性を考慮して薬物を開発することにより細胞内の GPCR を対象

とした新しい薬物治療が可能となるのである。

当研究室では、生体組織を破碎せず、そのままの状態に放射性ラベルされた薬物の結合を調べる薬物組織片結合実験法 (I Muramatsu, *J Pharmacol Sci*, 2005) を開発し、ムスカリン受容体の解析を行った。その結果、大脳皮質・海馬において、疎水性で細胞膜を通過できるムスカリン受容体アンタゴニスト QNB と比較して、親水性であり細胞膜を通過できない NMS の薬物結合量が有意に低い値を示すことを発見した。このことはこれら組織において、細胞表面と共に細胞内にもムスカリン受容体が存在することを示している。

大脳皮質・海馬では5つあるムスカリン受容体サブタイプのうち、M1 サブタイプが特に多く発現しており、記憶や学習といった高次脳機能に深く関わることが知られている。これまで、脳に発現しているムスカリン受容体をターゲットとしてアルツハイマー病や統合失調症の治療を目指す試みが行われてきたが失敗に終わっている。しかし、これらの研究は細胞膜上のムスカリン受容体のみを想定して進められてきたものである。我々は細胞内のムスカリン受容体が新たな創薬のターゲットとなる可能性を探る為に、生体組織における細胞内ムスカリン受容体の実態を明らかにすると共に、ニューロン初代培養系を用いて細胞内ムスカリン受容体の in vitro における機能性の評価を行った。

研究の内容および成果

成体ラットの各組織からのサンプルに対し、細胞膜透過性ムスカリン受容体リガンド QNB と非透過性 NMS の結合量の差を組織片薬物結合実験で調べたところ、細胞内ムスカリン受容体は大脳

皮質や海馬、線条体において確認できたが、その他の末梢組織では確認できなかった。このことから高次脳機能特異的な細胞内ムスカリン受容体の寄与が示唆された。また、これら細胞内ムスカリ

ン受容体は M1 サブタイプ選択的なアンタゴニストである pirenzepine と結合することから、細胞内 M1 受容体は M1 サブタイプから構成されていることが明らかとなった。このことは M1 遺伝子をノックアウトしたマウスでは細胞内ムスカリン受容体が確認できなくなったことから確認された。更にラットの大脳皮質・海馬からの初代培養ニューロンを M1 受容体特異的な抗体で免疫染色することにより、M1 受容体が細胞内のゴルジ体に特に局在することを明らかにした (図 1)。また、神経芽細胞種である N1E-115 細胞にムスカリン受容体サブタイプを一過的に発現させたところ、M1 サブタイプではゴルジ体への局在が観察されたものの、M2、M3 サブタイプでは細胞膜が主で、細胞内での局在はほとんど見られなかった。このことは M1 受容体タンパク質の配列中にゴルジ体局在に機能する配列が存在する可能性を示唆している。現在、このゴルジ局在性配列の同定を進めており、最終的には、その配列を変異させた M1 受容体遺伝子を作製し、M1 ノックアウトマウスに導入することで、細胞内 M1 受容体の高次機能における役割の解析が可能になると期待される。

次に、初代培養ニューロンを用いた細胞内 M1 受容体の in vitro 機能解析実験を、細胞膜 M1 受容

体をペプチド性 M1 拮抗薬 MT-7 により特異的に阻害することで行った。ムスカリン受容体のアゴニストである carbachol で大脳皮質・海馬の初代培養ニューロンを刺激すると M1 受容体を介して、PLC β の活性化に伴うフォスファチジルイノシトール (PI) の加水分解、及び MAP キナーゼ系の Extracellular Signal regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) の活性化が確認された。興味深いことに MT7 で細胞膜上の M1 受容体のみを阻害すると、PI 加水分解は阻害されたものの、ERK1/2 の活性化については阻害されなかった。このことは、大脳皮質・海馬ニューロンにおいては、細胞内の M1 受容体特異的に ERK1/2 の活性化が起こることを示している。ERK1/2 はニューロンの生存維持と共に Long Term Potentiation (LTP) といった神経活動の増強にも寄与している。ERK1/2 の活性化に応じた LTP 増強を仲介する因子として EGR-1 が知られているが、細胞内 M1 刺激によって ERK1/2 の活性化に伴った EGR-1 の発現上昇も確認された。以上のように、ムスカリン M1 受容体は細胞膜と細胞内という局在の違いと共に機能的にも使い分けられていることが明らかとなり、細胞内ムスカリン受容体が新たな創薬ターゲットとなる可能性が示された (図 2)。

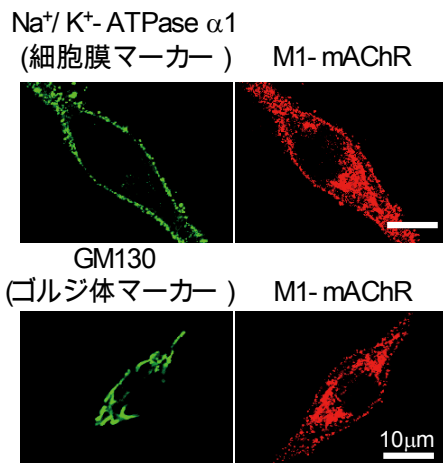


図 1. ラット海馬初代培養ニューロンの M1 特異的抗体による免疫染色像

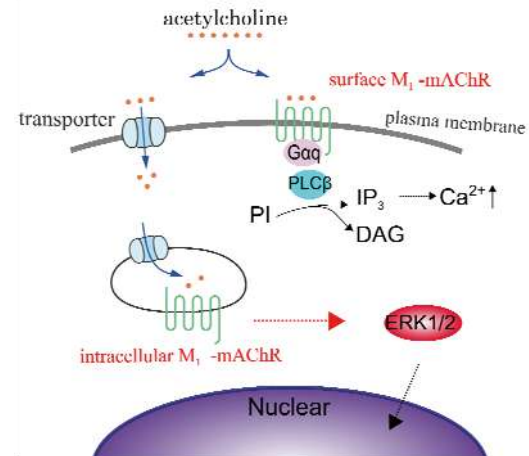


図 2. 細胞表面と細胞内のムスカリン受容体を介したシグナリング経路

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

発表論文:

Uwada J. et al. "Intracellular distribution of functional M1-muscarinic acetylcholine receptors in N1E-115 neuroblastoma cells." *Journal of Neurochemistry*. 118:958-967; 2011.

学会発表:

第 119 回日本薬理学会近畿部会・口頭発表・名古屋・2011 年

第 85 回日本薬理学会年会・ポスター発表・2012 年、京都

競争的資金・研究助成への申請・獲得状況:

日本学術振興会・学術研究助成基金助成金・若手研究(B)・申請予定

平成 23 年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 脳特異的新規 SUMO 化基質としてのスカッフオールドタンパク質 GISP と SUMO 化の神経活動依存性について

研究代表者：西宗 敦史（医学部・学内講師）

共同研究者：村松 郁延（医学部・教授）

概 要	我々は GPCR 型受容体の制御機構の研究を通して、GISP (G-protein coupled receptor interacting scaffolding protein) を見出した。GISP はタンパク質間相互作用に関する coiled-coil 構造を豊富に含んでおり、様々なタンパク質と結合してその機能を発揮すると考えられたため、結合タンパク質の探索を行ってきた。意外なことに、GISP は唯一のタンパク質 SUMO 化 E2 酵素である Ubc9 と結合することが分かった。本研究では Ubc9 との結合が生体内で起こっているか、GISP は SUMO 化修飾の基質であるか、基質であれば、SUMO 化はシナプス活動に依存するのかについて解析を行った。その結果 GISP はシナプスに存在する新規 SUMO 化基質であり、興奮性シナプス伝達に依存して、SUMO 化が調節されていることを明らかとなった。
関連キーワード	SUMO、G タンパク質共役型受容体、Ubc9 (SUMO 化 E2 酵素)、GISP (G-protein coupled receptor interacting scaffolding protein)、NMDA 受容体

研究の背景および目的

研究の背景: G タンパク質共役型受容体 (GPCRs) は、主要な薬物標的分子群であり、病因論上及び治療戦略上きわめて重要な分子標的である。これらの受容体の活性、薬理学的特性は、受容体タンパク質自身によって規定されている内因性の性質と受容体結合タンパク質などによって規定される外因性の環境の両方によって規定されており、特に後者は受容体の phenotype pharmacology (表現型薬理学) を支配する要因として注目を集めている。

GISP (GPCRs interacting scaffolding protein) は、我々が発見した、種々の GPCRs と結合し、脳特異的に発現しているシナプス後膜に濃縮したタンパク質である。GISP は、タンパク質間相互作用を媒介する coiled-coil 構造に富み、多くの異なるタンパク質と結合する足場 (スカッフオールド) タンパクとして機能していると考えられている。また GISP は GPCRs 等の膜タンパク質のリソソーム依存性分解を抑制する機能を持ち、受容体量調節

機構として機能している。

タンパク質 SUMO 化は、ユビキチンに類似したタンパク質 SUMO が基質タンパク質の特異的なリジン残基に可逆的に結合する翻訳後修飾で、我々はこの翻訳後修飾がシナプスで起こっており受容体の活性調節に不可欠の役割を果たしていることを世界に先駆けて示してきた。また我々を含む複数の研究グループから神経細胞での SUMO 化修飾の神経活動依存性が報告されている。

研究の目的: 本研究に先立ち、GISP に結合するタンパク質のスクリーニングを行い、様々なシグナル伝達関連の結合タンパク質の中に SUMO 化 E2 酵素 Ubc9 を見出していた。このことから、受容体制御に関する 2 つのシステム GISP-ESCRT 系と SUMO 修飾系が GISP の SUMO 化を介して関連している可能性が示唆された。従って本研究では、GISP が新規 SUMO 化基質である可能性と、その神経活動依存性について検討をおこなった。

研究の内容および成果

まず Ubc9 が新規 GISP 結合タンパク質である可能性に基づき、ラット脳の細胞質画分から抗 Ubc9 抗体を用いて免疫沈降を行い、GISP の免疫共沈を検出し、実際に生体内で GISP と Ubc9 が結合していることを確認した。また GISP 上の Ubc9 結合部位のマッピングを行ったところ、一次構造上不連続の 3 つの領域 (1-102、320-445、654-800) に Ubc9 の結合が見られた。

これらの結果から、GISP が生体内で SUMO 化修飾の基質となっている可能性が考えられた。また、これらの領域がそれぞれ独立した SUMO 化部

まず上記の 3 つの Ubc9 結合領域を含む領域をそれぞれ GST 融合タンパクとして発現させ、実際に SUMO 化を受けるか否かを解析した。3 つの領域は全て実際に SUMO 化を受けた (Fig2 下)。

初代培養海馬神経細胞は NMDA 型グルタミン酸受容体の内因性コアゴニストのグリシンによる刺激でシナプス伝達を活性化させ、シナプス伝達の長期増強に類似の可塑的な活動上昇を引き起こすことができる (Chem-LTP)。本法を適用して刺激の前後で GISP と Ubc9 及び SUMO1 の共局在を蛍光免疫染色法で解析したところ、GISP と

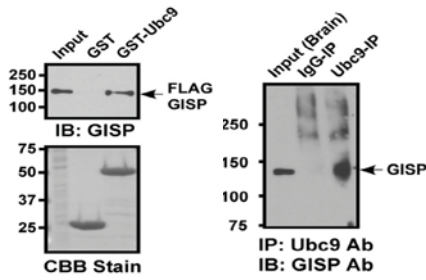


Fig.1. GISPとUbc9の結: *In vitro*の結合(左)、脳の可溶性画分からの免疫共沈(右)

SUMO1およびGISPとUbc9のいずれの局在も上昇することが示された (Fig3)。以上から、GISPのSUMO化の少なくとも一部はNMDA受容体を介する興奮性シナプス伝達による調節を受けていることが示唆された。

以上の結果から、未だに不明な点が多く残されている神経タンパク質のSUMO化基質として、新たにGISPを同定でき、今後の受容体修飾機構の研究の基盤となる成果が得られた。

GISPは分子内に多くのcoiled-coil構造を持ち実際に今回同定されたSUMO化部位のうちGISPΔ7(654-800)領域はリソソーム依存性膜タンパク分解機構(ESCRT complex)のサブユニットであるTsg101の結合部位でもある。従ってこの部位のSUMO化によってGISP-Tsg101間の結合が影響を受ける可能性が示唆された。今後の課題として、GISPはSUMO化によりTsg-101との結合を失い、結果として膜タンパク質の分解が促進方向へ向かうことを作業仮説として研究を進めたい。

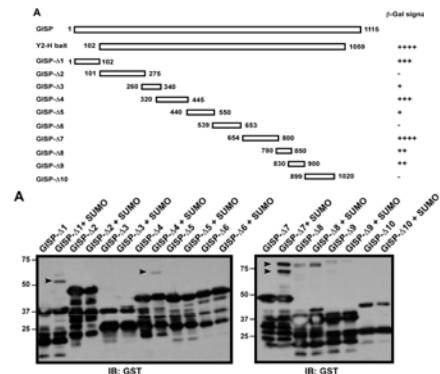


Fig.2. GISP上のSUMO化E2酵素Ubc9の結合部位(上)と、SUMO化部位(下)の解析

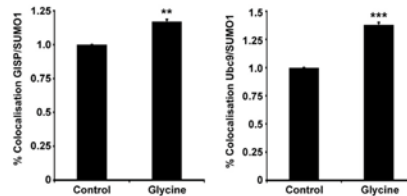


Fig.3. 海馬初代培養神経細胞におけるNMDA受容体のグリシン刺激によるGISPとSUMO1、GISPとUbc9の共局在の亢進

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

「主な発表論文等」

1. Nishimune A, Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman AS, Umada H, Muramatsu I. Phenotype pharmacology of lower urinary tract α(1)-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 2012; 165:1226-34.
2. Kantamneni S, Wilkinson KA, Jaafari N, Ashikaga E, Rocca D, Rubin P, Jacobs SC, Nishimune A, Henley JM. Activity-dependent SUMOylation of the brain-specific scaffolding protein GISP. *Biochem Biophys Res Commun.* 409:657-62. 2012.
3. Ikeda T, Anisuzzaman AS, Yoshiki H, Sasaki M, Koshiji T, Uwada J, Nishimune A, Itoh H, Muramatsu I. Regional quantification of muscarinic acetylcholine receptors and β-adrenoceptors in human airways. *Br J Pharmacol.* in press
4. Md Anisuzzaman AS, Nishimune A, Yoshiki H, Uwada J, Muramatsu I. Influence of tissue

integrity on pharmacological phenotypes of muscarinic acetylcholine receptors in the rat cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* 339:186-93. 2011.

5. Uwada J, Anisuzzaman AS, Nishimune A, Yoshiki H, Muramatsu I. Intracellular distribution of functional M(1) -muscarinic acetylcholine receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 118:958-67. 2011.

6. Wang MH, Yoshiki H, Anisuzzaman AS, Uwada J, Nishimune A, Lee KS, Taniguchi T, Muramatsu I. Re-evaluation of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain by a tissue-segment binding assay. *Front Pharmacol.* 2:65. 2011

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
G タンパク質共役型受容体の新規調節因子 CRELD1 の生体内機能の解明 平成 24 年度科学研究費 基盤 (C) 一般 採択

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 退院後に統合失調症患者を自宅で介護している親の 介護負担感の影響要因

研究代表者：川口 めぐみ（医学部・助教）

概 要	本研究では、退院から1年未満の統合失調症患者を介護している親の介護負担感に影響する要因を明らかにするために、患者を介護している親78名を対象に無記名自記式の質問紙調査を実施した。その結果、退院後1年未満の患者を介護している親の介護負担感に影響する要因は、親の対処技能の下位尺度である「あきらめ」と「回避」、子の社会生活技能合計得点であり、3要因で親の介護負担感に54.5%寄与していた。このことから、親の介護負担感を軽減するための看護援助を検討し、子の入院中における親の面会時や退院後の外来受診時を利用して親と個別に関わる機会を持ち、親の対処技能をアセスメントし、看護援助を実施すること、および、子の入院中から退院後を予測した日常生活援助や看護師が他職種と連携し援助を提供すること、居宅・通所サービス利用促進の必要性が示唆された。
関連キーワード	退院後、統合失調症患者、親、介護負担感

研究の背景および目的

わが国では、2004年の精神保健医療福祉の改革ビジョンの基本理念に基づき、脱施設化への取り組みが始められた。また、2006年の障害者自立支援法の施行により、地域での生活を支えるための社会資源の充実が図られた。

しかし、精神障害をもつ患者は症状の特徴による病識の乏しさや人間関係の未熟さから、患者自身が社会資源の利用に抵抗感を示す事が多いといわれている（殿村ら,2009）。また、精神障害をもつ患者の家族は、自分の家族員が精神疾患を抱えていることを受容することへの葛藤、世間の精神障害をもつ患者に対する偏見から、社会資源の利用を躊躇する傾向にあるといわれている（眞崎ら,2007）。

精神障害をもつ患者の中でも統合失調症患者は、好発年齢が10代後半から20代前半であることや、再発と寛解を繰り返し慢性的な経過を辿る（川野,1997）ことから長期にわたる介護を必要とすることが知られている（酒井ら,2002）。また、地域で生活する精神障害をもつ患者の65%以上が退院

後自宅で親と同居し、親の介護を受けている（厚生労働省,2008）。これらのことから、統合失調症患者の地域での生活を支えているのは、いまだに親の力が大きいと考えられる。

しかし親は、自責感、無力感、孤立無援感、重荷感等の介護による負担を感じている（岩崎,1998）。また親は、患者との接触時間が増えることで、患者に対する「敵意」、「批判的」、「情緒的巻きこまれすぎ」の対応を生むことが報告されており、この親の対応は患者の再発に関連があることが示唆されている（伊藤ら,1992）。実際に家族と同居する統合失調症患者の退院1年後の再発率の調査では、薬物療法を継続している統合失調症患者であっても38%であった（Falloonら,1990）。

そのため、統合失調症患者が自宅での生活を送るためには、患者の退院後1年未満の親の介護負担感に影響する要因を明らかにし、患者の入院中から退院後を通して、親の介護負担感を軽減するための看護援助を実施していく必要があると考えた。

研究の内容および成果

「研究方法」

1. 対象者

A 県内8病院を受診している統合失調症患者の外来受診に同伴している親および精神保健福祉家族会連合会全7家族会に所属する親のうち、退院後1年未満の患者と同居し、介護を行っている親78名

2. 方法

無記名自記式の質問紙調査。質問紙等の配布は、病院については調査者または外来担当看護師が、家族会については各家族会会長が実施した。回収は、郵送にて実施した。

3. 調査期間

2011年7月13日～11月末日

4. 調査内容

1) 親について

年齢、性別、親がどのように子の介護状況に対処しているかという親の対処技能について、子の病気や子への対処方法について情報を得る等の「情報」、子を回避する「回避」など7つの下位尺度を含む半澤らのFamily Coping Questionnaire 23項目、親が子を介護することで被る介護負担感について、経済的な困難等の「一般的な社会機能」、子が発病したことへの罪悪感等の「義務感」、子

の将来への心配等の「義務感」など 5 つの下位尺度を含む Reinhard らの Burden Assessment Scale 19 項目、副介護者の有無、相談者の有無（相談相手）、介護時間。

2) 子について

年齢、性別、子が社会生活を送る上での生活技能である社会生活技能について、社会資源の利用、コミュニケーションスキル、身だしなみへの配慮、生活環境の整備の 4 つの下位概念を含む、國方らの社会生活技能尺度 12 項目、罹患期間、直近の退院からの期間、入院回数、服薬援助の必要性の有無、精神保健医療福祉サービス利用の有無（内容）。

5. 分析方法

親の介護負担感との関連を明らかにするため、質的な変数については t 検定、量的な変数については Spearman の順位相関係数を算出した。また、親の介護負担感の影響要因を明らかにするため、重回帰分析（ステップワイズ法）を実施し有意水準 5%未満とした。

6. 倫理的配慮

本研究は、本学および各施設の倫理審査委員会の承認を受けた後に実施した。家族会会長、病院長、看護部長に研究目的、方法、個人情報保護等について文書と口頭で説明を実施し、承認を得た。また、各家族会会長および各病院の外來担当医に対象者の選定および文書と口頭による研究概要の説明を依頼した。研究参加の意向を示された方のみに、各家族会会長、調査者または外來担当看護師が研究目的、方法、個人情報保護等について文書と口頭にて説明を実施した。

「結果」

質問紙を配布した 78 名のうち 49 名（回収率 62.8%）から回答が得られ、5 名の欠損回答を除外した 44 名が分析対象であった（有効回答率 56.4%）。

対象者は、平均年齢 63.2±9.3 歳、男性 13 名、女性 31 名、1 日あたりの介護時間は 11.4±8.1 時間であった。また、介護負担感は 44.8±11.4 点、対処技能は 65.9±7.1 点であった。子の平均年齢は、33.8±8.8 歳、男性 20 名、女性 24 名であった。77.3%の対象者が利用しているサービスがあると回答したが、利用サービスの内容は「自立支援医療」「精神障害者保健福祉手帳」等の福祉サービスが約 8 割であるのに対し、「訪問看護」「デイケア」等の居宅・通所型のサービスは約 2 割であった。社会生活技能は 29.7±6.1 点であった。

介護負担感は親の対処技能の合計得点、親の対処技能の下位尺度である「情報」、「威圧」、「回避」、「あきらめ」、子の社会生活技能の合計得点と有意

な負の単相関が認められた。また、重回帰分析では、親の介護負担感と親の対処技能の「回避」（ $\beta = -0.329$ ）「あきらめ」（ $\beta = -0.336$ ）、子の社会生活技能の合計得点（ $\beta = -0.319$ ）に有意な関連が認められ（重相関係数 0.738）、寄与率 54.5%であった。

「考察」

親が子を避ける「回避」の対処および、子の病状や介護状況を改善するエネルギーはないという「あきらめ」の思いを持つこと、子の社会生活技能の低さは親の介護負担感を高めていた。

これらのことから、精神科看護師は、子の入院中から親の面会時等を利用して親と個別に関わり、対処技能をアセスメントすることが重要である。そして、対処技能を高めるための看護援助を検討し、必要な看護援助を提供することである。また、親が「あきらめ」の気持ちや「回避」の対処をする前に医師およびソーシャルワーカー等の他職種と連携し関わること、また、子に対して居宅・通所型サービスを導入し、親が子の介護から離れる時間を持つよう援助することが必要である。

さらに看護師は、子の入院中から退院後の生活を予測した上で社会生活技能向上への援助を検討・実施することが重要である。まず、看護師は社会生活技能について、個々の症状に合わせ、環境整備、食事等の機会を利用し、援助目標を定め、継続的に援助していくことが必要であるとする。

また、子が退院を控えた時期には、生活技能向上を目的としたデイケアや地域活動支援センター等のサービス利用を促進することが必要になる。例えば、看護師はソーシャルワーカーと協力し、親および子と施設関係者との調整役となり、彼らが信頼関係を築くことができるよう援助することが必要である。

「本研究の限界と課題」

調査時点で本研究の条件に該当する対象は、126 名であったが、質問紙の配布時点で調査への同意が得られなかった親 22 名、主治医の判断で対象者とならなかった親 26 名があり、全対象者の 38.1% が本調査対象者となることができなかった。統合失調症患者を介護する親の介護負担感という負の感情を扱い、かつ退院後 1 年未満という病状が安定しにくい時期の調査であったことが、理由として考えられる。

今後の課題としては、今回検討した、親の介護負担感を軽減するための看護援助が実際に親の介護負担感を軽減するかを明らかにすること、親の介護負担感に影響する 3 要因に影響を与える因子についても検討する必要がある。（引用文献省略）

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

「主な発表論文等」

第 38 回日本看護研究学会学術集会で発表予定

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費助成事業・若手研究

(B)・平成 24 年度～平成 27 年度・統合失調症患者を自宅で介護している親の介護負担感軽減のための看護支援プログラムの構築・代表・申請中

平成 23 年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 腎臓領域におけるレドックス制御機構の解明と臨床展開

研究代表者： 糟野 健司 (医学部・助教)

共同研究者： 木村 秀樹 (医学部・准教授)、高橋 直生 (医学部・助教)

概要	急性腎障害 (AKI) の死亡率は 50 年前と同様に 50%を上回り、生命予後不良である。予後不良の一原因として早期診断法の欠落により治療開始時期の遅れが指摘されている。AKI の発症には酸化ストレスが重要な基盤病態と考えられているが、現時点で酸化ストレスに特異的な診断法は確立されていない。そこで本研究では平成 22 年度挑戦的萌芽研究採択課題で発見した急性腎障害での超早期の尿中 TRX の特異的上昇という生体レドックス反応を応用発展させ、酸化ストレスに特異的でリアルタイムに動き、簡便でベッドサイドで利用可能な新規の迅速レドックス診断法を開発し、AKI の早期診断のためのツール開発を目的とし研究を行った。
関連キーワード	急性腎障害、酸化ストレス、迅速診断法、レドックス、チオレドキシニン、尿検体

研究の背景および目的

急性腎障害 (AKI) の診断法・病態解明・治療の研究はまだ緒についたばかりである。予後改善のためには早期診断が不可欠とされており、古典的なクレアチニンに代わる早期マーカーとして尿中 NGAL などが提唱されている。AKI は酸化ストレス、虚血、感染症、薬剤性など様々な病態により引き起こされるが、中でも酸化ストレスは重要な基盤病態の一つと考えられている。しかし、現時点で病因特異的な AKI 診断法は確立されていない。

本研究は、平成 22 年度に挑戦的萌芽研究で採択された「新規尿検査としての尿中エキソゾーム分画中腎症マーカー蛋白の検出」の研究過程で発見した「AKI における酸化ストレス制御因子チオレドキシニン (TRX) の尿中増加」という現象を進展させる

ものである。チオレドキシニン (TRX) は酸化ストレスによって誘導され、細胞外に分泌されるレドックス制御タンパクで、血中 TRX は虚血性心疾患などで高値を示すことが知られているが、尿中 TRX については報告がない。

今回の研究では、①尿中 TRX の上昇が酸化ストレスに特異的に反応したのかどうかを再確認し、②臨床現場で早期治療開始を可能にするための迅速診断法開発に必要な基礎技術の確立を目標とした。これらの研究により、AKI の詳細な病因診断が可能となり、病態に即した病因別 AKI 治療が早期に開始出来るようになり、AKI の予後改善に寄与することが期待される。

研究の内容および成果

① 尿中 TRX の酸化ストレス特異性の検証

尿中 TRX に関する報告がほとんど無いため、尿中 TRX を様々な 8 腎疾患で測定した。尿中 TRX は AKI で特異的に上昇しており、カットオフ値を 35.2 ng/mgCr とした場合、感度 0.9、特異度 0.82、AUC 0.9 の高精度で AKI の診断に有用であることが判明した。尿中 TRX が早期 AKI マーカーとして利用可能かどうかを調べるために、人工心肺開始後、1 時間毎に採尿をして尿中 TRX の推移を調べた。尿中 TRX は早期 AKI マーカーの代表である尿中 NGAL とほぼ同時に 2 時間で上昇した (図 1)。これに対し、現在、診断基準に用いられている血清クレアチニン

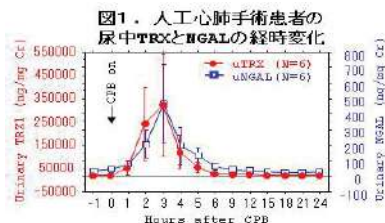


図 1. 人工心肺手術患者の尿中 TRX と NGAL の経時変化

細管の程度と有意な相関を認めた。さらにマウスの腎での InSitu hybridization やリコンビナントヒト TRX を静注したマウス腎をヒト TRX 特異的モノクローナル抗体で免疫染色することにより尿中 TRX の由来を調べた。定常時には腎尿細管局所で TRX が産生され、さらに血中からも TRX が糸球体でろ過され、尿細管で再吸収され、尿細管細胞内に蓄えられることを確認した。AKI での尿中 TRX 増加機序を調べるため虚血再還流後のマウス腎を継時的に免疫染色で観察した。染色結果から定常時に蓄えられた TRX が AKI の酸化ストレスにより尿細管細胞から尿中に逸脱し、さらに尿細管障害で再吸収出来ないため尿中に検出されることが示唆された。さらに酸化ストレス特異性を観察するために培養ヒト尿細管細胞に過酸化水素水やリポポリサッカライド (LPS) を

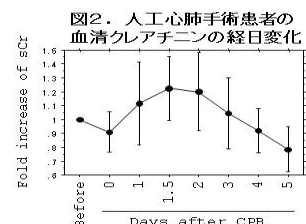
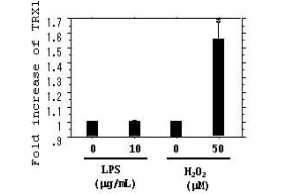
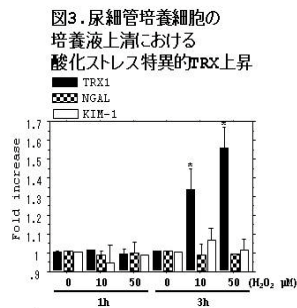


図 2. 人工心肺手術患者の血清クレアチニンの経日変化

添加し、培養上清中の TRX や既存の AKI マーカー、NGAL、KIM-1 を調べた。TRX のみが過酸化水素水の濃度依存性に特異的に上昇を示した。



TRX の上昇は過酸化水素水のみで認められ LPS では認めなかった (図 3)。

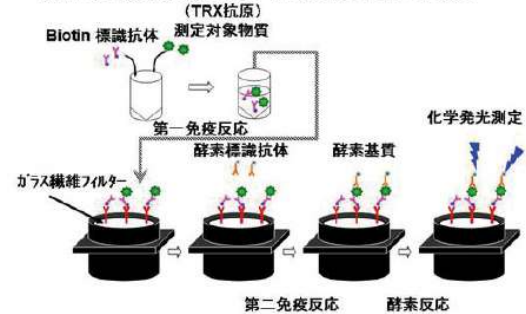
(Am J Physiol 投稿中)

② 尿中 TRX の迅速測定法 (化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA)) の開発

①の結果から尿中 TRX は他の AKI マーカーに比べ超早期に酸化ストレス特異的に上昇することが示

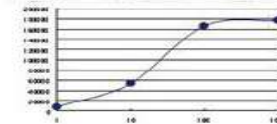
唆された。これら尿中 TRX の特徴を生かすため、迅速診断法の開発に取り組んだ。アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗 TRX 抗体とビオチン標識抗 TRX 抗体を用いたサンドイッチアッセイによって固相フィルター上に TRX 抗原をトラップし、そ

図4. 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) 診断システムの概要



の後 ALP の基質である発光基質を固相フィルターに添加することによって得られる発光シグナルを光電子増倍管 (PMT) を用いて検出を試みた (図 4)。従来の ELISA 法では 8 時間程度であったアッセイ時間が本測定法では 10 分程度で測定が完了した。リコンビナント TRX 段階希釈液をサンプルとして良好な検量線を得ることが出来た (図 5)。

図5. CLEIA法によるTRX検量線



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

「主な発表論文等」

<論文発表>

Kasuno et al. Urinary thioredoxin 1 is an oxidative stress-specific biomarker of acute kidney injury. Am J Physiol in submission.

<学会発表>

Kasuno et al. Urinary thioredoxin is a predictive biomarker of acute kidney injury. Poster presentation in Annual Meeting of International Society of Nephrology 2011.

Kasuno et al. Urinary thioredoxin 1 is an oxidative stress-specific biomarker of acute kidney injury. Poster presentation in Annual Meeting of American Society of Nephrology 2011.

Kasuno et al. Urinary thioredoxin is an oxidative stress associated biomarker of acute kidney injury. Poster presentation in Annual Meeting of International Congress on Uremia Research and Toxicity 2011.

糟野健司ら 「レドックス制御蛋白「尿中チオレドキシ」の酸化ストレス特異的急性腎障害 (AKI) マーカーとしての有用性」平成 23 年度日本腎臓学会学術総会 口頭発表

糟野健司ら

「急性腎障害 (AKI) の病因別診断に尿中チオレドキシが有用である」平成 23 年度日本臨床検査医学会学術集会 口頭発表

「特記事項」

平成 23 年度日本腎臓学会学術総会優秀演題賞受賞 国内特許、国際特許出願準備中

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金 基盤研究 (C) (H24~H26)

レドックス生体応答反応を利用した新規のベッドサイド迅速酸化ストレス診断法の開発 研究代表者 申請中

平成 24 年度 福井大学研究育成経費 東日本大震災からの復興に関連する調査・研究の支援

研究代表者 申請予定

科学研究費補助金 基盤研究 (B) (H23~H25) 酸化ストレスに対する新規のレドックス診断法の開発 (代表 中村肇) 分担 H23 年度 960 万円

平成 23 年度 福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センターTR センター公募採択型研究助成 急性腎障害に対する酸化ストレス特異的迅速レドックス診断法の開発についての研究 研究代表者 15 万円

平成 23 年度 福井大学 FS 可能性試験助成経費急性腎障害に対する酸化ストレス特異的迅速レドックス診断法の開発についての研究

研究代表者 50 万円

平成 23 年度 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進捗が期待できる研究の支援」腎臓領域におけるレドックス制御機構の解明と臨床展開 研究代表者 90 万円

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 マウス大脳皮質長連合線維の選択的標識と特異的プロモータの同定

研究代表者：岡 雄一郎（医学系研究科附属子どもの発達研究センター・特命講師）

共同研究者：佐藤 真（医学部・教授）

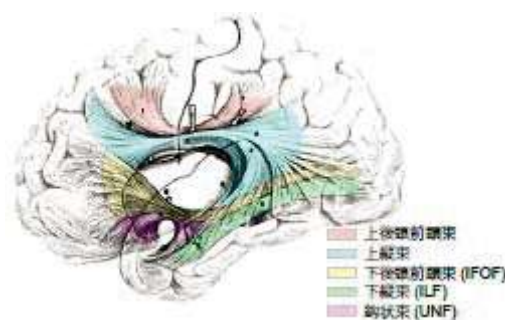
猪口 徳一（生命科学複合研究教育センター・特命助教）

概 要
<p>大脳皮質の長連合線維は、異なる頭葉間を結ぶ神経連絡で、高次の情報処理に関わるとされており、近年では、その異常と自閉症との関連も報告されてきている。しかし、長連合線維の詳細な回路構造や形成機構は未解明である。本研究は、マウスをモデルとして長連合線維の回路構造と形成機構を細胞レベルで解析することを目的とする。本年度は解析のツールとなる長連合線維を選択的に標識できるプロモータの同定すべく、長連合ニューロン特異的遺伝子の同定を行った。大脳皮質一次運動野に逆行性トレーサーを注入し、一次体性感覚野で標識された長連合ニューロンをレーザーマイクロダイセクションで回収し、遺伝子発現プロファイルのDNA マイクロアレイ解析を行った。得られた候補遺伝子について <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションによる発現パターンの解析を行った。</p>
<p>関連キーワード 大脳皮質長連合線維、軸索投射、神経回路形成、マイクロアレイ、自閉症</p>

研究の背景および目的

大脳皮質はいくつもの領野に分かれており、それぞれ特定の情報を処理しているが、異なる領野間を接続する連合線維は各領野で処理した情報の統合に関わっていると考えられている。そのうち長連合線維は、異なる頭葉に存在する離れた領野を結ぶ神経線維であり、異なる感覚情報の統合や意思による運動の制御などの高次脳機能の基盤と考えられる。例えばヒトにおいては、他人の顔の表情に現れる感情の認識への関与 (Philippi et al., 2009) や、自閉症スペクトラムや統合失調症などの疾患との関連も指摘されている (Shukla et al., 2011, Peters et al., 2010)。しかし、長連合線維を構成する長連合ニューロンの細胞レベルでの軸索投射の様式に関する現在の知見は非常に限られている。連合ニューロンはヒトを含む霊長類において大脳皮質6層構造の2/3層に分布しているが、げっ歯類では2/3層に加えて5層及び6b層にも存在する (Mitchell & Macklis, 2005)。これらの層には長連合ニューロン以外の神経細胞も存在するため、大脳皮質の特定の層への遺伝子導入によく利用される子宮内穿孔法では長連合ニューロンのみに選択的に外来性遺伝子を導入することはできない。したがって、長連合ニューロン特異的プロモータはその回路構造や機能の解析に必須であるが、現在のところまだ同定されていない。

長連合線維による情報処理機構を理解するためには、長連合ニューロンの詳細な接続様式を明らかにし、これらの細胞の神経活動を操作してその影響を解析することが重要である。そこで本研究では、将来的な神経活動の操作を視野に入れ、遺



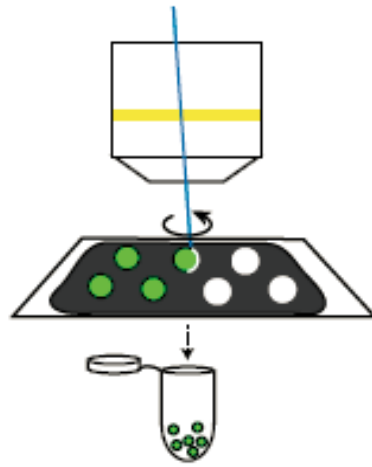
ヒト(成人)大脳における主な長連合線維の走行
Nieruwenhuys et al, *The Human Central Nervous System* (1998) より改変

伝学的手法が利用できるマウスをモデルとして長連合線維を選択的に標識する手法を確立し、その回路構造を明らかにする。(1) 逆行性トレーサー分子により長連合ニューロンを標識し、(2) 標識された長連合ニューロンを回収後、特異的に発現する遺伝子を探索・同定する。(3) この長連合ニューロン特異的遺伝子のプロモータを用いて細胞膜結合型GFPを発現させ、軸索伸長過程および最終的な軸索投射パターンを詳細に記述する。

本研究による長連合ニューロン特異的プロモータの単離後は、長連合細胞の神経活動を選択的に操作したマウスを用いた行動解析を通じ、連合記憶や随意運動制御などの高次脳機能において長連合線維回路が果たす役割を解析することにより、自閉症や統合失調症などの病態解明・治療法開発に道を拓く可能性がある。

研究の内容および成果

本研究では、長連合ニューロンに特異的なプロモータを同定するためのスクリーニングを行っている。まず、複数種類の細胞種が混在する大脳皮質から長連合ニューロンを選択的に集めるため、長連合ニューロンを含む大脳皮質一次体性感覚野(S1)の2/3層の神経細胞にエレクトロポレーション法により蛍光タンパク質 tdTomato を導入し、長連合線維の投射先を可視化した。長連合線維の投射が完了する生後21日目にその投射先領域である一次運動野(M1)に逆行性蛍光トレーサー分子を注入し、長連合ニューロンを標識した。長連合ニューロンは2/3層に加えて5層および6b層に分布していた(Mitchell & Macklis 2005の報告と合致)。次に、脳を摘出して新鮮凍結切片を作製し、蛍光トレーサーで標識された細胞をレーザーマイクロダイセクション法によって1細胞ずつ切り抜いて、各々約1000細胞ずつ集めた。同様に左右大脳半球を結ぶ交連ニューロン(2/3層と5層)も約1000個ずつ集めた。これら5つのサンプルからtotal RNAを調製し、NuGEN社のOvation Pico WTA SystemによりcDNAを増幅した。大脳皮質2/3層、5層、6b層のマーカーとして *cux1*、*ctip2* および *ctgf* の各遺伝子に対するRT-PCRを行い、各サンプルが適切に調製できていることを確認した。その後、これらの細胞集団における遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイ法によって比較した。アレイ上の35556種類の予測転写産物からコントロールなどを除いた7829遺伝子のうち、長連合ニューロンにより多く発現している遺伝子を各層から100種類ずつ選んだ。これら100遺伝子から、後にプロモータを利用することを念頭に、発現強度の高い遺伝子を2/3層から9種類、



レーザーマイクロダイセクション法。凍結切片上で蛍光標識された細胞をレーザーによって切り抜いた。

5層から8種類、および6b層から17種類をそれぞれ候補遺伝子とした。現在までに、これらの候補遺伝子のうち数種類について長連合ニューロンでの発現を、*in situ*ハイブリダイゼーションによって確認した。現在は、さらに*in situ*ハイブリダイゼーションによるスクリーニングを進めている。引き続き、蛍光トレーサー標識と*in situ*ハイブリダイゼーションを組み合わせた2重標識実験により長連合ニューロンに発現する遺伝子の絞り込みを行っていく。その後、得られた特異的遺伝子のプロモータを単離し、これを用いて長連合ニューロンとその軸索を選択的に標識する実験を開始する予定である。

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

「主な発表論文等」

Oka, Y. and Korsching, S. I. Shared and unique G alpha proteins in the zebrafish versus mammalian senses of taste and smell. *Chem. Senses* 36(4): 357-365. (2011)

Oka, Y., et al. Crypt neurons express a single V1R-related *ora* gene. *Chem. Senses* 37(3): 219-227. (2012)

「特記事項」

本研究課題は、以下の学会で発表を行った。
日本解剖学会第71回中部支部学術集会・平成23

年10月15日-16日・名古屋大学医学部・「ゼブラフィッシュ Crypt 細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子の同定」・口頭発表

日本解剖学会第117回全国学術集会以平成24年3月26-28日・山梨大学・「マイクロアレイ解析による大脳皮質長連合細胞特異的遺伝子の同定」・ポスター発表

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金・研究活動スタート支援・平成23-24年度・大脳皮質長連合線維の回路構造と形成機構の解析・代表・採択・2500千円

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」

反応性流体シミュレーションのための 炭化水素燃料簡略化反応モデルの構築

研究代表者： 酒井 康行（工学研究科・助教）

概 要	
	エンジン設計への利用を目指して、筒内燃焼の三次元数値流体力学 (3D-CFD) シミュレーションの技術開発が進められている。しかしながら、数千の中間化学種を含む複雑な炭化水素燃料の燃焼反応機構をモデル化して3D-CFDシミュレーションに組み込むと、解くべき反応方程式の数の多さにより、現実的な時間内にシミュレーションをすることが困難となる。本課題は、「炭化水素系燃料の複雑な反応過程の本質を明らかにし、単純化したモデルを構築する」という独自の化学的アプローチにより問題の解決を試みることを目的とした。エンジン上死点付近の温度・圧力雰囲気場での素反応経路解析結果から燃料の自着火に關与する数十の化学種と素反応を抽出し、3D-CFDに組み込み可能なサイズに簡略化された自着火反応モデルを構築し、モデルの妥当性を確認した。
関連キーワード	エンジン設計, 三次元数値流体力学シミュレーション, 化学反応モデル

研究の背景および目的

バイオエタノール・バイオディーゼル（脂肪酸メチルエステル）等の生物由来燃料の利用促進、オイルサンド・シェールガス等の化石燃料源の変化という状況から、自動車に使用される実燃料組成の変化が想定される。これまでの機械的側面のアプローチに加えて、燃料とその燃焼方法の組み合わせが新たな環境負荷低減技術のキーワードとなる。一例として、予混合圧縮着火 (HCCI: Homogeneous Charge Compression Ignition) 燃焼の実現は、着火性等の燃料の化学的性質の利用がポイントとなっている。

ー化学反応モデルに対する課題ー

新しい燃料と新しい燃焼制御手法の無数の組み合わせの中からの最適解導出、また、既存エンジンのNO_x, PM低減技術の開発といったようなエンジン燃焼設計に対し、燃料の「化学過程」とエンジン形状、混合気形成、シリンダ内流動のような「物理過程」の相互作用を明らかにすることが必要となる。そのための有効な一つの手段として、化学過程と物理過程をモデル化したシミュレーション技術の開発が進められている。一例として、三次元数値流体力学 (3D-CFD) シミュレーションの利用が挙げられるが、このような多次元・多領域のエンジン燃焼シミュレーションは、燃料の化学反応のモデル化がネックとなっている。その理由として、炭化水素燃料の燃焼のような複雑な反応系の詳細な化学反応機構はモデル化されているものの、膨大な数の化学種と素反応を含んだもの（詳細反応モデルと呼ばれている）であり、反応性流体計算に組み込む際に、化学種の数に比例して解くべき方程式の数が増加すること、*Stiffness*のために数値計算の時間刻みを小さくしなければならないこ

とが挙げられる。したがって多次元・多領域のエンジン燃焼シミュレーション実現のためには、燃焼の化学反応モデルの簡略化・*Stiffness*の解決が要求される。

ー簡略化に関する国内・国外の動向ー

DRG (Directed Relation Graph) 法¹, PCA (Principal Component Analysis) 法², CSP (Computational Singular Perturbation) 法³, ILDM (Intrinsic Low-Dimensional Manifold) 法⁴, RCCE (Rate-Controlled Constrained Equilibrium) 法^{5,6}などは、詳細反応モデルの簡略化や *Stiffness* 緩和に有効な方法であるが、大規模な反応機構を有する炭化水素系燃料に対する効果は未解決である。またいくつかの化学種、素反応をまとめて仮想的な反応を考えるランピング法⁷がある。しかしながらランピングされた反応の速度定数が燃料や反応条件に依存すること、推定方法論がないなどの問題点がある。本課題では、ランピング法による反応モデル簡略化の手法の確立と検証を目的とする。

[1] T. Lu, C. K. Law, Proc. Combust. Inst. 30 (2005) 1333-1341.

[2] S. Vajda, P. Valko, T. Turanyi, Int. J. Chem. Kinet. 17 (1985) 55-81.

[3] S. H. Lam, D. A. Goussis, Int. J. Chem. Kinet. 26 (1994) 461-486.

[4] U. Mass, S. B. Pope, Combust. Flame 88 (1992) 239-264.

[5] J. C. Keck, Prog. Energy Combust. Sci. 16 (1990) 125-154.

[6] Y. Shimizu, M. Koshi, Proceedings of the 47th Combustion Symposium in Japan (2009) 390-391.

[7] M. J. Pilling, Low-temperature combustion and autoignition, Chap. 4 (1997) Elsevier.

研究の内容および成果

数百化学種・数千反応を含むアルカンの詳細反応モデルの0次元シミュレーションの結果から、炭化水素燃料が反応開始から自着火に至るまでの複雑な素反応過程を整理した。炭化水素燃料の着火過程を、図1に示す低温酸化過程(LTO)と呼ばれる小さな発熱過程、それが停止する負の温度係数(NTC)領域、熱着火準備期間、熱着火の期間に区分したところ、下記(a)-(c)の知見が得られ、炭化水素燃料の着火過程をシンプルに記述することができる可能性が見出された。

- (a) 各期間を支配する反応群はわずか10反応程度
- (b) 燃料分子構造の特徴が現れるのはLTO, NTC期間
- (c) 熱着火準備期間、熱着火の反応は燃料に依らず共通

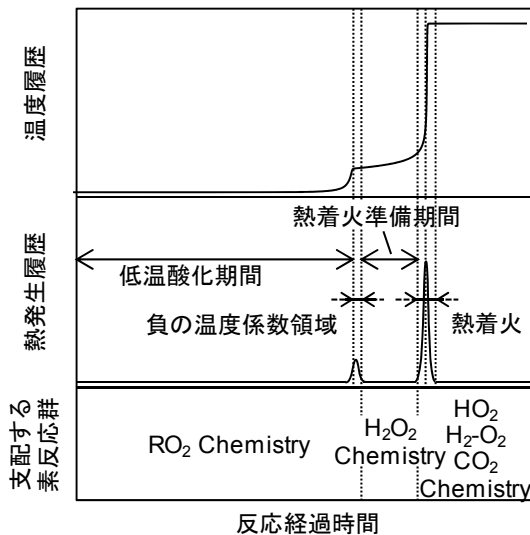


図1 炭化水素燃料の着火過程の整理

次に、詳細反応モデルから着火を支配する素反応群を抜き出し、さらにLTO, NTCに必要な素反応群に対しては異性体を一つの化学種にランピン

グすることにより1034化学種から25化学種に大幅に削減された簡略化反応モデルを構築した。図2は詳細モデルと簡略化モデルにより予測した各温度条件下において燃料が着火までに要する時間の比較である。詳細反応モデルは実験により検証済みのものである。化学反応モデルには、エンジン上死点近傍の温度領域(700-1000 K)で燃料の着火タイミングを正しく記述できることが要求される。本課題で構築した25化学種のモデルと1034化学種から構成されるモデルの予測値が要求される温度条件ではほぼ一致することがわかる。

以上の結果から、本課題の成果は以下の2点にまとめられる。

- ・エンジン設計用3D-CFDに組み込み可能なサイズのアルカン燃料の化学反応モデルを完成させた。
- ・簡略化モデル構築手法は様々な炭化水素燃料に適用できる可能性がある。

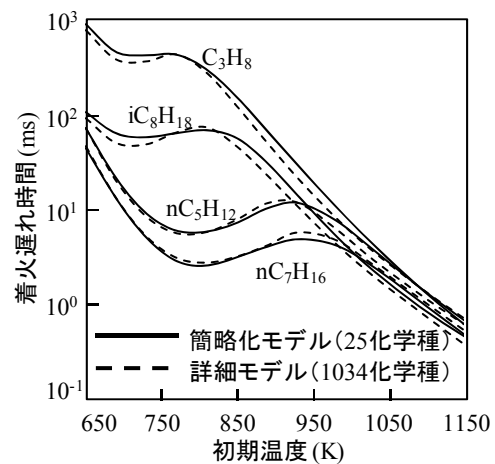


図2 簡略化モデルと詳細モデルによる着火遅れ時間の予測値の比較

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

「主な発表論文等」

学術論文2報

[1] 酒井 康行, 安東 弘光, 桑原 一成, "アルカン簡略化燃焼反応モデルの中間生成物反応パッケージ," 自動車技術会論文集 Vol.42, No.1 (2011) 213-218.

[2] Yasuyuki Sakai, Hiromitsu Ando, Kazunari Kuwahara, "Lumped Chemical Kinetic Model Based on the Detailed Analysis of Hydrocarbon Fuel Ignition," SAE Technical Paper (2011) 2011-01-1782.

その他, 学会発表3件

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

[1] 日本学術振興会・科学研究費助成事業・若手研究(A)・平成25年度(申請予定)

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 ナノファイバー基材を用いた極限微生物の培養技術の探索

研究代表者： 藤田 聡（工学研究科・准教授）

共同研究者： 末 信一郎（工学研究科・教授）、里村 武範（工学研究科・講師）

概 要	ナノファイバーを用いた培養基材を開発し、極限環境微生物の培養に成功した。超好熱菌は、通常の微生物と異なる化学システムを備えており、安定な酵素の供給源としても期待されている。しかし、これらの培養は高温で行われるため、通常のアガロースゲルを使用することはできず、固層培養による菌単離・スクリーニングが困難という課題がある。そこで本研究では、超好熱菌の長期培養に適した、高温で使用可能な足場材料として、エレクトロスピンニング法により作製したナノファイバー基材を用い、 <i>Sulfolobus solfataricus</i> の接着とコロニー化の挙動を調べた。その結果、酸素プラズマ処理により表面親水性を高めたポリウレタンナノファイバー上では、接着とコロニー形成がみられることを蛍光顕微鏡とSEMの観察により見出した。本結果は、極限環境微生物の培養において、合成高分子材料を使った固層培養というこれまでにない新たなアプローチの可能性をはじめて見出した。
関連キーワード	エレクトロスピンニング、ナノファイバー、超好熱菌、接着、足場材料

研究の背景および目的

超好熱菌は、100℃近くの高温で生育することのできる菌で、温泉などから単離されてきた。超好熱菌は、バクテリアや真核生物とは異なった代謝経路を有しており、極限環境、すなわち高温、高pHあるいは低pH、有機溶媒中等で安定な新規な酵素を見出されている。そのため、超好熱菌は生物学的な興味の対象としてだけでなく、産業上の応用の可能性を秘めていると期待されている。

超好熱菌の単離と培養には、一般的なバクテリアの培養に用いられる固体アガロースゲル培地ではなく、液体培地が用いられる。しかしながら、液体培地を用いてシングルコロニーを得ることは困難であるため、超好熱菌の単離は手間のかかるプロセスとなっている。固体培地が用いられない主な理由は、長期間の培養を要するためである。超好熱菌の増殖速度は遅く、高温下での培地の蒸

発を防ぎながら固体培地の体積を維持することは難しい。また、高温でアガロースゲルを調製することも難しい。こうした課題を解決すべく、固体ゲル培地に代わる培養基材が強く望まれている。しかし、培養基材の開発に向けては基材への接着やコロニー化に関しての知見が不足している。

本研究では、高温かつ低pHで活動する超好熱菌*Sulfolobus solfataricus*の培養に適した基材に関し、エレクトロスピンニング法を用いて作成したナノファイバーについて検討した。このプロセスは、基材を簡便かつ安価に作製でき、種々のポリマーにも適用でき、3次元構造も容易に作るができるため、哺乳類の細胞や医療デバイスなどの培養基材として広く使われている。極限環境微生物の培養において適用できれば、産業利用可能な新しい培養方法として期待できる。

研究の内容および成果

本研究においては、エレクトロスピンニング法により作製したナノファイバーの汎用性に着目し、超好熱菌*S. solfataricus*の培養に適用できるかどうか検討した。まず、哺乳類細胞で基材としてよく利用されているポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA; 75:25; Mw 20,000)を用いたところ、培養条件下(80℃, pH 3.0)では1週間で基材が分解されてしまった。そこで次に、ポリウレタン(PU; Mw

60,000)とポリスチレン(PS; Mw 20,000)について検討をおこなった。エレクトロスピンニングの条件をTable 1に示す。これらのポリマーは、十分な機械的強度を有しており、高温でも分解されないため、本目的には適していると考えた。ファイバーは基材の上に橋わたしするよう一方に配向させた(Scheme 1)。作成したファイバーは酸素プラズマ処理(100 W, 30 sec, <0.1 MPa)を施した。

作製したファイバーの直径を走査型電子顕微鏡(SEM)で測定した。ポリマー溶液15% PU, 20% PS, 30% PSで調製したナノファイバーの直径は、それぞれ 1.46 ± 0.70 , 1.83 ± 0.56 and $3.90 \pm 1.17 \mu\text{m}$ であった(Fig. 1)。

次に作製したナノファイバー基材上で*S. solfataricus*を所定の培養条件下(80℃, pH

Table 1
Polymer solutions and the condition of electrospinning.

#	Polymer	Solvent	Conc., w/v%	Voltage, kV	Infusion rate, mL/h	Collector rotation, rpm
1	PU	95% THF/ 5% DMF	15	25	0.8	1200
2	PS	THF	20	25	0.7	900
3	PS	THF	30	25	1.0	900

3.0) で培養した。培養 1 週間後の細胞の接着およびコロニー形成を、蛍光顕微鏡にて観察をおこなった。その結果、PS 基材上では細胞の接着が見られなかったが、PU 基材上では接着が見られた(Fig. 2)。

SEM の観察でも同様に、15% PU ナノファイバー基材上での接着およびコロニー形成が見られた(Fig. 3)。一方、直径が同じ程度の 20% PS ファイバー上へは接着およびコロニー形成はみられなかった。また PU ファイバーには細胞の接着は見られなかった。したがって、接着の違いは表面化学組成の違いに起因するものと考えた。動物細胞の培養では、ファイバーを培地中に浸漬した場合、

細胞接着より前にまずタンパク質が吸着し、その後吸着したタンパク質を介した細胞接着が起こることが知られているが、同様の現象が起きているものと考えられる。

以上まとめると、酸素プラズマ処理により親水性を向上させたエレクトロスピンニング法により作製した基材上では、超好熱菌の良好な接着とコロニー形成が見出された。これは、極限環境でも用いることのできる、細胞接着とコロニー形成に適した培養基材の開発に向けた第一歩となり、環境浄化や産業利用など極限環境微生物の応用につながるかと期待される。

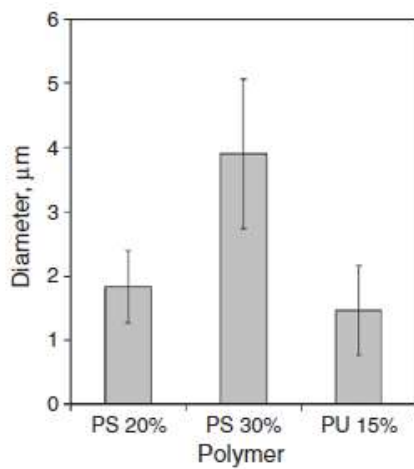


Fig. 1. Diameters of fabricated nanofibres. Means ± SD.

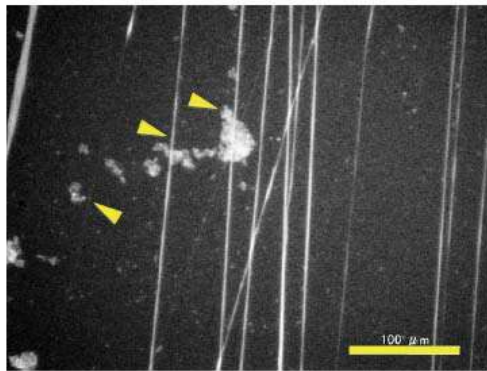
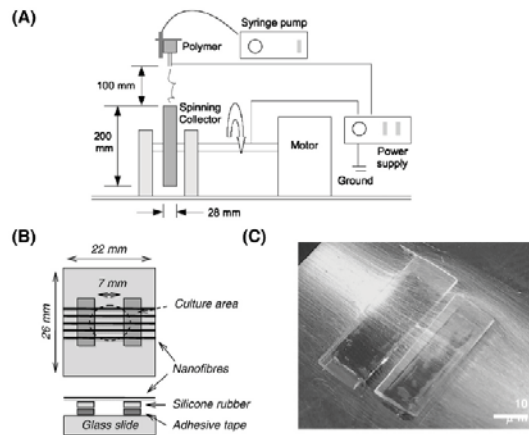


Fig. 2. Fluorescent microscopic observation of *S. solfataricus* which adhered and spread well onto the PU nanofibers after 1-week culture. Arrowheads indicate colonies. Cell nuclei were stained with Hoechst 33342. Fibres showed intrinsic fluorescence. Bar=100 μm.



Scheme 1 (A) Electrospinning setup. (B, C) 'Bridging' system.

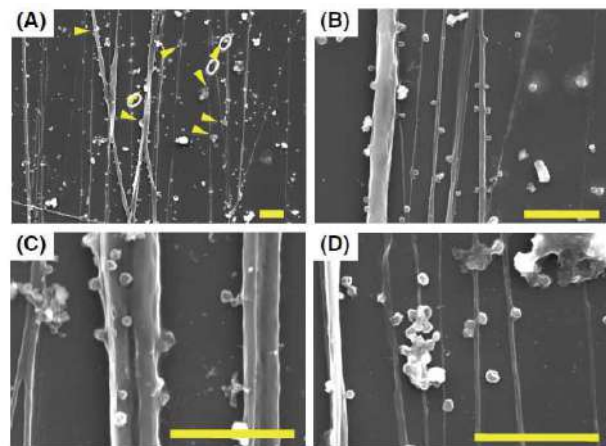


Fig. 3. SEM observation of *S. solfataricus* cultured on PU nanofibers for 1 week. (A) Low magnification image. Arrowheads indicate colonies. (B, C) High magnification images of a single cell attached on a thin (B) or thick (C) fibre. (D) High magnification image of a clump of proliferated cells. Bar=10 μm.

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

「主な発表論文等」

P.Hughes, S.Fujita*, T.Satomura, S.Suye, Hydrophilic-modified polyurethane nanofibre scaffolds for culture of hyperthermophiles. *Mater. Lett.* **72**, 88-91, 2012.
藤田聡, P.Hughes, 里村武範, 末信一朗, 超好熱

菌の固層培養を可能とする足場材料としてのナノファイバー、第 60 回高分子学会北陸支部研究発表会(金沢)、C25、2012.11.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
平成 24 年度 A-STEP (探索ステージ) 申請予定

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」

高耐久性金属複合化導電繊維の創出**—超臨界二酸化炭素を用いた金属複合化デポジションシステムの構築とその応用—**

研究代表者： 廣垣 和正（工学研究科・助教）

概要	繊維への新規な金属複合法として金属デポジションシステムの構築を検討した。ナイロン6繊維に超臨界二酸化炭素を媒体として有機金属錯体を注入し、その過程で錯体に熱や水素を作用させ還元分解した。錯体は繊維に注入されながら分解し、繊維内部および表面で錯体から遊離した金属が凝集して析出するため、繊維に金属が複合化される。布帛は金属複合化処理により ca. 10 wt% の重量増加が見られ、金属光沢のある黒色を呈した。体積抵抗率は未処理布の $>10^{15} \Omega \cdot \text{cm}$ に比べて $90.4 \Omega \cdot \text{cm}$ と大きく低下した。繊維表面近傍には ca. 200 nm の均一な金属堆積層が形成された。繊維表面から内部にかけて金属 Pd に加えナイロン由来の窒素元素が存在することから、金属堆積層が繊維へ複合化されていることが確認された。
関連キーワード	超臨界二酸化炭素、有機金属錯体、ナイロン6繊維、導電性繊維、金属複合化

研究の背景および目的

高度情報化社会を迎えるにあたり、ウェアラブルコンピュータの配線材料や電磁波シールド材料として導電性繊維が必要とされている。一般的な導電性繊維には、表面をめっきや蒸着により金属化したものやカーボンなどの導電材料で被覆したものがあるが、摩擦や屈曲に弱く耐久性に難点がある。一方で耐久性を改善するため紡糸段階で導電材を練り込んだものもあるが、導電材を繊維内へ均一に分散させることが困難であり、十分な導電性が得られていない。このような背景から、本研究ではポリエステルやナイロンなどの汎用繊維を対象に後加工により導電性を付与する技術確立し、ウェアラブルコンピュータの構成材料に堪える導電性繊維の創出を目指す。

導電性繊維を調整する手法として、超臨界二酸化炭素 (scCO_2) を媒体とした金属複合化デポジションシステムを構築する。 scCO_2 に有機金属錯体を溶解し繊維を処理する。この過程で系に錯体の還元・分解に有効な水素を連続して導入する。錯体は繊維に注入されながら分解し、繊維の内部および表面で錯体から遊離した金属が凝集して析出する。これにより、繊維内部に複合化された金属層から成長して一体となった金属皮膜を繊維表面に形成する。繊維表面を金属皮膜が覆うため高い導

電性が得られる一方で、皮膜は繊維内部にも複合化されているためアンカー効果により摩擦や屈曲に対する耐久性が得られる。摩耗などにより表面の皮膜が一部欠損しても繊維内に複合化された金属層による導通が得られるため導電性の低下を抑制できる。このシステムの確立と各機構の解明を研究目的とし、電気抵抗率が布帛で $10^{-1} \Omega \cdot \text{cm}$ の体積抵抗率を下回る高い導電性を備えながらも、屈曲や摩擦に耐久性があり軽量で柔軟性に富む導電性繊維の創出を目的とする。

本研究により高い導電性を備えながらも耐久性があり、軽量で柔軟性に富む、従来にない導電性繊維が創出されれば、これらの繊維はウェアラブルコンピュータの配線材料や電磁波シールド材料としての使用に堪え、高度情報化社会の到来を材料面からアシストできる。また、本研究で構築する金属複合化デポジションシステムは汎用性が高く、高強度なスーパー繊維に応用すれば、その優れた機械特性を生かして従来の送電線用電線にとって代わる導電性ワイヤーや電気抵抗体（発熱体）への応用も可能となる。金属複合化デポジションシステムは繊維以外にも高分子フィルムや成形品に適用できるため、従来にない耐久性を備えたフレキシブル基盤や導電性機械部品の新規製造法にも展開が期待できる。

研究の内容および成果

金属複合化デポジション処理として、 scCO_2 を媒体に繊維へ有機金属錯体を注入し、その過程で錯体に熱および、水素を作用させて還元分解した。錯体は繊維に注入されながら分解するため、繊維内部および、表面で錯体から遊離した金属が凝集して析出する。これにより繊維内部に複合化され

た金属層を繊維表面近傍に形成できるか検討した。有機金属錯体には Pd(II) acetylacetonate ($\text{Pd}(\text{acac})_2$) と Pd(II) acetate ($\text{Pd}(\text{oac})_2$) をそれぞれ単独および、重量比 1:1 で混合したものを用いた。繊維への錯体の注入は、錯体量を 100 %_{owf} とし、浴比 1:250、120 °C、25 MPa、15 h で行った。

錯体の還元分解は、錯体量の 10 mol 当量の水素を用い、120 °C、0.5 MPa、3 h で行った。

バッチ式の処理装置を用い、パラジウム (Pd) を複合化したナイロン 6 布帛の写真を図 1 に示す。布帛は金属複合化処理により、金属光沢のある黒色を呈した。布帛表面の金属複合化率と体積抵抗率の関係を図 2 にプロットする。体積抵抗率は複合化率が高まると共に線形に減少し、ca.10atmic% で 90.4 Ω・cm を示した。繊維断面の SEM 像を図 3 に示す。繊維表面近傍に厚み ca.200 nm の金属層が観察された。繊維の表面から内部へ深さ方向の元素分布を測定した結果を図 4 に示す。繊維表面から内部にかけて Pd に加え繊維由来の窒素原子が観察され、繊維への金属層の複合化が確認された。以上より、繊維に金属を複合化して導電性を付与できたが、体積抵抗率が目標値の 10⁻¹ Ω・cm に届かなかった。図 2 より、金属複合化率を ca.12atmic% に高めると目標値 10⁻¹ Ω・cm を達成できると予想される。バッチ式処理装置 (一定量の錯体・水素で処理) では金属複合化率の向上に限界があるため、フロー式処理装置 (錯体・水素を連続して供給) を作製し (図 5)、繊維への金属複合化を検討した。フロー式処理装置により金属光沢のある銀色の布帛が作製できたが、装置の調整が十分でなく処理むらから導電性を評価できなかった。今後はフロー式処理装置の調整を進め繊維の金属複合化率向上を検討する。

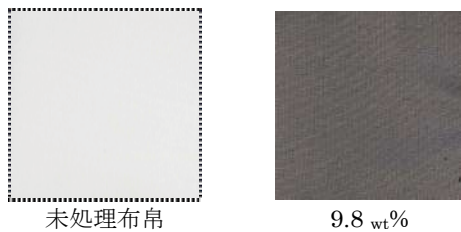


図 1. 金属複合化ナイロン 6 布帛 (上段から写真、金属複合化処理による重量増加)

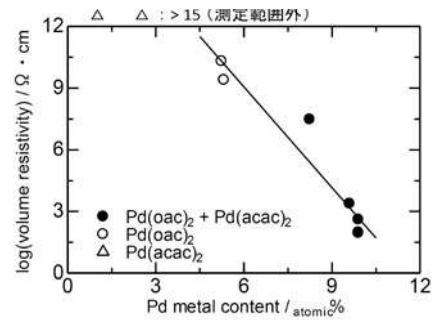


図 2. 金属複合化ナイロン 6 布帛の体積抵抗率と Pd 金属量 (X 線光電子分光法) の関係

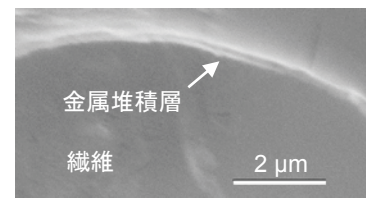


図 3. 金属複合化ナイロン 6 繊維断面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像

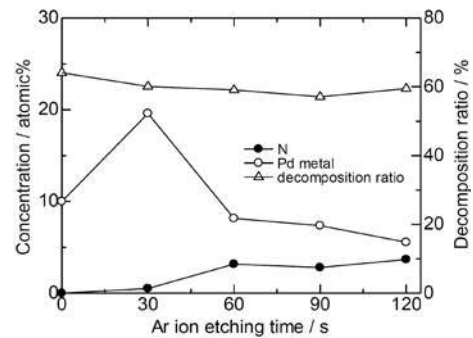


図 4. 金属複合化ナイロン 6 布帛の繊維表面から内部の元素分布と Pd 錯体分解率 (XPS 法、表面を Ar イオンエッチングした後に測定)

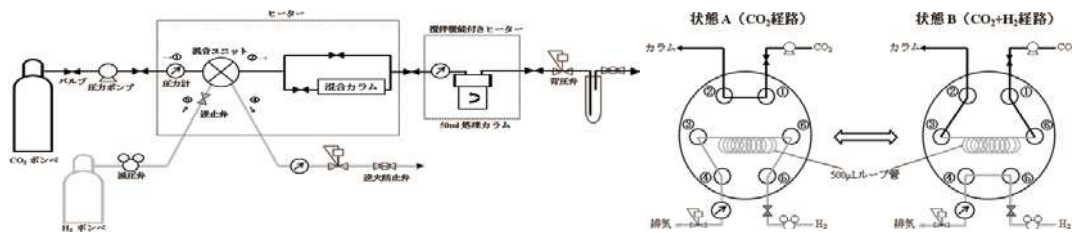


図 5. フロー式水素導入型超臨界流体処理装置 (左図フロー図、右図 CO₂/H₂ 混合ユニット)

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

「論文・学会発表」

発表：廣垣和正，“次世代繊維加工技術開発への取り組み”、平成 23 年度日本繊維機械学会北陸支部講演会、依頼講演 (他 1 件、予定 2 件)
論文：H24 年度に論文発表 1 件を予定

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費若手(B) 代表 H23~H26 採択額 4,550,000 円、(社)繊維学会 繊維科学・技術研究助成：代表 H23~H24 助成額 500,000 円、H24 福井大学研究育成経費申請予定

平成 23 年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」
**金属表面プラズモンによる電磁波の超集束効果を用いた、
 微量液体測定用テラヘルツ波プローブの研究開発**

研究代表者：山本 晃司（遠赤外領域開発研究センター・准教授）

共同研究者：谷 正彦（遠赤外領域開発研究センター・教授）

概 要	
	金属 V 溝結合平行平板導波路を作成し、テラヘルツ波超集束効果の検証と、微量液体測定への応用可能性を調べた。金属 V 溝結合平行平板導波路を用いることで回折限界波長以下の開口幅でもテラヘルツ波が透過することを確認し、テラヘルツ波が超集束することを実証した。テラヘルツ波の微量液体測定への応用可能性に対して、プラスチックチューブを金属 V 溝結合平行平板導波路で挟み、微量液体として超純水を移送しながらテラヘルツ測定を行った。その結果、チューブの外径や内径および形状に依存する応答が観測されたほか、超純水自身の吸収に関して 6 倍の高感度測定が可能であることが明らかになった。この結果、金属 V 溝結合平行平板導波路を用いることで、テラヘルツ波による微量液体検査応用への可能性が示された。
関連キーワード	金属 V 溝結合平行平板導波路、テラヘルツ、超集束効果、表面プラズモン、微量液体検査

研究の背景および目的

可視・赤外光で不透明な対象物に対しても、テラヘルツ波を利用することで非接触・非破壊で内部スペクトル検査が可能となることがこれまでに明らかにされてきた。一方、テラヘルツ波による液体、特に水を含む溶液の検査応用の研究例は少ない。この主な原因は、回折限界によってテラヘルツ波を微小な空間に集めることが困難であることである。つまり、自由空間を伝搬するテラヘルツ波は、サブミリメートル以下に集光することができない。そのため、従来のテラヘルツ時間領域分光測定では、数ミリメートルまたはそれ以上の直径を有する試料を準備する必要があった。波長よりも狭い幅にテラヘルツ波を集めること（超集束効果）ができれば、薄膜や微量サイズの試料に対するテラヘルツ時間領域測定可能となる。これ

までに、われわれは、金属 V 溝導波路の開口角が広い場合（開口角： 10° ）でもテラヘルツ波は効率よく超集束することを実験的に明らかにし、開口幅 $20\ \mu\text{m}$ の金属 V 溝導波路をテラヘルツ波が振幅比で 20%程度透過することを報告した。しかし、金属 V 溝導波路では、微小試料の配置など、テラヘルツ時間領域分光法へ応用する上で問題となる点が多い。そこで、本研究では、水を含む溶液に対してテラヘルツ波による検査応用研究を推進することを目的とした。具体的には、液体をチューブで移送した状態で、簡便にテラヘルツ波検査を行うことが可能となる、微量液体検査用のテラヘルツ波プローブの開発を目指すための基礎実験を行い、プローブの特性を明らかにした。

研究の内容および成果

本研究では、「微量液体検査用のテラヘルツ波プローブの開発」における問題点を克服するため、金属プラズモンによるテラヘルツ波の超集束効果を利用することによって、微量液体試料用テラヘルツ波プローブの開発を目指し、以下の目標に取り組んだ。

- [1] 金属 V 溝構造テラヘルツ波プローブの最適化
- [2] 微量液体循環システムと金属 V 溝構造テラヘルツ波プローブのカップリング最適化

測定は、テラヘルツ時間領域分光装置（Pulse IRS-1000, 先端赤外）を用い、テラヘルツ波の集光位置に金属 V 溝結合平行平板導波路を挿入し、金属 V 溝側からテラヘルツ波を入射して透過測定を行った。金属ブロックを平行移動させて金属平行

平板間隔を変えて測定することで、テラヘルツ波の透過に対する平行平板間隔依存性を調べた。課題[1]に対して金属 V 溝結合平行平板導波路（図 1）を作成した。

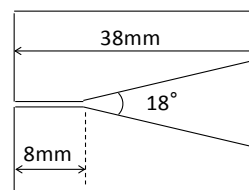


図 1. 金属 V 溝結合平行平板導波路の構造。金属は、アルミを使用。

この金属 V 溝結合平行平板導波路に対して、テラヘルツ波の透過特性を測定し、金属 V 溝結合平行平板導波路における超集束効果を調べた。

金属 V 溝結合平行平板導波路に対して、入射テラヘルツ波の偏光を金属平行平板と垂直にしたときのテラヘルツ波透過波形を図 2 に示す。金属平行平板間の間隔は 21 μm である。図 2 では、20% 程度の振幅のテラヘルツ波が、波長よりも 1 桁程度狭い金属 V 溝結合平行平板導波路を透過している。このことから、金属 V 溝と金属平行平板の結合面において、金属 V 溝で超集束したテラヘルツ波が、効率よく金属平行平板に伝送されることが明らかになった。

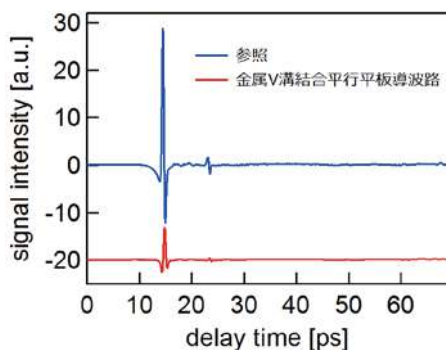


図 2. 金属 V 溝結合平行平板導波路を透過したテラヘルツ波パルス (下線) と、参照テラヘルツ波パルス (上線)。金属平行平板間の間隔: 21 μm 。テラヘルツ波の偏光方向は、金属平行平板に垂直。

次に、金属 V 溝結合平行平板導波路の金属平行平板間にプラスチックチューブ (PEEK®チューブ、外径: 1/16 インチ) を挿入し、液体クロマトポンプを用いてチューブ内に液体を流して微量液体のテラヘルツ波透過測定を行った結果を図 3 に示す。

金属 V 溝結合平行平板導波路のみを透過した場合と比較して、チューブを透過することでテラヘルツ波のスペクトルが連続的に減衰するとともに、10 cm^{-1} および 20 cm^{-1} 付近に線幅の細い減衰が見られる。チューブに超純水を流すと、連続的なスペクトルの減衰と比較して、線幅の細い減衰はより顕著になる。一方、水のテラヘルツ領域の吸収スペクトルには、このような線幅の狭い吸収線は存在しない。つまり、10 cm^{-1} および 20 cm^{-1} 付近の線幅の細い減衰を測定することによって、水溶液系の高感度検出の可能性が示唆された。

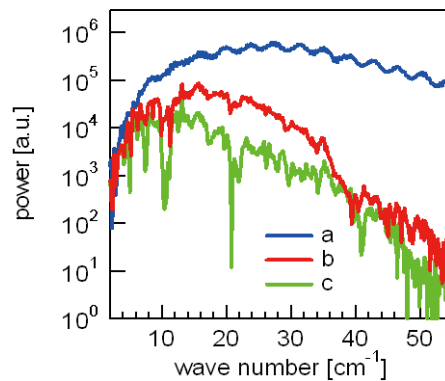


図 3. 透過テラヘルツ波のパワースペクトル。a: 金属 V 溝結合平行平板導波路、b: 金属 V 溝結合平行平板導波路+PEEK®チューブ、c: 金属 V 溝結合平行平板導波路+PEEK®チューブ+超純水

まとめとして、本研究において、金属 V 溝結合平行平板導波路を作成し、テラヘルツ波超集束効果の実験的検証と、微量液体測定への応用可能性を示すことに成功した。

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

「原著論文」

1. Masahiko Tani, Kohji Yamamoto, et al., "Photoconductive Emission and Detection of Terahertz Pulsed Radiation Using Semiconductors and Semiconductor Devices," In a special issue of Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, Vol.31, No. 5 (2012)
(他 2 件)

「学会発表」

1. 山本晃司、他 7 名、「金属 V 溝結合平行平板導波路のテラヘルツ透過特性」(17p-E8-3)、春季第 59 回応用物理学関係連合講演会、2012.3.15-18、早稲田

(他 66 件 (国際学会、国内学会を含む))

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 2012 年度~2013 年度、「金属表面プラズモンによる電磁波の超集束効果を用いた、微量液体測定用テラヘルツ波プローブの研究開発」、公益財団法人東電記念財団平成 23 年度研究助成 (電気・エネルギー一般研究)、1,000 千円/2 年
2. 2011 年度、「金属表面プラズモンによる電磁波の超集束効果を用いた、微量液体測定用テラヘルツ波プローブの研究開発」、中部科学技術センター学術奨励研究助成事業、300 千円/1 年

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 大脳皮質発生における intermediate progenitor の意義

研究代表者： 駒田 致和（生命科学複合研究教育センター・特命助教）

共同研究者： 佐藤 真（医学部・教授）

概 要
哺乳動物の大脳皮質形成においては、適切な時期に適切な数の細胞が増殖・分化することが重要である。近年、終脳背側において radial glial cell (RGC) のほかに、intermediate progenitor cell (IPC) が存在していることが報告されている。我々は終脳背側の Hedgehog シグナルが神経幹細胞の増殖や生存、分化を制御していることを報告し、さらに本研究では、特に RGC の IPC や神経細胞への分化、さらには IPC から神経細胞への分化を調節していることを示した。その作用は胎生後期においてより顕著であり、細胞周期を調節することによって RGC から IPC、さらには神経細胞への分化を制御している可能性を認めた。ヒトの大脳皮質では2、3層が高度に発達しているが、IPC は主にこの領域の神経細胞を産生することから、本研究は高次脳機能の形成や精神疾患の発症のメカニズムの解明に寄与することが期待される。
関連キーワード
Hedgehog、Intermediate progenitor cell、大脳皮質、細胞周期、神経分化

研究の背景および目的

哺乳動物の大脳皮質の形成においては、適切な時期に適切な数の細胞が増殖・分化を行うことが重要である。マウスでは胎生中期以降、終脳背側の脳室面で radial glial cell (RGC) と intermediate progenitor cell (IPC) が増殖と分化を繰り返し、分化した神経細胞は脳表面に向かって法線状に移動することで、6層構造を持つ大脳皮質が形成される。大脳皮質を構成する神経細胞は、産まれた時期によってどの層を構成するかが決定されることも知られており、適切な増殖・分化が正常な層構造の形成に重要である。このように大脳皮質の発生は神経細胞の増殖や分化、移動、局在、神経ネットワークの構築が複雑に制御されており、その制御は様々なシグナルが複雑に関与することで調節されている。

分泌タンパク質である Sonic Hedgehog (Shh) は、形態形成因子として心臓や肺、腸管、四肢、さらに神経管をはじめとする中枢神経系の発生に重要である。特にこれらの器官では腹側に発現し、パターン形成に関与していることが報告されている。今回我々は、大脳皮質の発生における Shh シ

グナルの役割に着目した。大脳皮質は終脳の背側に形成されるが、Shh は終脳の腹側に強く発現し、この領域のパターン形成や GABA 作動性介在ニューロンの増殖・分化を制御している。しかし弱いながらも背側に発現し、細胞の増殖や生存、分化に重要な役割を果たしていることを我々は報告している (Komada et al. *Development* 2008)。また先行研究により、終脳背側における Shh シグナルは特に IPC の維持や分化に重要であることが明らかにされていることから、本研究課題では Shh シグナルが制御する IPC の増殖・分化制御メカニズムを明らかにすることを目指す。

Shh シグナルは重篤な脳神経系の先天異常である全前脳胞症の原因遺伝子の一つであり、本研究課題では、終脳背側特異的に Shh シグナルの発現を抑制する遺伝子改変マウスを用いて、特に IPC に関連した表現型を詳しく解析するとともに、異常を引き起こす分子メカニズムを明らかにすることで、先天異常の発症メカニズムの解明にも寄与することを旨とする。

研究の内容および成果

Shh ノックアウトマウスは象鼻奇形症という重篤な先天異常を示し、中枢神経系も低形成となるため大脳皮質特異的な解析を行うことは困難である。そこで、Emx1-Cre ノックインマウスを用いて、胎生期の終脳背側特異的に Shh シグナルの介

在因子である Smoothened の発現を抑制したコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製し、終脳背側の Shh シグナルが神経幹細胞の増殖や生存、分化を制御していることを報告した (Komada et al. *Development* 2008)。

今回、さらにこのマウスを詳細に解析することによって、Shh シグナルが制御する IPC の増殖・分化メカニズムの解明を行った。チミジン類似物質を用いた cell cycle kinetics の解析によって Shh シグナルは細胞周期と cell cycle exit のタイミングを調節することによって RGC から IPC、さらには神経細胞への分化を制御していることが明らかになった。また、これらの異常は成熟した大脳皮質において 5 層と白質の低形成を誘発し、神経細胞の分布や層構造形成に異常を引き起こしていることを示した。この SmocKO マウスはサブプレートが低形成であるが (Komada et al. *Development* 2008)、この領域を通して大脳皮質に投射するドパミン作動性神経細胞の線維の投射にも異常を観察した。さらに、アストロサイトのマーカーである GFAP の異所性の発現も見られたことから、アストロサイトの分化、あるいは活性化の異常が引き起こされていることも確認した。つまり、Shh シグナルが制御する IPC の増殖・分化制御メカニズムは、神経細胞の分布や層構造形成を調節することによって、神経投射にも影響していることが示唆された。

IPC における細胞周期異常の原因を明らかにするために、胎生期に終脳背側に発現している CyclinD1、D2、E の発現について解析を行った。SmocKO マウスにおいて、特に CyclinD1 の発現異常が観察され、IPC の細胞周期の調節異常は、Shh シグナルを抑制されることによってその下流

で作用する CyclinD1 の発現が減少し、細胞周期のチェックポイントを適切に通過することができず、細胞周期が延長することによって起きていることが示された。つまり、Shh シグナルは IPC における CyclinD1 の発現を制御することによって IPC の細胞周期を適切に調節することで、適切な数の神経細胞を適切な時期に産生し、大脳皮質の層構造の適切な形成やアストロサイトの産生に関与している。このことが大脳皮質へのドパミン作動性ニューロンの投射にも影響しており、大脳皮質の機能的な成熟にも関与していることを示唆している。つまり、終脳背側に発現している Shh シグナルは、大脳皮質の器質的な先天異常の原因となるだけでなく、高次脳機能の異常にも関与していることが考えられる。

近年、胎児期の異常や環境が高次脳機能障害や精神疾患、生活習慣病などの成人後の疾患との関連性を示唆する DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説が唱えられており、胎児・発達期の栄養状態などの環境が精神疾患や生活習慣病の発症リスクへ影響することが報告されている。本研究課題では、終脳背側に発現している Shh シグナルが細胞周期の調節を介して、大脳皮質の形態形成や、高次脳機能の成熟に重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに、精神疾患や高次脳機能障害の発症メカニズムの一端の解明にも寄与することができた。

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

「主な発表論文等」

- ・ **Munekazu Komada**, Yasuko Asai, Mina Morii, Michie Matsuki, Makoto Sato and Tetsuji Nagao, Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology*. 16; 295 (1-3): 31-8, 2012.
- ・ **Munekazu Komada**, Hedgehog signaling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells by regulating the cell cycle kinetics during development of the neocortex. *Congenital anomalies*. 52(2): 72-7, 2012.

「特記事項」

本研究課題は以下の学会において発表した。

- ・ 駒田致和他 intermediate progenitor の増殖・

分化における Hedgehog シグナルの役割 第 51 回 日本先天異常学会学術集会 P-5 東京 ポスター 2011 年 7 月

- ・ M. Komada et al. The roles of Hedgehog signaling during the proliferation/differentiation of intermediate progenitor cells. *Neuroscience2011*, P3-e04, Yokohama, ポスター 2011 年 9 月

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- ・ 科学研究費補助金・若手研究 B・平成 22-23 年度・海馬歯状回形成における形態形成因子の役割の解明・代表・採択・3000 千円

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」
**高機能発達障害児における成功経験の想起が
 行動制御に及ぼす効能の検証**

研究代表者： 武澤 友広（生命科学複合研究教育センター・特命助教）
 共同研究者： 三橋 美典（教育地域科学部・教授）、谷中 久和（生命科学複合研究教育センター・特命助教）、小越 咲子（教育地域科学部・日本学術振興会特別研究員）、清水 聡（福井県立大学学術教養センター・教授）、平谷 美智夫（平谷こども発達クリニック・院長）

概要	本研究では、自閉症スペクトラム障害（ASD）のある人の過去の成功経験を想起させ自信を高めることで、負のフィードバックに基づく行動制御を促進する手法を提案する。今年度は、蓄積した日記の中からテキストマイニング技術を応用して成功経験に関する日記を抽出する電子日記システムの試作版を開発した。また、電子日記システムの利用が行動制御に及ぼす影響を検証するための検査課題の開発を行った。検査課題は、自己や他者の表情をフィードバック刺激とした確率学習課題に対戦ゲーム形式で取り組ませるものであった。11-17歳までの定型発達児14名、ASD児4名を対象に課題を実施したところ、フィードバックを行動制御に適切に反映できていない事例が確認された。今後、被験者を増やし、本課題の検査課題としての妥当性を確認する必要がある。
関連キーワード	自閉症スペクトラム障害、成功経験、行動制御、電子日記システム、確率学習課題

研究の背景および目的

発達障害者は定型発達者と比べると、負のフィードバックに過敏に反応してしまい、行動の制御に運用するのが難しい。例えば、大杉（2009）は知的障害のない自閉症スペクトラム障害（Autistic Spectrum Disorder: ASD）のある人が働いている職場において、彼らの就労態度に関する周囲の評価を聴取した結果、負のフィードバックに対する過敏性をうかがわせる次のような意見が得られた。「自尊心が傷つきやすく、引きこもったり、反対に攻撃的言動で自衛しようとする」「自己肯定感が著しく低く、だれにでもある何でもないミスでも自信を喪失する」などである。負のフィードバックは行動の制御を促す情報であるにもかかわらず、発達障害者は負のフィードバックに対して感情的に反応するのに終始し、行動の制御に利用できないことが多い。

発達障害者の社会適応を促す上で、彼らの負のフィードバックに対する感情的反応を抑制する介入方法を開発することは意義がある。このような介入方法の例として、Takezawa et al. (2011)は成功経験に関する日記を読むことで自信を向上させ、負のフィードバックに対する感情的反応を抑制する介入方法を提案している。成功経験とは、

達成感を感じた経験（達成経験）や人との絆を感じた経験（親和経験）を含む。井上ら（2010）は認知症者を対象にこの介入を試行し、自信の向上を確認している。

そこで、本研究では発達障害者の負のフィードバックにより喚起される不安を抑え、行動制御を促す介入として、過去の成功経験を想起させることで自信を高める手法を提案する。そして、成功経験の想起が負のフィードバックに対する過敏性を抑え、行動制御を促すことを確かめることを目的とする。これらの目的を達成する予備段階として、本年度は次の2つの目標を設定した。①過去の成功経験を想起する支援ツールを開発する。②負のフィードバックを利用した行動制御を評価できる実験課題を開発する。①において、発達障害者は経験の想起が難しいことが報告されているため、自信を高める経験を日記として記録・想起させる支援ツールを開発する。②において、フィードバックを利用した行動制御を評価する課題として従来、利用されてきた課題に確率学習課題がある。本研究ではフィードバック刺激として他者の表情（喜び、悲しみ）を用い、日常生活に近い状況における行動制御を評価できる課題を開発する。

研究の内容および成果

【目標①に関する内容および成果】
 過去の成功経験の想起を支援するツールとして、電子日記システムの開発を進めている。このシステムは、その日の印象に残った経験を日記として

記録させ、その経験から「どの程度、達成感を感じたか」「どの程度、人とのつながりを感じたか」をユーザーに5段階で評定してもらうものである。システムにアクセスするとこれまでに蓄積した日

記の中から、前述の評定値が高かった日記が抽出・呈示され、成功経験の想起を促す。現在、図1のようにWEB上で日記を記録・参照できるシステムを構築し、インターフェースの官能評価を実施している。今後、システムの利用を通して、成功経験が記録された日記を抽出するためのテキストマイニング技法を開発する必要がある。

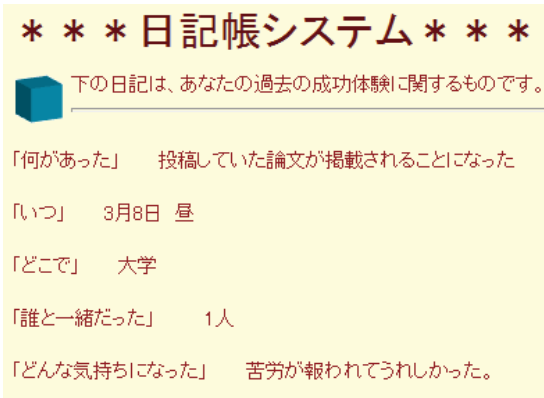


図1. 電子日記システムの画面例

【目標②に関する内容および成果】

11-17歳までの定型発達児14名(定型群), ASD児4名(ASD群)を対象に、図2で示す自己や他者の表情をフィードバック刺激とした確率学習課題に対戦ゲーム形式で取り組ませた。具体的には、画面に呈示される2枚のカードのうち、ボタン押しによっていずれかを選択すると、選択したカードがめくられ、自分の喜び表情、悲しみ表情、対戦相手の喜び表情、悲しみ表情のいずれかが呈示された。このうち、自分の喜び表情と相手の悲しみ表情は正のフィードバック(加点)を意味し、自分の悲しみ表情と相手の喜び表情は負のフィードバック(減点)を意味した。カードは、これらのいずれかの表情が約70%の確率で出現する4種類であった。つまり、加点のフィードバックが高確率で出現するカードと減点のフィードバックが高確率で出現するカードがそれぞれ2種類ずつあった。

図3のように、前試行のフィードバックの種類別に、各選択肢の選択率を算出したところ、前試行で負のフィードバックが出現した場合(図中の

“前試行が敗北”)でも、ASD群は定型群と同程度の確率で加点のフィードバックが高確率で出現する選択肢(図中の“勝率高”)を選択できていた。しかし、図4に示したように4名中1名のASD児について加点のフィードバックが高確率で出現する選択肢(図中の“勝率高”)の選択率が課題ブロックの進行に伴い低下していた。今後、この現象の再現性の高さを確認し、フィードバックに基づく行動制御を評価できる課題としての妥当性を検証する必要がある。



図2. 検査課題の流れ

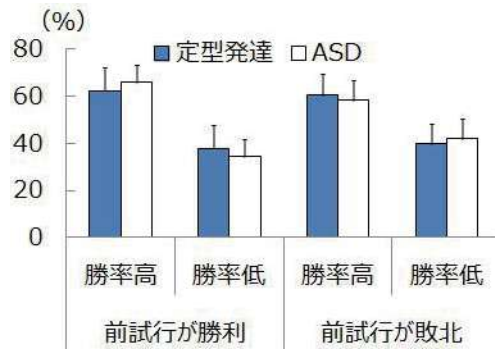


図3. 前試行の結果別、選択肢別の選択率

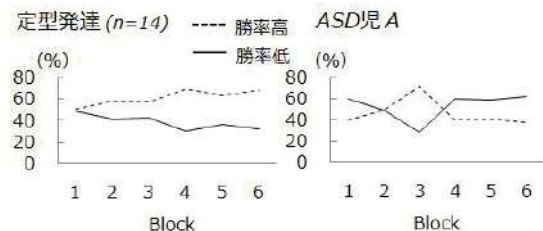


図4. 課題の進行に伴う選択率の推移

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

【主な発表論文等】

Takezawa et al. (2011) Computer Based Training Program to Learn the Relation between Facial-Based or Situation-Based Emotions and Prosocial Behaviors. 12th Asia Pacific Industrial Engineering & Management Systems Conference, p702-704.
 武澤ら (2012) 表情刺激を用いた確率学習課題に

おける自閉症スペクトラム障害児の認知特性. 日本特殊教育学会第50回大会

【競争的資金・研究助成への申請・獲得状況】
 日本学術振興会・科学研究費補助金・若手研究B・発達障害児に対する成功経験の想起支援が失敗に対する耐性及び行動改善に及ぼす影響・代表・申請予定

福井大学
生命科学複合研究教育センター
平成23年度研究費助成事業

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「脳発達プロジェクト研究」

神経細胞内 M₁ 受容体量を指標とした幼若マウス中枢神経系の拘束ストレス応答の解析

研究代表者： 西宗 敦史 (医学部・学内講師)

共同研究者： 村松 郁延 (医学部・教授)、A.S.M.Anisuzzaman (医学部・特命助教)

概 要	脳の発達過程において、シナプス形成に続く神経伝達物質受容体の機能発現は神経回路の発達上極めて重要なステップとなっている。本研究では、我々が新規に見出した、細胞内 M ₁ ムスカリン性アセチルコリン受容体を指標として、幼若期のマウスのストレスに対する中枢性の応答を解析する。これによって、発達期の化学的神経伝達の成熟過程のストレス感受性について理解を深めることを目的とする。
関連キーワード	ムスカリン M ₁ 受容体、細胞内受容体、Quinuclidinyl benzilate、拘束ストレス、幼若動物

研究の背景および目的

細胞内 M₁ ムスカリン性アセチルコリン受容体は、ラットでは外界のストレスに応答し、劇的にその量が減少する。また老化に伴っても細胞表面の受容体にはるかに先立って激減することから、生体内でストレスに反応するエフェクターの一つとなっている。マウスではラットと比較して遺伝学的な操作が広く行われており、ノックアウト動

物やトランスジェニック動物などの個体レベルでの分子の機能解析に有用なツールが豊富に入手できる。概要で示した目的に加えて、マウスで発達過程の細胞内 M₁ 受容体の挙動とストレス応答性を解析することで、ストレス応答の分子機構を解明するための基盤づくりを行う。

研究の内容および成果

我々の先行実験のデータは成体ラットで得られていたため、まずマウス (C57BL/6 ♂) の大脳皮質を用いて細胞内ムスカリン受容体の定量を行った。この結果、5~6 週齢を境に急激に受容体量が増大することが判明した (図 1)。

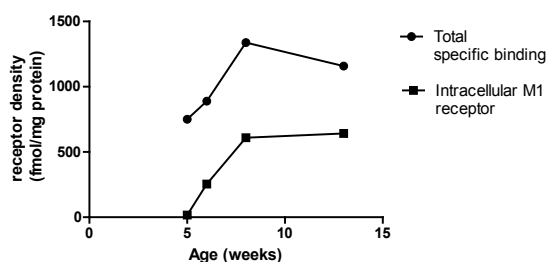


図 1. マウス大脳皮質におけるムスカリン受容体の発達と細胞内 M₁ 受容体の発現過程

50ml 容量のポリプロピレン製コニカルチューブを用いて拘束ストレスを与えた。チューブには呼吸のために先端部にφ0.8mm の細孔を 50 個あけた。また拘束中はかなりマウスが発汗していたので、不要な体温上昇を防ぐためチューブ全体に

孔を 200 個あけた。穴あけにはミニドリル (サンハヤト MINIDRILL D-3) を AC アダプターを用いて使用した。また拘束中に盛んに排泄するので、尾側に脱脂綿を詰めてスペースの減少と排泄物の散乱防止を実現した。拘束用チューブに一日当たり 2 時間入れて、チューブを飼育ケージ内に静置することでを行い、14 日間連続して拘束を与えた。

細胞内ムスカリン受容体の定量には、細胞内外の受容体を両方標識できる脂溶性のトリチウム標識リガンド [3H]-Quinuclidinyl benzilate (QNB) を用い、細胞表面の受容体のみと競合する親水性のリガンド N-methyl scopolamine (0.1 μM) で競合されて結合しなくなる部分を表面受容体、またアトロピン (1 μM) で競合されない QNB の結合部位を非特異的リガンド結合部位と定義した。組織をホモゲナイズすると、親水性リガンドの有無による細胞内外の受容体の分別定量が不可能になるため、大脳皮質より約 1mm から 1.5mm 角大の切片を作製し、切片のまま 4℃ で 8 時間インキュベートしてリガンドを飽和させた。未結合の過剰なリガンドは、切片をポリスチレン製小試験管内で 45 秒間震盪洗浄して除いた。洗浄後の切片は過剰な水分を除いた後、0.3M NaOH 溶液を加え、37℃ で完全に溶解するまで保温し、リガンドの定量とタンパク質定量に用いた。

週齢 (週) と ストレス負荷期間 (週)	細胞内 M ₁ 受容体量 (fmol/mg protein)	ムスカリン 受容体総量 (fmol/mg protein)
5 (control)	17	750
5 (3->5 拘束)	590	1400
6 (control)	250	890
6 (3->5 拘束)	690	1400
8 (control)	610	1300
8 (3->5 拘束)	490	1000
13 (control)	640	1200
13 (3->5 拘束)	385	1100

表 1 発達及びストレス負荷に伴う受容体量の変化

8 週齢以降の動物では、我々がラット成体で見出していたのと同様に拘束負荷によって細胞内ムスカリン受容体の減少がみられた。ところが、3 週齢から 5 週齢まで、或いは 4 週齢から 6 週齢まで拘束負荷を与えた場合、細胞内 M₁ 受容体は増加した。拘束負荷は幼若動物に対しては受容体の発現を左右するという点で攪乱要因となるが、成体とは全く異なる反応を示すことが明らかとなった。

以上より、本研究で明らかになった、マウスの細胞内 M₁ 受容体の特性とストレス応答の特徴に

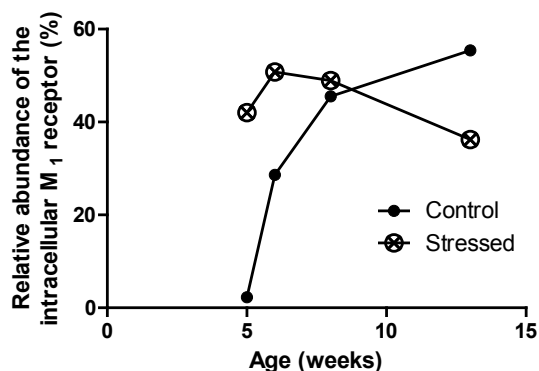


図 2 各週齢における大脳皮質細胞内 M₁ 受容体量と、ストレス負荷時における同受容体量。各条件でのムスカリン受容体総量を 100% とした相対値で表示した。

ついてまとめると

- ・細胞内 M₁ は表面の M₁ 受容体の発達に遅れ、生後 5 週以降に急激に増加する。
- ・6 週頃までは拘束ストレス負荷に反応して、細胞内 M₁ 受容体量は増加する。
- ・それ以降は拘束ストレス負荷に反応して、細胞内 M₁ 受容体量は減少するが、ラットのような悉無律的な消失は起こらなかった。

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

「主な発表論文等」

1. **Nishimune A**, Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman AS, Umada H, Muramatsu I. Phenotype pharmacology of lower urinary tract $\alpha(1)$ -adrenoceptors. *Br J Pharmacol*. 2012;165:1226-34.
2. Kantamneni S, Wilkinson KA, Jaafari N, Ashikaga E, Rocca D, Rubin P, Jacobs SC, **Nishimune A**, Henley JM. Activity-dependent SUMOylation of the brain-specific scaffolding protein GISP. *Biochem Biophys Res Commun*. 409:657-62. 2011.
3. Ikeda T, Anisuzzaman AS, Yoshiki H, Sasaki M, Koshiji T, Uwada J, **Nishimune A**, Itoh H, Muramatsu I. Regional quantification of muscarinic acetylcholine receptors and β -adrenoceptors in human airways. *Br J Pharmacol*. in press
4. Md Anisuzzaman AS, **Nishimune A**, Yoshiki H, Uwada J, Muramatsu I. Influence of tissue integrity on pharmacological phenotypes of muscarinic acetylcholine receptors in the rat cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther*.

339:186-93. 2011.

5. Uwada J, Anisuzzaman AS, **Nishimune A**, Yoshiki H, Muramatsu I. Intracellular distribution of functional M(1) -muscarinic acetylcholine receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 118:958-67. 2011.
6. Wang MH, Yoshiki H, Anisuzzaman AS, Uwada J, **Nishimune A**, Lee KS, Taniguchi T, Muramatsu I. Re-evaluation of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain by a tissue-segment binding assay. *Front Pharmacol*. 2:65. 2011

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 24 年度科学研究費・基盤 (C) 一般・H24～H26・G タンパク質共役型受容体の新規調節因子 CRELD1 の生体内機能の解明 代表 採択・546 万円
山田養蜂場みつばち研究助成基金 老化及びストレス負荷感受性神経細胞内ムスカリン M₁ 受容体に対するローヤルゼリーの保護効果 平成 23 年度 代表 不採択

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「脳発達プロジェクト研究」

**児童虐待防止のための親性育成看護介入プログラムの開発
-脳科学を基盤とした効果検証-**

研究代表者： 佐々木 綾子（医学部・准教授）
共同研究者： 小坂 浩隆（医学系研究科附属子どもの発達研究センター・特命准教授）、
松木 健一（教育学研究科・教授）、波崎 由美子（医学部・助教）、
瀬戸 知恵（医学部・助教）、岡沢 秀彦（高エネルギー医学研究センター・教授）

概 要	児童虐待防止をめざした親性育成看護介入プログラムの基礎的データとするため、育児期母親・父親の経験差(初産)および母親群の母性意識の高低と局所脳活動の関係について、明らかにすることを目的とした。その結果、母親群では、初産の母親の方が経産より左上側頭回、左中心前回/下前頭回が賦活し、父親群では、初産の父親の方が経産より左中前回、右島が賦活した。慣れないため泣き声を聞き分けようと努力していることが考えられた。母性意識の高低では、母親の母性肯定点が低い者ほど、左島/左楔前部の賦活が強く、泣いている乳児の声に対して嫌悪を感じている可能性が示唆された。これらの結果から、乳児との接触体験が親性育成を促し、虐待防止につながる可能性のあることが局所脳活動の面から明らかとなった。
関連キーワード	児童虐待防止, 親性育成, 母性意識, 生体反応, fMRI

研究の背景および目的

親性とは、乳幼児への好意感情、養育の意志、知識と技能など、子どもと関わる上で重要な性質である。親性は、本能だけではなく学び育まれるものであるが、今日では学び育む機会が極端に乏しい社会になっている。このため、かつては家庭や社会のなかに自然に備わっていた親性の教育機会を、意図的に創り出す必要性や、将来親となる若い世代を対象とした、長期的な視点に基づく施策の必要性が指摘されている。

しかし、親性育成は幼少期から成人にわたる時期に必要なにも関わらず、わが国ではいまだ体系化されていない。

一方、親性育成に関連した重要課題として、増加する児童虐待の予防があげられる。児童虐待の要因として、親の生育歴の問題・生活ストレス・社会的孤立・子ども自身の要因・親とその子どもとの関係などが明らかとなっている。虐待の具体的要因のひとつに乳幼児の「泣きに対する応答性の欠如」があげられ、妊娠中、また産後の乳幼児とのコミュニケーションが難しい時期に、「泣き」をはじめとする、乳幼児の感情表現に対する応答性を高めておくことが、児童虐待防止につながると考える。

親性育成のための介入は、妊婦や育児期の親を対象とし、健やかな親の育成のために行われているが、育児に必要な知識や育児技術が中心である。また、乳幼児の感情表現に対する応答性を高めるための一般化された看護介入プログラムは未開発であり、評価方法も心理学的な検討に偏っている。本研究の特に独創的な点である、fMRI (functional MRI: 機能的磁気共鳴画像) は、脳機能画像法として感情、注意、認知などについて研究が進められてきて久しいが、人間の親性行動の脳科学的基盤については十分に解明されていない。

筆者らのこれまでの研究の結果、育児体験をした青年期男女では、聴覚刺激課題において体験群は両側中前頭回、両側島、両側前部/後部帯状回の領域が体験後に有意に賦活した。これらの領域は感情・注意・認知と関連するとされ、体験で学習効果を得た領域と推察された。

そこで、本研究では、児童虐待防止をめざした親性育成看護介入プログラムの基礎的データとするため、育児期母親・父親の経験差(初産)および母親群の母性意識の高低と局所脳活動の関係を明らかにすることを目的とした。

【研究方法】

- 1.期間:平成23年7月～平成24年2月
- 2.研究デザイン:質問紙調査および準実験研究
- 1)対象者:泣きを起因とした虐待の生じやすい乳幼児を育児中の健康な母親26名・父親22名。
- 2)データ収集方法
 - ①親性レベルのスクリーニング(母性意識尺度・父親意識尺度・対児感情評定尺度)
 - ②心理・生理・内分泌・脳科学的評価:従来より親性を刺激するとされている課題(乳幼児の映像や泣き声など)を提示し、心理学的指標(STAI 状態不安)、生理学的指標(心拍 R-R 間隔測定)、内分泌学的指標(唾液アミラーゼの測定)、脳科学的指標による評価(fMRI)を行った。
- 3)分析方法
 - (1)初産・経産、母性意識の高低(母性意識肯定得点:高値・中央値と低値)を比較し統計学的に分析した。
- 4)倫理的配慮
 - 本研究は福井大学医学部倫理審査委員会の承認を得た上で実施した。

研究の内容および成果

【結果・考察】全体のうち育児期母親の局所脳活動の結果について報告する。

1. 育児期母親の経験差(初産)

聴覚刺激課題において、母親群では、初産の母親の方が経産より左上側頭回、左中心前回/下前頭回が賦活した(uncorrected, voxel level, $P<0.001$)。聴覚と視覚刺激課題において、父親群では、初産の父親の方が経産より左中前回、右島が賦活した(corrected, cluster level, $P<0.05$)。初産の父親・母親は、経産より脳賦活が認められたことから、慣れないため泣き声を聞き分けようと努力していることが考えられた

2. 母性意識の高低と局所脳活動の関係(図1~4)

聴覚刺激課題において、母性意識肯定得点低値群は高値・中央値群より、左の島が弱い閾値で賦活が認められた(uncorrected, $P<0.001$)。聴覚と視覚刺激課題において、両側の楔前部が弱い閾値で賦活が認められた(uncorrected, $P<0.001$)。島は、嫌悪を感じる部位であり、肯定得点が低い母親群は、泣いている乳児の声に対して嫌悪を感じている可能性が考えられた。楔前部は、視覚野の一部で、親和性にも関与している部位であり、肯定得点が低い母親群は、泣いている乳児の映像をいつもの風景のように感じている可能性が考えられた。つまり、泣いている乳児の映像をいつものことだと感じた(楔前部が賦活)ため、肯定得点が低くなったと推察された。さらに、全被験者の点数が高いほど、低いほど、どの脳賦活部位が強いかわかると検討した。その結果、前述の2つの部位が、強い統計閾値(corrected $P<0.05$)で相関が認められた。

これらの結果から、母性意識肯定得点が低い母親群は、「いつもと違う泣き方だ」、「泣いているのはどうしてだろう」という感覚が抱きにくい、つまり乳児の泣きの火急性を察知しにくい可能性が示唆された。

【結論】1. 初産の母親・父親は、経産より感情野の脳賦活が認められた。乳児の泣き声に不安を持ったり、なぜ泣くのかあらゆることを推測したりすることが不要となることは、普段から子育てしている者の親性の獲得になるのではないかと考えられた。2. 母親の母性意識肯定得点が低いものほど、左島/左楔前部の賦活が強かった。乳幼児の泣きに触れ、意味を考える機会を設定することは、親性を高め、児童虐待防止につながることを示唆された。

【今後の研究展望】妊娠期から育児にかけての親性育成効果検証(親子間の反応や泣きに対する応答性を高める)、妊娠先行婚男女の親性育成介入研究などを予定している。

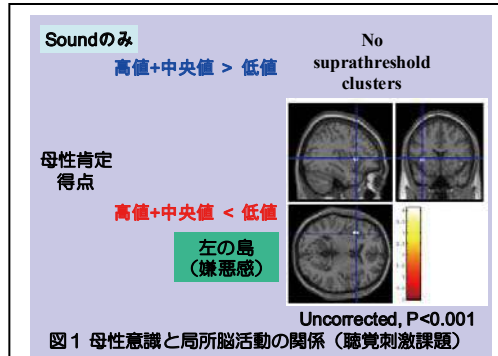


図1 母性意識と局所脳活動の関係(聴覚刺激課題)

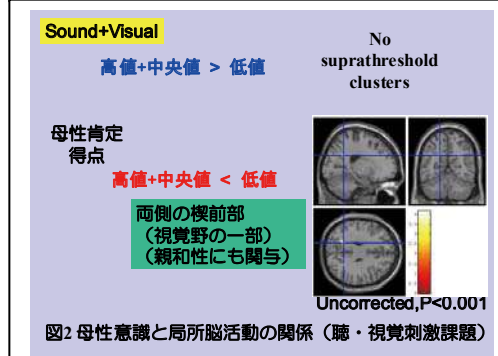


図2 母性意識と局所脳活動の関係(聴・視覚刺激課題)

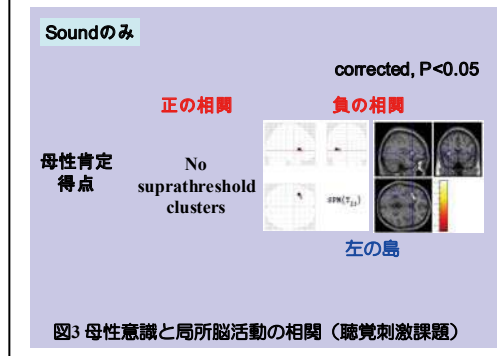


図3 母性意識と局所脳活動の相関(聴覚刺激課題)

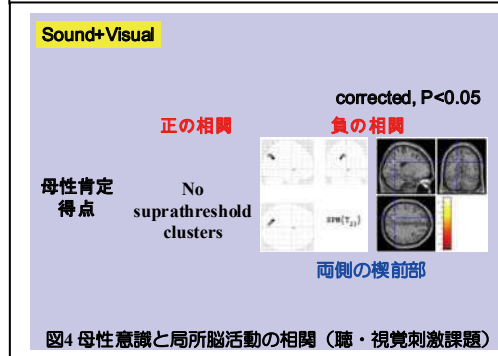


図4 母性意識と局所脳活動の相関(聴・視覚刺激課題)

本助成による主な発表論文

1) Ayako Sasaki, Hiroataka Kosaka, Yumiko Namizaki, Chie Seto, Kenichi Matsuki, Hidehiko Okazawa: Basic research on the Development of Parenthood: Comparison of the Brain Activation Effects of Caring for Infants in mothers, The 9th International Conference with the Global network of WHO, Kobe, 2012.
 2) Ayako Sasaki, Hiroataka Kosaka, Kimiyo Suehara, Michiko Machiura, Hidehiko Okazawa: Preparedness

for Parenthood among Adolescent Males and Females - Continuous Learning Experience of Caring for Infants and the Evaluation of its Effects with the Scale of Readiness for Parenthood and fMRI -, ICM2011, 2011.06, South Africa Durban.
 3) 佐々木綾子, 小坂浩隆, 波崎由美子, 松木健一, 岡沢秀彦: 母性意識の高低と局所脳活動の関係, 第53回日本母性衛生学会, 2012.11.

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「脳発達プロジェクト研究」

fMRI を用いた注意欠陥多動性障害 (ADHD) における 報酬系の神経基盤に関する検討

研究代表者： 友田 明美 (医学系研究科・教授)
共同研究者： 山崎 未花 (医学系研究科・特命助教)
八ツ賀 千穂 (医学系研究科・特命助教)
水野 敬 (理化学研究所分子イメージング科学研究センター・研究員)

概 要	ADHD 患者では、報酬系の障害による報酬遅延や報酬への感受性、ならびにドパミン神経系の異常が認められている。中枢刺激薬メチルフェニデート (MPH) によるドパミン神経系の改善効果は、PET を用いたドパミントランスポーターまたはレセプターの分子イメージングにより評価可能であるが、fMRI を用いて報酬課題遂行中の報酬系関連脳領域における報酬獲得時の神経賦活度により間接的に評価可能と考えられる。そこで、我々は、学童期の ADHD 患者における MPH 投薬前後の報酬系の脳神経基盤を fMRI により評価し、その治療効果の検証研究を進めた。その結果、未治療の小児 ADHD 患者と健常者の比較解析から、ADHD 患者において金銭報酬獲得時の視床の賦活度が有意に低く、治療後は症状改善とともに改善した。ADHD の鑑別とその神経病態生理の解明に fMRI は有用である可能性が示唆された。
関連キーワード	注意欠陥多動性障害 (ADHD)、fMRI、報酬系、メチルフェニデート (MPH)

研究の背景および目的

注意欠陥多動性障害 (ADHD) の主な症状は、不注意、衝動性、多動性であり、ADHD の病態の背景には脳の形態学的な異常や機能的な障害が存在していると考えられている。

学童の 5~15% に出現する ADHD 患者では、報酬系の障害による報酬遅延や報酬への感受性、ならびにドパミン神経系の異常が認められている。中枢刺激薬メチルフェニデート (MPH: Methylphenidate) は、ドパミントランスポーターを阻害することによりシナプス間隙のドパミン濃度を増加させる薬理作用を有し、ADHD 治療薬として頻用されている。MPH 投薬によるドパミン神経系の改善効果は、PET (Positron Emission

Tomography) を用いたドパミントランスポーターまたはレセプターの分子イメージングにより評価可能であるが、fMRI (functional Magnetic Resonance Imaging) を用いて報酬課題遂行中の線条体、側坐核、眼窩前頭野などの報酬系関連脳領域における報酬獲得時の神経賦活度により間接的に評価可能と考えられる。

以上の背景をもとに、我々は、学童期および思春期の ADHD 患者における MPH 投薬前後の報酬系の脳神経基盤を金銭報酬が得られる認知課題施行時の fMRI により評価し、その治療効果の検証研究を行った。

研究の内容および成果

【対象】DSM-IV-TR に基づき ADHD と診断された患児 17 名と定型発達児 17 名を対象とした。被験者の選定にあたっては、健康状態、症状、年齢、性別、同意能力等を考慮し、慎重に検討した上で被験者の自発的な同意の得られた場合のみ、fMRI 検査を行った。

【方法】既報 (Izuma, Neuron 2008) の Monetary Incentive Task による報酬系課題を被験者に遂行させ、fMRI 計測で得られた BOLD シグナルの変化による脳血流計測を行った。

【結果】MPH 投薬前の ADHD 患者と健常者の比較解析から、未治療 ADHD 患者では、低い金銭報酬獲得時両側視床 (特に Dorsomedial nucleus を中

心とした領域) および側坐核の賦活度が有意に低下していた (図1)。また、未治療時に低下していた視床の賦活度が治療後に定型発達児レベルまで改善していた (図2)。

【考察】本研究により、ADHD 患者の報酬への感受性の低下が示唆された。この機能不全は側坐核と視床で一致しており、ADHD の病態として報酬機能を司る側坐核-線条体-視床の辺縁系サーキット全体の不全が推察された。

先行研究では側坐核は報酬の期待や知覚を担う (低報酬のような知覚しづらいものは拾い上げにくい) ことが知られており、視床はそのモジュレーターの役割、すなわち「報酬の感受性」に関与し

ていることが示唆された。

図 1

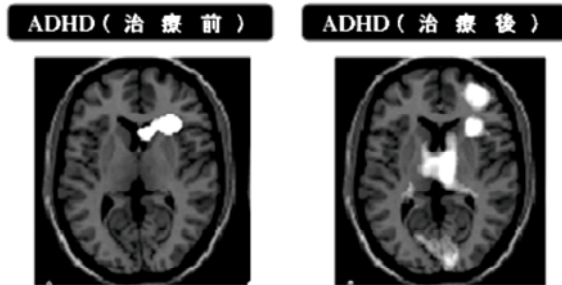


図 1. 治療前後の ADHD 患児の報酬課題遂行時の fMRI 所見：未治療の ADHD 患児では、低い報酬課題時のみに両側視床の神経賦活度が有意に低かった。

図 2

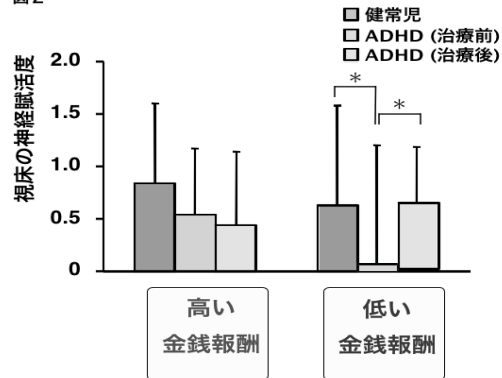


図 2. 健常児群と ADHD 群の視床の賦活度の違い：ADHD 患児では、未治療時に低下していた視床の賦活度が治療後に健常児レベルまで改善していた。

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

「主な発表論文等」

【学会発表】

Mizuno K, Tomoda A, Yoneda T, Watanabe Y. Neural substrates associated with reward system of ADHD using fMRI. 14th International Congress of ESCAP-European Society for Child and Adolescent Psychiatry (第14回欧州児童青年精神医学会), Helsinki, Finland

八ツ賀千穂, 豊久大樹, 松浦直己, 友田明美. 日本国内における ADHD 児の COMT 遺伝子多型解析, 第3回日本 ADHD 学会, 東京都

増田将人, 八ツ賀千穂, 濱田哲暢, 友田明美. 日本国内における ADHD 児のドパミン関連遺伝子の多型解析. 第3回日本 ADHD 学会, 東京都

Tomoda A, Mizuno K, Yoneda T. Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) in childhood and adolescence is associated with increased gray matter volume in the insula. 国際小児神経学会議 (第12回)・アジア大洋州小児神経学会議 (第11回) 合同会議, Brisbane, Australia

【原著論文】

Kawatani M, Hiratani M, Kometani H, Nakai A, Tsukahara H, Tomoda A, Mayumi M, Ohshima Y. Focal EEG abnormalities might reflect the neurophysiological characteristics of ADHD and PDD. Brain Dev, Jan 4, 2012.

Shi T, Li X, Song J, Zhao N, Sun C, Xia W, Wu L,

Tomoda A. EEG characteristics and visual cognitive function of children with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). Brain Dev, Mar 26, 2012.

Mizuno K, Yoneda T, Watanabe Y, Tomoda A. Neural substrates associated with reward system of ADHD using fMRI. Brain (Under Review).

Yatsuga C, Toyohisa D, Matsuura N, Hamada A, Tomoda A. Analysis of dopamine-related gene polymorphism in pediatric cases with ADHD. Brain Dev (Under Review).

【総説】

Coghil D, 林 隆, 氏家武, 友田明美, 清田晃生, 原田謙, 山下洋. 児童期および青年期の ADHD における薬物療法の個別化と最適化. 小児科臨床, 2012.

「特記事項」

神戸新聞掲載, 「ADHD 患者の脳の働き解明」

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究 (平成 23 年度) 「fMRI を用いた愛着障害の神経基盤の評価システム」, 友田明美 (代表) 2,210 千円

日本学術振興会: 日米科学技術協力事業「脳研究」分野グループ共同研究 (平成 23 年度) 「児童虐待に代表される小児期のストレスが脳発達におよぼす影響と敏感期解析」, 友田明美 (日本側代表) 1,400 千円

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「脳発達プロジェクト研究」

神経回路形成における細胞周期制御因子の新しい機能

研究代表者： 小西 慶幸（工学研究科・准教授）

概 要	細胞周期の制御因子である分裂後期促進因子（Cdh1-APC）は、分化後の神経細胞においても機能を持ち、軸索の伸長を特異的に制御する。本研究課題では Cdh1-APC が神経細胞において軸索という特定の細胞形態を制御する機構を明らかにする。細胞内で位置情報を担う要因として微小管の翻訳後修飾の関与を仮定し、これによって Cdh1-APC の下流因子が選択的に軸索に局在する可能性の検証を試みる。今期は、小脳の顆粒細胞の低密度培養とイメージングの解析系を立ち上げ、顆粒細胞において微小管修飾に依存した軸索への選択的輸送機構が存在することを示した。また、Cdh1-APC の下流で誘導される分子のうち、軸索に局在する分子が存在することを観察した。今後、これらの因子の局在が微小管修飾に依存することを示し、その分子機構と脳回路形成における機能を明らかにする。
関連キーワード	軸索、樹状突起、細胞周期、シグナル伝達、微小管

研究の背景および目的

軸索伸長制御における Cdh1-APC の機能は小脳顆粒細胞を用いて明らかにしてきたため、本研究では引き続き小脳顆粒細胞を用いて解析を進めることにした。一方、微小管修飾を介した軸索への局在制御は海馬錐体細胞を用いた解析により報告をしている。これは Banker らによって海馬錐体細胞の低密度が確立され、この細胞を用いて神経極性の制御や軸索への輸送特性などの解析が進んできたことによる。申請者の仮説を検証するために、

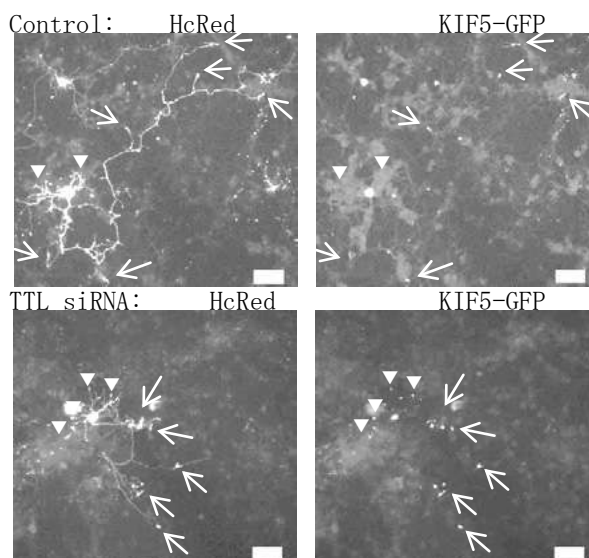
本研究課題では以下項目を具体的な目的とし実験を行った。(1) 小脳顆粒細胞においても低密度での培養を確立し、軸索や樹状突起への分子局在を解析する系を確立する。(2) 小脳顆粒細胞においても微小管修飾（チロシン化）に依存して軸索への輸送が制御されることを示す。(3) Cdh1-APC の下流で制御される因子のうち、軸索に局在する分子を同定する。

研究の内容および成果

(1) 小脳顆粒細胞は高密度で培養することで軸索や樹状突起を伸長させ、長期間安定的に生存させることが可能である。生後 5 日のマウス小脳から顆粒細胞を調整し、低密度（~4000 個/cm²）で培養を行った。この密度では数日で細胞は死滅してしまうが、フィーダー細胞として高密度の顆粒細胞自身、または生後 1 日のマウス大脳皮質から調整したアストロサイトと向かい合わせに共培養することで、維持することが可能になった。軸索と樹状突起のマーカーである Tau1 抗体と MAP2 抗体により免疫染色を行った結果、低密度で培養した顆粒は 1 本の軸索と樹状突起を形成し、正しく極性を形成することが確認された。

(2) 海馬錐体細胞においては、キネシンのモーター領域に GFP 蛍光タンパク質を融合した分子（KIF5-GFP）はキネシンの軸索認識の機構により軸索に特異的に輸送される。顆粒細胞（7DIV）における KIF5-GFP の局在を解析した結果、海馬錐体細胞と同様に軸索の先端に特異的に局在が確認された。さらに、微小管チロシン化酵素である TTL の siRNA を細胞に導入し、微小管修飾を阻害する

ことで、軸索のみに観察された KIF5-GFP のシグナルが樹状突起にも検出された（図 1）。このこと



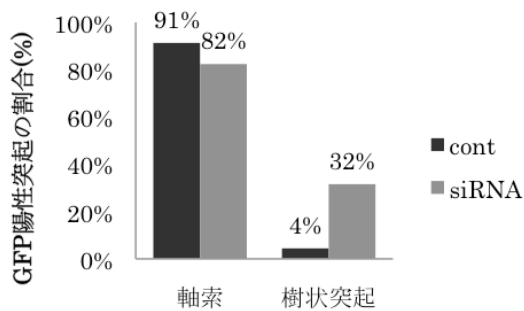


図1：TTL 阻害による顆粒細胞内の KIF5-GFP の局在変化 (スケール:20 μm)

から、微小管のチロシン化による翻訳後修飾は海馬錐体神経細胞のみならず小脳顆粒細胞においてもキネシンの輸送方向の制御を介して軸索への特異的な物質輸送に寄与していることが示唆された。

(3) これまでの研究で、Cdh1-APC は核内において転写因子 SnoN のユビキチン化-タンパク質分解を介して転写を制御し、軸索の伸長を抑制することが明らかとなっている。Ikeuchi らにより、DNA マイクロアレイを用いて小脳顆粒細胞における SnoN の標的因子の探索がなされた。SnoN の抑制により半分以上に発現が減少した 8 遺伝子のうち、細胞骨格や細胞接着への関与が示唆される 4 因子 (Tropomyosin1, Tropomyosin3, Ccd1, Talin1) を Cdh1-APC-SnoN の下流で直接的に軸索形態を制御する因子の候補とし、これらの因子が軸索に局在するか否かについて確認を行った。Tropomyosin1, 3 については Iowa 大学のハイブリドーマバンクから抗体を入手し免疫染色を行った。Ccd1, Talin1 については Harvard 大学 Bonni 博士、Leicester 大学 Critchley 博士との共同研究として GFP 融合タンパク質の発現ベクターを入手した。低密度で培養した顆粒細胞において Tropomyosin1, Tropomyosin3 の免疫染色を行っ

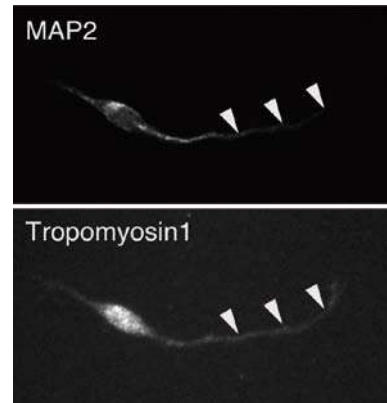


図2：培養2日目の Tropomyosin1 の免疫染色。矢尻は軸索を示す。

たところ、Tropomyosin3 は神経細胞において発現が弱かったが、Tropomyosin1 は神経細胞の軸索に局在が観察された (図2)。

また、GFP-Ccd1 を発現した顆粒細胞でその蛍光シグナルの分布を観察した結果、突起を伸長しはじめた神経細胞において軸索の先端に局在が観察された。より形態形成の進んだ神経細胞では樹状突起にもシグナルが観察され、極性の確立、軸索の形成が行われる初期の神経細胞で一過的に軸索に局在する可能性が示唆された。GFP-Talin1 は細胞全体に分布が観察された。これまでの研究で、本研究課題を遂行するための実験系を確立し、微小管修飾を介した軸索輸送制御の普遍性を示すことができた。また、Cdh1-APC の下流因子のうち少なくとも Tropomyosin1 および Ccd1 は軸索に局在することが示され、これらの因子が局所的に神経突起の形態を制御する可能性が示唆された。今後これら Cdh1-APC 下流因子の局在解析を継続すると共に、微小管の修飾に依存して細胞内局在が変化するか否かを解析する予定である。

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

「主な発表論文等」

Yang H, Sugiura Y, Ikegami K, Konishi Y, Setou M. Axonal gradient of arachidonic acid-containing phosphatidylcholine. *J Biol Chem.* 287(8):5290-300 (2012)

「特記事項」

(学会発表) 小西慶幸. 軸索形態制御に関わる翻訳後修飾を介した細胞内分子機構：軸索伸長および軸索識別についての研究. 第54回日本神経化学学会大会 2011/9/26-28 石川

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

内藤記念科学奨励金・平成23年度・代表・採択・3,000千円
 稲盛財団研究助成・平成24年度・代表・採択・1,000千円
 科学研究費補助事業 新学術領域研究 (公募研究) ・平成24-25年度・代表・申請中
 科学研究費補助事業 基盤研究 (B) 平成24-25年度・分担・申請中

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

in vitro および in vivo イメージングを用いて聴覚神経回路における 聴覚情報の統合の仕組みを探る

研究代表者： 伊藤 哲史（医学部・助教）
共同研究者： 池田 弘（工学研究科・教授）

概 要	音情報は多数の神経核によって特徴が抽出される。抽出された情報が収束する下丘で音情報が統合されると考えられるが、その統合がどの細胞で行われるか不明であった。下丘局所回路での情報処理様式を調べるため3つの実験を行った。第1に、組み換えウイルスを用いたニューロン標識によって、下丘大型抑制性ニューロンに対する情報の収束や放散の仕組みを可視化することに成功した。第2に、下丘スライスを用いて下丘への入力線維と下丘ニューロンの活動を切り分けて可視化することに成功した。第3に、生体マウスの下丘の多数の神経活動を可視化するための最適条件を決定することができた。これらのイメージング技術を組み合わせて下丘での情報処理、情報統合の仕組みを可視化することが可能であると考えられる。
関連キーワード	聴覚、電位イメージング、カルシウムイメージング、神経回路

研究の背景および目的

自然環境は周波数成分や時間変化に富んだ複雑な音に満ちている。聴覚系の一番明瞭な機能地図が周波数地図（トノトビー：同一最適周波数を持つ細胞が縞状に並ぶ）であることから従来の聴覚研究で用いられてきた純音は時間構造が定常であるが、そのような音は生物学的意義に乏しい。コミュニケーション音は音圧や周波数が複雑に時間変化するし、獲物/捕食者の立てる足音は音空間で時間に伴い移動することからわかるように、ダイナミックに変動する音こそが生物学的に重要である。このため音の時間変化について検出する神経回路が聴覚系に存在する。たとえば一部のニューロンは純音には殆ど応答せず、上昇する周波数変調音（FM）に応答する一方、同じスペクトルの下降 FM 音には応答しない。下丘は下位の聴覚神経核で並列処理された聴覚情報が初めて収束する場所であり、FM 音などの複雑音に特異的に応答する細胞が出現する。ではこのような複雑音に選好性を持つ細胞は形態学的に同定可能であろうか？

申請者が最近発見した下丘のニューロンの約10%を占める大型抑制性細胞（Ito et al., 2009）は、VGLUT2 陽性興奮性終末をその細胞体の周りに密

に受ける。ここで、VGLUT2 は聴覚系細胞の多くが発現することから、この大型抑制性細胞がさまざまな聴覚系神経核からの情報を統合することが想定される。さらに、下丘の多くの神経細胞が特定の周波数の音に対応した入力を受けるのに対し、大型抑制性細胞はさまざまな周波数からの音を統合するのに適した形態を有している。このことから大型抑制性細胞は様々な聴覚情報を統合する、つまり複雑音への選好性を持ちうる形態を有していると考えられる。

大型抑制性細胞が下丘や下丘下の多数の興奮性ニューロンの活動を統合して複雑な音への応答を作り出す、という仮説を検証するためには、多数の大型抑制性細胞と興奮性細胞が作る神経ネットワークの構築を調べ、それが生体内でどのように応答するか調べる必要がある。

本研究は、申請者が得意とする局所神経回路の分析に加え、下丘の興奮性と抑制性細胞集団の活動を機能イメージング技法によって調べる。これによって大型抑制性細胞の聴覚情報処理における役割が解明することを目的とする。

研究の内容および成果

下丘の局所神経回路の構築とその機能を解明するため、以下に挙げる3種類の実験を行った。

1：組み換えウイルスを用いた下丘大型抑制性細胞への興奮性入力の解析

Sindbis palGFP ウイルスや Sindbis pal-mRFP ウイ

ルスを下丘や、下丘に投射する下位神経核に注入したところ、標識終末の一部が大型抑制性細胞細胞体に接触するさまが観察された。単一終末レベルの解析から、1個の大型抑制性細胞の細胞体上に約300個の興奮性ニューロンの軸索が終末を

作っていると概算された。また、単一下丘興奮性細胞を標識することで、興奮性細胞は周囲の大型抑制性細胞を支配していることも明らかになった(図1)。さらに2つの神経核に2種類のウイルスを打ち分けることで、単一大型抑制性細胞の細胞体上に複数の神経核からの入力収束することも明らかとなった。

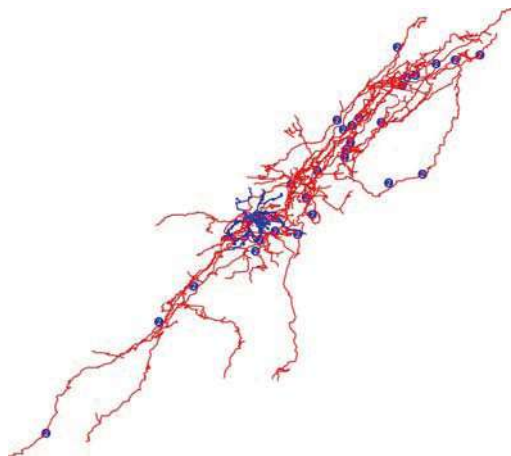


図1. 下丘単一興奮性細胞の再構築画像。この細胞は30個の大型抑制性細胞(丸)を支配しており、それらは単一下丘の層板(トノトピー構造を反映する)に並んでいる。

2: 下丘スライスを用いた、下丘内の興奮伝播様式の解明と抑制性、興奮性伝達の役割についての解析

電位感受性色素で染めた下丘スライスを入力線維が通る部位で刺激したところ、下丘中心核を経由し背側核へ達する経路と、外側核を上行する経路の2つを通して神経活動が伝播することが明らかとなった。この経路は抑制性伝達を遮断しても変化しなかった。抑制性伝達の遮断によって背側核や外側核の活動が大きく上昇したのに対し、中

心核では上昇の度合いは小さかった。

また、興奮性伝達を遮断すると、中心核や外側核下部でわずかに刺激直後の活動が残存したものの、それ以外の領域で活動が消失した。カルシウムイメージングで活動が残存した領域を観察したところ、興奮性伝達の遮断によって活動細胞体は見られなくなった。このことは、興奮性伝達の遮断によって残存する活動が入力線維の活動であることを示す。以上のことから、下丘中心核では入力線維そのものの活動が重要であるのに対し、それ以外の領域では下丘興奮性細胞と抑制性細胞の相互作用によって複雑な活動が引き起こされることを示唆している。

3: 生体マウス下丘のカルシウムイメージング

生体マウスの下丘に蛍光カルシウム指示薬を負荷することによって、下丘細胞の活動を可視化することが可能であるが、この際、呼吸や心拍などのアーティファクトが問題になってきた。麻酔薬や、指示薬の負荷法、頭部の固定法などを比較検討した。

キシラジンを混合した麻酔薬を用いることで、劇的に拍動を低下させることができた。これはキシラジンの降圧効果によるものと考えられた。指示薬の負荷を再現性よく行うためにミリ秒単位で作動するタイマーで制御されるガス注入装置を開発した。更に、頭部の固定に頻用されるイヤバーは音刺激の際にイヤバー内部での音の残響が問題になることが明らかになったため、頭蓋骨を直接接着剤で固定するヘッドプレート固定法を採用した。ヘッドプレート固定によっても安定した固定を得ることに成功している。

この結果、工学部のニポウディスク顕微鏡、医学部の二光子顕微鏡の何れでも安定した生体イメージングが可能になった。さらに、GAD67-GFPマウスに蛍光カルシウム指示薬を負荷することによって、抑制性細胞を同定した上でイメージングすることも可能となった。

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

「主な発表論文等」

論文を1本投稿中、1本は投稿準備中である。

また、本研究の一部は

平田雄大 他 「電位イメージング法とカルシウムイメージング法による下丘トノトピー構造への抑制性入力の影響の解明」、2011年 神経科学学会

平成23年度工学研究科修士課程修了論文(平田雄大、古川博史)、平成23年度工学部卒業論文(廣瀬潤一)にて発表された。

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

助成組織・助成制度・種目・期間・研究課題・代

表/分担・採否・採択金額など

かなえ医薬振興財団 研究助成金 2011年度 「聴覚神経回路の集団機能イメージングを用いて聴覚情報の統合の仕組みを探る」代表 不採択

武田科学振興財団 2011年度 医学系研究奨励

「音情報の統合の仕組みを形から迫る-形態学、in vivo/ vitro 機能イメージング-」代表 不採択

内藤記念科学奨励金(研究助成) 2011年度

「音情報の統合の仕組みを形から迫る -形態学、in vivo/ in vitro 機能イメージング-」代表 不採択

第一三共生命科学研究振興財団 平成23年度(第29回)研究助成「音情報の統合の仕組みを形から

迫る-形態学、in vivo/ vitro 機能イメージング-」代表 不採択

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

PSD 95 関連分子による AMPA 受容体制御について

研究代表者： 謝 敏珏（医学部・助教）

研究分担者： 佐藤 真（医学部・教授）

概 要	シナプス形成に関与する蛋白質の異常により学習障害、痴呆や自閉症の精神症状発現が引き起こされることが近年知られるようになってきた。しかし、興奮性シナプス伝達とその可塑性変化を担うグルタミン酸受容体である AMPA 受容体(AMPA-R)を制御する分子機構の解明自体はいまだ十分ではない。我々は、細胞骨格関連因子である分子がスパイン形成および成熟に関わることを <i>in vitro</i> 系にて見出ししているが、最近同分子のノックアウトマウスにおいて、 <i>in vivo</i> 系でもスパイン成熟に関わることを見出した。さらに、長期抑圧(LTD)をおこすと AMPA-R のエンドサイトーシスが阻害されたことから、この分子が LTD のシナプス可塑性に関連し、AMPA-R の輸送を制御することが明らかとなった。
関連キーワード	LL5β、シナプス、ノックアウトマウス、LTD、LTP

研究の背景および目的

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

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

我々は、PIP3 と特異的に結合する PH (pleckstrin homology)domain を持つ LL5β (PHLDB2;pleckstrin homology-like domain, family B, member 2) (Takabayashi, T and Xie M-J et al., *J. Biol. Chem.* 13:36;2010)の解析を進めていたが、その過程で、この分子が神経細胞に発現し、PSD に存在する足場蛋白質である PSD-95 やカルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素 II(CaMKII)、AMPA-R およびアクチン結合たんぱく質 drebrin A に結合することを見出した。

シナプスは脳の情報伝達機構の基盤であり、学習・記憶など高次機能の実態として、刺激により変化しうる可塑性と呼ばれる柔軟性を持つ。シナプス可塑性に中心的な役割を担うグルタミン酸受容体の細胞表面量がどのような分子により調節されているのか、またその調節機構はどのようなものであるのかについて十分ではない。

本研究では、現在まで進めてきた LL5β の解析をさらに展開し、LL5β のシナプス後肥厚部(PSD)分子複合体への働きを解析し、シナプス形成から成熟に至る分子過程を解き明かし、さらには学習・記憶などの脳高次機能と密接に関わる LTP および LTD に対する LL5β の役割を解明する。

研究の内容および成果

以下の成果を得た。

(1)スパイン形成時期の海馬において LL5β の海馬

での発現を確認した。

(2) LL5 β ノックアウトマウスを作製した。LL5 β exon 2 を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟むターゲティングベクターを構築し、このような遺伝子座を持つ flox マウスを作製した。その後、この flox マウスを tnapCre 発現マウスとかけ合わせることで、LL5 β の exon 2 の欠損マウスを得た。LL5 β ノックアウトマウスでは LL5 β の発現が大脳皮質および海馬にて欠損していることを Western blot 法により確認した。その他、腎臓、肺、肝臓などの臓器に対しても LL5 β ノックアウトマウスでは LL5 β の発現の欠損を確認した。

(3) LL5 β ノックアウトマウスにて、LL5 β がスパイン成熟に重要な役割を果たしていることを明らかにした。シナプス成熟過程では、未成熟なフィロポディアや thin 型スパインが形成され、その後、成熟に伴い形態が stubby 型や mushroom 型のスパインとなることが知られている。Golgi 染色法により、生後 3 週齢マウスの脳切片を用いて、CA1 錐体細胞のスパイン形態変化を検討した。LL5 β ノックアウトマウスではフィロポディア型の未成熟型スパインを多数認めた。この結果は *in vitro* 系にて報告されている LL5 β をノックダウンした海馬神経細胞のスパインでは、フィロポディアもしくは thin 型の未成熟型スパインを増加した結果と一致したことから、LL5 β はスパイン成熟に重要な役割を果たすと証明された。

(4) LL5 β がシナプス可塑性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。海馬培養細胞に LL5 β 発現ベクターを導入し、その後 NMDA 処理により LTD をおこすと、LL5 β がスパイン内部から樹状突起シャフトへの局在変化するを見出したが、LTP をおこすと LL5 β の局在変化がみられなかった。このことから LL5 β がシナプス可塑性(特に LTD) に重要な役割を果たしていると考えられた。

(5) LL5 β が AMPA-R の輸送を制御することを見出した。培養海馬神経細胞に HA tag をつけた AMPA-R を発現するベクターを導入し、LTD 誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面上における AMPA-R の発現量の変化を検討した。AMPA-R 発現量は HA を免疫染色し、定量化した。野生型神経細胞では LTD 誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面に局在する AMPA-R 量が減少し、細胞内に移動したことを観察した。一方、LL5 β ノックアウトマウスでは LTD 誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面に局在する AMPA-R 量の変化が観察されなかった。このことより、AMPA-R のエンドサイトーシス阻害がされたと考えられた。以上のことから、LL5 β は AMPA-R の輸送を制御すると想定された。

これらの結果より、LL5 β はスパインの成熟に関わり、学習・記憶に関わるスパインでの分子メカニズムの重要な一翼を担うと想定された。

本助成による主な発表論文

「発表論文」

Takabayashi, T*, Xie, M-J*, Takeuchi, S., Kawasaki, M., Yagi, H., Okamoto, M., Tariqur, R.M., Malik, F., Kuroda, K., Kubota, C., Fujieda, S., Nagano, T. and Sato, M. LL5 β directs the translocation of Filamin A and SHIP2 to sites of PtdIns(3, 4, 5) P3 accumulation and PtdIns(3, 4, 5) P3 localization is mutually modified by co-recruited SHIP2. *J.Biol.Chem* 13:36; 2010. *謝 (Xie, M-J.) を含む 2 名は筆頭著者扱い。

「学会発表」

謝敏カク, 黒田一樹, 八木秀司, 駒田致和, 猪口徳一, 佐藤真. 大脳皮質形成期の法線方向移動における神経細胞の多極性から双極性への形態変化に

成長円錐が重要である. 第 116 回日本解剖学会全国学術集会・第 88 回日本生理学会大会, 2011, 3, 誌上開催, *J. Physiol.Sci* 61:1, S287.

謝敏カク, 八木秀司, 黒田一樹, 駒田致和, 猪口徳一, 佐藤真. 大脳皮質での glia-guided locomotion の開始には、樹状突起の成長円錐が重要である. 第 34 回日本神経科学大会 2011, 9, 横浜.

Xie, M-J., Yagi, H., Kuroda K., Wang C-C, Komada M., Iguchi, T.Sato, M. Dendritic growth cone activities are essential for completing multipolar-bipolar transition and starting glia-guided locomotion. *Neuroscience* 2011, 11, Washington.

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

アダプター蛋白質 3BP2 の B 細胞における生理機能に関する研究

研究代表者： 千原 一泰 (医学部・准教授)

共同研究者： 定 清直 (医学部・教授)、竹内 健司 (医学部・学内講師)

概 要	
我々の研究室ではこれまでに、アダプター蛋白質 3BP2 が B 細胞受容体刺激により Syk によるチロシンリン酸化を受け、転写因子 NFAT の活性化を調節する事を明らかにしている。本研究ではジーンターゲティングの手法により新たに 3BP2 欠損 B 細胞株を作成し、B 細胞受容体シグナル伝達における 3BP2 の生理機能をより詳細に明らかにする事を目的とする。現在までに得られた研究成果を以下に示す。① 3BP2 欠損 B 細胞株の樹立に成功した。② 3BP2 の欠損は B 細胞受容体刺激による細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルや、NF- κ B の活性化に対して顕著な影響を与えなかった。③ 3BP2 の欠損は Rac1 蛋白質の活性化レベルを上昇させた。④ 3BP2 と会合する分子量約 100kDa のチロシンリン酸化蛋白質を新たに見出した。	
関連キーワード	アダプター蛋白質、チロシンリン酸化、3BP2、B 細胞受容体

研究の背景および目的

【研究の背景】

アダプター蛋白質 3BP2(c-Abl SH3-domain binding protein-2)は c-Abl の SH3 ドメインに会合する機能不明の分子として同定された。これまで我々は 3BP2 がマスト細胞の脱顆粒反応を促進すること (Sada *et al.* *Blood* 2002)、Syk によりリン酸化される部位がチロシン 174、183、446 の 3 箇所、Lyn と会合しリガンドとして活性化すること (Maeno *et al.* *J. Biol. Chem.* 2003)、これらのリン酸化が T 細胞の NFAT 活性化を促進すること (Qu *et al.* *Biochemistry* 2005)を明らかにした。その後、海外の研究グループにより、3BP2 の発現がリンパ球、マスト細胞の他、破骨細胞にも認められ、B 細胞に最も高い発現が見られることや、3BP2 欠損マウスの表現型が顕著ではなく、B 細胞の成熟や腹腔内 B1 細胞の分化に影響があることなどが明らかとなった (de la Fuente *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 2006; Chen *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 2007)。さらに、我々は B 細胞抗原受容体刺激による 3BP2 のチロシンリン酸化に Syk が不可欠であることを見だし、チロシンリン酸化を受けた 3BP2 が Vav1、PLC γ 2、BLNK と複合体を形成し、NFAT の活性化を促進することを明らかにした (Shukla *et al.* *J. Biol. Chem.* 2009)。また、マスト細胞においては 3BP2 が抗原刺激に応じて SHP-1 と会合し、TNF- α の産生を促進することを明らかにした (Chihara *et al.* *Genes Cells*, 2011)。

【研究の目的】

本研究では 3BP2 の生理機能を詳細に解析する事

を目的とし、ジーンターゲティングの手法により新たに樹立する 3BP2 欠損 B 細胞株や新規抗 3BP2 抗体を用いて、免疫系、特に B 細胞における 3BP2 の生理機能について分子遺伝学的解析を行う。具体的には以下の点に焦点を当て研究を進める。

1) ジーンターゲティング法による 3BP2 欠損 (ノックアウト) 細胞の作成

ニトリ Pre-B 細胞株である DT40 細胞の 3BP2 ゲノム領域をジーンターゲティング法により破壊し、3BP2 欠損 B 細胞株を樹立する。この細胞を用いて B 細胞抗原受容体を介する 3BP2 会合分子のチロシンリン酸化や転写因子 NFAT、更に NF- κ B への影響について解析を行う。

2) B 細胞シグナル経路の分子解剖 (molecular dissection)

免疫系組織の分化・増殖に必要なチロシンキナーゼ (Syk、Lyn、Abl、Arg) を欠損する DT40 細胞における 3BP2 のチロシンリン酸化を解析する。また、3BP2 の各種変異体を用いて、会合分子やシグナル伝達への影響を明らかにする。

3) 免疫系組織における 3BP2 の発現解析

3BP2 は臓器別では脾臓に最も強い発現が認められる。そこで、脾臓における 3BP2 の発現部位と細胞を明らかにする。また、3BP2 isoform の機能的差異を明らかにする。

4) 感染免疫応答における 3BP2 の役割についての解析

B 細胞へのウイルス感染動物モデルを用いて、脾臓やリンパ節における 3BP2 の機能について解析する。

研究の内容および成果

1) ジーンターゲティング法による 3BP2 欠損 (ノックアウト) 細胞の作成

ニトリ 3BP2 遺伝子は第 4 染色体に存在し、そのゲノム DNA の塩基配列が明らかとなっている。

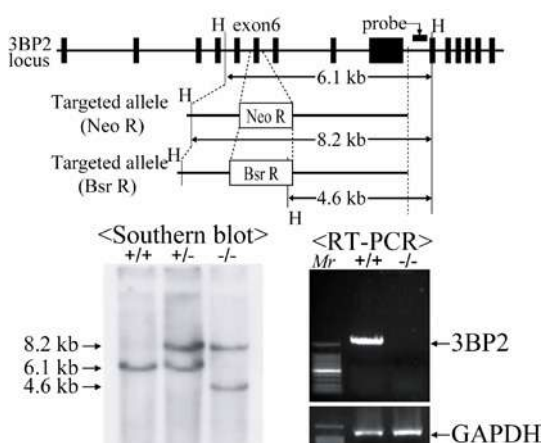


図1) 3BP2 欠損 B 細胞株の作成

そこで、エクソン4からエクソン9を含むゲノム領域をPCRで増幅し、エクソン6をNeo耐性遺伝子、あるいはBlasticidinS耐性遺伝子に置換し、ターゲティングベクターを構築した。ターゲティングベクターの導入により薬剤耐性となった細胞をスクリーニングし、得られたクローンの3BP2ゲノム領域にターゲティングベクター由来のDNAが組み込まれているのかサザンブロットにより解析した。その結果、3BP2欠損細胞の樹立に成功した事を確認した。3BP2欠損細胞ではmRNAレベルで3BP2の発現が認められない事をRT-PCRにより確認している(図1)。

2) B細胞シグナル経路の分子解剖 (molecular dissection)

A) 細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルに与える影響: 野生型細胞と3BP2欠損細胞をそれぞれ抗IgM抗体で刺激し、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルを抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロットにより解析した。その結果、3BP2の欠損は細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルに顕著な影響を与えなかった。それゆえ、3BP2はB細胞受容体シグナルの始点に作用するのではなく、下流に位置するシグナル分子に特異的に作用

すると考えられた。この仮説を強固にするために、今後3BP2がB細胞受容体の発現レベルに与える影響をフローサイトメトリーにより解析しておく。

B) 3BP2 会合分子のチロシンリン酸化に与える影響: 3BP2の欠損はB細胞受容体刺激によるPLC γ 2のチロシンリン酸化に影響を与えなかった。また、B細胞受容体刺激による細胞内カルシウムレベルの上昇にも影響は認められなかった。遺伝子導入により、3BP2の発現量を増やすとNFATの活性化が増強されることから、通常よりも3BP2の発現が増加する状態において、PLC γ 2の活性化が増強されると考えられた。Vav1のチロシンリン酸化レベルに与える影響は現在入手可能な抗体が無いため、タグを付けたVav1遺伝子を細胞に発現させることで今後解析を進める。

C) NF- κ Bの活性化に及ぼす影響: ルシフェラーゼアッセイによる解析から、定常状態および抗IgM抗体で刺激した細胞において、3BP2の欠損はNF- κ Bの活性化に影響を与えなかった。

D) 低分子量GTP結合蛋白質Rac1の活性化状態に及ぼす影響: PAK1のp21-binding domainを用いたpull-downアッセイによる解析から、3BP2の欠損によりRac1の活性化レベルの上昇が認められた。この現象が3BP2の遺伝子発現の有無に依存している事を明らかにする目的で、3BP2欠損細胞に3BP2の発現を戻したrevertant細胞を作成した。現在、この細胞を用いて3BP2がRac1の活性化に抑制的に働くのか、確認を急いでいる。

E) 新たな3BP2会合分子の発見: HAタグを付した3BP2を過剰発現するDT40細胞を抗IgM抗体で刺激し、3BP2を免疫沈降したところ、3BP2に会合する分子量約100kDaの蛋白質を見出した。今後、質量分析を行い、この分子の同定を行う。

【研究の目的】に示した3) 免疫系組織における3BP2の発現解析および、4) 感染免疫応答における3BP2の役割についても今後解析を進める。

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

「主な発表論文等」

<日本語総説>

① 中島謙治、千原一泰、竹内健司、定 清直 「次世代低分子化合物: Syk 阻害薬. 特集 関節リウマチの最新情報-寛解を目指した診断と治療の最新展開-」、最新医学 67(2), 101-106, 2012

② 千原一泰、中島謙治、竹内健司、定 清直 「Spleen tyrosine kinase(Syk)の生理的役割とその阻害薬の作用」、リウマチ科、投稿中

<学会発表>

① Sada, K., Nakashima, K., Ogi, K. and Chihara, K. 「Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates

BCR-mediated activation of NFAT」 Immunology 2011, 2011.

② Chihara, K., Nakashima, K., Takeuchi, K. and Sada, K. 「Association of 3BP2 with SHP-1 regulates SHP-1-mediated production of TNF- α in RBL-2H3 cells」第34回日本分子生物学会年会、2011.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金 基盤研究(C) 2012年度

「アダプター蛋白質3BP2によるB細胞活性化調節機構の分子遺伝学的解析」 代表 申請中

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

SNI 結合分子の探索と溶血性連鎖球菌特異的抗生剤の開発

研究代表者： 藤井 豊（医学部・教授）、浅原 雅浩（教育地域科学部・准教授）

共同研究者： 田中 幸枝（医学部・助教）、浦崎 芳正（医学部・講師）

概 要
<p>SNI (Streptococcus NADase Inhibitor) は、溶連菌毒素である NADase と共発現することで病原菌自身の保全を図っている。そのため、SNI の機能阻害剤 (SNII) の開発を目指し、多様な生物資源から、SNI 機能阻害物質の探索を行った。そのアッセイ系として、NADase/SNI 複合体からの NADase の復活活性を指標として用いた。その結果、カビ、キノコ、植物および動物などの抽出成分に、NADase の復活活性を示す有効な成分の存在が判った。キノコ抽出成分では、分子量約 2,000 の化合物が、NADase/SNI 複合体からの NADase の復活に有効であることが解った。一方、カビ抽出成分には強い NADase 阻害活性が認められた。</p>
関連キーワード
NADase、SNI、阻害剤、活性化、溶連菌

研究の背景および目的

【背景】 A 群β溶血性連鎖球菌 (Group A β-hemolytic *Streptococcus pyogenes*: GAS) は、小児に多く見られる上気道感染症 (扁桃腺炎、咽頭炎) を引き起こす病原菌である。その病原機構は、菌体内で産生された溶血毒素ストレプトリジン O (SLO) を分泌し、宿主細胞膜に蛋白質が通り抜けられる細孔を開けて、酵素蛋白 NADase を送り込み、宿主細胞内の補酵素 NAD⁺ を分解枯渇してエネルギー産生をブロックすることで細胞に大きな障害を与えるというものである。

SLO 遺伝子 (*slo*) の上流には、NADase 遺伝子 (*nga*) がある。SLO はそのプロモーターからポリシストロニックに転写され、NADase と同時に翻訳される。このことから、SLO は単に宿主細胞に細孔を開ける溶血毒素ではなく、NADase を宿主細胞内に輸送するシステムとして機能していると考えられるようになった (BBA 1681:134, 2005)。また、SLO と NADase の間に機能不明な第 3 の遺伝子が 1 つある。これら 3 つの遺伝子がオペロンを形成しているのにはそれなりの理由があると考え検討したところ、その第 3 遺伝子産物が NADase と 1:1 で強力に結合し、NADase 活性を

完全に阻害することを明らかにした。この阻害蛋白質を Streptococcal NADase Inhibitor (SNI) と命名した (JBC 281:9181, 2006)。溶連菌自身を NADase の酵素活性から防御するための巧みな仕組みがそこにあった (日経産業新聞 H18/7/18 (特撰 2005-254512-特許 4270466))。NADase は分泌蛋白質で、N 末端シグナルペプチドが付いて発現されるが、それでも完全な酵素活性を示す。この仕組みを逆にとり、菌体内の SNI の機能を阻害する薬物 (SNI-Inhibitor=SNII) または SNI による封じ込められた NADase 活性を復活させる薬物を投与すれば、NADase の活性を菌体内で封じ込めることができず、自身の NAD⁺ を分解枯渇してしまうに違いない。従って、この原理を応用すれば、病原性溶連菌の新しい抗生剤の開発が可能になる。

【目的】 NADase/SNI 複合体からの NADase の復活活性を指標として、SNI の機能を阻止する物質をカビ、キノコ、動植物抽出物やタンパク質分解酵素阻害剤など合成物および天然物からスクリーニングし、その化合物を SNI 阻害剤 (SNI Inhibitor:SNII) として、溶血性連鎖球菌に特異的な抗生剤の開発を目指す。

研究の内容および成果

【研究内容・成果・考察】 NADase/SNI 複合体からの NADase 復活活性を有する天然物スクリーニング

カビ (オアカビとシロカビ) 2 種、キノコ 28 種、植物 5 種の他、lysozyme とタンパク質分解酵素阻害剤 (ロシュ、complete、EDTA-free、Protease

Inhibitor Cocktail) の NADase/SNI 複合体からの NADase 復活活性をスクリーニングした (図 1、図 2)。SNI 結合型 NADase には、非常に弱いながらも活性がある。いろいろな化合物を添加して、NADase 活性の増強復活が認められれば、結果的に SNI 機能の阻害を意味するが、その効果が SNI

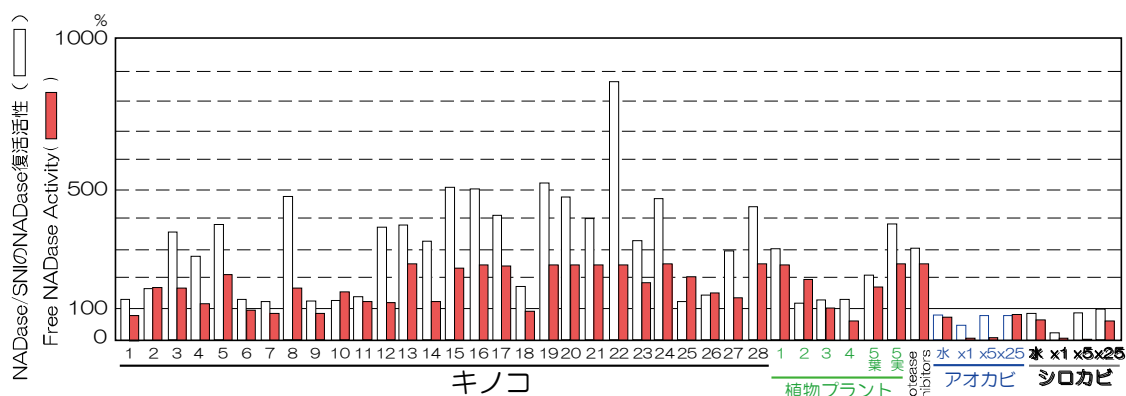


図1 キノコ、植物プラントおよびカビ抽出エキスとタンパク質分解酵素阻害剤によるフリー-NADase および SNI 結合型 NADase 活性に及ぼす影響。

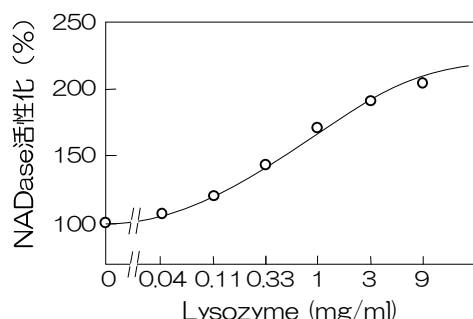


図2 Lysozyme による NADase の活性化

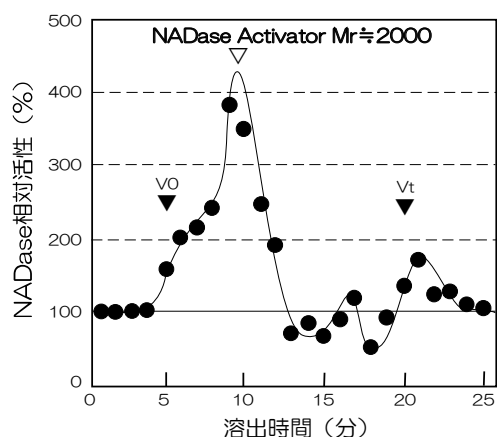


図3 キノコ22成分のスーパーデックスペプチドカラムによりゲル濾過分析
0.1M Na-phosphate, pH7.4

に直接的か間接的かを判断する目的で、SNI フリーの NADase 活性に与える影響をコントロールとした。

乾燥したキノコおよび植物の水抽出エキスは、殆どの場合、SNI 結合型 NADase の増強復活活性が認められ、中には 10 倍ほどの活性化を引起す例が認められた。しかし、すべてのケースで、フリーの NADase も活性化している。動物由来では、卵白由来の lysozyme 水溶液（生化学工業、6 回再結晶）に同じく NADase の活性化がみられた（図 2）。以前の研究で、溶菌に使用した lysozyme が NADase/SNI 複合体と一緒に精製されてきたことから、lysozyme の効果を検討した。

他方、大変面白いことにタンパク質分解酵素阻害剤（セリンおよびチオールプロテアーゼ阻害剤：アンチパイン、ベスタチン、キモスタチン、E64、ロイペプチン、ペプスタチン等のカクテル）にも SNI 結合型 NADase の増強復活活性が認められたことである。しかしながら、これも NADase を直接活性化することによるものと思われた。

最も SNI 結合型 NADase の増強復活活性が認められたキノコ 22 の成分をさらにスーパーデックスペプチドカラムによりゲル濾過分析した（図 3）。分子量 2000 の位置に強い NADase の活性化因子 Activator が溶出してきた。さらに低分子側には、弱いながらも阻害因子が溶出している。

一方、カビ抽出エキスには強い阻害因子 inhibitor が存在している。抗生剤としての用途より、すでに菌体外に分泌された NADase をブロックする用途としての価値がある。

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

「主な発表論文等」「特記事項」なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- ① H23～25 年度科研費・基盤研究 (C)、分担 (研究代表者：田中幸枝)、「多剤耐性菌出現リスクを回避するための溶血性連鎖球菌専用抗生

剤の開発」

- ② 富山大学和漢医薬学研究所・H24 年度共同研究探査プロジェクト・代表：藤井豊、分担：田中幸枝、「A 群溶血性連鎖球菌咽頭炎治療薬の和漢医薬探査研究プロジェクト」

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

生殖腺体細胞の性差構築の分子機構の解析

研究代表者： 矢澤 隆志 (医学部・学内講師)

概 要	精巣と卵巣は、ステロイドホルモンを初めとする性ホルモンの産生を通じからだ全体に性差を誘導する。性差の構築は、精巣と卵巣の体細胞が、性特異的なホルモンを産生するよう分化することであると言える。よって、ホルモン産生を行う生殖腺体細胞の性差を知ることは、性分化の本質を知ることになると考えられる。これまでの研究により、生殖腺体細胞で性差を持って発現する多くの遺伝子が同定されている。本研究では、その中で精巣で強い発現が観察される HMG 合成酵素である Hmgcs2 遺伝子に着目した。ノックダウンや過剰発現の実験から Hmgcs2 は、ライディッヒ細胞において、ケトン体の合成やステロイドホルモンの産生に重要な役割を果たしていることが分かった。その一方で、肝臓において明らかとされているような転写調節に関する役割は、ライディッヒ細胞において果たさないことが分かった。
関連キーワード	Hmgcs2、ライディッヒ細胞、性差、生殖腺体細胞、SF-1

研究の背景および目的

高等脊椎動物の生殖腺は中間中胚葉に由来し、副腎皮質と起源を共にする。これは、生殖腺と副腎皮質がステロイドホルモンを産生するという共通の機能を有することからも明らかである。このステロイドホルモン産生機能に深く関与しているのが、オーファン核内受容体の SF-1 である。SF-1 は、生殖腺の体細胞に発現し、ステロイド合成酵素や性分化に関わる因子の転写を司る転写因子である。私は、生殖腺や副腎皮質と同じ中胚葉由来の間葉系幹細胞に SF-1 を安定導入し、培地に cAMP を添加することによりライディッヒ細胞や副腎皮質のコルチゾール産生細胞に分化誘導することに成功している。現在、この細胞を用いて、ステロイドホルモン産生細胞の発生・分化の詳細な解析を行うことが可能となった(Yazawa et al. Endocrinology, 2006, 2008, 2009; Mol Endo. 2010)。

生殖腺、すなわち精巣と卵巣は、ステロイドホルモンを初めとする性ホルモンの産生を通じ、からだ全体に性差を誘導する。すなわち性差の構築は、精巣と卵巣の体細胞が、性特異的なホルモンを産生するよう分化することであると言える。よって、ホルモン産生を行う生殖腺体細胞の性差を知ることは、性分化の本質を知ることになると考えられる。これまでの研究から、

多くの遺伝子が、生殖腺体細胞で性差を持って発現し、性差の構築に貢献していることが知られているものの、不明な点が多く残されている。これは生殖腺が性ホルモンを産生する体細胞に加えて、生殖細胞など多くの細胞系列から形成されるため、解析が困難であることが理由に挙げられる。私たちが、確立した幹細胞から生殖腺体細胞を分化させる系は、このような問題を解決し、性差を調べるための有用な系となりうる。

実際に、私は、幹細胞由来の生殖腺体細胞を解析することにより、これまでに報告されていない性差を持って生殖腺に発現する遺伝子群を同定している。本研究では、これらの遺伝子のうち HMG 合成酵素である Hmgcs2 遺伝子に着目した。Hmgcs2 は、肝臓においてケトン体合成の律速酵素として働くことがよく知られている。生殖腺においては精巣のライディッヒ細胞で強い発現が見られるが、卵巣では、その発現を検出することができない。そこで、Hmgcs2 の精巣 (ライディッヒ細胞) における転写調節機構ならびに、機能を調べることにより生殖腺体細胞の性差の一端を解明することを目的に研究を行なった。

研究の内容および成果

(1) Hmgcs2 遺伝子のライディッヒ細胞における発現調節機構の解析

Hmgcs2 遺伝子のライディッヒ細胞における転写調節機構を調べるために、遺伝子の5'上流域・1 kb をルシフェラーゼベクターに組み込んだレポータープラスミドを作製した。このプラスミドをラット・ライディッヒ細胞由来の R2C 細胞株にトランスフェクションしてレポーターアッセイを行った。このレポーターは、R2C 細胞において非常に高い活性を示した。レポータープラスミドに deletion と mutation を入れることにより、転写開始点近傍にある SP1 結合サイト並びに、SF-1 或いは PPAR の結合領域が転写活性化に重要な役割を果たしていることが分かった。R2C 細胞の核抽出物を用いた EMSA の結果から、それぞれのサイトには、SP1/SP3 と SF-1/PPAR/RXR が結合していることが分かった。PPAR のアイソフォームのうち、 α と β は、オスの生殖腺で強い発現が観察されることから、これらが Hmgcs2 遺伝子のライディッヒ細胞特異的発現に重要であると考えられる。

(2) Hmgcs2 遺伝子の機能解析

Hmgcs2 のライディッヒ細胞における機能を調べるために、shRNA を用いて R2C 細胞に内在性に発現する Hmgcs2 遺伝子のノックダウンを行なった (図1)。shRNA の導入より R2C 細胞中の90%近い Hmgcs2 の mRNA 発現が抑制され、タンパク質の発現量は著しく低下した。これらの細胞では、ケトン体の産生が低下していた。その一方で、肝臓で報告されているような PPAR を介して遺伝子の転写活性化を行なっている機能はノックダウン細胞株においても全く変化が見られなかったことから、ライディッヒ細胞で Hmgcs2 は転写調節には関わっていないことが明らかとなった。さらに、Hmgcs2 ノックダウン細胞ではプロジェ

ステロンの産生が低下したことから、ライディッヒ細胞の Hmgcs2 はステロイドホルモン産生にも関わる可能性が示唆された。

また、Hmgcs2 遺伝子が内在性に発現していないヒト卵巣顆粒膜細胞由来の KGN 細胞株に、Hmgcs2 遺伝子を異所的に発現させた。するとライディッヒ細胞株におけるノックダウンの実験を反映して、KGN 細胞はケトン体を産生するようになった。また、Hmgcs2 を発現する KGN 細胞のプロジェステロン産生量は、コントロールの細胞株に比べて2倍に増えた。

以上のオスの生殖腺体細胞におけるノックダウンとメスの細胞株における過剰発現の結果は、Hmgcs2 がライディッヒ細胞においてケトン体の産生とステロイドホルモンの産生に関わることを強く示唆するものである。

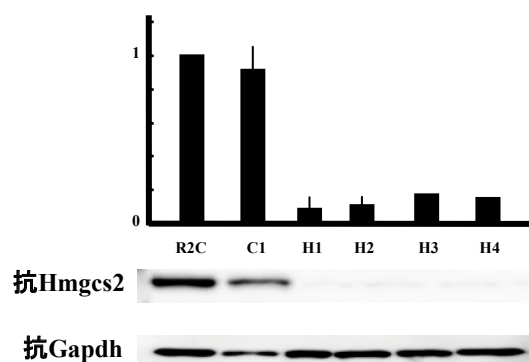


図1 R2C細胞におけるHmgcs2遺伝子のノックダウン細胞株の作製

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

「主な発表論文等」

1. Soneda S. *, **Yazawa T.** *, Fukami M*. et al. 2011 : Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and crucial function of Sp1 binding sites. J. Clin Endocrinol Metab. 96, E1881-7. (*These authors equally contributed to this work.)
2. 矢澤隆志ら 2011 : 卵巣におけるステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の転写調節機構. 日本生殖内分泌学会誌. 16, 5-8
3. 矢澤隆志ら 2011 : 万能細胞からのステロイ

ドホルモン産生細胞の創出. 医学のあゆみ. 239, 1445-50

「特記事項」

平成23年度日本動物学会奨励賞受賞
矢澤隆志 「ステロイドホルモン産生の分子機構の解明」

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費・基盤研究 (C) ・平成23年～25年度・代表・採択・「幹細胞からのセルトリ細胞の作製と分化機構の解明」

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

異分野融合による多方面からのエピジェネティクスの解明

研究代表者： 沖 昌也（工学研究科・准教授）

共同研究者： 吉田 俊之（工学研究科・教授）、水谷 哲也（医学部・准教授）

概 要	<p>近年、発生・分化の過程のみならず、様々な生命現象及び疾患との関与も報告され、DNA 配列に依存しない「エピジェネティックな遺伝子発現調節機構」に関する研究が注目されている。本共同研究では、「酵母を用いた分子レベルでの解析」、「酵母で得られた知見をもとに、多細胞生物での分化誘導システムの実験系を用いた解析」、「新たなスクリーニングを行う上で必須となるデータ解析をオートメーション化するシステムの開発」など、異なる分野の研究者が融合し、独自の手法によりエピジェネティクスの機能解明を目指すことを目的に研究を行った。その結果、酵母で分離されたエピジェネティクス制御遺伝子が生物種を越えて幅広く存在すること、そのうちの1つ Fub1p のヒトホモログが酵母と同様の機能を持つことを明らかにした。データ解析のオートメーション化も、まだ幾つかの問題点が残されているが、実際に使用出来るようになり、解析に要する時間が大幅に短縮可能となった。</p>
関連キーワード	<p>エピジェネティクス、酵母、細胞分化、単一細胞追跡ソフト、クロマチン</p>

研究の背景および目的

生物にとって重要な機能は種を越えて保存されている。しかし、DNA 複製、修復、組換え等多細胞生物の多様な制御機構の詳細な分子レベルでのメカニズムが、真核生物の中で、最も単純な生き物の1つである「酵母」の研究から明らかにされてきたという事実はあまり認識されていない。我々が注目しているエピジェネティクス現象も例外ではない。この現象の特徴は、全く同一の DNA 配列を持つ個々の細胞間での遺伝子の発現状態が状況に応じて変化し、子孫にも同様の発現状態が記憶され遺伝されていくことである。

我々は、現在までに、独自のスクリーニング法により、エピジェネティックな現象に関わる因子を酵母全遺伝子約 6000 個 1つ1つに関して解析し、55 個分離した(Oki M et al., (2004) Mol. Cell. Biol.)。興味深いことに、ヒストン修飾因子に代表されるようにほとんどの因子が種を越えて保存されていた。これらのヒトホモログが、組織特異的な発現調節や分化に伴う発現調節に対してどのような役割を果たしているのかアプローチし、多細胞生物における新たなエピジェネティックな現象の発見とそのメカニズムを本共同研究により明らかにしていく。特に水谷グループが確立した幹細胞から性腺や副腎様の細胞へと分化誘導するシステムを用い、どのようなエピジェネティックな調

節により分化が支配されているか明らかにしていく。

また、沖グループは DNA 上でエピジェネティックに遺伝子の発現調節が起こる領域を同定し、この領域にレポーター遺伝子 EGFP を導入することにより単一細胞の世代を超えた発現状態の変化を蛍光顕微鏡下で追跡するシステムを確立した。この解析から、エピジェネティックな遺伝子発現調節機構は現在までの一方向性しか持たないという報告とは異なりリバーシブルにも起こりうることを初めて明らかにした。この結果は、生物の持つ、エピジェネティックな遺伝子発現調節機構の可能性を大きく広げ、ゲノムワイドな解析を行うことにより、新たな発見が期待される。しかし、現状での「単一細胞追跡システム」は、1つ1つ手作業での作業であり、膨大な時間を費やしてしまい、大量のデータを処理することは出来ない。そこで、本共同研究により独自の解析ソフトを開発し、大幅な解析時間の短縮により、ゲノムワイドな解析を可能とすることを目的とした。

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

研究の内容および成果

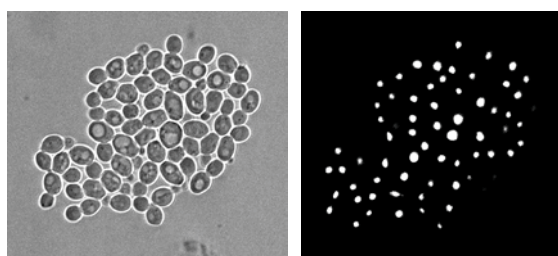
【1】解析ソフトの開発

我々は、酵母染色体上でエピジェネティックに遺伝子の発現状態が変化する領域を同定し、その領域に蛍光タンパク質を挿入することにより、分裂を繰り返した際の単一細胞の発現状態の変化を

追跡するシステムを確立した。

図1 (a) は、酵母細胞を通常光で撮影した画像（明視野画像）、同 (b) は (a) を蛍光撮影した画像の例である。このような画像を時系列として撮影し、分裂を繰り返す各細胞の蛍光輝度の変化を

追跡し解析することにより、世代を越えたエピジェネティックな遺伝子発現調節機構に関する様々な情報が得られる。

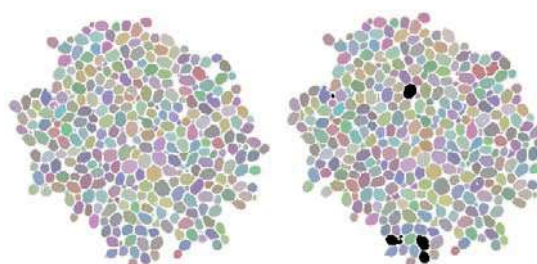


(a) 明視野画像 (b) 蛍光画像

図1：細胞画像の例

申請者らは、このような解析を計算機上で自動処理することを目指し、細胞を領域分割・時間的にトラッキングすると共に蛍光輝度を自動抽出するソフトウェアの開発に取り組んできた。しかしながら、これまでの手法ではトラッキングの精度が不十分で、エラーの手動修正に要する労力が大きく、効率性に問題が残されていた。そこで本年度は、細胞のトラッキング精度を改善し、また、生物学の研究者にとって使いやすい解析支援システムを構築することを目的とした。

過去の手法では、明視野画像の撮影間隔が短い場合には画像間での各細胞の移動量は十分小さいと仮定し、前フレーム上での注目細胞と重なりが最も大きい細胞領域を後フレーム上で求めることを基本としてトラッキングを実現していたが、十分な精度を得るには至っていない。そこで本研究では、2つの細胞に対する重心距離、面積の差、周長の差の重み和を一致度と定義し、この一致度に対してアニーリング処理を導入して対応関係を順次求めることで、トラッキングの精度改善を図った。また、各細胞の移動量はコロニー内部では小さく、外周部では比較的大きく移動する可能性が高いこと、細胞の分裂後の成長速度等を補助情報として利用し、さらに精度の向上を目指した。



(a) 前フレーム (b) 後フレームに対する結果

図2：本手法によりトラッキングを行った結果

図2は実験結果で、単一細胞から10時間ほど分裂を繰り返して300個程度に成長した細胞群に対して、時間間隔3分で撮影した2枚の画像を利用した。図2(a)は、前フレームを領域分割して着色した結果、(b)はその後フレームに対してトラッキング処理を行った結果である。(b)において、トラッキングに誤りが生じているのは黒印を付けた4つの細胞のみで、正しくトラッキングされた割合(精度)は98.5%となった。過去の手法では、平均して80%程度の精度しかなく、一致度とアニーリングの導入により、トラッキング精度が大きく改善されることを確認した。

現在、本トラッキング手法を開発中のソフトウェアに移植する作業を進めている。また、本ソフトウェアを実際に使用するのは生物学系の研究者で、計算機に精通していない利用者にとっても扱いやすいシステムを目指し、システム構築を行っている。

【2】ヒトホモログの機能解析

出芽酵母を用いて分離した55個のエピジェネティクス制御遺伝子のヒトホモログを探索した。現在、cDNAライブラリーを用い候補遺伝子をクローニング中であるため、全ての機能的相補は確認していないが、分離した遺伝子ほとんどにホモログが存在することが明らかとなった。また、RNAiにより、分化誘導に対する影響を解析したが、現在のところ顕著な影響は観察されていない。

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

「主な発表論文等」

1. Hatanaka A, Chen B, Sun JQ, Mano Y, Funakoshi M, Kobayashi H, Ju Y, **Mizutani T**, Shinmyouzu K, Nakayama J, Miyamoto K, Uchida H, **Oki M**. (2011) *Genes Genet.Syst.* **86**, 305-314.
2. Sun JQ, Hatanaka A, **Oki M**. (2011) *Genes Genet.Syst.*, **86**, 73-81.
3. Doubayashi D, Ootake T, Maeda Y, **Oki M**, Tokunaga Y, Sakurai A, Nagaosa Y, Mikami B, Uchida H. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1662-1667.
4. Yazawa T, Kawabe S, Inaoka Y, Okada R, **Mizutani T**, Imamichi Y, Ju Y, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. (2011) *Mol. Cell. Endocrinol.* **336**, 127-132
5. Miyamoto K, Yazawa T, **Mizutani T**, Imamichi Y, Kawabe S, Ju Y, Umezawa A (2011) Stem

- cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol. Cell. Endocrinol.* **336**, 123-126
6. 尾形尚敏, 水野真城, 仲野豊, **吉田俊之** (2012) 映像情報メディア学会技術報告, VOL.36, No. 8, pp. 68-72,
 7. **水谷哲也**, 宮本 薫 (2011) 日本生殖内分泌学会雑誌 **16**, 27-29
 8. **水谷哲也**, 宮本 薫(2011) 生化学 **83**, 388-391

「本研究に関わる講演」

1. **吉田俊之**, **沖昌也** 「細胞画像の遺伝子学的解析を支援するソフトウェア」新技術説明会 JST ホール 2011年8月23日(東京)

「特記事項」

1. 研究交流を目的に合同セミナーを行った。
<日時>平成23年12月7日
<場所>医学部(松岡キャンパス)

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

D-アミノ酸アッセイ系構築を目指したセンサー用素子の機能開発

研究代表者： 里村 武範（工学研究科・講師）

共同研究者： 末 信一郎（工学研究科・教授）

概 要	本申請では、生体内に存在する D-アミノ酸を簡便、高感度に定量できるバイオセンサー用素子の開発を目的として研究を行った。D-アミノ酸は近年、ヒトにおいて様々な病気の診断用マーカーとして期待されている。そこで、安価で高感度に物質の濃度を測定可能な酵素を素子としたバイオセンサーに注目が集まっている。しかしながら現在までに見出されている D-アミノ酸定量用のバイオセンサー用素子は安定性が非常に低いため、センサーへの実用化はおろか素子の詳細な機能解析も進んでいない。そこで、バイオセンサー用素子の現在における課題となっている短寿命という要素を克服するため、安定性が高い超好熱菌由来酵素からセンサー用素子を探索し機能解析を行い、新規バイオセンサー用素子として利用可能であるかの評価を行った。本申請では特にバイオセンサー用素子とし有用性が高いことが既実証されている色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の機能解析によるバイオセンサーへの評価と新規バイオセンサー用素子として近年注目されているアミノ酸ラセマーゼの機能評価について研究を行った。
関連キーワード	D-アミノ酸、色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素、D-アミノ酸ラセマーゼ、超好熱菌

研究の背景および目的

近年、遊離型 D-アミノ酸はヒトの生体内の様々な組織に局在し多くの生理機能を果たしていることが明らかとなっており、その例を挙げれば枚挙にいとまはないが代表的なものは下記のとおりである。

①D-アスパラギン酸は脳ホルモンの分泌制御に働いている。②精巣内のテストステロンの合成促進にも働いている。③D-セリンは記憶や学習など脳の高次機能制御に関与する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体のコアゴニストとして機能している。以上のように様々な D-アミノ酸が生体内の生理機能に関与しており、新たな D-アミノ酸の生理機能も続々と発見されている。

それに伴い、D-アミノ酸と人の疾病の関連性にも大きな関心が寄せられており、①無精子症患者において精液、精漿中の D-アスパラギン酸濃度が有意に低下する、②統合失調症やアルツハイマー患者では血中や脊髄液中の D-セリン濃度が低下することが報告されている。その他にもさまざまな種類の D-アミノ酸がヒトやマウスなど哺乳動物で見出されはじめ、様々な病気と D-アミノ酸の関連について注目され始めている。そこで、手軽に迅速かつ低コストに D-アミノ酸を測定できる方法が求められている。

現在、D-アミノ酸の定量分析には主に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた定量法が行われている。この方法は微量のアミノ酸の同時

分析が可能であるが高コストで分析時間を要し、分析条件の設定などに熟練の技術を要するなど迅速な D-アミノ酸分析が困難である。一方、HPLC を用いる定量法以外では D-アミノ酸を基質とする酵素を素子としたバイオセンサーによる定量方法が存在する。このバイオセンサーを用いた定量方法は、HPLC を用いた方法に比べて、簡便、迅速に測定できることから HPLC に代わる D-アミノ酸定量方法として期待されている。しかし、現在、バイオセンサーによる定量法で用いられている酵素素子は安定性に欠けること、基質特異性が低いこと、利用できる pH 域、温度が限られるなどセンサー用素子として充分機能を果たせない点と、汎用性に適したデバイスの開発が進んでいないため、バイオセンサーを利用した方法は有効な D-アミノ酸の検出、定量方法とはなっていない。そこで、本申請では、これらの課題を克服できうる唯一の酵素素子である超好熱菌由来酵素に着目し研究を進めた。特に、基質を電気化学的信号に容易に変換することによって物質の濃度を簡便に測定できる酸化還元酵素の一種である色素依存性脱水素酵素と、近年、基質の光学異性体を高度に認識できる識別用素子として注目されているラセマーゼに焦点を当て、色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素と D-アミノ酸ラセマーゼの機能解析を進めることを目的として研究を進めた。

研究の内容および成果

D-アミノ酸測定バイオセンサー用素子として既に有用性が証明されている超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* 由来色素依存性 D-プロリン脱水素酵素を用いて D-アミノ酸測定用素子としてさらなる高機能化へつなげるため、本酵素の立体構造解析を進めた。本酵素は大腸菌によるタンパク質の大量発現系は構築できているので、本酵素の結晶化条件の検討を進めた。288種の結晶化条件を検討したが、本酵素の結晶は得ることができなかった。本酵素は膜結合性酵素であるためタンパク質の結晶化に必要な高濃度タンパク質条件下では凝集してしまうことから良質な結晶が得られなかったと考えられた。そこで、様々な界面活性剤を添加し結晶化条件の検討を進めた。しかしながら現在のところ良質な結晶を得ることはできていない。現在、本酵素の膜結合部位であるN末端アミノ酸部位を除去した酵素を作成し結晶化条件の検討を進めている。さらに、本酵素と相同性の高いタンパク質を近年ゲノム解析が終了した超好熱菌から2種類見出すことに成功した。現在、本酵素だけではなく新たに見出した本酵素ホモログの大腸菌によるタンパク質発現系を構築し結晶化条件の検討を進めている。

一方、D-アミノ酸測定バイオセンサー用素子として利用を検討しているラセマーゼについては、超好熱菌ゲノム情報より検索した結果、超好熱菌 *Pyrobaculum calidifontis*, *Aeropyrum pernix* の2種類の菌からラセマーゼホモログ (Pcal_1660, Ape_1498.1) を抽出することに成功した。これらのラセマーゼ候補遺伝子を用いて大腸菌によるタンパク質大量発現系の構築を行った。その結果、これらホモログタンパク質の大腸菌によるタンパク質発現系の構築に成功した。しかしながら、これら大腸菌による発現タンパク質は封入体を形成しており、酵素活性を有した状態で得ることはできなかった。そこで、これら封入体タンパク質のリフォールディングを行った。その結果、*P. calidifontis*由来 Pcal_1660のリフォールディングに成功した。*A. pernix*由来 Ape_1498.1についてはリフォールディングには成功していないが現在、リフォールディング条件の最適化を検討している。リフォールディングに成功した Pcal_1660 発現タンパク質について、様々なアミノ酸を用いて本タ

ンパク質の機能の同定を進めたところ、セリンラセマーゼ活性を有していることが明らかとなった (図1)。D-セリンはヒトにおいて記憶や学習などの脳の高次機能制御に関与する N-メチル-D-アスパラギン酸受容体のコアゴニストとして機能していることが報告されている。また、統合失調症やアルツハイマー患者では血中や脊髄液中の D-セリン濃度が低下することも指摘されている。このように D-セリンの濃度を簡便、安価に測定することは、これら病気の予防、検出に有用であると考えられる。そこで、本申請で明らかにできた *P. calidifontis*由来 Pcal_1660のバイオセンサー用素子としての評価を行うために本タンパク質の詳細な機能解析を行った。その結果、本酵素は70°Cでも活性を失わず、非常に高い安定性を有していることが明らかとなった。また、本酵素はラセマーゼ活性だけでなく、L-セリンデヒドラターゼ活性を有していることが明らかとなった。これらの結果から、本申請で明らかにできたセリンラセマーゼはバイオセンサー用素子として有用であることが明らかとなった。今後、本酵素の更なる機能解析を進め、光導波路と組み合わせた新規センサー用素子として利用する研究を進めていく予定である。

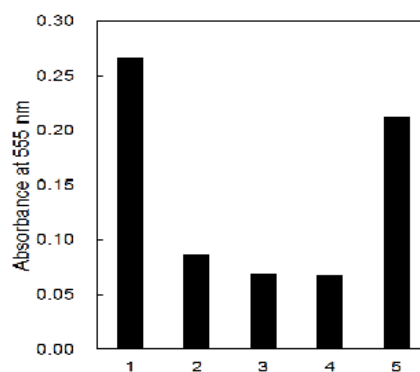


図1. *P. calidifontis* 由来セリンラセマーゼ (Pcal_1660) 活性

1: 酵素添加 (Pcal_1660), 2: 酵素非添加,
3: 基質 (セリン) 非添加, 4: 酵素, 基質非添加
5: ポジティブコントロール

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

「主な発表論文等」

平成 24 年度日本生物工学会発表予定

平成 24 年度日本農芸化学会発表予定

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 23 年度 A-Step フィージビリティスタディステージ 探索タイプ・1年間・バイオマーカーの迅速検出を実現するアッセイシステムの開発・代表・否・1,500,000 円

平成 23 年度野口遵研究助成金・1年間・酵素機能電極用素子の網羅的探索と応用開発・代表・否・2,200,000 円

平成 24 年度 A-Step フィージビリティスタディステージ 探索タイプ・1年間・D-アミノ酸の迅速検出を可能とするアッセイシステムの開発・代表・申請予定・1,500,000 円

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

亜鉛による痛覚調節機構の解明

研究代表者： 池田 弘（工学研究科・教授）

共同研究者： 村田 哲人（医学部・准教授）

概 要	亜鉛は、痛覚過敏を調節していることが報告されているが、そのメカニズムは明らかではない。また最近、長期増強が、痛覚伝達経路の1つである脊髄後角においても起こることが報告され、脊髄後角で起こる長期増強が痛覚過敏のメカニズムの1つではないかと考えられている。本研究では、亜鉛が痛覚過敏にどのような影響を与えるのかを、亜鉛欠乏マウスに痛覚過敏を起こすことなどによって検証し、亜鉛が脊髄後角内の長期増強の形成にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。実験の結果、亜鉛欠乏食を4週間与えることによってマウスの脊髄内の亜鉛濃度が減少していることがわかった。また、このような亜鉛欠乏状態のマウスの脊髄後角では、NMDA 受容体を介した長期増強が抑制されることがわかった。
関連キーワード	長期増強、脊髄後角、光計測、痛覚過敏、NMDA 受容体

研究の背景および目的

亜鉛は、免疫機能や生殖機能、酵素活性やタンパク合成といった生命活動において重要な役割を果たしている。中枢神経系には亜鉛イオンの形で特に多く局在している。最近、記憶や学習などの脳内メカニズムであると考えられている長期増強の形成に亜鉛イオンが重要であることが報告されている。

痛覚過敏は、以前より激しい痛みを感じる、以前は触覚として感じていた刺激を痛みとして感じるといった痛みで難治性疼痛であるといわれており、現在もそのメカニズムが明らかではない。亜鉛

は、痛覚過敏を調節していることが報告されているが、そのメカニズムは明らかではない。また最近、長期増強が、痛覚伝達経路の1つである脊髄後角においても起こることが報告され、脊髄後角で起こる長期増強が痛覚過敏のメカニズムの1つではないかと考えられている。

本研究では、亜鉛が痛覚過敏にどのような影響を与えるのかを、亜鉛欠乏マウスに痛覚過敏を起こすことなどによって検証し、亜鉛が脊髄後角内の長期増強の形成にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

研究の内容および成果

1. 亜鉛染色

1-1 内容

亜鉛を含まない飼料を4週間与えたマウスの脊髄内の亜鉛の量が減少しているかを亜鉛染色によって調べた。

1-2 方法

マウスを、硫化ナトリウムを含んだリン酸緩衝生理食塩水溶液およびホルマリン溶液で灌流固定した後、脊髄を摘出し、ホルマリン溶液で24時間保存後、スクロース溶液で72時間保存した。脊髄をクリオスタットでスライスし、銀増感反応法によって亜鉛を染色した。

1-3 結果

まず、亜鉛染色法によって亜鉛が染まっているのかを確認するために、亜鉛のキレート剤を腹腔注射してから1時間後のマウスと通常のマウスの亜鉛染色の濃度を比較した。実験の結果、通常のマウスで見られる濃褐色の点が、亜鉛をキレートさせたマウスでは見られなかった。したがって、

通常のマウスで見られた反応は、亜鉛を染めていることが確認された。また、亜鉛欠乏食を4週間与えたマウスの脊髄を亜鉛染色したところ、亜鉛の濃度が減少していることがわかった（図1）。このような変化は亜鉛欠乏食を2週間与えたマウスでは見られなかった。

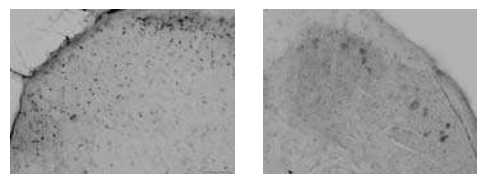


図1：脊髄後角の亜鉛染色

左写真：通常のマウス、右写真：亜鉛欠乏マウス

2. 脊髄後角での長期増強

2-1 内容

後根への低頻度の反復電気刺激（低頻度刺激）

によって、脊髄後角で長期増強が起きるのか、また、その増強は、亜鉛によって調節されるのかを亜鉛キレート剤を腹腔注射したマウスおよび亜鉛欠乏食を4週間与えたマウスから摘出した脊髄スライス標本を用いて検証した。

2-2 方法

マウスより脊髄スライス標本を作成し、膜電位感受性色素で染色した。染色されたスライスを倒立顕微鏡下のチャンパーに乗せ、後根を単発刺激した時の脊髄後角を伝播する神経興奮を高感度、高速フォトダイオードアレイカメラで計測した。長期増強を起こすための条件刺激としては、2Hzの繰り返し電気刺激を2分間後根へ与えた。亜鉛キレート剤を腹腔注射して1時間後のマウスと亜鉛欠乏食を4週間与えたマウスから摘出した脊髄スライス標本でも同様の実験を行い、長期増強に違いが見られるかを検証した。

2-3 結果

後根への単発刺激によって、脊髄後角のI層からIII層の領域に神経興奮が見られた(図2)。条件刺激によって、I層およびII層の外側(IIo)の領域の神経興奮で長期増強が見られた(図2)。一方、II層の内側(IIi)、III層の領域で長期抑圧が見られた(図2)。

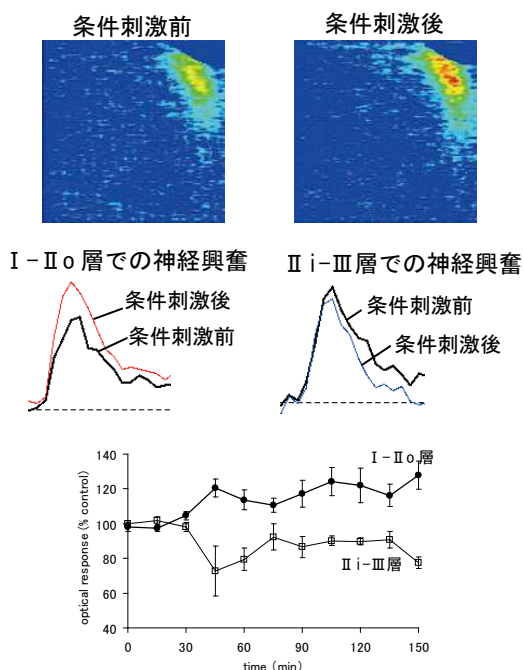


図2: 条件刺激による脊髄後角神経興奮の長期増強と長期抑圧

I-IIo層で起きる長期増強は、NMDA受容体の拮抗薬であるD-AP5投与下で、条件刺激を与えると起きなかった(図3)。一方、IIi-III層で起きる長期抑圧はD-AP5投与下でも影響を受けなかった(図3)。

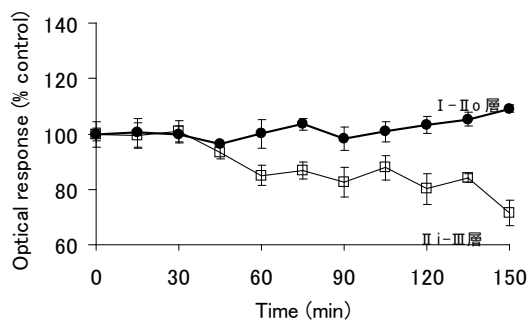


図3: NMDA受容体拮抗薬の効果

次に亜鉛欠乏状態でも、同様の条件刺激によって、脊髄後角で長期増強が起きるのかを調べた。その結果、亜鉛キレート剤を与えたマウス、亜鉛欠乏食を与えたマウスのどちらの脊髄スライスにおいても、I-IIo層での長期増強が起きないことがわかった(図4)。

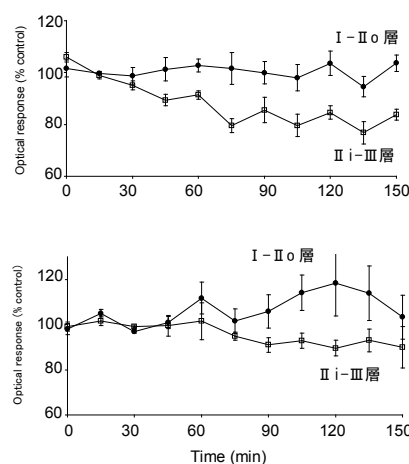


図4: 亜鉛欠乏マウスへの条件刺激

これらの結果より、脊髄内の亜鉛の濃度が少ないと長期増強が起きにくいことがわかった。また、このような調節には、NMDA受容体が関与していると考えられる。これらの結果は、亜鉛による痛覚調節メカニズムを解明するものであるが、今後、詳細な解析が必要である。

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

「主な発表論文等」

学会発表予定

K Iwasa, H Ikeda, K Murase, The regulation of

long-term potentiation in the spinal dorsal horn by zinc. Neuroscience2012

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

ナノファイバーを用いたバイオハイブリッド材料の創製と 幹細胞の微小環境制御

研究代表者： 藤田 聡 (工学研究科・准教授)

共同研究者： 末 信一郎 (工学研究科・教授)

概 要
本研究では、造血幹細胞の培養の足場に適したナノファイバー基材を作成することを目的に、ナノファイバー上での間葉系幹細胞の分化制御をおこなった。本研究では、生体組織がナノメートルサイズの繊維構造が配向した構造から成る細胞外マトリクスで構成されていることから、配向性を有したナノファイバーに着目した。また、細胞としては、造血支持能を有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いた。本研究では、エレクトロスピンング法を用いて、配向性等の幾何構造の異なるナノファイバー基材を作製し、この上での細胞挙動への影響を検討した。その結果、配向性の違いによって増殖・分化が異なることがわかった。これにより、造血幹細胞の培養足場に適したバイオハイブリッド材料の設計にむけて、有効な知見が得られた、造血幹細胞の分化制御する技術につながるものと期待できる。
関連キーワード
エレクトロスピンング, ナノファイバー, 配向性, 間葉系幹細胞, 造血幹細胞

研究の背景および目的

造血幹細胞は、白血病などの難治性血液疾患の治療や次世代の再生医療に有効な細胞ソースとして期待されている。造血幹細胞は骨髄や臍帯血から採取されるが、ドナー不足や一度に少量しか採取されないという課題がある。この問題を根本的に解決するために、造血幹細胞の効率的な増幅培養手法が強く望まれている。しかしながら、その未分化能を維持したまま増幅することは、今なお実現していない。

造血幹細胞は、生体では骨髄中に局在し、その周辺環境は細胞外マトリクスと呼ばれる構造から構成されている。細胞外マトリクスは、コラーゲンなどのタンパク質や、グルコサミノグルカンなどの多糖類から成るナノサイズの繊維状の構造を有する。これらの細胞外マトリクス中には、間葉系細胞 (MSC) が存在し、さまざまなサイトカインや成長因子などの生理活性物質を分泌している。したがって、骨髄中のこうした構造を模倣することで、造血幹細胞の効率よい増幅が期待される。

ハイドロゲルや多孔体などの3次元環境を利用した培養環境についてはこれまでも報告されてい

る。一方で、支持細胞との共培養系も血液細胞の培養ではよく知られた手法である。しかしながら、両者を統合し、支持細胞との共培養系を3次元培養系に拡張して造血幹細胞の増幅に応用しようという試みは、その有効性がこれまでほとんど示されてこなかった。その理由は、細胞の配向や液性因子の担持という観点からの根拠に立脚した材料設計が行われなかったからと考えられる。

そこで本研究では、合理的な設計根拠をもとにナノファイバー上でMSCをハイブリッドさせ、造血幹細胞の増殖を制御する因子を担持させる。これにより従来達成され得なかった、造血幹細胞の効率的な増幅を可能とする培養基材の構築が期待される。臍帯血由来造血幹細胞は、難治性の血液疾患の移植治療に用いられているが、細胞数の不足から移植が適用されないケースも多い。本課題で創製する基材で培養することで、こうした患者の救命にもつなげられると期待される。

今回、この目的に適したナノファイバー基材を開発すべく、配向性の異なるナノファイバー基材上でMSCの増殖および分化を評価した。

研究の内容および成果

<ナノファイバー基材の作製>エレクトロスピンング法を用いて、12.5%ポリウレタン溶液 (95%THF/5%DMF) からナノファイバーを基板上に作製した。配向性を有するファイバーはコレクタ回転速度1500rpmで3分間、無配向のナノファイバーはコレクタを回転させないで30秒間紡糸することで作製した。コレクタを回転させること

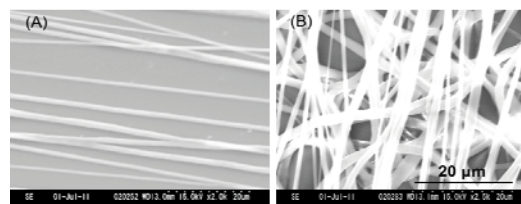


図1 (A)配向性, (B)無配向ナノファイバーのSEM

で配向性のあるファイバーを作製できた (図1)。<ナノファイバー基材での MSC の接着・増殖>作製したナノファイバーに酸素プラズマ処理を施したのち、MSC を播種し、37°C/5% CO₂ インキュベーター内で培養した (培地: DMEM/10% FBS)。播種後 24 h, 48 h に F-アクチンおよび細胞核を染色した (図2)。その蛍光画像より細胞数及び細胞の伸展面積・方向を定量した。また、細胞数の増加から倍加時間を算出した。その結果、MSC は配向性を有するファイバー上では、細胞もファイバー同様に一方向に揃って配向していたのに対し、ランダムなファイバー上では細胞にも方向性はみられなかった。また細胞の面積は倍加時間と相関がなかったのに対し、ファイバーの配向性は細胞の増殖と相関がみられた。細胞の向きが一定方向に揃い、伸展することで細胞の増殖速度が向上したものと推測される。

<ナノファイバー基材上での MSC の分化>ナノファイバー基材に酸素プラズマ処理を施したのち、MSC を播種し、その 6 時間後に、脂肪細胞誘導培地と骨芽細胞誘導培地に培地交換し、分化誘導を開始した。分化 7 日後に脂肪細胞は Oil Red-O 染色で、骨芽細胞は ALP 染色で細胞の分化を観察した (図3)。分化 1, 3 日後に RT-PCR でそれぞれの細胞の遺伝子発現を調べた。骨芽細胞への分化は、配向性を有するナノファイバーおよびランダムなナノファイバー上では、差はみられなかった。一方、脂肪細胞への分化は、ランダムなナノファイバー上では分化培地にかかわらず、分化が抑制された。RT-PCR で

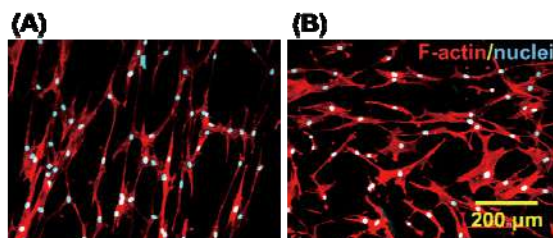


図2 (A)配向性, (B)無配向ナノファイバー上で培養した MSC の蛍光顕微鏡像 (赤: アクチン, 青: 核)。

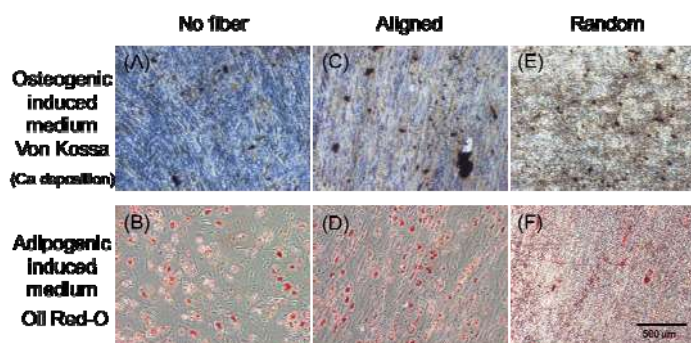


図3 配向性・無配向ナノファイバー上で分化培養した MSC。上段: 骨芽細胞への分化, 下段: 脂肪細胞への分化。

も同様の分化マーカーの発現パターンがみられた。<考察と展望>これまでに細胞の伸張が抑制されると脂肪細胞への分化が促進されるという研究結果が報告されている。細胞の伸展面積や細胞骨格の発現をそうした報告例と比較して、詳しく評価する必要がある。本法によりナノファイバー基材を用いて間葉系幹細胞制御をおこない、造血幹細胞の培養に向けた 3 次元培養系の開発をおこなう。

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

「主な発表論文等」

ナノファイバーの配向性を利用した細胞の伸展及び増殖の制御, 吉村英晃, 末信一朗, 藤田聡, 高分子学会北陸支部発表会, 金沢, 2011.11.
幾何的特性の異なるナノファイバー上での細胞挙動の解析, 吉村英晃, 末信一朗, 藤田聡, 日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2011.11.
配向性を有したナノファイバー上での細胞増殖, 吉村英晃, 末信一朗, 藤田聡, 日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会, 福井, 2011.12.
ナノファイバーの配向性に基づいた間葉系幹細胞の分化方向の制御, 清水遥絵, 末信一朗, 藤田聡, 日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会, 福井, 2011.12.
Cell proliferation on aligned nanofibers, H.Yoshimura, S.Suye, S.Fujita, Taiwan-Japan Workshop on Biomedical & Biomaterials, Taichung, 2012.1
Control of the commitment of mesenchymal

stem cells on nanofiber scaffold, H.Shimizu, S.Suye, S.Fujita, Taiwan-Japan Workshop on Biomedical & Biomaterials, Taichung, 2012.1.
培養基材の幾何学的性質が細胞挙動へ与える影響の解析, 吉村英晃, 末信一朗, 藤田聡, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都, 2012.3.
間葉系幹細胞の分化制御を可能とするナノファイバーの幾何構造の影響の検討, 清水遥絵, 末信一朗, 藤田聡, 第 61 回高分子学会年次大会, 横浜, 2012.5
Control of differentiation of human mesenchymal stem cells by altering the geometry of nanofibers. S.Fujita, H.Shimizu, S.Suye. *J. Nanotechnol.* (in press)
「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
日本学術振興会・科学研究活動スタート支援・H23-24 「ナノファイバーを用いたバイオハイブリッド材料の創製と幹細胞の微小環境制御」代表・採択 (H23 年度 1690 千円)

福井大学
トランスレーショナルリサーチ
推進センター
平成23年度公募採択型研究費

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「重点プロジェクト研究」

ヒト気管支における、ムスカリン受容体、アドレナリン受容体の同定と喫煙の影響

研究代表者： 池田 岳史（医学部・助教）
共同研究者： 村松 郁延（医学部・教授）

概 要	ヒト呼吸器系組織のムスカリン受容体およびβアドレナリン受容体は、喘息や慢性閉塞性肺疾患の治療上重要な対象であるが、得られる検体が制限されるため、放射性リガンドを用いたそれらの系統的な定量、定性的評価は未だなされていない。今回、気道部位別（区域気管支～亜区域気管支～肺実質）のムスカリン受容体およびβアドレナリン受容体の分布とその subtype について少量の組織検体でも解析可能な組織片結合実験法を用いて定量した。また気管支においては機能実験を追加した。M ₃ 受容体は気管支に有意に発現するもその密度は区域気管支から亜区域気管支へ移行するにつれ減少した。一方、M ₁ 受容体は肺実質でのみ検知され、M ₂ 受容体は気管支と肺で一様に存在した。β ₂ 受容体は気道が末梢へ移行するにつれ増加し、その密度は各部位においてムスカリン受容体の約2倍であった。β ₁ 受容体は肺実質でのみ検知された。気管支の収縮、弛緩はそれぞれ M ₃ 受容体、β ₂ 受容体により制御されていた。今回、intact な組織片を用いた結合実験法にてはじめて作製されたヒト気管支～肺までのムスカリン受容体およびβアドレナリン受容体の分布図は、今後の呼吸器疾患における薬物治療および新薬開発に重要な知見を与えるものと考えられる。
関連キーワード	Human airway; bronchus; mAChR; β-adrenoceptor; intact segment binding

研究の背景および目的

ヒト気管支のムスカリン受容体およびアドレナリン受容体は、喘息や慢性閉塞性肺疾患（COPD）治療薬の主要なターゲットであるが、これら呼吸器系組織の G protein-coupled receptor は(GPCR)の部位別の発現量や割合に関しては未だ一致した見解は得られていない。

放射性リガンドを用いた結合実験は GPCR 検出に頻用される方法ではあるが、従来方法では相当量の検体を要し、ヒト組織のような貴重なサンプルでは系統的評価が非常に困難であった。

本研究では近年、我々が開発した少量のサン

プルでも解析可能な組織片結合実験法を用いて、肺癌患者から外科手術時に摘出された肺の少量のサンプルにてヒト呼吸器系組織におけるムスカリン受容体、アドレナリン受容体の系統的薬理学的解析を行うことを目的とした。さらに将来的には受容体発現パターンと薬剤感受性、喫煙歴、基礎疾患（間質性肺炎など）、および病理組織学的所見との関係についても検討し、喘息や COPD 治療薬、治療法開発に繋がる研究の基盤となり得る知見を得ることを目的とした。

研究の内容および成果

肺癌に対して肺葉切除を施行され摘出された肺の健常部位（1区域）を使用した。男性19人、女性8人（年齢50～78歳）が本研究の対象となった。今回は全例非喫煙であり術前にムスカリン受容体拮抗薬、β受容体刺激薬の非使用を確認した。検体として使用した組織片の病理像を次項に示す（小枠が使用した組織片）。

区域気管支 (A)、亜区域気管支 (B)、肺実質 (C) を剖出、病理組織学的に正常であること確認し、組織片結合実験法を用いて各受容体の分布を検討した。

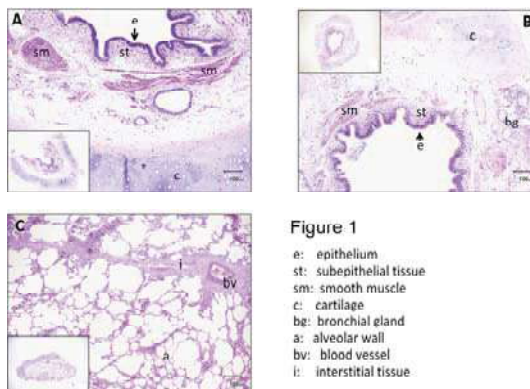
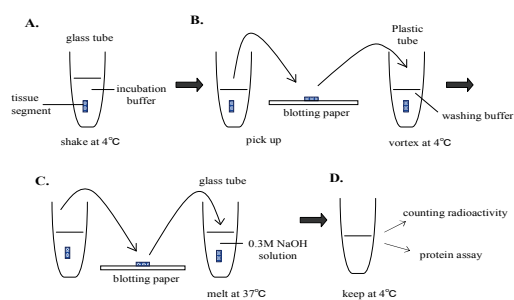


Figure 1

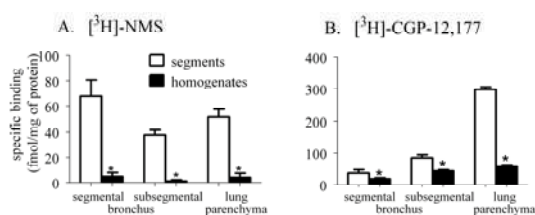
e: epithelium
st: subepithelial tissue
sm: smooth muscle
c: cartilage
bg: bronchial gland
a: alveolar wall
bv: blood vessel
it: interstitial tissue

組織片結合実験法の詳細については以下の通り行なった。



組織片を放射性リガンドとともに incubation し、洗浄した後に 0.3 M 規定の水酸化ナトリウムで溶解し、単位タンパク質あたりの受容体量を計測する方法である。

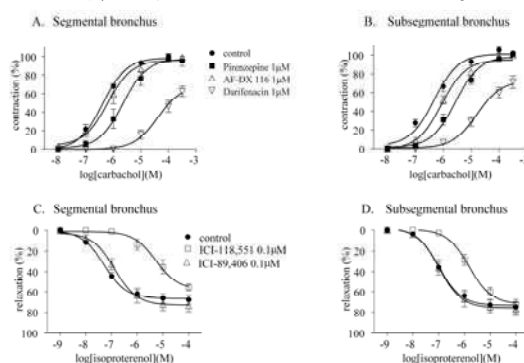
従来の組織を homogenize する方法と組織片結合実験法を比較するための結合実験結果を下に示す。



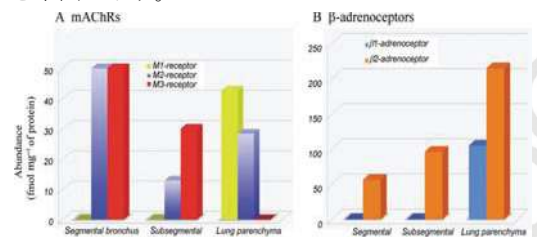
いずれの組織においても組織片結合実験法が従来のホモジネートを用いた方法に比して 2~5 倍の受容体量を検出した。そこで組織片結合実験法を用いて飽和実験を行い、ムスカリン受容体、アドレナリン受容体の各部位における総発現量を検討し、次 (右上) 表の結果を得た。

	Region of the airway	Bmax (fmol·mg ⁻¹ of protein)	K _d (pM)
[³ H]-NMS binding sites	Segmental bronchus	97 ± 11*	220 ± 28
	Subsegmental bronchus	43 ± 3*	105 ± 26
	Lung parenchyma	71 ± 7*	130 ± 14
[³ H]-CGP-12,177 binding sites	Segmental bronchus	47 ± 9*	100 ± 37
	Subsegmental bronchus	90 ± 10*	81 ± 30
	Lung parenchyma	320 ± 26*	98 ± 10

また、得られた組織片 (区域気管支 A、亜区域気管支 B) が機能的であるか、つまり組織片結合実験法により検出された受容体が機能的であるかどうかの検討のため下図に示すとおり、carbachol と isoproterenol を使用した気管支平滑筋の収縮、弛緩の機能実験を行い、有意な収縮 (Derifenacin: M₃ 選択的 antagonist で阻害)、弛緩 (ICI-118,551: β₂ 選択的 antagonist で阻害) 反応を検出し、実験の対象部位が機能的であることを証明した。



各受容体に選択的な薬物を使用して競合実験を行い、各組織における受容体別の発現様式を明らかにした。現在、その存在が証明されている M₁~M₃ 受容体および β₁、β₂ 受容体の部位別の発現量を下図に示す。



気管支平滑筋の収縮に関係するとされる M₃ 受容体発現量 (赤) は末梢の組織へ移行するにつれ減少した。一方、平滑筋弛緩すなわち気道の拡張に関係する β₂ 受容体 (橙) は末梢に移行するにつれ増加した。この結果は末梢における気道閉塞を防ぐ機構を考える上で貴重な結果であり、非常に興味深く思われた。

トランスレーショナル研究推進センター公募採択型研究費

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

発表論文

Ikeda T, et al. Regional quantification of muscarinic acetylcholine receptors and β-adrenoceptors in human airways.

British J Pharmacology, in press (2012)

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

難聴者に対する脳波計測に基づく客観的聴力評価

研究代表者： 扇 和弘（医学部・医員）
共同研究者： 清野 正樹（高エネルギー医学研究センター・招聘教授）
岡沢 秀彦（高エネルギー医学研究センター・教授）
山田 武千代（医学部・講師）
山本 英之（医学部・助教）
窪 誠太（医学部・助教）

概 要
<p>現在、難聴者に対し補聴器のフィッティングを行う際には、聴覚閾値および不快閾値を主観的に表現することで行われている。しかし難聴者の多くは高齢者であるため、主観的な不快閾値を適切に表現することが困難である。補聴器のフィッティングに際して、脳波の測定により不快閾値を客観的に推定する方法を新たに考案し、実際の臨床検査としての実用性を検討した。健聴者では、主観的に申告された不快閾値と脳波測定による不快閾値の差は平均誤差が5 dB以下となった。実際に補聴器使用予定の難聴者に対し、簡易型脳波測定ヘッドホンを用いて脳波測定を行いその有用性について検討をおこなった。</p>
<p>関連キーワード</p>
<p>補聴器、不快閾値、脳波、聴力評価</p>

研究の背景および目的

難聴者の聴力改善に補聴器は有効な手段である。補聴器を快適に使用するためには補聴器のフィッティングが適切になされている必要がある。フィッティングは聞こえの評価結果に基づいて行われるが、自身の聞こえ状態を適切に表現できる難聴者は少なく、適切な聴力評価が困難なため補聴器が適正に使用できず購入した補聴器が無駄になるケースが存在する。難聴者が補聴器の使用を断念する原因は聴力の改善が得られないことよりも、周囲の雑音が大きく増幅されることによる不快感が原因であることが多い。しかしながら難聴者の多くは高齢者であるため、検査に対する理解が不良であることが多く適格に不快閾値を測定することが困難な症例が多い。このため不快閾値の客観的な評価手法が求められている。

脳波の一種である聴覚誘発電位は、音刺激に関連して自動的に発生する脳波であり、客観的な評価指標として活用できる可能性がある。共同研究者らは、音の大きさや不快閾値と聴覚誘発電位の

関係を調査し、健聴者における聴覚誘発電位の分析により不快閾値の推定ができる可能性を確認した。

本研究では、前記の健聴者を対象に確認された脳波特性が、難聴者に対しても観察されることを確認するために、難聴者を対象にした探索的臨床試験を実施する。音刺激による不快な感覚を脳波で客観的に定量する方法は報告されていない。

軽度もしくは中等度の難聴者に対して、音刺激に対する脳波反応を計測し、事前に取得した主観報告による不快閾値と脳波解析による不快閾値との一致度合いを評価することを目的とする。これにより健聴者で確認された脳波特性の難聴者における再現性が確認できる。再現性が確認できた場合には、脳波を計測するだけで不快閾値が推定できる可能性が高まり、再調整の少ない精度の高い補聴器フィッティングの実現につながることを期待される。

研究の内容および成果

今回の研究に際して、音刺激の提示と脳波計測のための電極の装着が簡単に行える簡易型脳波計
得られた脳波を脳波計経由でノートパソコンにとりこみ解析した。様々な大きさの音を順に提示し脳波を計測した。評価時間は5分程度であり実際の臨床検査として用いる際にも十分実用的であると考えられた。

周波数、強度が同じ2連発音を提示し、その事象関連電位のN1成分の振幅比を算出した。1発目の音に対する脳波と2発目の音に対する脳波のN1成分を測定し、その変化量を解析した。強大音、即ち大きすぎて不快な音に対しては2発目の音に対するN1成分の振幅比が減衰するとされて

測ヘッドホンを作成した。ノートパソコンから音刺激を出力し、ヘッドホンに内蔵された電極からいる(図1、図2)。

まず健聴者の症例として、共同研究組織であるパナソニック株式会社の社員12名に対し検査をいった。この健聴者を対照した調査では主観的に申告された不快閾値と、脳波測定による客観的な不快閾値の平均誤差が5dB以下となった。

現在、耳鼻咽喉科補聴器外来を受診され検査に対する同意が得られた難聴者に対し、同様に脳波測定による不快閾値の推定を行い、その有効性を検討中である。

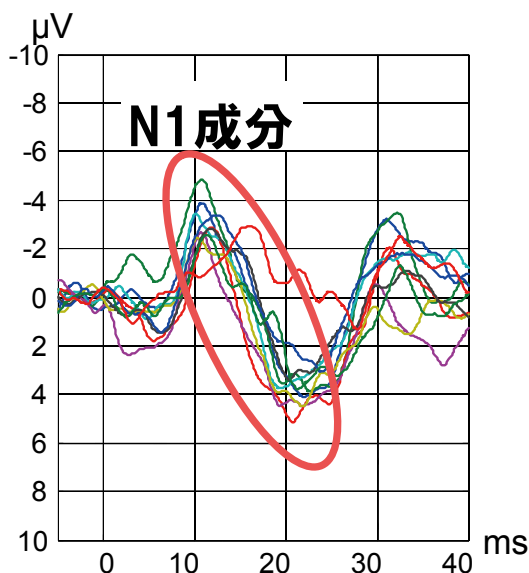


図1. 1発目の音に対する脳波

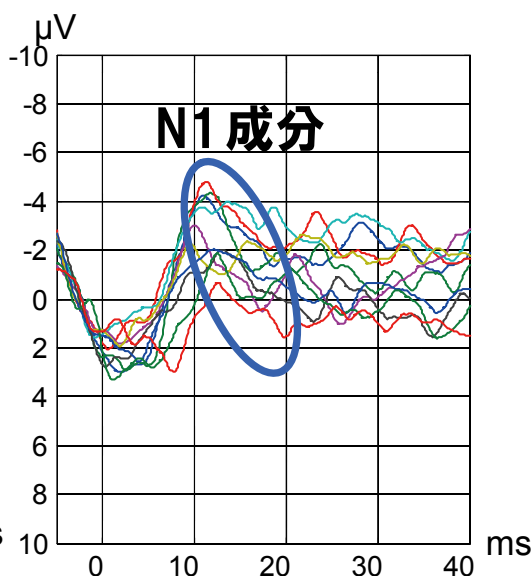


図2. 2発目の音に対する脳波(N1成分が減衰)

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

「主な発表論文等」

医学関連学会での発表及び投稿を予定

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

アレルギー性鼻炎患者におけるバイオマーカーの検討

研究代表者： 意元 義政（医学部・医員）

概 要	<p>スギ花粉症発症に関連する遺伝子の同定のために、スギ花粉飛散期に鼻上皮細胞を搾過し、これらの mRNA のプロファイル、スギ花粉症発症者およびスギ特異的 IgE 陽性未発症者（感作陽性未発症者）、および非アレルギー者（コントロール群）において比較検討をした。抽出した RNA サンプルを用いて Illumina 500GX システム（イルミナ）を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。鼻上皮細胞ではスギ花粉症患者群とコントロール群において、発現差が4倍以上かつ $P < 0.05$ の18遺伝子を同定した。その中の1つである <i>intelectin 1</i> に関して定量的 PCR で追認を行い、スギ花粉症患者が感作陽性未発症者及びコントロール群と比べ有意に高く発現していることを確認した。免疫組織化学的染色では <i>intelectin 1</i> は鼻下甲介粘膜上皮細胞に存在し、IL-4 と IL-13 によりその発現が認められることが判明した。</p>
関連キーワード	スギ花粉症、マクロアレイ、鼻粘膜上皮細胞、 <i>intelectin1</i> 、Th2

研究の背景および目的

ここ10年でスギ花粉症の罹患率は10%増加したことを申請者らは報告してきた。スギ花粉症患者の増加によりその社会的影響、経済的損失は大きくなっている。花粉症のアレルギー反応がどのように起こるかについてはある程度解明されているが、なぜ特定の個人のみが花粉症を発症するのか、花粉特異 IgE 抗体産生のメカニズムなど、依然として不明な点が多い。これまで申請者が所属する耳鼻咽喉科頭頸部外科では、理化学研究所と筑波大学と共同研究を行ってきた。解析手法として、全遺伝子による遺伝子多型解析（GWAS）、舌下免

疫療法におけるプロテオーム解析、末梢血細胞と鼻粘膜細胞のマクロアレイ解析を行ってきた。その結果スギ花粉症の病態に関連する複数の遺伝子を同定した。しかしながら、それらの遺伝子がどのようにスギ花粉症の急激な増加に関与しているか、それらの遺伝子の制御がどのようになされているのか、依然として不明な点が多い。本研究では、スギ抗原感作から発症にいたる過程で、どのような遺伝子が関与し、症状を増悪あるいは抑制されるのか同定し、それらの遺伝子を制御する因子を同定することを目的とする。

研究の内容および成果

福井大学アレルギーデータベースからスギ花粉症患者群（血清スギ特異的 IgE が CAP スコアで2以上かつ毎年スギ花粉飛散時期にスギ花粉症の症状を認め、スギ花粉症と診断がされている）、感作陽性未発症者群（血清スギ特異的 IgE が CAP スコアで2以上であるが、今まで全く花粉症の症状がない）、非アレルギー群（7項目の吸入アレルギーに対する血清特異的 IgE が全て陰性であり鼻炎の症状を認めていない）であるコントロール群を抽出した。CAP スコアの測定はスギ、ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ、カモガヤ、ブタクサ、アスペルギルス、カンジダの7項目が測定されて

いる。さらにスギ花粉症の症状の有無、気管支喘息やアトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどの既往も調べられている。スギ花粉症患者群及び感作陽性未発症者群とも、血清スギ特異的 IgE のみ CAP スコアで2以上であり、測定した他の6項目の血清特異的 IgE は陰性である人を選んだ。さらに3群とも気管支喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーの既往は認めていない人を選んだ。対象者とは本研究の内容を書面と口頭にて説明し、文書で同意を得て行っている。本研究は福井大学医学部倫理委員会における承認を得て行った。

本研究において解析の対象とした細胞は、鼻上皮細胞である。鼻粘膜上皮細胞は2009年度および2010年度とも、スギ花粉飛散時期（3月中旬）に施行した。採取は下甲介粘膜を、細胞診用ブラシで数回擦過し、鼻粘膜上皮細胞を採取した。これから total RNA を抽出し網羅的遺伝子発現解析を行った。鼻粘膜上皮細胞より合成した cRNA を用いたマイクロアレイは、HumanRef-8 ver3 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) によって行い、アレイの蛍光強度を BeadsStation 500X 遺伝子発現解析システム (Illumina) により検出した。網羅的遺伝子発現解析は、BeadStudio ソフトウェア (version3.1, Illumina) を用い、検出した蛍光強度をシグナル値として出力した。シグナル値とともに出力される Detection p -value は検出結果の信頼性の指標であり、 $p < 0.01$ であればシグナル値の信頼性があるとされる。よってこれらの値を基に結果の信頼性について検討した。また、Detection p -value を基に Flag を付加し、 $p < 0.01$ を Present、 $p > 0.05$ を Absent とした。Present と Absent の中間である $0.01 < \text{Detection } p\text{-value} < 0.05$ は Marginal とした。BeadStudio ソフトウェアにより出力された各サンプルのシグナル値より、バックグラウンドを引いた値の解析は、GeneSpring GX Software Version 10.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) によって行った。シグナルの最小値は 5 とし、それ以上の値をシグナル値として採用した。チップ間のノーマライズは、シグナル値からバックグラウンドを引いた値の 75% タイルに合わせて補正する Median Shift 補正を行った。また Baseline 補正は Baseline to median of all samples により行った。スギ花粉症患者群とコントロール群の遺伝子発現量が 4 倍以上の増加あるいは減少があった遺伝子を抽出した。発現量の比較について Mann-Whitney 検定を行い、多重比較補正は

Benjamini Hochberg false discovery rate (FDR) を行い、 $p\text{-value} < 0.05$ を統計学的な有意水準とした。

鼻上皮細胞のマイクロアレイについては、スギ花粉症患者群とコントロール群において、発現差が 4 倍以上かつ $p < 0.05$ の 18 遺伝子を同定した。そのうち、スギ花粉症患者が非アレルギー群と比べて、有意に増加している遺伝子は 13 遺伝子であった。また好酸球に強く発現しているものは 5 遺伝子であり、それらを除いた 13 遺伝子のうち、コントロール群とスギ花粉症患者において、特に高発現であった遺伝子を対象に、定量的 real-time PCR を行った。その結果、顕著に有意差の強く認められた *intelectin1* (*ITLN1*) については、スギ花粉飛散量が異なる 2009 年と 2010 年度の 2 つのスギ花粉シーズンでも、スギ花粉症患者では健常者と比較して有意に高発現していることが確認できた。*ITLN1* はスギ花粉症患者群では、感作陽性未発症者群と非アレルギー群と比べ有意に発現が上昇していたが、感作陽性未発症者群と非アレルギー群間では差は認めなかった。福井大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科において、手術時に採取された通年性アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜で免疫組織化学的染色を行ったところ、*intelectin1* は下甲介粘膜の上皮部分に存在していることが判明した。鼻粘膜上皮細胞の初代培養細胞では、IL-4 と IL-13 の刺激で *intelectin 1* の発現が認められた。

IL-4 と IL-13 は代表的な Th2 サイトカインであり、*intelectin1* がアレルギー性炎症により誘導されること、スギ花粉症発症者に高く *intelectin1* が発現していることから、*intelectin1* がアレルギー性鼻炎の発症に関連する遺伝子であることが示唆された。

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

Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, Arinami T, Fujieda S : Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int.* 60:87-92,2011

意元義政、藤枝重治

スギ花粉症に関する鼻上皮細胞の網羅的遺伝子解析 耳鼻免疫アレルギー 29(3):201-207,2011

意元義政、藤枝重治

網羅的遺伝子解析によるスギ花粉症発症に関する遺伝子解析 臨床免疫・アレルギー科 57: 39-44, 2012

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

生活習慣病、腎尿路系疾患における IRAP/AT4 のマーカーとしての臨床応用

研究代表者： 此下 忠志 (医学部・准教授)、横山 修 (医学部・教授)
共同研究者： 宮森 勇 (医学部・教授)、牧野 耕和 (医学部・大学院生)

概 要	<p>DNA チップを用いたトランスクリプトーム解析により、高血圧や糖尿病に特有な発現変動遺伝子群をクラスター解析し、C9orf3、ACE2、IRAP/AT4 (LNPEP) など、レニン-アンジオテンシン系遺伝子群が抽出された。RT-PCR を用いた解析で、IRAP/AT4 (LNPEP) の発現変化が示唆された。IRAP/AT4 (LNPEP) は受容体型アミノペプチダーゼであり、遺伝子の構造から約 800 アミノ酸配列分が Soluble form となると想定された。3 か所の抗体作製イデオタイプ部位を設定し抗体を作成した。標準品をもちいて検量線の作製を試みたところ、ELISA としての測定系が成立することがほぼ確認された。今後のバイオマーカーとして臨床応用に向けて、一次抗体反応時間、二次抗体反応時間、発色反応時間、反応温度、検量線段階希釈濃度などの適正化を進めている。</p>
関連キーワード	網羅的発現遺伝子解析、レニン-アンジオテンシン系、AT4、IRAP、LNPEP

研究の背景および目的

腎組織 RNA を用い、55,000 遺伝子転写物の網羅的解析により、生活習慣病・腎尿路系疾患で特異的に変動するクラスターを抽出した。特異的な発現変化を示す遺伝子クラスター No 11 の Gene Ontology 解析と Pathway 解析により C9orf3、ACE2、IRAP/AT4 などが抽出された (図1)。

正常腎と糖尿病/高血圧腎のクラスター解析

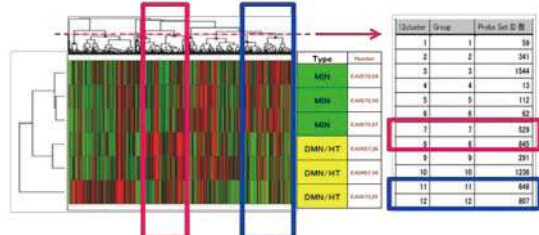


図1

抽出された個別の遺伝子について RT-PCR 法を用い評価し、糖尿病/高血圧において IRAP/AT4 (LNPEP) の発現変化が示唆された (図2)。

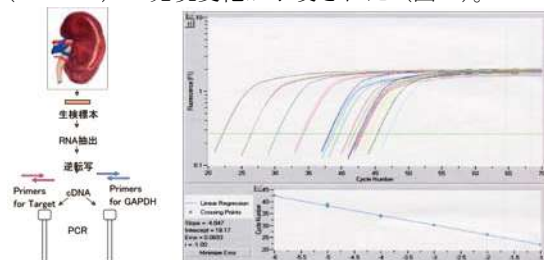


図2

この IRAP/AT4 は受容体型酵素であり。構造か

ら Phe154 と Ala155 の間で分解され、約 800 アミノ酸配列分が Soluble Form となると想定される (図3)。

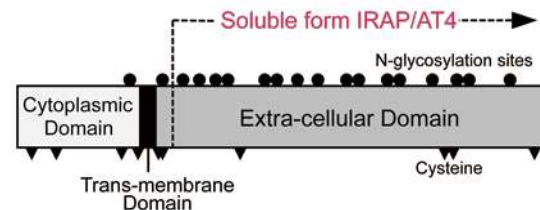


図3

可溶性部分のアミノ酸配列 3 か所の抗体作製用イデオタイプ部位を各 19 残基で設定し、家兔を免疫し、3 イデオタイプの抗体を作成した (図4)。

LNPEP(IRAP/AT4)の抗体作製部位

```

1 MEPFTNDRLQ LPRNMIENSM FEEEPDVDL AKEPCLHPLE PDEVEYEPWG RLLVVRGLGE
61 HEMEEDEEDY ESSAKLLGMS FMNRSSGLRN SATGYRQSPD GACVSPSART MVVCAFVIVV
121 AVSVMVYL LPRCTETKEG_CHKKNGSIGL IQPFATNGKL FPWAGIRLPT AVVPLRYELS
181 LHPNLTGATP RGSYVTSVGA LGVTVNHLH STGHNSRYT FMSAVSQEK QAEILEYAVH
241 GQIAVAPEA LLAGHNYTLK IEYSANISS YYGFGYFSYT DESNEKKYFA ATQFEPLAAR
301 SAFFPCDEPA FKATFIKI RDEQYALSN MPKSSVLLD DGLVDFESE SVKMSTYVA
361 FVGMKMLS GDVNGTLVSI YAVPEKGGV HYALETYKL LEFGNYFEI GYPLKLDLV
421 AFDPEAGAM ENWGLTFRE ETLYQSNIS SMADRKLVTK IIAHELAWOH FGNLYTKRWV
481 NDWLNEGFA TFMEYFSLEK IKKELSSYED FLDFARFKTMK KDSLNSHPH SSSVQSEQI
541 EEMFDSLSEY KGSLLMLK TYLSEDFQH AVVLYLHNS YASIOSDDLW DSNFVNTQT
601 LDVFRMKKTW TLQKGFPLVT VQKKGKELF QGERFFLNK PEIQPSDTSY LWHPLSYT
661 EGRNYSKYQS VSLLEKSGOV INLSEVLLW KVINNKSY YVHAYDQWE ALRHQLKIMP
721 YVLSKDRAN LNNIFELAG LGKVPLKRAF DLINYLGNEN HTAPITEALF QTDLIYNLE
781 KLGYMDLASR LVTRVFKLQ NQIQQOTWTD EGTPSMRELR SALLEFACH NLGNCSTTAM
841 KLFDVMMASIN GTQSLFDVM TVPKVGAKT DKGWSFLGK YISQSEAEK NKLEALASS
901 EDVRKLYWLM KSSLNGDNFR TQKLSPIRT YGRHFPGLL AWDFYKENWN KLVQKFLGS
961 YTIQNVAGS TYLFSTKTHL SEVOAFFENQ SEATFRLRVCV QEALIEVLQN IQWMEKNKS
1021 LFWWL
    
```

図4

作製した抗体を用い、標準品による検量線の作製を試みたところ、ペプチド 276 と 611 の組み合わせで ELISA の測定系が成立することが期待された。そこでキットを作成し、測定条件を適正化する。

研究の内容および成果

二抗体法による ELISA の測定系としてのキットが作製された (図 5)。



図 5

実際の測定では左端列を検量線用標準品の希釈段階とし有効な発色が確認された (図 6)。

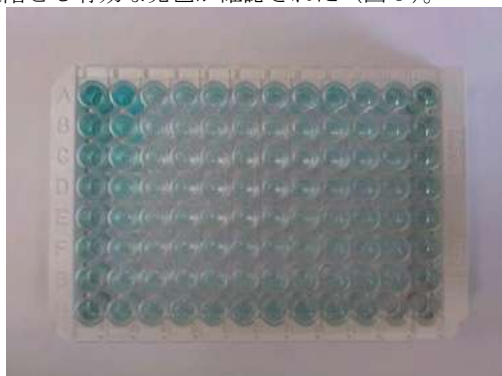


図 6

プレートリーダーによる測定で、極めて精度の高い測定が可能であることが確認された (図 7)。

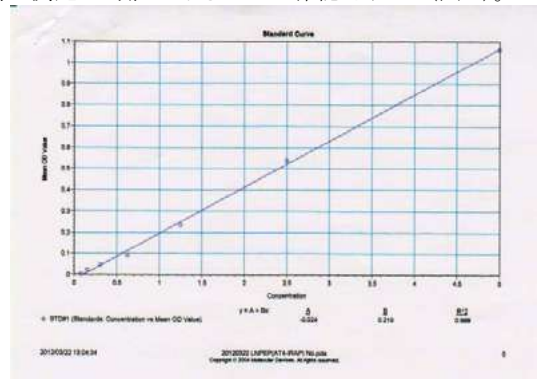


図 7

また duplicate sample での CV 値も低く、測定感度にかかる検体での測定間の相関も悪くないと考えている。しかしこれまでの測定で実際の血漿での濃度はかなり低めであることが想定される。そこで、一次抗体反応時間、二次抗体反応時間、発色反応時間、反応温度、検量線段階希釈濃度などについて様々な組み合わせを試み、測定法の適正化を進めている。

今後、測定法の適正化が完了すれば、千例規模でストックしている血漿、尿を用いて、疾患の有無や病期におけるバイオマーカーとしての意義を検討する。バイオマーカーとしての可能性を検討する。

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

「主な発表論文等」

Konoshita T*, et al. A crossover comparison of urinary albumin excretion as a new surrogate marker for cardiovascular disease among 4 types calcium channel blockers. *Int J Cardiol* 2011. 11.21. [Epub ahead of print]

Fujii M, Konoshita T, et al. Aldosterone inhibits endothelial morphogenesis and angiogenesis through the downregulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 expression subsequent to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129: 145-152, 2012

Tanaka T, Konoshita T, et al. The Differences in the Involvements of Loci of Promoter Region and Ile50Val in Interleukin-4 Receptor α Chain Gene between Atopic Dermatitis and Japanese Cedar Pollinosis. *Allergol Int* 61:57-63, 2012

Konoshita T* Do genetic variants of the Renin Angiotensin system predict blood pressure

response to Renin-Angiotensin system-blocking drugs? : A systematic review for pharmacogenomics in the Renin Angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 13: 356-361, 2011

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 22~24 年度 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (C) 22590909 網羅的発現遺伝子解析により抽出された高血圧関連遺伝子 AT 4 / I R A P の役割

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

舌苔を有する高齢者へのアクチニジン含有洗口液による 口腔清拭の効果

研究代表者： 上原 佳子（医学部・准教授）、定 清直（医学部・教授）
共同研究者： 長谷川 智子（医学部・教授）、千原 一泰（医学部・准教授）
礪波 利圭（医学部・助教）、林 真理子（大学院医学系研究科）

概 要	本研究は、舌苔を有する高齢者を対象にアクチニジン含有洗口液による口腔清拭と水による口腔清拭を実施し、舌苔面積、舌上細菌量、口腔内 pH の変化を比較し、アクチニジン含有洗口液による口腔清拭の効果を明らかにすることを目的とした。対象者は 65 歳以上の自分で口腔清拭が行えず、嚥下障害がある非経口摂取者とした。対象者に同一研究者が同一の手技と時刻による口腔清拭（5 分間）を、連続した 4 日間を 1 クールとし、3 日間のインターバルを挟んで 2 クール実施した。【清拭前】【清拭後】【清拭 4 時間後】【清拭 24 時間後】での測定項目の変化を比較した結果、アクチニジン含有洗口液による口腔清拭は舌苔除去と口腔内細菌量の増殖の抑制に有効であることが示唆された。
関連キーワード	口腔清拭、高齢者、舌苔、アクチニジン、口腔内細菌量

研究の背景および目的

口腔内細菌は誤嚥性肺炎、敗血症や細菌性心内膜炎など重篤な疾患を誘発させる原因となる。特に高齢者は、防御機能の低下、唾液分泌減少や嚥下機能の衰えにより誤嚥性肺炎を誘発しやすい。また疾患後遺症の影響により自力で口腔清拭が行えない高齢者も多い。その結果、舌運動や口蓋粘膜と舌の摩擦の減少により舌上に口腔内細菌や角化した細胞もしくは分泌物が停滞し舌苔が発生しやすくなる。舌苔は細菌増殖の温床で、舌苔がある場合は唾液中の細菌数が多くなり、少量の誤嚥でも肺炎を発症しやすい。よって舌苔除去は誤嚥性肺炎等を予防するために欠かせないケアである。

舌苔除去方法には機械的清掃と化学的清掃がある。機械的清掃はブラシなどで舌上を擦過するため舌を傷つけ、嘔吐反射を誘発する危険性が高い。化学的清掃は口腔用消毒薬等を洗口液として使用し口腔内細菌の増殖を抑制するが、洗口液を誤嚥した場合人体に悪影響を及ぼす危険性がある。

口腔清拭は口腔ケアの一つで、自力で口腔内の

清潔を維持できない対象者に対して、洗口液に浸したスポンジブラシを用いて口腔内全体を清潔にする看護ケアである。近年、アクチニジン含有タブレットの成人の舌苔への化学的清掃の効果が報告されている（中村、1999）。アクチニジンは植物由来の消化酵素で、唾液に溶解後、舌乳頭間に容易に浸透し、不要な蛋白成分を分解し軟らかくする作用がある（西山、2007）。それを洗口液として用いた場合、口腔粘膜を傷つけず容易に舌苔を除去でき、また誤って誤嚥しても人体への有害性はなく、他の洗口液を使用した口腔清拭より優れていることが考えられる。これまで、アクチニジンを洗口液として使用し、口腔内の細菌数に及ぼす影響を明らかにした文献はみあたらない。そこで、舌苔を有する高齢者を対象にアクチニジン含有洗口液による口腔清拭【介入】と水による口腔清拭【コントロール】を実施し、舌苔面積、舌上の細菌量、口腔内 pH の変化を比較し、口腔清拭の効果を明らかにすることを目的に研究を行った。

研究の内容および成果

<研究方法>

1. 対象：65 歳以上で次の①～⑥の条件を満たす患者 6 名とした。条件：①舌苔がある、②自分で口腔清拭が行えない、③嚥下障害があり非経口摂取である、④研究開始前の 10 日間に抗菌薬投与がない、⑤肺炎・口腔内疾患・開口困難がない、⑥パインナップルやキウイフルーツのアレルギーがない
2. 研究期間：平成 23 年 8 月 8 日～9 月 31 日
3. 測定項目：1) 舌苔面積、2) 舌上の細菌量、3) 口腔内 pH

4. 研究方法：病室内で対象者に対し同一研究者が同一の手技と時刻（11 時）による口腔清拭を、連続した 4 日間を 1 クール、3 日間のインターバルを挟んで連続して 2 クール実施した。対象者 A～C に対しては 1 クール【コントロール】、2 クール【介入】、対象者 D～F に対しては順序を反対に行った。舌苔面積測定後、【清拭前】試料採取を行い、5 分間の口腔清拭を実施後、【清拭後】【清拭 4 時間後】【清拭 24 時間後】に試料採取と舌苔面積測定を行った。対象者は実験による口腔清拭以外は担当看

看護師による口腔清拭（3時&17時）を含め通常通りの看護ケアを受け、安静臥床を保った。

5. 分析方法：対象者の1日目から4日目の【清拭前】を基準値とした各測定ポイントの変化率を算定し、【コントロール】と【介入】における対象者6名の4日分(述べ24名)の測定ポイントの変化の比較をFriedman検定 ($p<0.05$)、その後それぞれの測定ポイント間の差をみるためにWilcoxonの符号付順位和検定 (Bonferroniの修正、 $p<0.008$)を行った。

<結果&考察>

1. 舌苔面積 (図1)

対象者6名の4日分の舌苔面積の比較について、Friedman検定では【コントロール】【介入】ともに、【清拭前】【清拭後】【清拭4時間後】【清拭24時間後】の4群間に有意な差がみられた。Wilcoxon符号付順位和検定では、【コントロール】【介入】ともに、【清拭前】に比べて【清拭後】および【清拭4時間後】で舌苔面積は有意に減少した。【コントロール】では、【清拭前】に比べて【清拭24時間後】では舌苔面積に有意な差がなかったのに対し、【介入】では有意な減少がみられた。このことから、【コントロール】【介入】ともに口腔清拭4時間後に面積は一旦減少するが、【コントロール】ではその後増加した一方、【介入】では舌苔除去の効果が24時間後も維持できていた。

2. 舌上の細菌量 (図2)

細菌量6名4日分の比較について、Friedman検定では【コントロール】【介入】ともに、【清拭前】【清拭後】【清拭4時間後】【清拭24時間後】の4群間に有意な差がみられた。Wilcoxon符号付順位和検定では、【コントロール】【介入】ともに、【清拭前】に比べて【清拭後】および【清拭4時間後】で細菌量の有意な減少がみられたが、【清拭前】に比べて【清拭24時間後】では細菌量に有意な差がみられなかった。【清拭4時間後】に比べて【清拭24時間後】では有意に細菌量の増加がみられた。【コントロール】では【清拭後】に比べて【清拭4時間後】で細菌量の増加がみられたが、【介入】では【清拭後】に比べて【清拭4時間後】では細菌量に有意な差はみられなかった。このことから、アクチニジンを使用した口腔清拭では、細菌増殖が清拭後少なくとも4時間は抑制されていた。

3. 口腔内 pH

対象者6名の4日分の口腔内 pH の比較について、【コントロール】【介入】とも【清拭前】に比べて【清拭後】に上昇するが、【清拭4時間後】には【清拭前】の pH に戻っており、その値や変化にはほぼ違いはみられなかった。

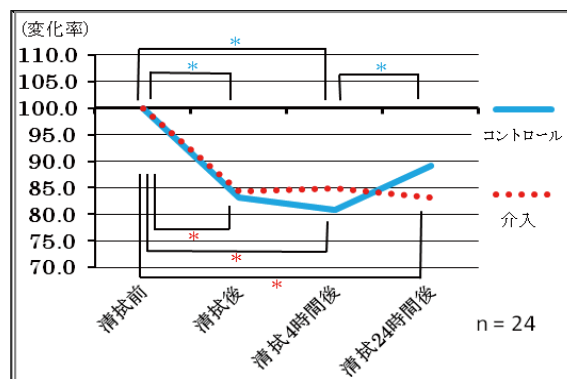


図1【介入】と【コントロール】における対象者6名(平均値)の4日分の測定ポイントの変化率の比較：面積
Wilcoxonの符号付順位和検定 * $p<0.008$

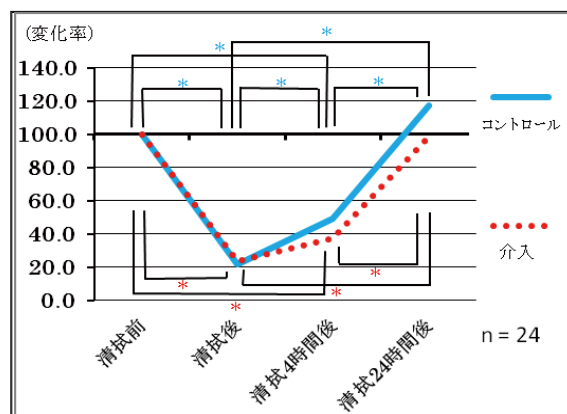


図2【介入】と【コントロール】における対象者6名(平均値)の4日分の測定ポイントの変化率の比較：細菌量
Wilcoxonの符号付順位和検定 * $p<0.008$

4. まとめ

アクチニジン含有洗口液による口腔清拭は水による口腔清拭に比べ、舌苔を除去し、口腔内細菌数の増殖を抑制していた。アクチニジンが細菌増殖の温床である舌苔を軟化し、容易に舌苔を除去することが可能となり、その結果、水による口腔清拭よりも舌上の細菌量を減少させることにつながったと考えられる。本研究により、アクチニジン含有洗口液を使用した口腔清拭は、臨床現場で舌苔を効果的に除去する看護ケアであることが示唆された。

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

本研究は、第32回日本看護科学学会にて発表予定である。

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

嚥下障害患者に対する嚥下造影検査自動解析ソフトウェアの開発 (継続)

研究代表者： 成田 憲彦（医学部・助教）
共同研究者： 新家 信行（福井県歯科医師会・学術担当理事）
村山 敏一（高嶋技研株式会社・代表取締役）

概 要	嚥下（食物の飲み込み）を評価する嚥下造影検査の解析を自動で行うソフトウェアを開発する。高齢化社会において嚥下障害患者の増加は明らかであり、今後さらに嚥下機能検査の社会的なニーズが増加すると思われる。しかしながら、嚥下機能評価に必要な検査は、専門知識を持つ耳鼻咽喉科医師が行う必要があり、経費、時間的に多数の患者に対応出来ない。特に嚥下機能評価に最も診断力が高いと言われる嚥下造影検査は、数値化された客観的評価が難しいため、結果の解析に嚥下専門医の技術と経験が必要とされる。本研究では、この嚥下造影検査の結果を画像解析技術を用いて自動で解析、評価するソフトウェアを開発、実用化することを目的として行う。実用化がなされれば、嚥下に関する専門医のいない医院レベルでも嚥下機能評価が可能となり、嚥下障害患者の摂食状況の改善、誤嚥性肺炎の減少に貢献できると考える。
関連キーワード	嚥下障害、嚥下造影、誤嚥、動画、解析

研究の背景および目的

嚥下造影検査は動画で保存されるが、主観を除外した数値化による解析の方法はなく、経験を積んだ嚥下専門医（多くは耳鼻咽喉科医）が経験則に基づいて診断を行い、嚥下訓練の方針を決定している場合がほとんどである。本研究では新規の動画処理、解析ソフトウェアを作成することにより嚥下造影検査の評価・診断を自動化し、経験のない医師や言語療法士が嚥下造影を行えるようなソフトウェアシステムを構築する。我々はこれまでに、嚥下造影解析を手動で行うソフトウェアを試作的に開発し、実際の臨床サンプルの解析を行

った。その結果、嚥下造影の結果を画像処理で数値化・評価することが可能であることが解った。今後は、数値化の自動化を目的に継続研究を行う。嚥下機能評価対象患者は全国統計で80万人以上と言われている。嚥下機能評価を必要とするが、専門医不在のため施行できていない民間病院あるいは歯科医院の数は相当数にのぼると予想される。嚥下造影解析ソフトウェアが実現すれば、嚥下造影評価がこれらの施設でも可能となり、嚥下障害患者の治療に大きく貢献できると考える。

研究の内容および成果

嚥下造影を行うと、正常な嚥下では、造影剤が口腔から咽頭に入った時点で喉頭および舌骨の挙上運動が生じ、食道入口部が開き、造影剤が食道へと通過する。嚥下後は挙上した喉頭および舌骨は元の位置に戻り、食道入口部は閉鎖される。

ところが、嚥下障害患者では、造影剤通過に伴って起こる喉頭、舌骨の挙上や食道入口部開大が不完全になったり、そのタイミングが遅れる。また、気管への造影剤流入（誤嚥）や喉頭への残存

が見られる。これらの所見は、点数化する基準が報告されているが、専門医による評価が必要である。今回の研究では、嚥下造影の画像処理による数値化の意義を検討するため、前年度 TR 研究費で作製した試作バージョンを用いて、造影剤と舌骨、喉頭の挙動を手動で30例の臨床サンプルを実際に数値化・解析した。

その結果、誤嚥なし群では誤嚥あり群よりも嚥下開始から舌骨最大移動時間および造影剤咽頭通過

時間が短い傾向があることが解った (図1)。また誤嚥なし群は誤嚥あり群よりも舌骨の最大前方移動および最大上方移動距離が大きい傾向があることが解った (図2)。しかしながら、喉頭の前方移動、上方移動は、誤嚥の有無に関係がなかった。この初期データから造影剤の通過時間および舌骨の挙動の数値化が嚥下診断に最も有用である可能性が示唆された。

研究の次の段階として現在動画解析技術を用いて、嚥下造影検査時の造影剤 (通常バリウム) と舌骨の自動追跡を研究中である。初期解析ではあるが動画解析専用ソフトウェアを用いて造影剤、舌骨の自動追尾及び数値化は可能であることが解った。

自動化においての問題点として、嚥下造影時にどうしても患者自身が動いてしまい、追跡エラーや喉頭挙上の数値化データに誤差が含まれる例が多いことが分かった。この点については、頸椎椎骨を追跡して基準線を描出し、これをもとに数値を補正する理論を考え、解析中である。頸椎も同様に追尾可能であると考えられ、頸椎を用いた体動補正も可能と考える。これを用いて、さらに臨床サンプルの自動解析が可能かを引き続き検証する。実現すれば、手動での数値化では現実的に不可能であったフレーム毎の数値化が可能になり、さらに詳細な嚥下機能解析、臨床応用への実現化に飛躍できると考える。

図1

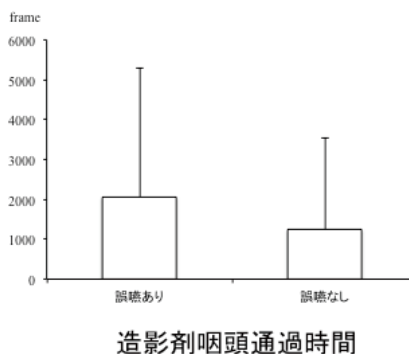
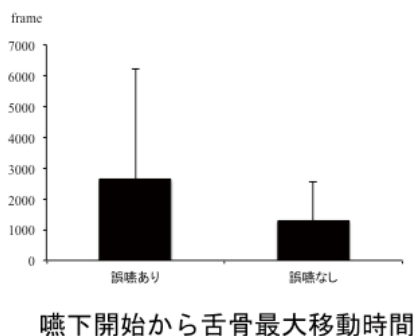
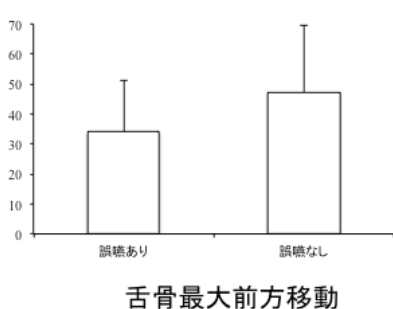
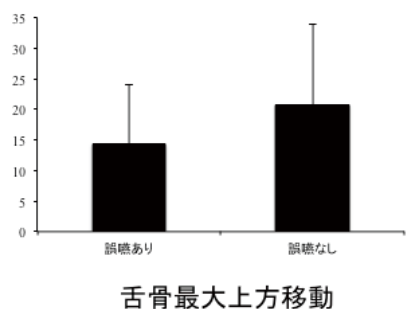


図2



福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

小児気管支喘息患者の病型診断用バイオマーカーの開発

研究代表者： 大嶋 勇成（医学部・教授）

共同研究者： 安富 素子（医学部・助教）、白崎 仁幸子（医学部附属病院・医員）

河北 亜希子（医学部附属病院・医員）

概 要	気管支喘息は単一の疾患ではなく様々な病型からなる症候群と考えられることから、病型診断に有用なバイオマーカーを同定するために、呼気中 NO(FeNO)の小児喘息患者への応用の可能性と、末梢血線維細胞数の計測方法について基礎的検討を行った。NIOX MINO による FeNO の測定値は、呼吸機能の各種パラメーターとの相関性は低かった。FeNO は、喘息の真の重症度が重症であるほど、また、喘息のコントロールが不良であるほど高値を示した。アレルギー性鼻炎を合併する場合には、鼻炎症状が増悪した患者で高値を示した。一方、喘息が重症であっても FeNO が高値を示さない患者も存在しており、好酸球性炎症以外が重症化に関与する病型が存在することが示唆された。フィブロネクチンをコートしたプレートに単核細胞を培養し線維細胞数を計測する方法を確立した。
関連キーワード	気管支喘息、呼気中 NO、線維細胞、呼吸機能

研究の背景および目的

小児気管支喘息はアトピー型が大半を占めると考えられている。しかし、実際には気道感染症時にのみ発作を起こす患者や、発作頻度は少ないが大発作となり易い者、治療薬への反応性などその病型は多彩である。しかし、小児喘息の病型の違いに基づいた病態解析は十分には行われていない。

本邦の小児気管支喘息ガイドライン(JPGL2012)においては、発作頻度に基づき重症度を判定し、吸入ステロイドを主体とした長期管理薬の使用を推奨している。しかし、病型によっては必ずしも吸入ステロイドによる治療が最善とはいえない症例の存在する。また、吸入ステロイド治療にも関わらず、気道リモデリングが進行してしまう可能性もある。

JPGL2012 では、好酸球性の気道炎症を反映する客観的指標として呼気中 NO(FeNO)、喀痰細胞診、気流制限を反映するものとして、血液ガス、フローボリューム曲線、ピークフローなどが上げられている。この内 FeNO は、成人の喘息管理に

おいてその有用性が報告され、保健収載への働きかけがあるものの、小児喘息の管理における有用性についてはまだ十分に検討されていない。

一方、喘息の治療では気道過敏性や気流制限につながる気道リモデリングの制御が重要と考えられている。気道リモデリングの評価は通常、気管支内視鏡による気道粘膜生検組織の解析により行われるが、小児に対し気管支内視鏡を実施することは侵襲性が高く困難である。そこで、成人の喘息患者において気流制限の進行と相関するとの報告がある線維細胞に着目し、末梢血線維細胞数を解析する手法を確立することで、気道リモデリングの新たな指標として用いることが期待される。

本研究では FeNO や線維細胞数といったバイオマーカーと、従来の臨床パラメーターと組み合わせ、クラスター分析などの統計解析手法を用いることで、小児喘息の病型分類を行う手法を確立するための基礎的データの収集を目的とする。

研究の内容および成果

1) 小児気管支喘息患者の呼気中 NO(FeNO)測定

FeNO の測定は Aerocine 社の NIOX MINO を用いて測定した。7 歳未満の全例、7 歳以上 10 歳未満では一部の患者で FeNO を測定することは出来なかった(図 1)。測定不可能の原因としては、一定流速で一定時間呼出をすることが低年齢では困難であることが問題となった。

成人での検討では、FeNO が 25 ppb 以上の場合、好酸球性の気道炎症が生じていると報告されている (Szeffler SJ et al. J Allergy Clin Immunol2012)。実際、シックハウス症候群や心

因性咳嗽の患者ではそれぞれ、10 ppb, 7 ppb と低値を示してし、吸入ステロイドが無効であると予

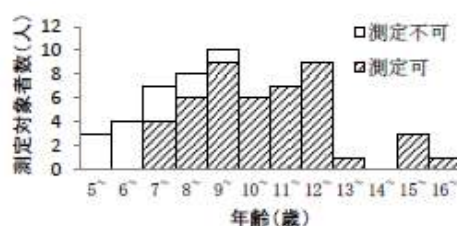


図 1 測定対象者の年齢分布

測する上では有用と考えられた。

呼吸機能の各種パラメーターと FeNO との相関はいずれも低く、中枢気道狭窄を反映するピークフロー値よりも末梢気道狭窄を反映する V50 や V25 の方が FeNO と弱いながらも負の相関を示す傾向を認めた。小児では中枢気道狭窄は重症でないことが明らかにならないため、FeNO が反映する気道炎症による気道狭窄への影響は末梢気道に出やすいことが示唆された。

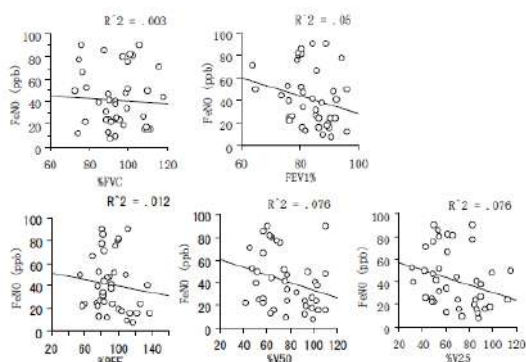


図2 呼吸機能パラメーターと FeNO との相関

治療を加味した真の重症度との関係では喘息が重症であるほど FeNO は高値を示す傾向が認められ、コントロール状態が不良であるほど FeNO は高値を示した。しかし、重症例であっても FeNO が低値を示す症例もあり、このような患者ではコントロール状態が不良でも高値とならず、好酸球

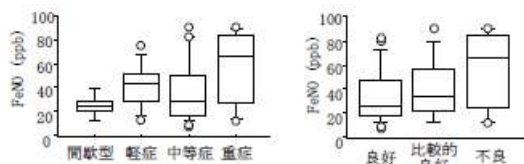


図3 重症度別、コントロール状態別 FeNO 値

性の気道炎症以外の病態が重症化に関与している例が存在する可能性が考えられた。

また、アレルギー性鼻炎を合併した小児では、鼻炎症状が落ち着いている場合には、鼻炎の合併が無い児と FeNO の値には有意な差を認めなかったが、鼻炎症状が増悪すると FeNO 値は有意に高い値を示した。従来、FeNO 高値の患者では吸入ステロイドがロイコトリエン拮抗薬より有効性が高く、鼻炎合併例ではロイコトリエン拮抗薬の方が有効性が高いことが報告されているが、FeNO 値が、鼻炎増悪により影響を受けることから、FeNO 値に基づき治療薬を決定することは困難であり、鼻炎症状を加味した上で FeNO 値を評価することが重要と考えられた。

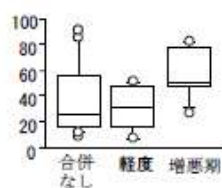


図4 アレルギー性鼻炎症状の有無と FeNO 値

2)末梢血線維細胞数の測定法の基礎的検討

線維細胞数を測定する方法として報告された、コラーゲン I 発現 CD45 陽性細胞をフローサイトメーターで測定する方法は、採血量が限られる小児検体には応用が困難と考えられた。一方、 α -平滑筋アクチン発現量を ELISA で測定する方法では、感度と再現性が低かった。そのため、フィブロネクチンをコートしたプレートに末梢血単核細胞を培養し、特徴的形態を呈する細胞数を測定する方法が簡便に再現性が高い方法とであることを確認した。この方法により、患者によって、紡錘形の典型的な線維細胞が増加している患者と、非紡錘形の大型の細胞が増加する患者が存在することが明らかとなった。

トランスレーショナルリサーチ
推進センター公募採択型研究費

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

「主な発表論文等」

論文発表

- 1) 抗原感作とアレルギー疾患発症予防アレルギー・免疫 19:9-10 (2012)
- 2) アレルギー疾患の病態: 免疫細胞の関与小児内科 43:1825-29 (2011)
- 3) 免疫反応の発達周産期医学 41:605-607(2011)
- 4) アレルギー疾患発症に関わる免疫システムアレルギーの臨床 31:381-385(2011)

学会発表

- 1) 小児気管支喘息の病態と治療栃木県小児アレルギー研究会 特別講演 2011.11.16 宇都宮
- 2) IL-33 の線維細胞に及ぼす影響 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011.11.25-27 東京
- 3) 小児アレルギー疾患の耐性獲得機序と免疫療法

第 19 回大分アレルギー研究会 特別講演
2011.10.14 由布

- 4) 小児喘息の多様性と長期管理第 6 回奈良小児喘息治療セミナー特別講演 2011.10.10 奈良
- 5) JPGL の乳児喘息診断・治療基準の妥当性と問題点の検証 (第 4 報) 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011.05.14-15 幕張

「特記事項」

線維細胞に関するデータの一部は原著論文 IL-17A/F modulates fibrocyte functions in cooperation with CD40-mediated.として投稿中

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 24 年度基盤研究(C)・小児気管支喘息エンドタイプの診断と治療・代表・申請中

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

EBNに基づく分娩後のシャワー浴および入浴開始時期に関する研究

研究代表者： 瀬戸 知恵（医学部・助教）

共同研究者： 佐々木 綾子（医学部・准教授）

概 要	本研究では、根拠が曖昧なまま続けられている、分娩後のシャワー浴および入浴の開始時期について、わが国の実態を明らかにし、EBNの視点から望ましい方法を検討することを目的とした。全国の病院の、責任者の立場にある助産師を対象に、郵送法により無記名自記式質問紙調査を実施した。その結果、分析対象は399名であり、シャワー浴開始時期は「産褥1日目」（80.1%）、入浴開始時期は「産褥1ヶ月目」（40.8%）が最も多い割合を占めていた。早期開始群は非開始群に比べて、明確な理由に基づいて実施している傾向があることが示唆された。また、望ましいと考える時期には幅があり、現在実施している時期よりも早期と考えている者も多くいることが分かった。文献検討や今回の結果から、シャワー浴については分娩2時間後以降の時期に、また入浴については産褥1週間以降の時期に、褥婦の状態や希望に応じて実施していくことが望ましいと考えられる。
関連キーワード	EBN、分娩後、シャワー浴、入浴、開始時期、ケアの見直し

研究の背景および目的

これまで、分娩ケアについては、EBN（Evidence-Based Nursing）の視点から様々な見直しが行われてきている。例えば、分娩前の浣腸や剃毛は、既に不要であることが実証され周知されており、またフリースタイル出産も、根拠に基づいたケアとして多くの施設で取り入れられるようになってきている。しかし、根拠が曖昧なまま続けられていると考えられるケアは依然としてまだ多数あり、今回我々は、その中でも早期の改善が望まれる、分娩後のシャワー浴および入浴の開始時期に着目することとした。

分娩後のシャワー浴および入浴については、わが国では現在、シャワー浴は産褥1日目から、入浴（浴槽につかる）は産褥1ヶ月から開始とする方法が一般的であり、看護学や助産学テキストにも概ねそのように記載されている。しかし、先行

文献や解剖生理、現代人の清潔習慣、海外の状況、また独特の入浴文化を有するわが国の特徴などを鑑みると、シャワー浴は分娩2時間後、入浴は産褥1週間後という早期から可能であると考えられ、早期の改善が求められる。

わが国の現状は、根拠が曖昧なまま、感染予防という名目や長年の慣習に基づいて、遅い時期となっていることが予想されるが、その正確な実態は明らかではない。本研究ではそれらを明らかにし、EBNの視点から、望ましい方法を検討することを目的とした。

本研究は、EBNに基づいた質の高い看護ケアの提供に寄与すると共に、褥婦のQOLの向上にも大きく貢献することが期待できる。また、臨床現場だけでなく、助産・母性看護教育現場の改革にも寄与するものとする。

研究の内容および成果

【研究方法】

1. 調査方法：全国の分娩介助業務を行っている病院の、助産業務の実態を最も把握していると考えられる責任者の立場にある助産師で、調査協力を得られた者を対象に、郵送法により、独自に作成した無記名自記式質問紙調査を実施した。

2. 調査内容：1) 対象者・施設の背景（職位、施設の種類、年間分娩件数、帝王切開率、会陰切開率、シャワー浴・入浴設備の状況等）2) 分娩後のシャワー浴・入浴に関する実態（開始時期、その理由、褥婦の声、分娩後のシャワー浴・入浴に関する考え等）

3. 分析方法：各項目の単純集計後、早期開始群と非開始群の比較を行った。統計学的分析にはSPSS18.0J for Windowsを用い、有意水準は5%

未満とした。

なお、本研究は福井大学医学部倫理審査委員会の承認を受けて実施した（第475号）。

【研究結果】

調査用紙配布数930の内、回収数は399であり、その内有効回答の得られた397を分析対象とした。回収率は42.9%、有効回答率は99.5%であった。

1. 対象者の背景

対象者の職位は、看護師長199名（50.4%）、助産師（スタッフ）68名（17.2%）、主任61名（15.4%）であった。施設の種類は、総合病院（MFICU・NICUなし）181施設（45.6%）、総合病院（NICUのみあり）114施設（28.7%）、総合病院（MFICU・NICUあり）42施設（10.6%）の順であった。

年間分娩件数の平均値は530±367件、帝王切開

率は 24.9±13.7%、会陰切開率は初産婦 67.2±32.1%、経産婦 40.0±28.6%であった。

病棟内のシャワー浴・入浴設備は（複数回答）、「共用のシャワー設備」があると答えたのは 324 名（81.6%）、「個室のシャワー設備」197 名（49.6%）、「共用の入浴設備」175 名（44.1%）等であった。

正常分娩後の抗生物質処方は、「ルーチンで実施している」は 251 名（63.2%）であった。

2. 分娩後のシャワー浴・入浴開始時期の実態

シャワー浴開始時期は、「産褥 1 日目」と答えたのは 318 名（80.1%）と最も多く、「分娩 2 時間後」は 7 名（1.8%）であった。「その他」（自由記載）としては、「6 時間後」6 名、「12 時間後」3 名等であった。再分類した結果（図 1）、「1 日未満」であったのは 24 名（6.0%）、「1 日以降」であったのは 355 名（89.4%）であった。開始時期の理由（複数回答）は、「医師の指示」131 名（33.0%）、「特に理由はない」96 名（24.2%）、「その他」149 名（37.5%）等であった。

望ましいと思うシャワー浴開始時期（図 2）は、「産褥 1 日目」と答えたのは 301 名（76.0%）、「その他」62 名（15.7%）、「分娩 2 時間後」24 名（6.1%）の順であり、「その他」（自由記載）としては「当日（6 時間後、12 時間後等）」27 名、「褥婦の希望、状態に応じて」27 名等の回答があった。その理由（自由記載）としては、「1 日目」と答えた者は、「褥婦の全身状態を考慮して」204 名、「2 時間後」と答えた者は、「保清やリフレッシュのため」10 名、「気分不良がなければ」12 名等であった。

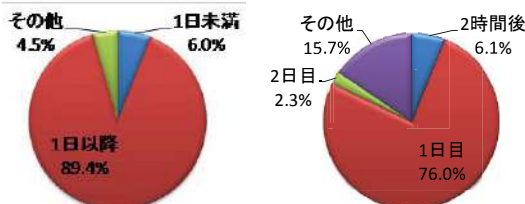


図1 シャワー浴開始時期

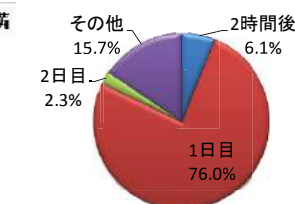


図2 望ましいと思うシャワー浴開始時期

入浴開始時期（図 3）は、「産褥 1 ヶ月目」と答えたのは 341 名（85.9%）と最も多く、次いで「その他」29 名（7.3%）、「2 週間目」13 名（3.3%）の順であった。「その他」（自由記載）としては、「悪露が（ほぼ）消失してから」17 名、「3 週間目（頃）」4 名等であった。開始時期の理由（複数回答）は、「医師の指示」243 名（61.2%）、「昔からの慣習だから」122 名（30.7%）、「その他」78 名（19.6%）等であった。

望ましいと思う入浴開始時期（図 4）は、「産褥 1 ヶ月目」162 名（40.8%）、「その他」91 名（22.9%）、「2 週間目」86 名（21.7%）の順であった。「その

他」（自由記載）としては、「血性悪露が消失してから、出血が少なくなってから」29 名、「悪露が消失してから」14 名等であった。その理由（自由記載）としては、「1 ヶ月目」と答えた者は、「感染予防、子宮復古を考慮して」96 名、「現代はシャワーやビデで対応できるため必要がない」11 名等であり、「2 週間目」と答えた者は、「退院後自宅であれば良いと思うから」13 名等であった。

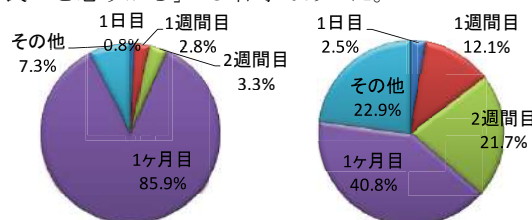


図3 入浴開始時期

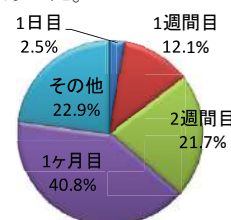


図4 望ましいと思う入浴開始時期

シャワー浴、入浴の開始時期に関して、褥婦からの要望が「ある」と答えたのは 109 名（27.5%）、「ない」と答えたのは 284 名（71.5%）であり、その内容としては、「もっと早く入りたい」が 84 名（21.2%）、「もっと遅く入りたい」が 45 名（11.3%）等であった。

その他、自由記載欄の中で、「なるべく早く入浴できれば快適」、「循環が良くなり母乳分泌促進にもなる」等、より早期の入浴開始時期について積極的な意見を述べていた者が、計 197 名いた。

3. 早期開始群と非開始群の比較

シャワー浴早期開始群（1 日未満）と非開始群（1 日以降）に分類し、開始時期の理由について比較を行ったところ、「その他」と答えた者は早期開始群で有意に多かった（ $p < 0.01$ ）。また入浴早期開始群（3 週間以内）と非開始群（1 ヶ月）に分類し、開始時期の理由について比較を行ったところ、「昔からの慣習だから」と答えた者は非開始群で有意に多かった（ $p < 0.05$ ）。

【考察】

分娩後のシャワー浴は産褥 1 日目、入浴は産褥 1 ヶ月目から実施している施設が多かった。早期開始群は非開始群に比べて、明確な理由に基づいて実施している傾向があることが示唆された。また、望ましいと考える時期には幅があり、現在実施している時期より早期と考えている者も多くいることが分かった。文献検討や今回の結果から、シャワー浴については、分娩 2 時間後以降の時期に、また入浴については、産褥 1 週間以降の時期に、褥婦の状態や希望に応じて実施していくことが望ましいと考えられる。今後は、褥婦を対象とした実態調査や、望ましい時期についての臨床現場および教育現場に対する啓発活動が必要と考える。

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

研究の成果は、第 14 回日本母性看護学会（2012 年 6 月開催予定）、ICOWHI 19th International

Congress on “Women’s Health 2012”（2012 年 11 月開催予定）で発表予定である。

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

急性腎障害 (AKI) に対する 酸化ストレス特異的迅速レドックス診断法の開発についての研究

研究代表者： 糟野 健司 (医学部・助教)、信川 泰成 (医学部・助教)
安田 善一 (医学部・講師)、重見 研司 (医学部・教授)
共同研究者： 木村 秀樹 (医学部・准教授)、高橋 直生 (医学部・助教)

概 要	急性腎障害 (AKI) の集中治療室 ICU での死亡率は 50%を上回り、予後不良である。予後不良の一原因として早期診断法の欠落により治療開始時期の遅れが指摘されている。AKI の発症には酸化ストレスが重要な基盤病態と考えられているが、現時点で酸化ストレスに特異的な診断法は確立されていない。そこで本研究では平成 22 年度挑戦的萌芽研究採択課題で発見した AKI での超早期の尿中 TRX の特異的上昇という生体レドックス反応を応用発展させ、酸化ストレスに特異的でリアルタイムに動き、簡便でベッドサイドで利用可能な新規の迅速レドックス診断法を開発し、AKI の早期診断のためのツール開発を目的とし研究を行った。
関連キーワード	急性腎障害、酸化ストレス、迅速診断法、レドックス、チオレドキシシ、尿検体

研究の背景および目的

急性腎障害 (AKI) の診断法・病態解明・治療の研究はまだ緒についたばかりである。予後改善のためには早期診断が不可欠とされており、古典的なクレアチニンに代わる早期マーカーとして尿中 NGAL などが提唱されている。AKI は酸化ストレス、虚血、感染症、薬剤性など様々な病態により引き起こされるが、中でも酸化ストレスは重要な基盤病態の一つと考えられている。しかし、現時点で病因特異的な AKI 診断法は確立されていない。本研究は、平成 22 年度に挑戦的萌芽研究で採択された「新規尿検査としての尿中エキソゾーム分画中腎症マーカー蛋白の検出」の研究過程で発見した「AKI における酸化ストレス制御因子チオレドキシシ (TRX) の尿中増加」という現象を発展

させるものである。チオレドキシシ (TRX) は酸化ストレスによって誘導され、細胞外に分泌されるレドックス制御タンパクで、血中 TRX は虚血性心疾患などで高値を示すことが知られているが、尿中 TRX については報告がない。

今回の研究では、①尿中 TRX の上昇が酸化ストレスに特異的に反応したのかどうかを再確認し、②臨床現場で早期治療開始を可能にするための迅速診断法開発に必要な基礎技術の確立を目標とした。これらの研究により、AKI の詳細な病因診断が可能となり、病態に即した病因別 AKI 治療が早期に開始出来るようになり、AKI の予後改善に寄与することが期待される。

研究の内容および成果

① 尿中 TRX の酸化ストレス特異性の検証

尿中 TRX に関する報告がほとんど無いため、尿中 TRX を様々な 8 腎疾患で測定した。尿中 TRX は AKI で特異的に上昇しており、カットオフ値を 35.2 ng/mgCr とした場合、感度 0.9、特異度 0.82、AUC 0.9 の高精度で AKI の診断に有用であることが判明した。尿中 TRX が早期 AKI マーカーとして利用可能かどうかを調べるために、人工心肺開始後、1 時間毎に採尿をして尿中 TRX の推移を調べた。尿中 TRX は早期 AKI マーカーの代表である

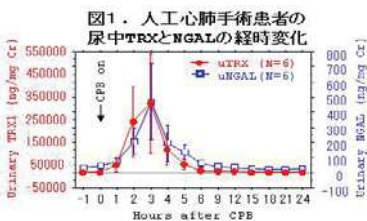


図1. 人工心肺手術患者の尿中TRXとNGALの経時変化

尿中 NGAL とほぼ同時に 2 時間で上昇した (図 1)。これに対し、現在、診断基準に用いられている血清クレアチニン

(Cr) は手術後 36-48 時間後に遅れて上昇した (図 2)。尿中 TRX は尿細管障害の指標である尿中 NAG や萎縮尿細管の程度と有意な相関を認め

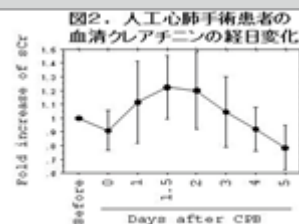
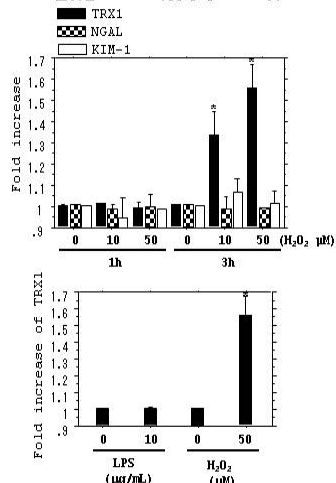


図2. 人工心肺手術患者の血清クレアチニンの経日変化

た。さらにマウスの腎での InSitu hybridization やリコンビナントヒト TRX を静注したマウス腎をヒト TRX 特異的モノクローナル抗体で免疫染色することにより尿中 TRX の由来を調べた。定常時には腎尿細管局所で TRX が産生され、さらに血中からも TRX が糸球体でろ過され、尿管で再吸収され、尿管細胞内に蓄えられることを確認した。AKI での尿中 TRX 増加機序を調べるため虚血再還流後のマウス腎を継続的に免疫染色で観察した。染色結果から定常時に蓄えられた TRX が AKI の酸化ストレスにより尿管細胞から尿中に逸脱し、

さらに尿管障害で再吸収出来ないため尿中に検出されることが示唆された。さらに酸化ストレス特異性を観察するために培養ヒト尿管細胞に過酸化水素水やリポポリサッカライド (LPS) を添加し、培養上清中の TRX や既存の AKI マーカー、NGAL、KIM-1 を調べた。TRX のみが過酸化水素水の濃度依存性に特異的に上昇を示した。TRX の上昇は過酸化水素水のみで認められ LPS では認めなかった (図 3)。(Am J Physiol 投稿中)

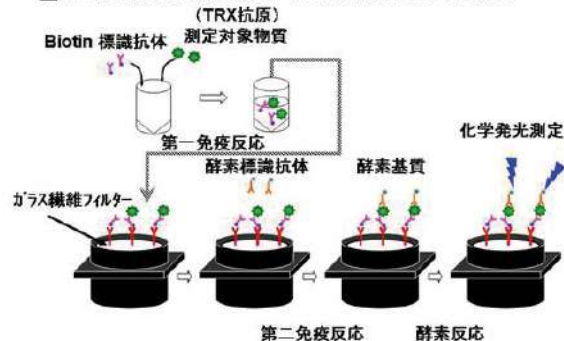
図3.尿管培養細胞の培養液上清における酸化ストレス特異的TRX上昇



② 尿中 TRX の迅速測定法 (化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA)) の開発

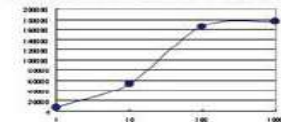
①の結果から尿中 TRX は他の AKI マーカーに比べ超早期に酸化ストレス特異的に上昇することが示唆された。これら尿中 TRX の特徴を生かすため、迅速診断法の開発に取り組んだ。

図4. 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) 診断システムの概要 (TRX抗原)



アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗 TRX 抗体とビオチン標識抗 TRX 抗体を用いたサンドイッチアッセイによって固相フィルター上に TRX 抗原をトラップし、その後 ALP の基質である発光基質を固相フィルターに添加することによって得られる発光シグナルを光電子倍增管 (PMT) を用いて検出を試みた (図 4)。従来の ELISA 法では 8 時間程度であったアッセイ時間が本測定法では 10 分程度で測定が完了した。リコンビナント TRX 段階希釈液をサンプルとして良好な検量線を得ることが出来た (図 5)。

図5. CLEIA法によるTRX検量線



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

「主な発表論文等」

<論文発表>

Kasuno et al. Urinary thioredoxin 1 is an oxidative stress-specific biomarker of acute kidney injury. Am J Physiol in submission.

<学会発表>

Kasuno et al. Urinary thioredoxin is a predictive biomarker of acute kidney injury. Poster presentation in Annual Meeting of International Society of Nephrology 2011.

Kasuno et al. Urinary thioredoxin 1 is an oxidative stress-specific biomarker of acute kidney injury. Poster presentation in Annual Meeting of American Society of Nephrology 2011.

Kasuno et al. Urinary thioredoxin is an oxidative stress associated biomarker of acute kidney injury. Poster presentation in Annual Meeting of International Congress on Uremia Research and Toxicity 2011.

糟野健司ら 「レドックス制御蛋白「尿中チオレドキシ」の酸化ストレス特異的急性腎障害 (AKI)マーカーとしての有用性」平成 23 年度日本腎臓学会学術総会 口頭発表

糟野健司ら 「急性腎障害(AKI)の病因別診断に尿中チオレドキシが有用である」平成 23 年度日本臨床検査医学会学術集会 口頭発表

「特記事項」

平成 23 年度日本腎臓学会学術総会優秀演題賞受賞
国内特許、国際特許出願準備中

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金 基盤研究 (C) (H24~H26)
レドックス生体応答反応を利用した新規のベッドサイド迅速酸化ストレス診断法の開発
研究代表者 申請中

平成 24 年度 福井大学研究育成経費 東日本大震災からの復興に関連する調査・研究の支援
研究代表者 申請予定

科学研究費補助金 基盤研究 (B) (H23~H25)
酸化ストレスに対する新規のレドックス診断法の開発 (代表 中村肇) 分担 H23 年度 960 万円

平成 23 年度 福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センターTRセンター公募採択型研究助成 急性腎障害に対する酸化ストレス特異的迅速レドックス診断法の開発についての研究 研究代表者 15 万円

平成 23 年度 福井大学 F S 可能性試験助成経費急性腎障害に対する酸化ストレス特異的迅速レドックス診断法の開発についての研究 研究代表者 50 万円

平成 23 年度 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」腎臓領域におけるレドックス制御機構の解明と臨床展開 研究代表者 90 万円

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

解毒酵素 GSTM1 遺伝子多型と vincristine の薬動力学、 効果・副作用との関連

研究代表者： 岸 慎治（医学部・助教）

共同研究者： 細野 奈穂子（医学部・助教）、五十嵐 敏明（医学部附属病院・薬剤部）

概 要	一般に抗がん薬は治療域と毒性の幅が極めて狭いにもかかわらず作用には幅広い個人差が存在する。この原因の一つとして抗がん薬の血中・組織中濃度の相違、およびその背景にある遺伝子多型が考えられている。Vincristine は血液悪性疾患の Key drug であるが低濃度での簡便な測定は難しく、その薬物動態/薬力学 (PK/PD) 関連の報告は少ない。解毒酵素の一部である GSTM1 は遺伝子多型によりヒトの約半数が欠損しており、その発現は vincristine の薬剤耐性と関連する事が示唆されている。本研究では血液悪性腫瘍患者で GSTM1 の有無、vincristine の PK/PD の関連を明らかにする事を目的とした。液体クロマトグラフ-質量検出器を用いて、簡便かつ鋭敏な血中 vincristine の定量が可能となった。その薬物動態は幅広い個人差を認めた。末梢神経障害を認めた症例では、クリアランスの低下、半減期の延長を認めた。フルコナゾールが併用された患者では半減期の延長と AUC の増加傾向が認められた。少数例の検討では GSTM1 の有無と vincristine の薬物動態、副作用と有意な関連は認められなかったが、重篤な末梢神経障害を認めた例では GSTM1 は認めなかった。
関連キーワード	vincristine、GSTM1、遺伝子多型、PK/PD、治療薬物モニタリング

研究の背景および目的

一般に抗がん薬は致死性の毒性を内包するにも関わらず治療域と毒性の幅が極めて狭く、しかもその作用には幅広い個人差が存在し、ときに予想外の毒性が出現したり、期待どおりの抗腫瘍効果が得られない症例が存在する。この患者間のばらつきの原因として薬剤相互作用、年齢、性別、栄養状態、肝・腎機能、腫瘍組織型、局在部位、腫瘍量、病期、薬剤耐性などがあげられ、これらの結果、抗がん薬の血中・組織中濃度に相違が生じ、個人差が生じると考えられている。そのため、がん化学療法は本来治療薬物モニタリング (therapeutic drug monitoring: TDM) が重要な分野である。さらに個人差の背景には代謝酵素や、受容体などの薬剤の“標的”における遺伝子多型が薬物治療の効果と毒性に重要な影響を与えることが認識されている。投与された抗がん薬の薬物動態およびその背景にある遺伝的素因とその治療効果および副作用との関連が明らかとなり、個人差が予測できれば、抗がん薬のテーラーメイド治療が可能となり、将来のがん化学療法は飛躍的に安全かつ効果的に行いうる。

Vincristine はリンパ系腫瘍を中心とした血液悪性疾患の Key drug であり、細胞内に転入後 tubulin と結合し、microtubules の合成を阻害し、分裂毒として働く事を作用機序としている。肝で

CYP3A により代謝され、薬剤特有の副作用として容量規定毒性である末梢神経障害や消化器毒性、内分泌毒性が知られている。また文献的にその血中薬物動態は 3 相性で、副作用はその薬物血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) と関連するとされるが、低濃度での簡便な測定は難しく、その薬物動態/薬力学 (PK/PD) 関連の報告は少ない。

Glutathione S-transferase (GST) は発がん物質や薬剤などの外因物質をグルタチオン抱合することで細胞を保護する解毒酵素として働く。ヒトには GST α 、GST μ 、GST π 、GST θ の 4 種類のアイソザイムがあり、GSTM1、GSTP1、GSTT1 にはその表現型を変化させる遺伝子多型が存在する。そのうち GSTM1 は遺伝子多型によりヒトの約半数が欠損しており、細胞株を用いた基礎的実験で、その発現は vincristine の薬剤耐性と関連する事が示唆されている。また臨床的にも小児急性リンパ性白血病患者で GSTM1 を有する患児は有しない患児より再発率が高い事が報告されている。

そこで、本研究では新規発症の成人リンパ系腫瘍患者において、GSTM1 遺伝子の有無と vincristine の血中濃度測定を行い、GSTM1 の有無が vincristine の PK/PD に与える影響を明らかにし、将来の個別化医療の一助となる事を目的とする。

研究の内容および成果

酢酸エチルにて抽出後、内部標準をビンブラスチンとして、液体クロマトグラフ-質量検出器を用いて測定を行った。検量線は良好な相関が得られ、

検出限界は 0.1ng/ml であり、簡便かつ鋭敏な血中 vincristine の定量が可能となった (図 1)。対象は悪性リンパ腫患者 15 例 (男/女: 6/9) で全例に

CHOP like regimen が施行された。経時的に採血された血中濃度は 2 コンパートメントモデルで解析した。抗酸菌感染症疑いの一例ではリファンピシンの投与有無により、2 回測定した。別に文書で同意が得られた患者につき単核球を分離し、DNA を抽出、genomic PCR で GSTM1 を検出した。

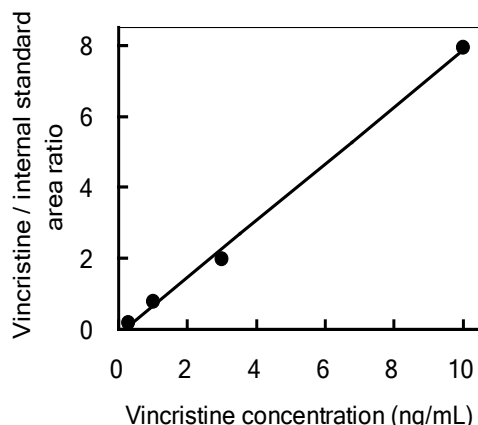


図1. LC-MS法によるvincristineの標準曲線

Vincristine の薬物動態は、クリアランス； 0.56 ± 0.30 L/h/kg、消失相半減期： 28.6 ± 37.4 h、AUC： 65.5 ± 54.6 ng・h/ml と幅広い個体差を認めた。Grade 2 以上の末梢神経障害を認めた症例では、クリアランスの低下、半減期の延長、AUC が増加を認めた (図 2)。リファンピシンが併用された 74 才男性患者では、リファンピシン併用時に消失相半減期の短縮傾向がみとめられ (併用時 10.7 h、非併用時 17.3 h)、リファンピシンによる CYP3A の代謝誘導作用のためと推測された。アゾール系抗真菌剤フルコナゾールが併用された患者では消失相の半減期の延長と AUC の増加傾向がみとめられ、同薬による、vincristine の CYP3A 阻害作用が示唆された (図 3)。

GSTM1 を解析しえた 9 例 (無 5 例、有 4 例) では vincristine の薬物動態、副作用と有意な関連は認められなかったが、同薬の中止が必要な grade3 の末梢神経障害を認めた例では GSTM1 は認めなかった。

Vincristine の血中薬物動態は副作用 (末梢神経

障害)・薬物間相互作用 (リファンピシン・フルコナゾール) と関連を認めた。

今後、さらに症例集積を重ね、リンパ系腫瘍の患者において GSTM1 の有無による vincristine の体内動態の変化、および同薬の薬物相互作用による効果・副作用の差異を明らかにすることで、将来のテーラーメイド治療に貢献しうると考えられた。

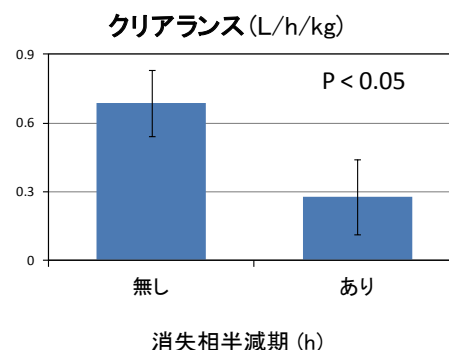


図2. Vincristineの血中濃度と末梢神経障害

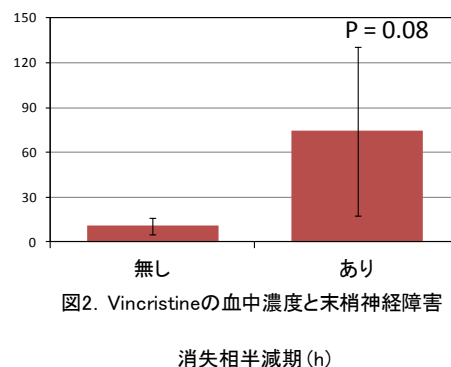


図3. フルコナゾールの使用とVincristineの血中濃度

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

「主な発表論文等」

悪性リンパ腫患者における vincristine の血中薬物動態と毒性・薬物相互作用の検討、日本血液学会北陸地方会、2011 年、金沢

「特記事項」

ゲノム研究を含む臨床研究として、説明と同意書を含む詳細な研究計画書がすでに作成されており、倫理的な配慮についても本学の IRB で

十分な検討がなされ、承認されている。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 24 年度科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金) 基盤研究 (C) に研究代表者として申請中。研究課題：血液がん治療の薬物治療モニタリングと薬理遺伝学的解析によるテーラーメイド化

トランスレーショナルリサーチ推進センター公募採択型研究費

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

葉酸・ビタミンB₁₂欠乏症による認知症発症機序の解明

研究代表者：濱野 忠則（医学部・講師）

共同研究者：白藤 法道（医学部・大学院生）、土田 龍郎（医学部・講師）

概 要	高齢化社会の急速な進行とともに、認知症患者数が急増しており、本邦で約200万人、福井県内でも約2万人に達するものと推察される。認知症をきたす代表的疾患はアルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD)であるが、治療可能な認知症としてビタミンB ₁ 、B ₁₂ 、葉酸といったビタミン欠乏症の重要性が再認識されている。葉酸・ビタミンB ₁₂ は、ホモシステイン(Hcy)からメチオニン合成の補酵素として働くため、これらのビタミン欠乏は高Hcy血症をきたす。 高Hcy血症は、ADの独立した危険因子である。 ADの代表的病理所見は神経原線維変化、および老人斑であり、神経原線維変化の構成要素は高度にリン酸化したタウ蛋白である。われわれは、TetOff inductionにより3種類の野生型タウ蛋白を発現する神経芽細胞腫細胞を用い、Hcyのタウ代謝に及ぼす影響を検討した。Hcyを培養液中に加えることにより、特にカスパーゼにより切断されたタウが増加した。またサルコシル不溶性画分におけるタウが増加しており、タウ重合の促進が示唆された。さらに、葉酸、ビタミンB ₁₂ 欠乏患者に対する補充療法の臨床的効果を神経心理学検査、ならびに血中Hcy値の変動により解析した結果、葉酸欠乏患者、およびビタミンB ₁₂ 欠乏患者では、認知機能の低下のみならず、血中Hcy値の高値を示していた。ビタミン補充療法を行ったところ、認知機能の改善のみならず、血中のHcy値も正常化した。本研究の結果から、葉酸・ビタミンB ₁₂ 欠乏は、Hcy値の上昇に伴うタウ蛋白の重合促進をきたし、ADの病態を促進するという機構が存在することが推察された。
関連キーワード	認知症、タウ蛋白、葉酸欠乏症、ビタミンB ₁₂ 欠乏症、高ホモシステイン血症

研究の背景および目的

高齢化社会の急速な進行とともに、認知症患者数が急増しており、本邦で約200万人、福井県内でも約2万人に達するものと推察される。認知症をきたす代表的疾患はアルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD)であるが、治療可能な認知症としてビタミンB₁、B₁₂、葉酸といったビタミン欠乏症の重要性が再認識されている。葉酸・ビタミンB₁₂は、ホモシステイン(Hcy)からメチオニン合成の補酵素として働くため、これらのビタミン欠乏は高Hcy血症をきたす。**高Hcy血症は、ADの独立した危険因子である。**また、ADの代表的病理所見は神経原線維変化、および老人斑であり、神経原線維変化の構成要素は高度にリン酸化した

タウ蛋白である。

われわれは、TetOff inductionにより3種類の野生型タウ蛋白を発現する神経芽細胞腫細胞を用いた検討を行ってきた(Hamano et al., 2008, 2009, 2011)。今回Hcyを培養液を培養液中に加えることによるタウ蛋白の凝集促進の有無を検討する。

さらに、当院、および関連施設で行っているもの忘れ外来通院患者のうち、葉酸、およびビタミンB₁₂欠乏を呈する患者に対する補充療法の臨床的効果を神経心理学検査、ならびに血中Hcy値の変動により検討し、葉酸・ビタミンB₁₂欠乏による認知症の発症機序の解明、および補充療法の治療効果を検討することを本研究の主たる目的とする。

研究の内容および成果

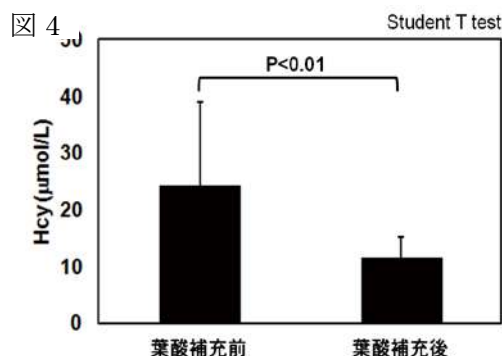
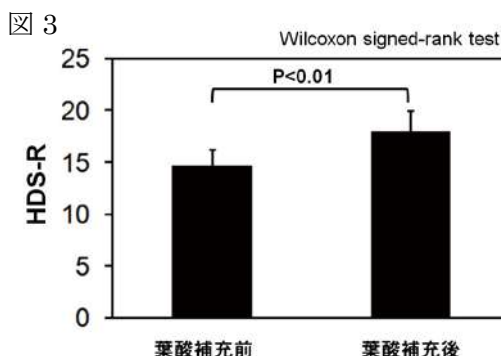
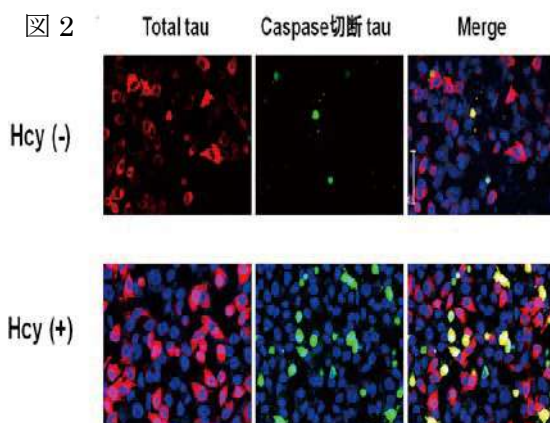
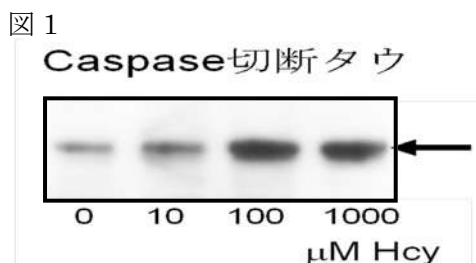
TetOff inductionにより3種類の野生型タウを発現する神経芽細胞腫細胞を用い、Hcyを培養液中に加えることにより、タウの重合促進の有無を検討した。その結果、Hcy投与によりタウ蛋白の蓄積量が増加した。なかでもカスパーゼ切断タウの増加がウエスタンブロット法(図1)、ならびに免疫組織化学法(図2)により証明された。また神経原線維変化の形成に最も重要なサルコシル不溶性画分におけるタウが増加しており、タウ重合の促進が証明された。またカスパーゼの活性化も示された。

さらに、当院、および関連施設でおこなっているもの忘れ外来通院中の患者中、葉酸、ビタミンB₁₂欠乏を示す患者に対し、ビタミン補充療法をおこない、その効果を神経心理学検査、ならびに血中Hcy値の変動により解析した。その結果、葉酸、ビタミンB₁₂欠乏患者では、認知機能の低下とともに、血中Hcy値が高値を示していた。ビタミン補充療法を行ったところ、認知機能(HDS-R, MMSE)が統計学的に有意に改善した(図3)。さらに治療前に高値を示していた血中のHcy値が正常に復した(図4)。

葉酸、ビタミン B₁₂ 欠乏により、Hcy のメチオニンへの変換が阻害され、血中 Hcy 値の上昇をひきおこす。さらに、血中 Hcy 量の増加がタウ蛋白の重合を促進し、AD の病態を進行させるという機構が存在することが推察された。

これらの結果から、葉酸、ビタミン B₁₂ 欠乏患者

のうち、既に認知機能障害をきたしている症例のみならず、認知機能に異常がない症例に対しても、ビタミン補充療法を行うことが、AD の発症を遅らせる、あるいは発症を未然に防ぐという効果を期待できる可能性があり、今後のこの分野における研究のさらなる進展が期待される。



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

「主な発表論文」

1. **Hamano T**, Yen SH, Gendron T, Ko LW, Kuriyama M. Pitavastatin decreases tau levels via the inactivation of Rho/ROCK. *Neurobiol Aging*. 2011 Nov 29. [Epub ahead of print]
2. **Hamano T**, **Shirafuji N**, Makino C, Yen S-H, Ueno A, Yoneda M, Nakamoto Y, Kuriyama M. Pioglitazone decreases the phosphorylated and total tau protein. in submission

「学会発表」

1. **Shirafuji N**, **Hamano T**, Hayashi K, Ishida C, Nishino H, Yoneda M, Nagata M, Makamura Y, Kuriyama M. **Cognitive dysfunction in patients with folate deficiency**. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2011 in Paris, France, July, 2011.
2. **Hamano T**, **Shirafuji N**, Makino C, Yen S-H, Ueno A, Yoneda M, Nakamoto Y, Kuriyama M. Pioglitazone decreases the phosphorylated and total tau protein. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2012 in Vancouver, Canada,

July, 2012.

3. **白藤法道**、**濱野忠則**、松永晶子、井川正道、山村 修、林 浩嗣、永田美和子、栗山 勝、米田 誠. 認知機能障害を呈したビタミン B₁₂ 欠乏症の特徴. 第 29 回日本神経治療学会総会 2011 年 11 月、福井
4. **白藤法道**、**濱野忠則**、石田智恵美、Yen SH、米田 誠、栗山 勝. ホモシステインによるカスパーゼ活性化を介するタウ蛋白重合促進機序の解明. 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月、東京

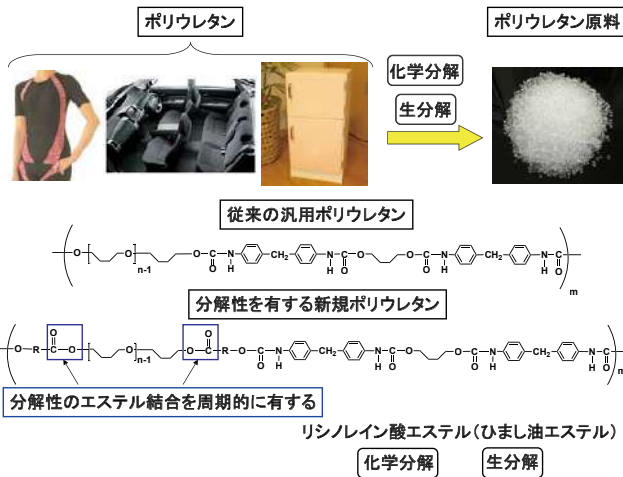
「特記事項」

新聞記事「**高脂血症治療薬、認知症にも効果、福井大 濱野講師が発表**」 福井新聞、日刊県民福井、読売新聞、朝日新聞、産経新聞、中日新聞、東京新聞、河北新報社、神戸新聞、西日本新聞、徳島新聞、宮崎日日新聞など掲載紙多数、2012 年 2 月 1 日

**福井大学
産学官連携本部
平成23年度実用化研究助成
(FUNTECフォーラム
福井大学研究シーズ
紹介ポスター発表)**

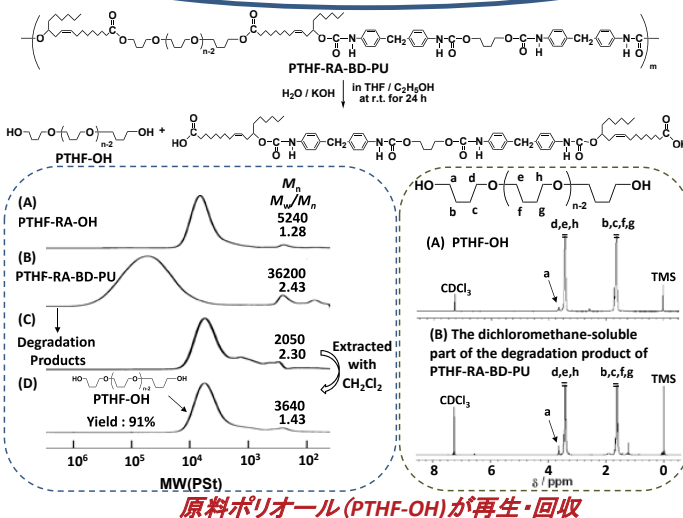
化学分解・生分解可能な汎用リサイクル性材料

福井大学大学院 工学研究科 材料開発工学専攻 橋本 保

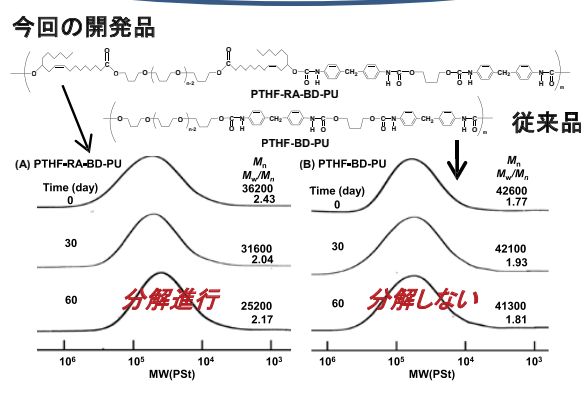


ケミカルリサイクルが困難なポリウレタン材料に、化学分解および生分解可能な結合を導入して、使用後は特定の処理条件下で分解してポリウレタンの原料であるポリオールを再生、回収できる新型の汎用ポリウレタン材料を開発することが本研究の目的である(左図参照)。持続可能な資源循環型社会をつくることは21世紀の最重要課題の一つである。プラスチック・繊維・ゴムなどの高分子材料のリサイクルの方法として、大きく分けてサーマル(熱)、マテリアル(材料)、ケミカル(化学)リサイクルがあるが、材料資源が真に循環するのはケミカルリサイクルのみである。本研究では、ひまし油由来の分解性エステル結合を汎用ポリウレタン材料に導入して目的の達成を目指している。

化学分解: アルカリ加水分解(室温, 24時間)



生分解: リパーゼ酵素分解(pH 7.4, 37°C, ~60日)



結論

PTHF-RA-BD-PU

$$\left(\text{O}-\text{R}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}''-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}'-\text{O} \right)_m$$

M_n (数平均分子量) = 36200 M_w/M_n (多分散度) = 2.43

T_m (融点) = 19 °C T_d (熱分解温度) = 315 °C

化学分解: $\text{HO}-\text{O}-\text{R}-\text{O}-\text{H}$ 収率(原料再生率): 91%

生分解: M_n (数平均分子量) 36200 から 22600 に低下/60日

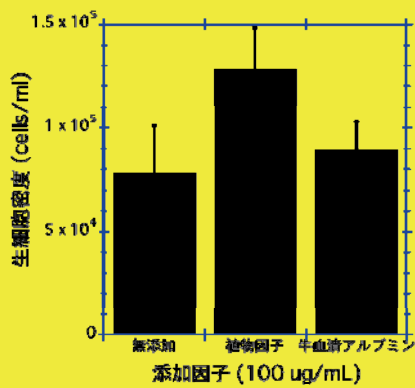
産学官連携本部
実用化研究助成

新しい細胞培養の添加因子

福井大学大学院工学研究科生物応用化学専攻 准教授 寺田聡

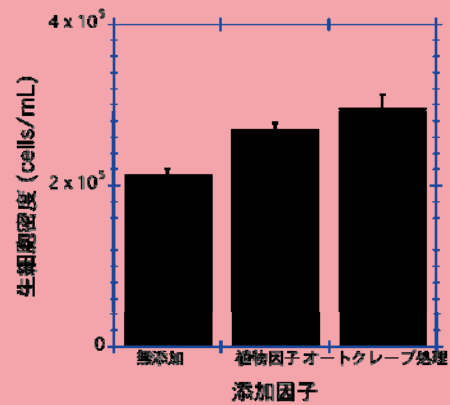
現在、動物細胞培養によってバイオ医薬品(特に抗体医薬)が生産され、さらに再生医療ないし細胞治療も現実のものになりつつある。これら細胞の培養では、増殖因子を培地に添加せねばならず、現状では牛血清など動物由来因子が利用されている。しかしながら動物由来因子を利用することは、狂牛病など人畜共通感染症が懸念されるため、医薬品生産やヒトに移植される細胞の培養に利用されることは忌避されるべきである。そのため、化学合成品と植物などに由来する、細胞培養のための増殖因子/培地が求められている。われわれは日本国内で広く栽培されている農作物からのある抽出物が、細胞増殖促進作用を有することを見いだした。

実験1. 抗体生産細胞への効果



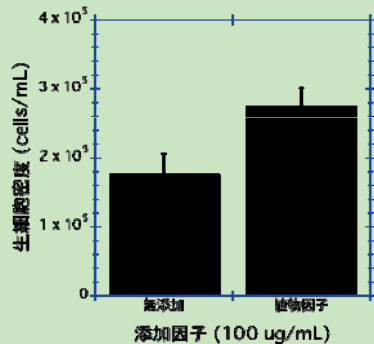
ハイブリドーマ細胞の培養系に因子を添加し、2日間培養
ASF104培地を利用。牛血清アルブミンはポジティブコントロール

実験2. オートクレーブ滅菌後の活性



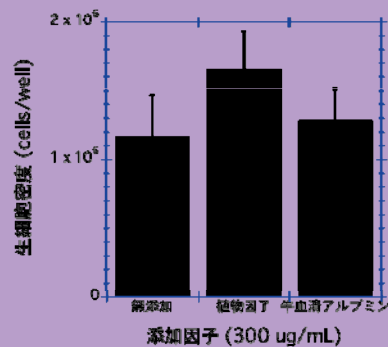
植物因子をオートクレーブ滅菌(121°C、20分)
ハイブリドーマ細胞を、3日間培養

実験3. 組換タンパク質生産細胞への効果



CHO細胞の培養系に因子を添加し、3日間培養
DMEM培地を利用

実験4. 人工肝臓用細胞への効果



HepG2細胞の培養系に因子を添加し、4日間培養
ASF104培地を利用。牛血清アルブミンはポジティブコントロール

福井大学寺田まで、何なりとお問い合わせくださいませ。

In vitro modeling of metastasis of cancer cells using nanofibers

Yusuke OGIHARA¹⁾, Shin-ichiro SUYE^{1,2)} and Satoshi FUJITA^{1,2)}*

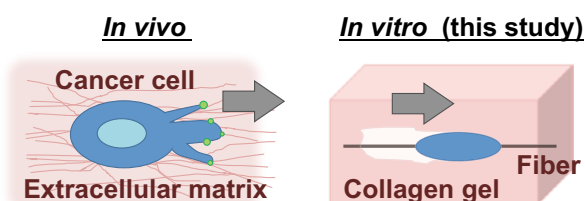
1) Department of Applied Chemistry and Biotechnology, University of Fukui, Japan

2) Department of Fiber Amenity Engineering, University of Fukui, Japan

* Corresponding.

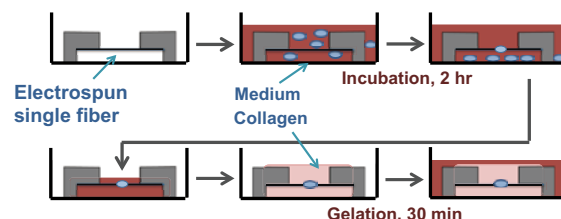


Introduction



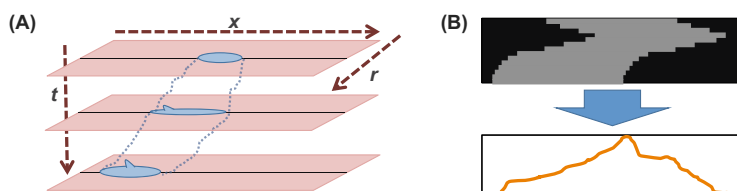
Scheme 1 In metastasis, cancer cells invade extracellular matrix (ECM) of connective tissues secreting matrix metalloproteinase (MMP). To visualize and quantitate this process in the real-time, we established the model experiment by using a single nanofiber embedded in collagen gels. Our experimental setup enables to evaluate metastatic behaviors of cancer cells in a 3D-environment as a 1D-migration along with a nanofiber.

Cell culture in collagen gel



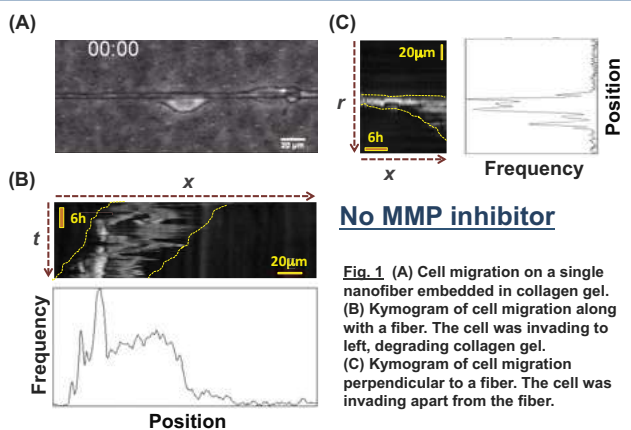
Scheme 2 Cancer cells (HT1080; human fibrosarcoma, Mitomycin C-treated) were seeded onto a single polystyrene nanofiber which were bridged between two basements by electrospinning and pre-coated with collagen type I. After cell attachment, a single fiber with a cell was embedded into collagen gel. The culture was observed by time-lapse microscopy for 24 hrs.

Quantitative analysis of invasive migration



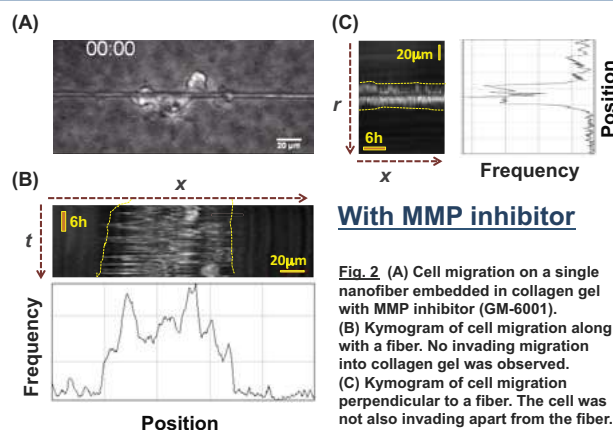
Scheme 3 (A) Captured time-lapse images were stacked and re-sliced by x-axis (along with fiber), or r-axis (perpendicular to fiber) and developed location - time. The location - time plot (kymogram) visually represents the cell migration. (B) In the kymogram, bright signals represent cell. The bright signals during a constant observation time are stacked into a histogram shown in the lower panel. This histogram shows the frequency in which cells exist at the position.

Dependence of invasive migration on MMP



No MMP inhibitor

Fig. 1 (A) Cell migration on a single nanofiber embedded in collagen gel. (B) Kymogram of cell migration along with a fiber. The cell was invading to left, degrading collagen gel. (C) Kymogram of cell migration perpendicular to a fiber. The cell was invading apart from the fiber.



With MMP inhibitor

Fig. 2 (A) Cell migration on a single nanofiber embedded in collagen gel with MMP inhibitor (GM-6001). (B) Kymogram of cell migration along with a fiber. No invading migration into collagen gel was observed. (C) Kymogram of cell migration perpendicular to a fiber. The cell was not also invading apart from the fiber.

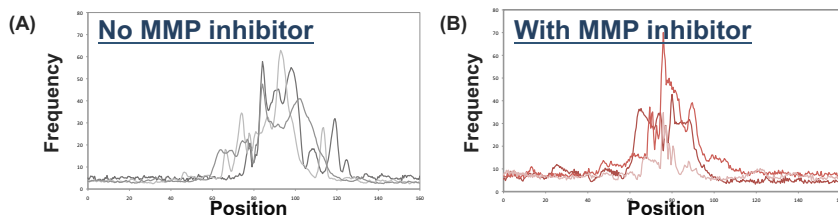


Fig. 3 Histogram of the frequency against the distance apart from nanofiber. The wide distribution of this plot shows that the cell migrate widely perpendicular to the fiber in the absence of (A) or in the presence of (B) MMP inhibitor (GM-6001). The (A) Cell migration on a single nanofiber embedded in collagen gel with MMP inhibitor (GM-6001).

Conclusion

We have established the experimental model to study the invasion of cancer cells into collagen gel on a single fiber.

This model is available to observe cell migration in the 3D-environment.

腫瘍細胞傷害活性を有する形質細胞様樹状細胞の誘導技術の確立とがん治療への応用

医学部: 伊保 澄子・細野 奈緒子

概要

- デスレセプターを標的としたがん治療法として腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)受容体に対するアゴニストの開発が進められているが、大量・長期投与による肝毒性の発生が問題となっている。
- これに対し我々は、免疫反応に中心的役割を担い、腫瘍組織に遊走する性質のある形質細胞様樹状細胞(pDC)の活性化を基盤とした、安全ながん免疫療法の開発を目指している*1。
- これまでに、BCGの核酸成分であり免疫刺激作用を有する G91*2と結核菌抗原であり DNA 結合能を有するタンパク質 MDP1*3を用いて、免疫賦活を伴う腫瘍細胞死の誘導の可能性について検討した。
- その結果、G91 と MDP1 の組み合わせは結核予防を兼ねる革新的ながん治療法の創出を可能にすることが示唆された。

***1 pDC活性化に基づいた腫瘍排除の機構(仮説)**

アポトーシスをおこした腫瘍細胞

腫瘍抗原

腫瘍細胞

アポトーシス誘導因子

γδT

NKT

マクロファージ

TRAIL受容体

腫瘍抗原

アポトーシス

パーフォリン・グランザイム

細胞傷害性Tリンパ球(CTL)に成熟

分化補助

CD8⁺T細胞

腫瘍抗原の提示

Th1細胞

分化補助

CD4⁺T細胞

成熟補助

未熟な抗原提示細胞

抗原提示細胞が死んだ腫瘍細胞や腫瘍抗原を取り込む

G91(+MDP1)

pDC

活性化

***2 免疫刺激オリゴDNA: G91**
(特許第3976742号, 福井大学・伊保 他)

- Th1免疫と粘膜免疫を誘導
- 免疫抑制剤との併用が可能
- 安全性が期待できる
- 投与によるアレルギー発症の可能性が低い

5' end

3' end

***3 結核菌DNA結合性タンパク質: MDP1**
(特許第4415200号, 大阪市立大学・松本 他)

- 結核菌の主要な菌体蛋白質
- 休眠期にも発現
- 結核菌からの直接精製や組み換え蛋白質として供給可能
- DNAと結合すると抗原性が強まり結核防御免疫を誘導し得る

シーズ創出の可能性を示すこれまでの成果 -1-

(1) G91は、ヒトpDCにTRAIL遺伝子の発現を16~217倍増強した。
→ pDC媒介性の腫瘍細胞死を誘導できる可能性が有る(検討中)。

(2) G91は、pDCの細胞内受容体であるTLR9に認識されてIFN-α産生を誘導し、タンパク質抗原に対する細胞性免疫反応を増強した。(rCTBはG91の対象アジュバントとして用いた。)
→ G91投与によりがん免疫の賦活が期待できる。

Strain	rCTB	G91
BALB/c	~3.2	~4.5*
C57BL/6	~2.5	~4.2*

シーズ創出の可能性を示すこれまでの成果 -2-

(3) MDP1を組み合わせるとIFN-αの産生が亢進する。
→ TRAIL発現の亢進については検討中。

(4) MDP1とG91をBCG免疫の低下したモルモットに追加免疫すると、MDP1に対するDTH反応が強く誘導された。

1 μMのG91と組み合わせたDNA結合タンパク質(μg/mL)	IFN-α産生量 (% of control)
10	~220
1	~210
0.1	~140
0.01	~110
0	~100

MDP1の皮膚接種量(μg/モルモット)	MDP1+G91を追加免疫	MDP1のみを追加免疫
0.2	~0.2*	~0.1
2	~0.2*	~0.1

シーズ創出の可能性を示すこれまでの成果 -3-

(5) マウスにG91とMDP1を共投与するとMDP1特異的なTh1型抗体が既知のrCTBに比べ有意に高く産生された。

Group	Serum titer (Log10)
MDP1	~3.8
MDP1 + G91	~5.2*
MDP1 + rCTB + G91	~2.8

Group	Serum titer (Log10)
MDP1	~3.2
MDP1 + G91	~4.0*
MDP1	~2.8

→ 特願2011-080646(福井大学・伊保 他)
→ 結核予防を兼ねたがん治療技術の開発可能性が示唆される。

先行技術と提案技術の比較

開発	開発基盤	課題・利点
先行技術	TRAIL受容体に対するアゴニストを用いる	大量・長期投与の必要性; 肝毒性
提案技術	G91によって誘導されたpDC上のTRAILが主役	pDC上のTRAILを介した腫瘍細胞死の検証が必要
	G91によって活性化されたpDCが担う免疫賦活	がん患者の免疫力を高める; 免疫抑制剤との併用が可能
	結核菌抗原MDP1の併用による結核免疫の賦活	成人結核予防等の付加価値のある抗がん剤の開発が可能

結論・考察
G91にはpDCにTRAIL発現を誘導すると共に細胞性免疫を増強する作用があった。MDP1と組み合わせることで、成人の結核菌感染や発症・重症化の防止を兼ねたがん治療法の開発が可能になると思われる。

謝辞: 本研究はJST A-STEP 育成研究(H22:AS2121188G), ハイリスク研究(H23-24: AS2314067G), 探索研究(HS23: AS231203382G), 学審基盤(C)研究(H22-23: 22591105), および本学助成により施行された。研究実施にご協力を賜りました前山順一博士(感染研), 山本三郎博士(BCG研究所), 松本壮吉博士(大阪市立大学)に深謝致します。

連絡先: 福井大学・医・伊保澄子

産学官連携本部
実用化研究助成

多軸負荷を考慮した疲労強度評価手法による 設計支援解析ツールの開発

福井大学 伊藤 隆基 (工学研究科、機械工学専攻 教員), 栗木 優 (学生)

研究概要

実機の疲労設計を行う上で、容易に疲労強度評価ができる設計支援解析ツールが必要不可欠である。本研究では疲労強度解析手法 (IS法) による計算プログラムの開発を行い、任意の負荷履歴データから解析が容易かつ視覚的に解析結果を出力することができる設計支援解析ツールを開発する。この解析ツールを使用することで、原子力発電・火力発電や航空機をはじめとする、各種構造部材・構造物に対して、複雑な繰返し多軸負荷においては応力・ひずみを評価する適当な手法がなく、これまででは不可能であった非比例多軸負荷の影響を考慮した疲労強度設計・評価が容易に実施できるようになる。さらにCAD・CAEと組み合わせることにより疲労強度設計の高効率で高精度なツールとして広範に使用できることが期待できる。

非比例多軸負荷とは

単軸応力とは主応力が一方向だけに存在する状態であり多軸負荷とは主応力が多軸状態にあることをいう。また、多軸負荷は比例負荷と非比例負荷に分類される。比例負荷は主応力が時間に伴って変化しないで、常に一定方向に固定される負荷である。一方、非比例負荷は、主応力の方向が時間的に変化する負荷であり、比例負荷に比べて疲労損傷が著しく増加することがある。非比例の度合いを表すパラメータとして非比例度 f_{NP} を用いる。

解析ツールの概要

図1に示すように、応力・ひずみの時刻歴のデータおよび実験から得られる寿命データを入力すると、プログラムが自動で計算を行い、最終的に応力・ひずみの状態、非比例度、予測寿命などの各パラメータを出力する。出力データでは解析結果を視覚的および数値にて確認することができ、非比例度を考慮した強度評価の要否の判断や予測寿命の瞬時的な把握・判断が可能になる。すなわち、非比例多軸負荷での疲労に関する専門知識がない技術者でも機械的かつ手軽に解析ツールを使用することができる。

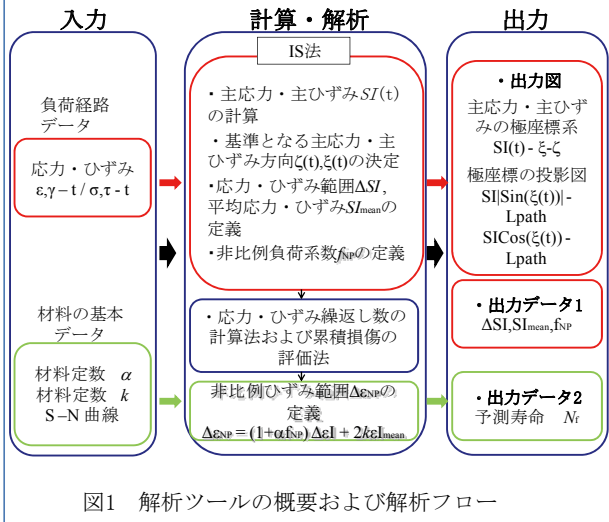


図1 解析ツールの概要および解析フロー

実機での解析例 (ダンプのボディ)

図2に示すように、例えば自動車に張り付けられた3枚のひずみゲージで、3方向のひずみを計測し、得られたデータを図3に示す。

図3から分かるように、実機では多軸の複雑な負荷が加わっており、従来からある単軸負荷の評価手法が使用できなかった。多軸負荷を考慮した疲労強度評価手法により、多軸の複雑な負荷を単軸に置き換えることで解析が可能となった。

図4はひずみの振幅と非比例度の強さを表したもので、各時刻におけるひずみ (負荷) の大きさや非比例度の強さが読み取れる。

このように、結果を視覚的に表すことでより大きいダメージを与える部分が目でわかり、破損が起り得る部位を重点的に解析することが可能となる。

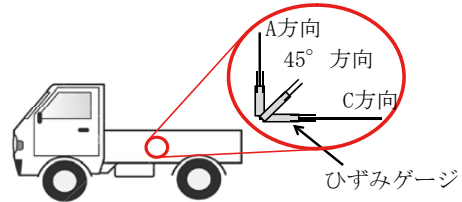


図2 ひずみゲージによるひずみ測定

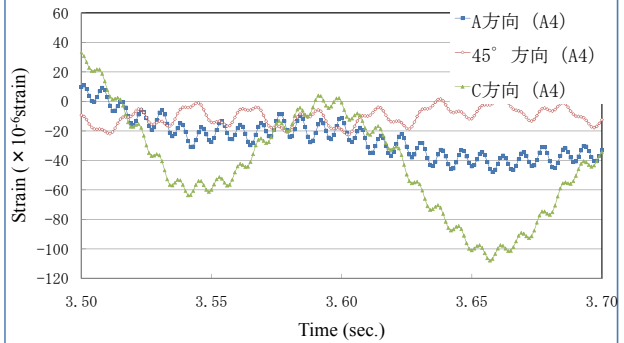


図3 ボディのひずみ (多軸負荷)

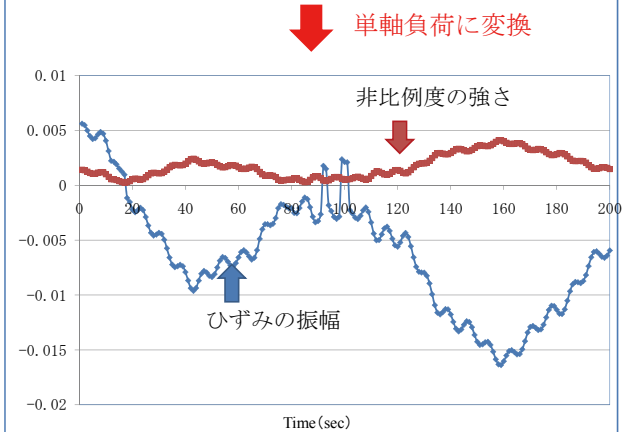


図4 ひずみの振幅・非比例度の強さ

長周期波を含む南海地震から美術品を守る小型3次元免震装置の改良

福井大学大学院工学研究科機械工学専攻 新谷真功

1. 研究内容

本研究は、長周期波に対して応答加速度及び相対変位を低減する小型3次元免震装置の開発を目的とする。免震装置は水平方向に摩擦斜面板と圧縮ばねを用いて、また鉛直方向に圧縮ばねと摩擦を用いて、ばねの復元力と摩擦力によって、応答加速度及び相対変位を低減する構造である。重たい円錐盤型摩擦斜面から、軽量の薄板型摩擦斜面板に変えることで、装置の軽量化、摩擦力の増加、装置の高さも低くできる利点を持っている。そして、免震対象物は500kg程度までの重量美術品が可能となっている。

2. 実験装置

図1に今までの円錐盤型摩擦斜面を用いた免震装置(A5号機)を示し、図2に薄板型摩擦斜面板を用いた免震装置(C1号機)を示す。免震装置は最大変位においても1m×1m以内に設置できる設計となっている。摩擦斜面板の角度は5度としている。

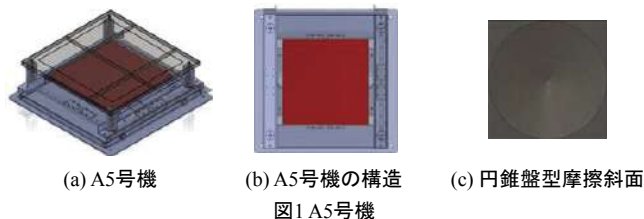


図1 A5号機

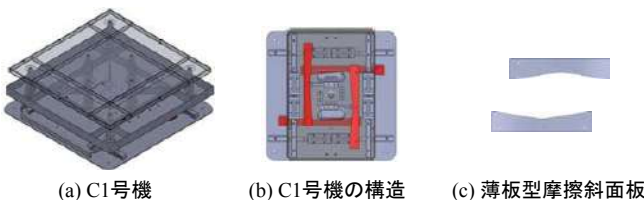


図2 C1号機

3. シミュレーション解析

図3に薄板型摩擦斜面板を用いた免震装置の断面図と、摩擦斜面、圧縮ばねの取り付け位置を示し、図4に本研究で使用している解析モデルと運動方程式を示す。 m_h と m_v は質量、 k_t と k_v は圧縮ばねのばね定数、 h は圧縮ばねの初期圧縮量、 μ_s は摩擦係数、 F_s は最大静止摩擦力、 F_d は動摩擦力、 F_{li} はリニアガイドの静止摩擦力を示す。また、表1に解析時のパラメータを示す。

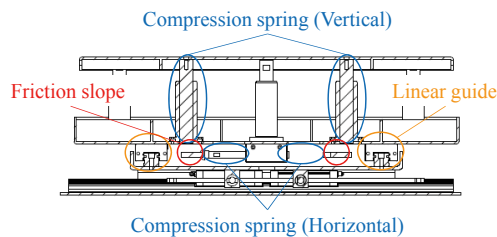


図3 断面図

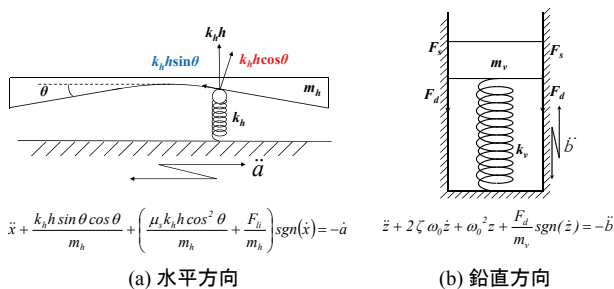


図4 解析モデルと運動方程式

表1 解析時のパラメータ

Name		Name	
Maximum static friction force (Linear : Horizontal)	24.2N	Maximum static friction force (Vertical)	0.45
Maximum static friction force (Isolation device : Horizontal)	47.2N	Friction force (Vertical)	0.4
Initial compression (Horizontal)	1.14×10^{-2} m	Coefficient of static friction (Horizontal)	0.22

4. シミュレーション解析結果

図5に能登半島地震(2007年3月25日)を用いた解析結果を、図6に兵庫県南部地震(1995年1月17日)を用いた解析結果を示す。また、図7に東南海地震を想定した名古屋三の丸波を用いた解析結果を示す。黒色が入力した地震波形、青色が解析結果を示す。各図の(a)に水平方向の応答加速度、(b)に水平方向の相対変位を示し、(c)に鉛直方向の応答加速度、(d)鉛直方向の相対変位を示す。名古屋三の丸波の鉛直方向の地震波形は入手ができなかったため、本研究で用いていない。

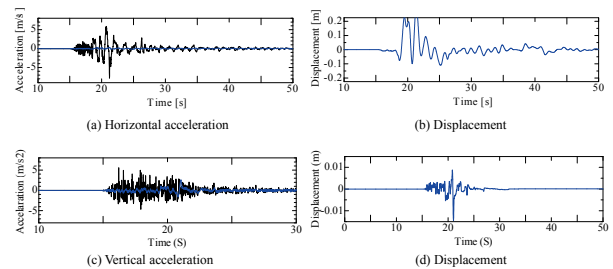


図5 能登半島地震 (2007年3月25日)

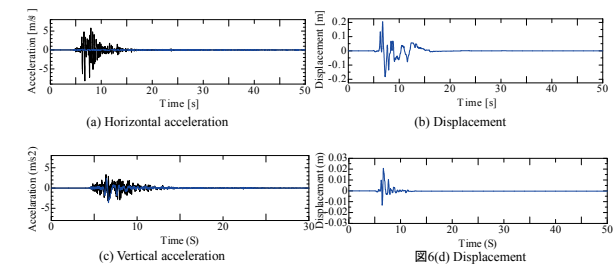


図6 兵庫県南部地震 (1995年1月17日)

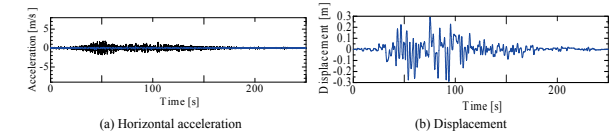


図7 名古屋三の丸波 (想定地震波)

5. まとめ

- 薄板型摩擦斜面板を用いた免震装置の設計、製作を行い、シミュレーション解析により、免震装置の性能評価を行った。
- 水平方向の応答加速度は約1/8に低減、能登半島地震の鉛直方向の応答加速度は約1/2に低減されている。
- 水平方向の応答変位は円錐盤の半径0.225m以内、鉛直方向の応答変位は0.03m以内にほぼ収まっている。
- 長周期波の三の丸波は十分に低減されていないが、薄板型摩擦斜面板の角度を変えるなどで、改善できる。

繊維補強吹付モルタルを用いた袖壁増設による補修・耐震補強技術の開発
福井大学建築建設工学専攻 磯研究室/株式会社 クラレ

1 研究開発の背景と目的

東日本大震災では、耐震性能が不足または構造計画が悪い鉄筋コンクリート造建物が多く被災した(写真1)。そのため今後発生するであろう地震に対して、耐震性能が不足する建物については耐震性能を向上させて、事前に備えておく必要がある。

以上のことから本研究では、繊維補強モルタル(製品名称:アフタープロテクション(AP))を吹き付けて、壁を「増設」「増打ち」「開口閉塞」する安価で、短工期な耐震補強技術(AP工法)「2 使用材料」「3 施工」を参照)を開発してきた。しかしながら、平面計画上、壁を入れられないなどの制約がある場合には、本補強工法は使用できない。以上より、本研究では耐震補強における様々な要求に答えるために、図1に示す**既存の柱に繊維補強モルタルを吹き付けて袖壁を増設して補強する**新たな耐震補強工法を開発する。本補強工法のメリットは、開口を完全に塞ぐことなく耐震補強できるため**視光を確保**できる。さらには、従来の鉄筋コンクリートの袖壁増設補強に比べて型枠は片面だけ良く、吹付機材もコンパクトであるため**安価で短工期**となる。

本研究では本補強方法の構造性能を確認するために構造実験を行い、本補強工法の設計手法を開発するものである。

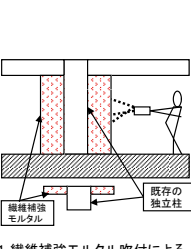


写真1 東日本大震災により被災した建物(壁が偏心し、剛重比のバランスが悪い建物)

図1 繊維補強モルタル吹付による袖壁増設補強工法イメージ図

2 使用材料

表1 アフタープロテクション(AP)の材料特性

試験項目	管理値	測定値(平均)	試験方法	設計値	
フロー	(mm)	180±15	180	JIS R 5201	-
単位容積質量	(g/cm³)	2.15以上	2.2	JIS A 1171	2.2
圧縮強度(28日後)	(N/mm²)	34以上	48	JIS A 1108	30
ポアゾン比	-	-	0.2	ASTM C489-02	-
圧縮弾性率(28日後)	(N/mm²)	-	3.81×10⁴	JIS A 1149	2.23×10⁴



写真2 製品外観 写真3 ひび割れ制御用ピロニオン繊維

3 施工



図2 吹付け機材

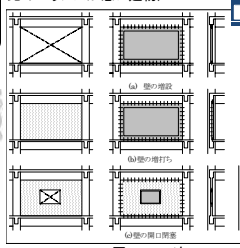


図3 AP工法

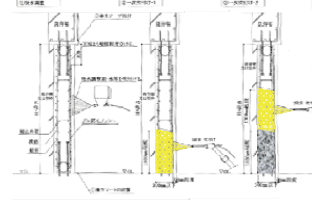


図4 標準的な吹付け施工手順(壁厚350mm複配筋の例)

■施工例



繊維補強吹付モルタルを用いた袖壁増設による補修・耐震補強技術の開発
福井大学建築建設工学専攻 磯研究室/株式会社 クラレ

4 実験概要

■表1-1試験体一覽を、図1に試験体配筋図を示す。試験体の固定要因は、柱断面B×Dが300mm×300mm、柱の内法高さ h_p が700mmである。帯筋比は現行基準の下限値相当とし $\rho_p=0.21\%$ とした。変動要因は、袖壁の有無および袖壁に使用する材料である。No.4-1試験体は、袖壁が無い独立柱の試験体であり、No.4-2、No.4-3試験体の基準となるものである。一方、No.4-2試験体は従来型の袖壁増設補強を想定したものであり、鉄筋コンクリートにより袖壁を構築するものである。一方、No.4-3試験体は、本研究で開発する補強工法であり、繊維補強モルタル(アフタープロテクション:AP)を吹き付けて袖壁を構築するものである。また、袖壁を無視した柱部分および増設した袖壁を含めた袖壁付きRC柱全体としての破壊モードは、両者ともに同じ破壊先行型となるように設計を行った。以上、試験体総数は計3体である。以上、3体の構造実験により、その構造性能を確認すると同時に、袖壁を増設することによる補強効果および本提案工法が従来の補強工法と遜色ないかを確認する。

■図2に加力装置図および加力プログラムを示す。加力は、片持ち型式の加力方法により行う。水平力は500kN車型の押し引きジャッキにより導入する。加力の初期段階では荷重制御により、その後は変位制御により、正負交番の繰り返し載荷とする。軸力は1000kNセンターホールジャッキにより導入する。軸力は一定軸力 $N=1/6 F_c$ 、 $b \times D=270kN$ を導入し、所定の軸力を常に保持するように制御を行う。

表1 試験体一覽

No.	試験体名称	袖壁厚さ t (mm)	袖壁の出幅 $\beta \cdot D$ (mm)	袖壁部の コンクリート	壁筋筋 ρ_w (%) (仕様)	鉛直結合部接筋筋 ρ_{jv} (%) (仕様)	袖壁筋筋筋筋筋 (仕様)	壁筋筋 ρ_w (%) (仕様)	水平結合部接筋筋 (仕様)
4-1	BC					0.51	1.14	1.52	1.01
4-2	BC+RCW	125	300	2カー(普通 40-18-18-H)	2-D6 (SD295A) #50	14-D10(SD295A) #50F*	D6(SD295A)#50	壁内側端部 4-D10(SD295A) 壁外側端部 4-D10(SD295A)	3-D13(SD295A) 戻付き7カー
4-3	BC+APW			PVA繊維補強 モルタル (AP吹付)					

■共通要因
断面: B×D=300×300
内法高さ: $h_p=700$ mm
柱筋コンクリート強度: $F_c=18N/mm^2$ (普通18-18-H)

主筋: $\rho_p=0.84\%$ (#13/SD295A)
帯筋: $\rho_{pw}=0.21\%$ (#2/SD295A#100)
軸力: $N=1/6 F_c \times B \times D=270kN$

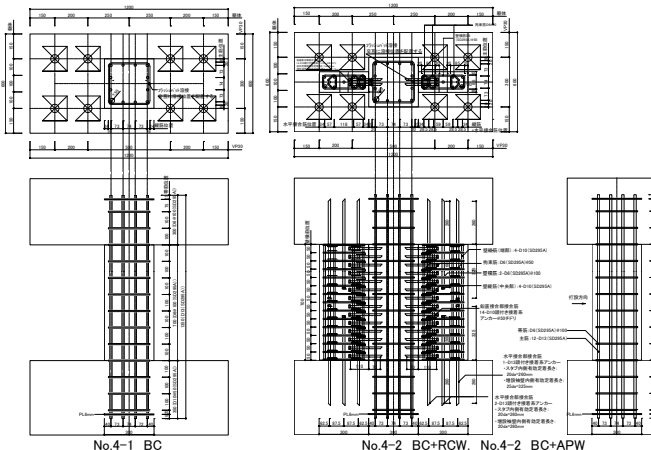


図1 試験体配筋図

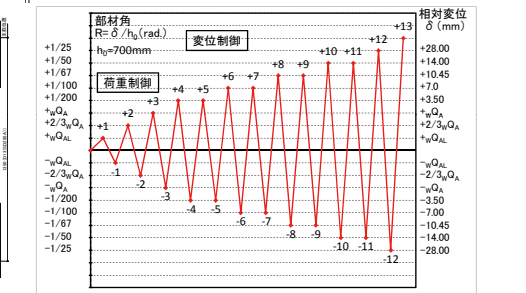
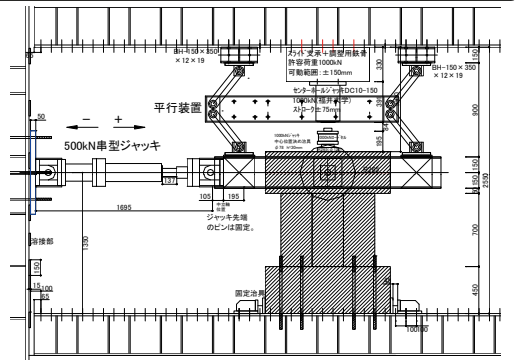


図2 加力装置図および加力プログラム

産学官連携本部
実用化研究助成

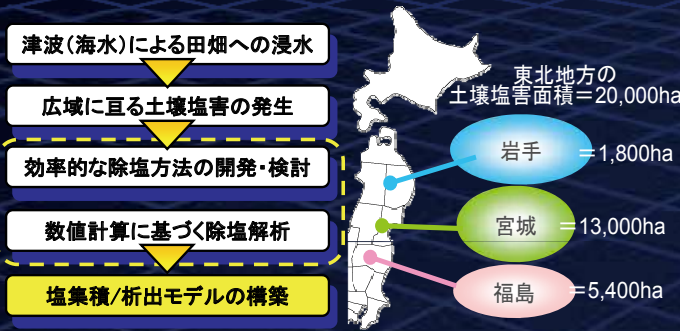
効率的な除塩技術開発に向けた塩集積/析出予測モデルの構築

Development of Accumulated Salt Prediction Model for Optimum Salt Removal

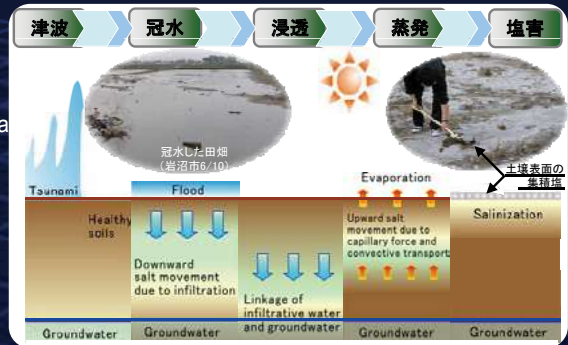
福井大学 研究員 ●寺崎 寛章 福井大学大学院 大学院生 草間 政寛
 福井大学大学院 教授 福原 輝幸 福井大学大学院 大学院生 齊田 光

【研究概要】本研究では、津波後の農地の塩害問題を対象として、計画的、かつ効果的なリーチング、表層塩削除などの除塩技術開発の根幹となる析出塩を考慮した土壤中の熱・水分・塩移動モデルを構築し、その精度を検証することを目的とする。

① 東北地方における塩害概要



※1 塩害メカニズム



② 野外調査および塩移動解析概要

【野外調査概要】
 現地調査期間：2011年6月～2012年3月
 調査対象場所：宮城県岩沼市および名取市(合計10地点)
 調査協力機関：宮城県亘理農業改良普及センター
 調査方法：鉛直プロフィール方式土壌サンプリング法
 調査項目：土壌塩濃度、冠水塩濃度、冠水深、排水塩濃度
 【塩集積/析出予測モデルによる塩移動解析】
 解析モデル：析出塩を考慮した熱・水分・塩移動同時連成解析
 解析解像度：1メッシュ(100m×100m)
 解析方法：気象+土壌物性+地形データ⇒析出塩+塩濃度

※2 除塩技術

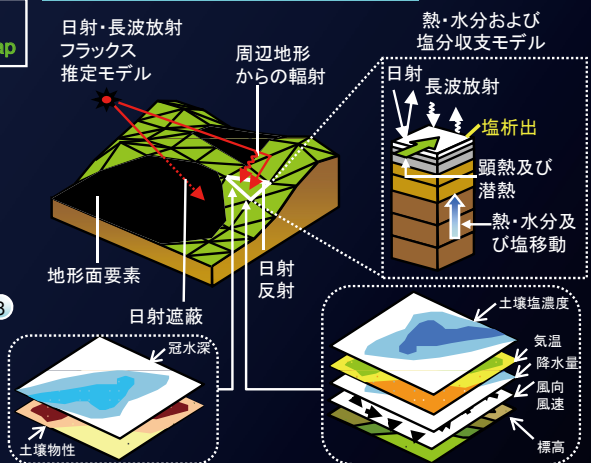
現在、東北で行われている除塩方法
 ⇒除塩に伴う事前事後評価が重要!

除塩方法	リーチング	土壌削除	植物浄化
コスト	×	◎	○
時間	○	○	×
労力	×	○	△
インパクト	◎	◎	△
環境負荷	△	○	◎
課題	投入水量	タイミング	長期化
適用性	◎	◎	△

③ 実験および解析結果



※3 塩集積/析出予測モデル



●塩集積/析出予測モデル→広域除塩シミュレーション可能。除塩後の調査継続中！！

FUNTECフォーラム2011

2012年1月17日 於 福井商工会議所ビル

パイプライン熱と地中蓄熱による農業用ビニールハウスの高度化に関する研究

福井大学大学院工学研究科
研究員 藤本 明宏

□ 研究の概要

- 本研究では、水供給という農業灌漑用パイプライン本来の機能に潜在するシーズ（パイプライン熱）を引き出して、地域農家のニーズとマッチングさせることで、低炭素、省エネ、高収穫を兼ね備えた新しい農業用施設園芸ハウス（以下、**エコ・バイオ・フレンドリーハウス：EBFハウス**）を開発し、農業所得の向上を見込める魅力のある農業づくりを通して、被災地の再建と振興を支援する。
- 図1は本課題の解決に向けた流れと位置付けについて示す。

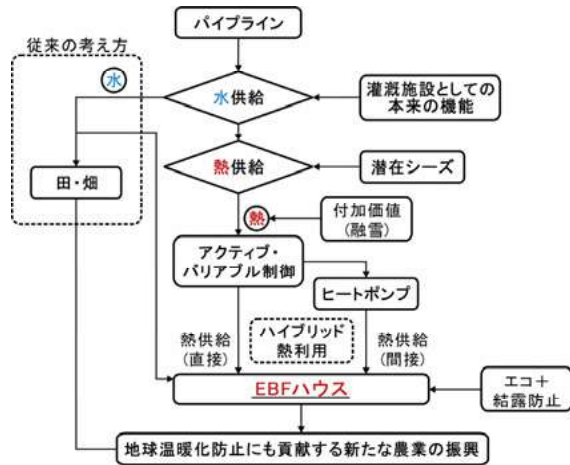


図1 本研究の流れと位置付け

□ EBFハウスの特徴

- EBFハウスの特徴は図2に示すように、水冷式ヒートポンプを介した灌漑用パイプライン熱と地中熱の利用(低炭素)、空気暖房とハウス内地中蓄熱を組み合わせた温風・輻射暖房方式(省エネ)、気象条件に積極的に対応する可変制御にある。
- 通常、ヒートポンプの規格(暖房性能)は夜間・早朝の気温低下に対応できるように決定されるため、日中はヒートポンプの稼働率が低下する。この日中の余剰エネルギーを地中に蓄熱し、夜間から早朝に亘ってハウス内空気に放熱することで、ハウスを暖める。
- こうした新たな熱利用によりヒートポンプの規格(初期設備費)の縮小や運転コストの削減だけでなく、地盤から空気を暖めることで葉面結露による品質低下の抑制(高収穫)も期待できる。

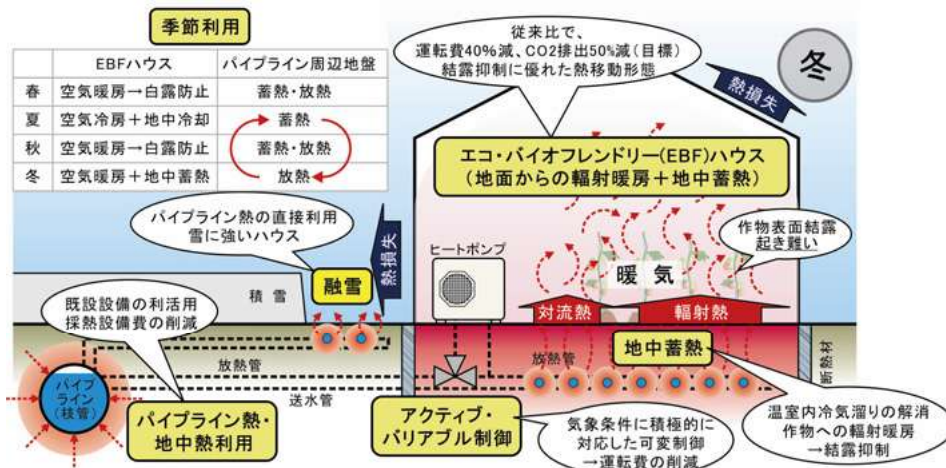


図2 EBFハウスの特徴と熱の流れ

□ 研究内容

- EBFハウスの熱・水分移動に関する基礎的研究：1年目
- パイプライン流体温度の測定（パイプライン熱の定量的評価）：1年目
- EBFハウスの熱移動解析・結露診断モデルの構築：2年目～4年目
- EBFハウスの実証試験（予定）：3年目～4年目

福井大学助成研究成果集 2012
—明日への挑戦—

発行日 平成24年7月3日

編集 福井大学研究推進委員会

研究推進委員会（平成23年度）

委員長	理事（副学長）研究・評価	真弓	光文
委員	附属図書館長	田村	信介
〃	産学官連携本部長	山本	嵩勇
〃	附属国際原子力工学研究所長	竹田	敏一
〃	高エネルギー医学研究センター長	岡沢	秀彦
〃	遠赤外領域開発研究センター長	齊藤	輝雄
〃	総合情報基盤センター長	堀	俊和
〃	ライフサイエンス支援センター長	横田	義史
〃	生命科学複合研究教育センター長	佐藤	真
〃	トランスレーショナルリサーチ推進センター長	宮本	薫
〃	教育地域科学部教授	中田	隆二
〃	医学部教授	定	清直
〃	工学研究科教授	岩井	善郎

発行 福井大学

〒910-8507 福井市文京3丁目9-1

（総合戦略部門研究推進課）

TEL 0776-27-8880

E-mail skkenkyo-k@ad.u-fukui.ac.jp

印刷 能登印刷株式会社

