

人工的な膵島様組織における インスリン分泌活性化機構の解明

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 准教授
小島 伸彦

(研究目的)

本研究の目的は、試験管内で作製した膵島（ランゲルハンス氏島）様組織を用いて、インスリン分泌機能の活性化メカニズムを解明することである。

ヒトiPS細胞から膵β細胞のようなインスリン分泌細胞を誘導する技術は、近い将来に実用化され、1型糖尿病患者に対する移植治療の細胞ソースとして用いられるようになると思われる。しかし、膵β細胞はバラバラの状態では効率よくインスリンを分泌できないため、膵島様の3次元組織へと再構築する必要がある。これまでに申請者は、マウスの膵α細胞、膵β細胞の細胞株を用いて、実際の膵島に類似した構造を再構築する方法を確立し、膵α細胞の比率を変化させると、インスリン分泌活性が変化することを見出した。膵α細胞はインスリンを分泌しないため、細胞間相互作用によって、間接的に膵β細胞のインスリン分泌を制御していると考えられる。このような制御機構を明らかにし、細胞あたりのインスリン分泌活性を高めることができれば、移植に際して、より少ない細胞数で治療効果をあげることが可能となる。すなわち、本研究の目的は、将来的に1型糖尿病患者に対する移植治療費を抑制することや、限られた細胞を多くの患者に供与することと同義である。

(研究方法)

膵α、膵β細胞として、細胞株αTC 1.6およびMIN6m9を用いる。細胞の凝集法は、申請者の考案した高分子含有培地法を用いる[Kojima et al. *Biomaterials* 2012]。図上段に高分子含有培地を用いた細胞凝集法について示す。この方法を用いて膵α、β細胞を凝集させると、図下段のように、自己組織化的に実際の膵島に似た構造を誘導できる。これまでの研究により、膵α細胞と膵β細胞を1:8の割合で混合した際に、他の比率や膵β細胞単独の場合より

も、グルコース応答性のインスリン分泌活性が高くなることが分かっている（第12回再生医療学会総会2013年3月）。これらの結果を踏まえ、以下の2つのアプローチを用いて、インスリン分泌活性化機構を解明する。

<計画1> 自己組織化に伴う膵α細胞の移動の有無が、インスリン分泌活性に与える影響を検証する。膵α細胞が膵β細胞の外側に移動しないような（図下段左側の状態の）膵島を

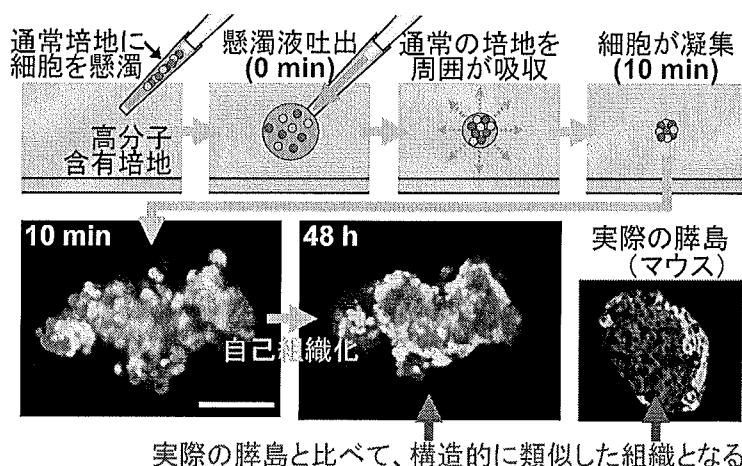


図 高分子含有培地による細胞凝集と膵島様構造への自己組織化
高分子を含んだ培地は通常培地を急速に吸収し、細胞は相対的に中心へと凝集する。凝集した細胞（α細胞：緑、β細胞：赤）は、自己組織化的に、膵島様構造を形成する。

作製し、これを用いてインスリン分泌活性を評価する。

＜計画2＞ 膵 α 細胞と膵 β 細胞との相互作用は、膵 α 細胞の細胞膜に存在する膜タンパク質を介していると想定される。膜タンパク質に結合する糖鎖に着目して、糖鎖の生合成を抑制するような阻害剤や、糖鎖をブロックするような因子を用いて、膵 α 細胞と膵 β 細胞との間の相互作用を攪乱することができるような分子を見いだす。

（結 果）

＜計画1：細胞配列とインスリン分泌活性との関係＞

アルギン酸ハイドロゲルビーズを凝集体に混ぜ込むことにより、凝集体の構造と細胞の配列を変化させてインスリン分泌活性を評価することを試みた。我々はこれまでに、細胞とハイドロゲルビーズとを1対1の割合で混ぜ合わせて凝集体を作製することで、凝集体内部にハイドロゲルビーズが数珠状に連なった微小環境を形成できることを報告している。ハイドロゲルビーズは大きな分子量を持つため、物質交換のための通路・流路としての効果が期待できるほか、ハイドロゲルビーズ自体は生物活性がないために、ビーズに接触している細胞は、ビーズに接着することはできない。つまり、毛細血管のような空洞が凝集体内部に張り巡らされているような状態を作り出すことができる。この方法をとることで、本研究における人工的な膵島様組織の内部にも空隙を数多く作り出すことができ、 α 細胞と β 細胞の配列にも影響を与えることができた。すなわち、 α 細胞は凝集体の外側に並ぶことはなくビーズの周囲に留まる傾向をしめした。このことにより、 α 細胞が凝集体内部に入り交じったような構造をつくることができた。この状態でインスリン分泌活性を測定したところ、ビーズが存在しない状態よりもより高い活性がみられた。

＜計画2：細胞間認識のメカニズム＞

α 細胞と β 細胞とが互いに認識し合う際に関与すると思われる膜タンパク質を想定し、糖鎖を介して結合などの相互作用を行っているという仮説をたてた。この仮説に立脚して、まずは特定の糖鎖の合成を阻害するような、1-デオキシノジリマイシンによって、細胞をあらかじめ処理しておき、処理済みの α 細胞と処理無しの β 細胞、処理無しの α 細胞と処理済みの β 細胞、また、処理済みの α および β 細胞を用いて、自己組織化現象に影響が出るかどうかを調べた。その結果、残念ながら明らかに自己組織化を阻害し得るとは言えないことが分かった。

続いて糖鎖を認識する分子を用いて、あらかじめ細胞間認識に関与すると思われる糖鎖を「中和」する実験を行った。興味深いことにいくつかの糖鎖が β 細胞特異的に発現していることが分かった。この β 細胞特異的な発現は、マウスの膵臓切片を用いた染色でも確認することが出来た。

（考察）

計画1（細胞配列とインスリン分泌活性との関係）の実施によって、インスリン分泌活性がより高くなる細胞配列、凝集体構造の一例を見出すことができた。 α 細胞が凝集体内部に散在することと、凝集体内部に物質交換性を高めるビーズが存在することの二つの要素が関与しているため、どちらの要素がインスリン分泌活性を高める効果をもっているか現時点でははっきりしないが、少なくとも、 α 細胞が凝集体の外側にあることが、必ずしもインスリ

ン分泌活性の向上に繋がることではないと考えられる結果であった。マウスの膵島では α 細胞が外側に、 β 細胞が内側に存在する構造をとるが、この構造は動物種によって少しずつ異なっており、例えばヒトでは膵島の内部に α 細胞が入り込んでいることがよく知られている。このようなパターンの違いは血管の分布など、様々な要因に影響を受けていると思われる。今回、通常のマウス膵島の細胞配位よりも、より効率よくインスリンを分泌できる細胞配列、膵島様組織の構造が明らかとなったことから、さらにより効率的な細胞配列構造が存在する可能性も否定できないものとなった。今後、細胞の自己組織化・細胞の配列構造の制御を通じて、より高機能な膵島構造の発見に向けて取り組んでいきたい。

計画2（細胞間認識のメカニズム）について、今回の実験系では α 細胞と β 細胞がそれぞれ移動して、外側が α 細胞、中心側が β 細胞といった細胞配列を自発的に獲得する。この過程には細胞膜たんぱく質による細胞間の認識メカニズムが存在すると予想される。今回は特に糖鎖を介在した細胞表面分子による相互作用が存在するかどうかを確かめる実験を行った。糖鎖転移酵素の阻害剤である1-デオキシノジリマイシンによる処理に関しては、自発的な細胞配列パターン形成にほとんど影響がみられなかったが、阻害剤の濃度や処理時間など、より詳細な検討が必要である可能性もある。一方、糖鎖に結合する分子を用いた、いわゆる「中和」実験については、特定の糖鎖に結合する分子が、 α 細胞と β 細胞によるパターン形成現象を抑制することを見いだすことが出来た。この糖鎖は実際のマウス膵島にも発現しており、発生における形態形成にも、何らかの影響を及ぼしている可能性もある。今後、このような配列パターンの異なる膵島のインスリン分泌活性の測定を始めとして、この糖鎖が結合する膜タンパク質の同定など、 α 細胞と β 細胞の配列と機能との関係、さらにはその配列が獲得されるメカニズムについて、糖鎖が結合している細胞膜たんぱく質に注目しながら、研究を進めたい。（計画2の成果等については、特許申請の準備中であるため具体的な試薬名等を伏せた）

（研究期間内における外部発表リスト）

原著論文(英文, 査読あり)

1. Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y. Fabrication of microchannel networks in multicellular spheroids. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **198**, 249-254 (2014).
2. Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y. Engineering of Pseudoislets: Effect on Insulin Secretion Activity by Cell Number, Cell Population, and Microchannel Networks. *Transplant. Proc.*, **46**, 1161-1165 (2014).
3. Katsuda, T., Kojima, N., Ochiya, T. and Sakai, Y. Biliary epithelial cells play an essential role in the reconstruction of hepatic tissue with a functional bile ductular network. *Tissue Eng.*, **19**, 2402-2411 (2013).
4. Kojima, N. and Sakai, Y. Control of liver tissue reconstitution in mesenteric leaves: the effect of preculture on mouse hepatic progenitor cells prior to transplantation. *J. Robot. Mechatron.*, **25**, 698-704 (2013).

総説(英文, 査読あり)

1. Kojima, N. In vitro reconstitution of pancreatic islets. *Organogenesis*, **Accepted**.

論文(英文, 査読なし)

1. Kojima, N., Ogata, Y., Nakaoka, S. and Sakai, Y. Mathematical modeling for the self-organization of cells. *Proceedings of the 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013)*, 1830-1832 (2013).

招待講演

1. 小島伸彦 内部構造の制御による肝および膵島様スフェロイドの高機能化, 日本組織培養学会第 87 回大会 (東京都千代田区・星陵会館), 2014 年 5 月 29 日 (シンポジウム)
2. 小島伸彦 微小環境を再現したミニチュア臓器作製の取り組み, 創薬・探索研究所セミナー (大阪府豊中市・塩野義製薬株式会社・社医薬研究センター), 2014 年 4 月 23 日 (単独講演)
3. 小島伸彦 ミニチュア臓器の作製: 微小環境の再現を目指す, 表面、材料に関する生物化学工学シンポジウム (神奈川県横浜市・横浜国立大学・化工安工棟), 2014 年 3 月 28 日 (他講演者 1 名)

国際学会発表

1. Motoyama, W., Aoki, S. and Kojima, N., Protection from Cell Death in Multicellular Spheroids. *9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences*. Hotel Hilton Prague, Prague, Czech Republic. August 24-28 2014 (Poster presentation)
2. Kojima, N., Functional Enhancement of Multicellular Spheroid by Microchannel Fabrication. *TERMIS EU 2014 Chapter Meeting*. Magazzini del Cotone Conference Center, Genova, Italy. June 10-13 2014 (Oral presentation)
3. Kojima, N., Fabrication of Multicellular Spheroids with Microstructures. *JST ERATO International Symposium on 3D Tissue Fabrication*. Institute of Industrial Science, The University of Tokyo Convention Hall, Tokyo, Japan. May 20-21 2014 (Poster presentation)
4. Kojima, N., Ogata, Y., Nakaoka, S. and Sakai, Y. Mathematical modeling for the self-organization of cells. *μ TAS 2013*. Messe Freiburg, Freiburg, Germany. October 27-31 2013 (Poster presentation)
5. Kojima, N. Fabrication of microchannel network in multicellular spheroids by embedding hydrogel beads. *World Congress on Regenerative Medicine*. Messe Leipzig, Leipzig, Germany. October 23-25 2013 (Oral presentation)
6. Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y. Engineering of islets to achieve higher insulin secretion rate. *CAST 2013*. Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. September 2-6 2013 (Oral presentation)

国内学会発表

1. 本山和加子, 青木茂久, 小島伸彦 上皮細胞に適した 3 次元スフェロイド培養法の開発, 第 21 回肝細胞研究会 (東京医科歯科大学 M&D タワー), 2014 年 6 月 27-28 日 (ポスターセッション)
2. 小島伸彦 In vitro における膵島様組織の再構築 (Engineering of islet-reconstitution in vitro), 第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド), 2013 年 12 月 3-6 日 (ポスターセッション)
3. 小島伸彦 微小流路の構築による肝細胞および膵 β 細胞凝集体の高機能化, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来 (東京大学生産技術研究所コンベンションホール), 2013 年 11 月 25 日 (ポスターセッション)
4. 小島伸彦 微小流路の構築による肝および膵島様凝集体の高機能化, 第 1 回細胞凝集研究会 (ヒルトン福岡シーホーク), 2013 年 11 月 8 日 (シンポジウム)
5. 小島伸彦, 尾方優花, 中岡慎治, 酒井康行 Mathematical Modeling to Simulate Cell Migration and Adhesion *In Silico*, 第 20 回肝細胞研究会 (大阪国際会議場), 2013 年 9 月 26-27 日 (一般口演)

高精度テラヘルツ波透過率測定法の確立と その物性測定への適用

横浜国立大学大学院 工学研究院 知的構造の創生部門
南 康夫

研究目的

テラヘルツ(THz)波の発生が容易になった近年、THz域の種々の物性測定にテラヘルツ波が適用されつつある。しかし、透過率や反射率のテラヘルツ波計測においてはS/Nが必ずしも良いとは言えず、スペクトルから高精度の透過率評価、反射率評価を行うことは困難である。そこで本研究では、透過率測定に焦点をあて、スペクトル域での定量的な議論を可能とする高精度測定法を確立することを研究目的とする。

そして、半金属や金属など、THz域で透過率がほぼ一定の物質に高精度透過率測定法を適用し、その有効性を示す。

研究方法

図1に示すような申請者の構築した光学系を用いた。フェムト秒レーザーのポンプ光をグレーティングで回折させ、パルス面を傾斜させたうえで非線形光学結晶LiNbO₃に入射する。すると、結晶内でチェレンコフ放射によりテラヘルツ波が発生する。それを軸外し放物面鏡を用いて試料に集光し、さらに、その透過テラヘルツ波を再び軸外し放物面鏡で光学結晶GaPに集光し、テラヘルツ波を検出する。このとき、測定試料上にテラヘルツフィルターを載せ、透過するテラヘルツ波の帯域を制限した。この周波数フィルターは金網状のものであり、テラヘルツ波の透過率を制限するだけではなく、表面プラズモンポラリトンの共鳴により注目しているテラヘルツ波の帯域の情報を強調させることが可能である。本研究では、選定の結果、テラヘルツフィルターとして50 mesh/inchのステンレス網を用いた。

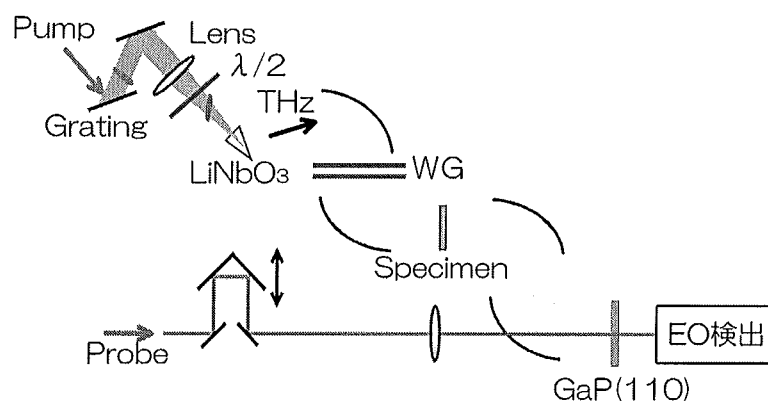


図1 テラヘルツ波による測定系の概形図。

結果と考察

図2(a)に本研究で使用したテラヘルツ波のパワースペクトルを示す。実線は金網のないときのもので、破線は金網を通したときのものである。両パワースペクトルから、0.3 - 1.3 THz程度での測定が可能であることが分かる。また、図2(b)に窒素雰囲気での金網のテラヘルツ波透過スペクトルを示す。0.6 - 1.0 THzに大きなディップがある。これが金網による吸収や反射の効果であり、本研究ではこのディップの様子から精密に試料の吸収を測定する。

まず初めに、テラヘルツ域の透過率がよく知られているシリコン基板上に金網を貼り付けて透過率スペクトルを観察した。シリコンの透過スペクトル、シリコン上に金網を貼り付けた場合の透過スペクトル、この2つを除することで求めた金網の透過率スペクトルを図3に示す。図3(b)を見ると、図2(b)に比べて0.6 - 1.0 THzのディップがより深くなっている。また、ディップの中心周波数が低周波数側にシフトしている。ディップの底の値をディップの低周波数外側と高周波数外側の平均値で除すると 6.7×10^{-2} となった。テラヘルツ波のシリコンの透過率は 5.0×10^{-1} 程度であることが知られており、この値から測定値は大きくずれることが分かった。これはテラヘルツ波と金網の表面プラズモンポラリトンなどとの相互作用の効果が透過率を下げる方向に寄与しているためである。したがって、透過率の絶対値の測定はできないことが分かった。

同様に、金薄膜（膜厚11.5 nm）上に金網を貼り付けて透過率スペクトルを観察した。金薄膜の透過スペクトル、金薄膜上に金網を貼り付けた場合の透過スペクトル、この2つを除することで求めた金網の透過率スペクトルを図4に示す。図4(b)を見ると、シリコン基板の場合と同様に、図2(b)に比べて0.6 - 1.0 THzのディップがより深くなっている。また、ディップの中心周波数が低周波数側にシフトしている。ディップの底の値をディップの低周波数外側と高周波数外側の平均値で除すると 1.6×10^{-2} となった。テラヘルツ波の金薄膜の透過率は 1.2×10^{-2} 程度であることが分かっており、この値に近いと言えるが、やはりシリコンでの測定値のように金網の表面プラズモンや表面プラズモンポラリトンなどの効果が寄与している可能性があるため、透過率の絶対値測定は難しいと考えられる。

金網を貼り付ける効果をシリコンの場合と金薄膜の場合とで比較するために、金薄膜上に金網を貼り付けたときの透過スペクトルを(図5(a)の破線)シリコン基板に金網を

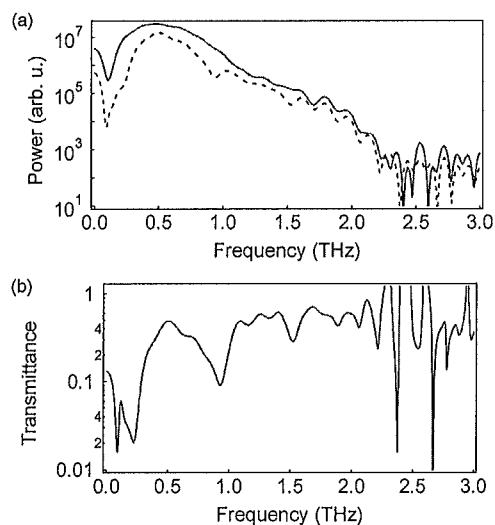


図 2 窒素雰囲気でのテラヘルツ波のパワースペクトル(a)（金網有り：破線、無し：実線）と金網のテラヘルツ波透過率スペクトル(b)。

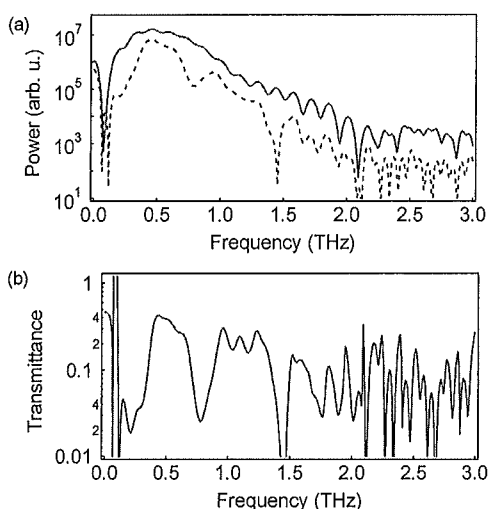


図 3 シリコンの透過スペクトル(a、実線)と、シリコン上に金網を貼り付けたときの透過スペクトル(a、破線)。金網の透過率スペクトル(b)。

貼り付けたときの透過スペクトル(図5(a)の実線)で除した。これを図5(b)に示す。図5(a)からはどちらも0.7 THz付近にディップがあることが分かるが、図5(b)により、金のディップの方がより深く鋭いこと、ディップの中心周波数がより低周波数にあることがはっきりと見て取れる。この周波数やディップの深さの違いが物理的にどう意味するか現在のところ不明であるが、テラヘルツ波と表面プラズモンポラリトンの相互作用が金網とシリコンよりも、金網と金薄膜の方が大きいためだと考えられる。また、金網を貼り付ける試料によってそれらの相互作用がスペクトルへ与える影響が異なるため、試料ごとに基礎データを取る必要があることが分かった。

本研究で行った金網を試料に貼り付けることによる敏感測定をセンサーなどに用いる場合、ディップの幅が狭いことや深さが深いことから、金薄膜に金網を貼り付けたものの方が優れていると予想される。今後、雰囲気を変えたり、試料表面に分子レベルの異物を付着させたりするなど、その特性を活かした物性測定を行いたいと考えている。

まとめ

ステンレス製の金網によりテラヘルツ波スペクトルの特定周波数にディップができることを確認した。そして、シリコン基板、金薄膜に金網を貼り付け、そのディップの特徴が変化する様子を観察した。シリコン基板と金薄膜とでディップの深さ、中心周波数が異なることが分かり、したがって、金網による精密測定を適用する試料によって特性を調べる必要があることが分かった。

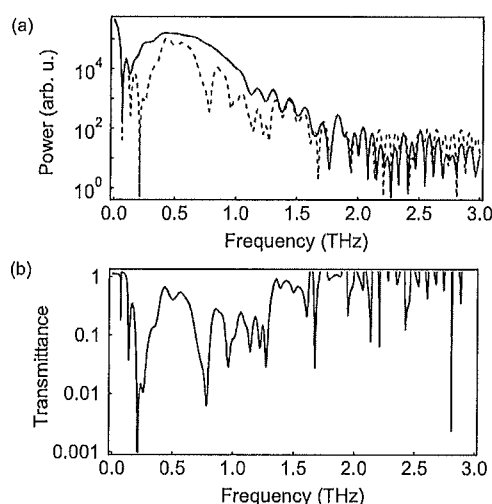


図4 金薄膜の透過スペクトル(a、実線)と、金薄膜上に金網を貼り付けたときの透過スペクトル(a、破線)。金網の透過率スペクトル(b)。

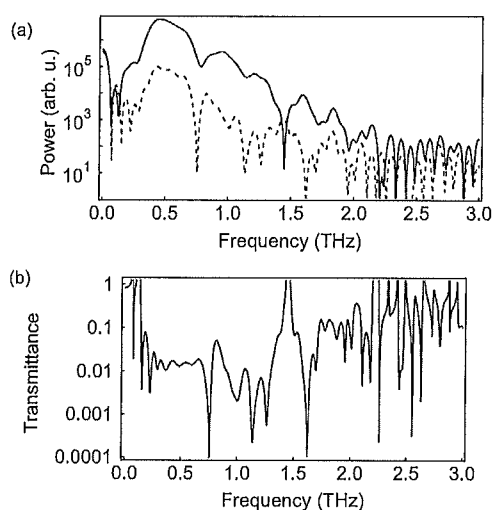


図5 シリコン基板に金網を貼り付けたときの透過スペクトル(a、実線)と、金薄膜上に金網を貼り付けたときの透過スペクトル(a、破線)。(a)の破線をじ実線で除したもの(b)。

気候変動にさらされている豪雪環境下の山岳地における樹木種であるオオシラビソの集団遺伝構造の解明

横浜国立大学 環境情報研究院 准教授

森 章

研究目的

気候変動に起因する全球規模あるいは地域的な温暖化に伴い、日本のような海洋島では、長期的には降雪量の増加が生じる。実際に、最終氷期以降の温暖化の中で、日本海側の山岳地域では降雪量が著しく増加してきた。このような多雪環境は、生育期間（夏）の短さ、加湿・嫌気性の土壌、積雪による物理的ストレスをもたらすことで、多くの生物にとって不適となる。

本研究で着目している北アルプス立山山脈は、世界的に見ても極端に積雪量が多い。立山の弥陀ヶ原湿原は、ラムサール条約で保護指定されている重要な湿地生態系であるが、そこでは多雪環境に対する耐性が特異的に強い「オオシラビソ」という針葉樹の集団が、点在している。この種は、様々な生物種の生育や生態系の機能（炭素蓄積や養分循環など）の基盤となっている。本研究では「基盤種」としてのオオシラビソが、いかにして特異的な環境条件の中で生存し得るのかを、形態的、生理的、遺伝的な特性から評価する。とくに、生物にとっての生育条件が厳しい環境下では、遺伝的な多様性を損ないがちである。本研究では、新しい分子遺伝手法を導入し、オオシラビソ集団の多様性存続メカニズムを解き明かす。この知見は、気候変動下における山岳生態系保全と管理に重要な示唆を与えられよう。

研究方法

・調査地の設置と集団移住モデルの開発について

これまでに多雪環境の湿原に4箇所、比較的少雪環境の尾根上に広がる森林に2箇所の調査区を設置した。前者の場所では、オオシラビソ集団は多雪環境により生育が制限されることで開花時期が遅れ、後者の森林集団から遺伝的に隔離されている可能性がある。つまり、花粉を介した遺伝子の流動が、2立地間で均等に生じていないかもしれない（遺伝子流動の非対称性）。本研究では、オオシラビソ集団動態と生態系への貢献を解明するため、まず遺伝データから集団移住モデルの開発を行った。開発したモデルから、オオシラビソ集団の存続に必要なパラメータ（集団サイズ、各集団間の移住率、遺伝子流動パターン）を推定した。なお、積雪量を通じて空間的に隔離された集団間の遺伝子流動パターン（対称と非対称）は、生物種の集団構造と遺伝子動態を評価する際に重要な指標となる。

具体的には、合祖理論(Coalescent Theory)とマルコフ連鎖モンテカルロ(Markov Chain Monte Carlo Method)に基づいたベイズ推論法(Bayesian Inference; Beerli and Palczewski, 2012)に基づいて、遺伝子流動の対称性／非対称性を示す異なる四つの移住モデルを作った。実際のデータから、もっとも適合性の良いモデル確率を計算することで、積雪量の違いが遺伝子流動に与える影響

を評価した。計算は、Open MPI という並列演算環境を搭載しているスーパー演算サーバーを用いた。

・野外調査

豪雪環境で存続できるオオシラビソ集団が、具体的にどのような生態的プロセスに従うのかを評価するために、生理的・形態的な特性を現地調査より評価した。遺伝的な特性と、各個体が示す持つ形態的・生理的な特性とをつなぎ合わせることで、集団間の相違性を明らかにした。

結果

・二つの立地間における分布するオオシラビソ集団の遺伝的な構造

Analysis of molecular variance (AMOVA) の結果より、多くの遺伝的バリエーションが多雪地と少雪地のオオシラビソ集団間に起こるのではなく、生息地内部に生じたことが示唆された (Percentage of variation: 97.18%)。不均質の環境条件や積雪条件による遺伝隔離は、高山帯の草本群種の中によく報告されている。この場合、隔離された集団は、遺伝交流の制限・損失に伴い、集団内の遺伝的多様性も下げ、集団間の分化が次第に起こる。しかし、本研究では、オオシラビソ集団においてこのような遺伝的隔離と遺伝的多様性の損失は検出されなかった。

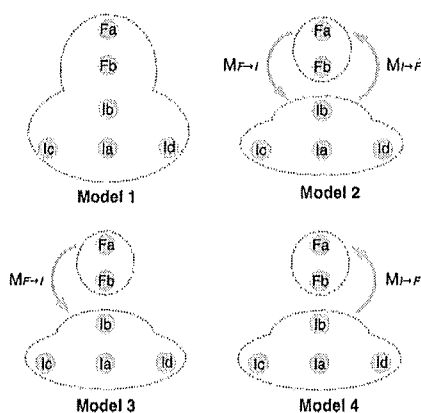


図 1 四つの集団移住モデル。

Fa, Fb は多雪の尾根に分布するオオシラビソ集団、Ia, Ib, Ic, Id は少雪の湿原に分布するオオシラビソ集団。 $M_{F \rightarrow I}$ は尾根の集団から、湿原集団への移住率。 $M_{I \rightarrow F}$ は湿原の集団から、尾根集団への移住率。 Model 1 を示している移住パターンは、遺伝子がすべてのオオシラビソ集団間でランダムに交流するパターンである。 Model 3 と Model 4 は、非対称的な遺伝子流動パターンを示すモデルである。

本研究に行われたモデルシミュレーションの結果により、Model 3 の移住パターンが最も適合性の高いモデルと判明された。Model 3 で示される移住パターンは、完全に隔離されていないが、尾根から湿原への、非対称的 (asymmetric) な遺伝子流動パターンである。このような遺伝子流動パターンの形成要因については、尾根上のオオシラビソ集団は個体サイズが大きく、森林状に連続的に分布している。対照的に、湿原のオオシラビソ集団は個体サイズが小さく、パッチ状に点在している。集団サイズや密度とオオシラビソ個体のサイズが、花粉生産量に強い影響を与えたためと考えられる。

完全に隔離された集団と比べ、遺伝子流動の存在により、サイズの小さい集団は主たる集団からの「救援効果 (rescue effect)」を受けられ、小集団であっても長期的に集団を維持すること

が可能であったと推察された。従って、遺伝子が交流するうえで、空間的に分断された湿原のオオシラビソ集団の局所的適応 (local adaptation) が起こった可能性は低い。さらには、空間的に分断されても、遺伝的な分断がないために、湿原のオオシラビソ集団は、遺伝的多様性の損失が短期間に起こりにくいと考えられた。

・オオシラビソ集団の樹形・生理的なパターン

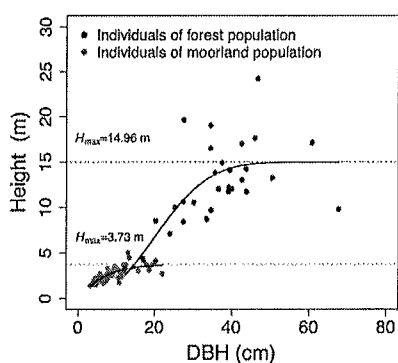


図2 オオシラビソ樹高—DBH（胸高直径）の関係。

雪の少ない尾根上の上部斜面と積雪の多い湿原において、オオシラビソの樹形が大きく異なる。推定された最大樹高は、尾根上個体が 14.96m、湿原個体が 3.73m である。

積雪は樹木の成長、林冠の発達に強いストレスを与える。本研究で調べた弥陀ヶ原湿原は、冬の積雪深が 4～6m 以上である。このような積雪量は、湿原に生育するオオシラビソの矮小化の主要な要因であると考えられた。

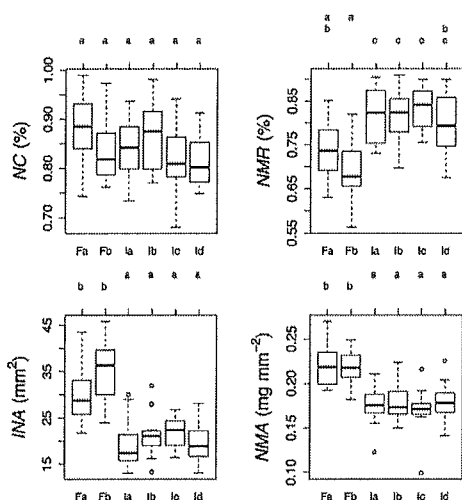


図3 一年枝から測定した針葉の特徴パターン。

個体針葉面積(Individual Needle Area, INA)、面積ごとの針葉重量(Needle Mass/Area, NMA)に関して、尾根付近と湿原の集団の間に有意な差異が認められた。

本研究では、遺伝的な隔離は検出されず、樹形や枝、針葉の形態的可塑性が検出された。特に、環境条件が不均質な場所では、可塑性による植物の生理的な調整は種の存続に重要である。例えば、本研究のような湿原では、高い積雪量は物理的なストレスとなり、林冠の発達が制限される。この場合、樹体を構造的にサポートする器官に、同化産物を投資する戦略が必要となる。そのために、湿原のオオシラビソ個体では、葉と枝のバイオマスの中、葉の割合 (NMR) が低かった。

考察

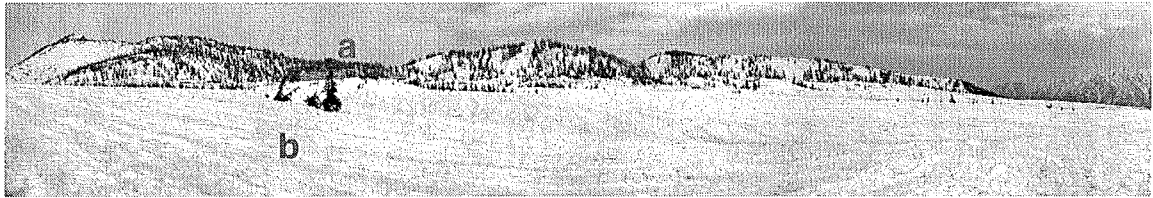


写真 1 調査地の積雪パターン(弥陀ヶ原・立山)。(a、積雪量の少ない尾根上に生育しているオオシラビソ。個体のサイズが大きく、林冠も雪の上にある。b、尾根と隣接する湿原。冬には非常に高い積雪量がある。ここに生育しているオオシラビソは小さく、ほとんどは雪の中に埋まっている)

気候変動下では、種の分布域は高標高地帯や高緯度地帯に移動することがよく報告されている。高標高に生育している種、特に木本種は移動する能力が低く、移動可能な地域が狭いために、絶滅するリスクも高いといわれている。このような種は、分布域を移動しなくても、局所的な進化や、形態的可塑性によって変動する環境に対応できると考えられた。針葉樹は古い種なので、局所的な進化が起こりにくく、代わりに高い可塑性を持つことが先行研究においてしばしば論じられている。

本研究で調べたオオシラビソは、異なる積雪量による集団の空間的な分断に関わらず、遺伝的交流はあまり遮断されていなかった。尾根上の集団から湿原の集団への遺伝子流動は、小さい湿原のオオシラビソ集団に救援効果を与え、オオシラビソ集団全体がより長期間的に維持できると想定している。同時に、高い形態的可塑性は不均質な環境に柔軟に対応できると考えられる。このような柔軟性は、種の生存における大切な特徴である。

気候変動に伴う生物の絶滅が危惧されているにも関わらず、生態系プロセスや他の生物の群集構造、個体群動態などに対して大きな影響を持っている「基盤種」に関する関心は薄い。基盤種が消失すれば（あるいは、種が存在していても、生態系で担う機能が消失すれば、群集の構造、食物網、一次生産、エネルギーや養分の循環、水分条件などの多くのプロセスが根本から変わる、あるいは、失われてしまう。このような条件下で、「基盤種」の生存メカニズムの解明は、今後の生態系保全や管理を行う際に、既存知識による詳しい理解に加え、完備的なフレームワークの作成に貢献できると考えられている。

成果

Shenhua Qian, Waka Saito, Makiko Mimura, Shingo Kaneko, Yuji Isagi, Eri Mizumachi, Akira S. Mori (2014) Plastic morphology and source-sink population structure of *Abies mariesii* in a snowy subalpine ecosystem in Japan (学術誌「*Plant Ecology*」に投稿中)

基本転写因子 TFIID の転写初期反応における役割

横浜市立大学・生命医科学研究科 特任助教

大山 良文

(研究の背景と目的)

多段階の反応から成る転写において、筆者が考える現在最も解明が待たれる問題は、転写開始の引き金を引く、いわゆるアクチベーター・エンハンサーなどの多様な転写調節因子からのシグナルが、どのように転写酵素RNAポリメラーゼによる転写という単一の反応に変換されるのかという点にある。実は真核生物においてRNAポリメラーゼは単独では転写を始めることができず、基本転写因子と呼ばれる一群の因子の補助を必要とする。mRNAの転写を行うRNA polymerase II (pol II) の場合、6種類の基本転写因子が存在しており、一つを除きすべてが複合体である。基本転写因子のうちTFIID (transcription factor II D)は以下の二つの機能を有する点からpol II転写の最も初期の反応を司る中心因子と考えられている。第一に転写調節因子(アクチベーター)と直接相互作用して、そのシグナルをpol IIへと伝えるコアクチベーターとして機能を持つ。第二に、転写開始点を決定するDNA上の制御配列であるコアプロモーターを認識し結合する能力を持っている(pol IIは持っていない)。既知の知見および我々のグループの研究から、上記の二つの機能は転写開始における一つの反応ステップの制御として捉えることが可能であると考えられる。それは、TFIIDの構成因子の一つTBP (TATA-binding protein) のコアプロモーターエレメントTATA-boxへの結合の制御である。TFIIDの他の構成因子である1~14のTAFs (TBP-associated factors)は、TBPのTATA-box認識を補助する一方、TBPのTATA-boxへの直接の結合を阻害するという相矛盾する機能を保持する因子である。TAFsのうち、TAF1はこの両機能を保持することから、TBPの機能制御に必須の役割を果たすと我々は予測している。

本研究では、TAF1によりTBPのTATA-boxへの結合の阻害がどのように行われるのかをTAF1とTBPの結合様式を調べることにより明らかにすることを目的とした。また転写調節因子がこの阻害を解除することで、転写開始のシグナルをpol IIに伝えていられると考えられる知見について考察する(結果①)。次に転写に必須の役割を果たすと考えられるTFIIDについて、生体内での転写における役割を明らかにすることを目的に現在進めている研究についても述べる(結果②)。

(研究方法)

TBPは鞍型構造と呼ばれる特有のタンパク質立体構造を取り (Fig. 1)、凹面でTATA-boxと直接結合し、また凸面では他の基本転写因子(TFIIAなど)と結合することが報告されている。我々は過去の研究において、TAF1のN末端領域(TAND: TAF N-terminal domain)はTBPに結合すること、TANDはTAND1-2の二つのサブドメインに分割され、TAND1がTATA-box結合同面に、TAND2がTFIIAの結合同面に結合することで、TBPと他因子との相互作用を阻害していることを示した。今回、Linköping大学のM. Sunnerhagenらとの共同研究により、出芽酵母のTANDとTBPを用いて両者の結合様式を結晶構造解析により詳細に明らかにすることに成功した(構造解析はM. Sunnerhagenらが担当)。筆者は結晶構造が生理的結合状態を反映したものであるか否かを確かめるため、結晶で相互作用が示されたアミノ酸残基について変異体を作成し、生化学的手法と遺伝学的手法を用いてTAND-

TBPの機能に与える影響を観察した。

(結果と考察)

① TAND-TBPの結合様式の解析

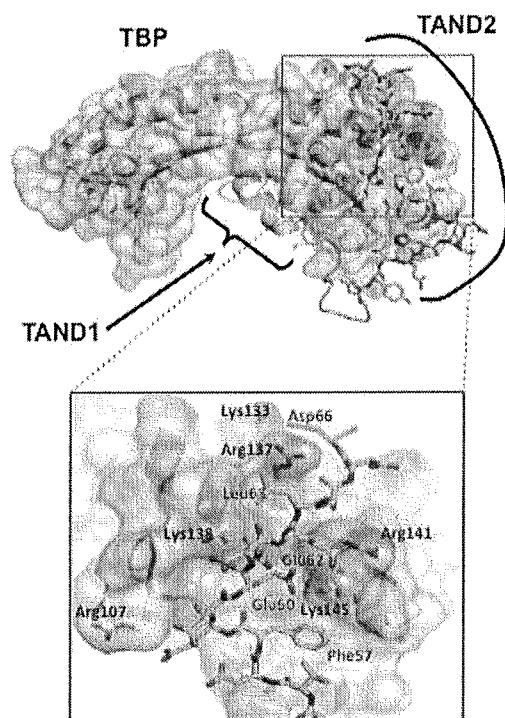


Fig. 1, TAND-TBPの構造
TBPを空間充填モデルで、TANDをリボンモデルで示した。

出芽酵母のTAF1のTAND領域とTBPを、リンカー配列を介して連結したキメラ遺伝子を作成し、大腸菌でのタンパク質の発現と精製、結晶化が行われた。M. Sunnerhagenらは得られた結晶から、最終的に1.97 Åの高解像度で結晶構造を解くことに成功した。Fig. 1に示した通り、TAND1はTBPの凹面に結合すること、またこの結合はTAND1がTATA-box DNAを分子擬態した構造を取ることでなされていることが明らかとなった（TAND1のTATA-box擬態は先行研究で示されていた）。これに対し、TAND2はTBPの凸面の中でも塩基性アミノ酸残基に富んだ領域に主に静電的相互作用を通して結合していることが明らかになった（TFIIAの相互作用面と一致）。明確な二次構造を持つTAND1に対して、TAND2は二次構造を持たないもののTBPと非常に安定に結合していることが示された。

筆者はこのTAND2-TBPの結合が実際のTAND-TBPの相互作用に寄与するものであるか否

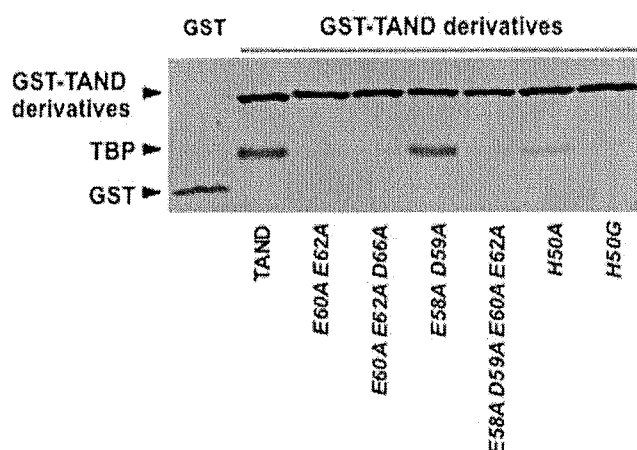


Fig. 2, GST-TANDとTBPの結合
図に示した各種GST-TANDとTBPを1:2の割合で混合し、GST-pull down assayを行った。

かを確かめるため、結合の認められた様々なアミノ酸に変異を入れ、以下に述べる手法を用いて観察することにした。TAND2内の電荷を持つアミノ酸を電荷のないAに置換した変異体を作成し、GST (Glutathione S-transferase)融合タンパク質として、大腸菌内で発現させた。またこれとは別に、野生型TBPを、大腸菌で発現させ精製した。これらTAND, TBPを試験管内で混合し、グルタチオン結合ビーズ（GSTに特異的に結合する）を用いて、GST-TANDをトラップしたとき、TBPもいっしょにトラップされるのかを観察

した（GST pull-down assay）。Fig. 2に示したとおり、一部のTAND2変異体（E58A D59A）を除き、全ての変異体でTBPの結合が低下～消失することが明らかとなった。

次に、上記のTAND-TBP結合が出芽酵母の細胞内で機能を果たしているか否かを確かめるため、変異体を持つ酵母の生育を観察することにした。TAND（全体）を欠損した酵母は高温（ $\sim 38^{\circ}\text{C}$ ）での生育が不能となる（TS性）（Fig. 3, レーン2, 11, 20）。これに対し、TAND1またはTAND2のみを欠損した酵母はTS性が弱い（Fig. 3, レーン3, 12, 21）。従って、TAND2のみを持たせた酵母（ ΔTAND1 ）でTAND2が正常に機能しなければ、TAND全体を欠損した場合と同様の強いTS性を示すことが考えられた。そこで、TAND1欠損変異にTAND2の変異を重ねた酵母変異体を作成し（Fig. 3, レーン13-18, 22, 23）、様々な温度での生育を観察した。その結果、GST pull-down assayでTAND-TBPの相互作用が低下した変異体ほどTS性が強くなることが確認された。以上の事実から、結晶構造解析により明らかとなったTAND-TBPの相互作用は出芽酵母内での生理的結合状態を反映したものであるとの結論に至った。

TANDがTBPに結合している状態は、転写開始反応の必須段階であるTBPのTATA-boxへの結合が妨げられた状態であると考えられる。これまでに、TANDはある種のアクチベーターの転写活性化領域に匹敵する転写活性化能を持つことを我々は明らかにしている。現在予備実験段階ながら、転写活性化領域もまたTBPに対してTANDと同様の様式で結合を

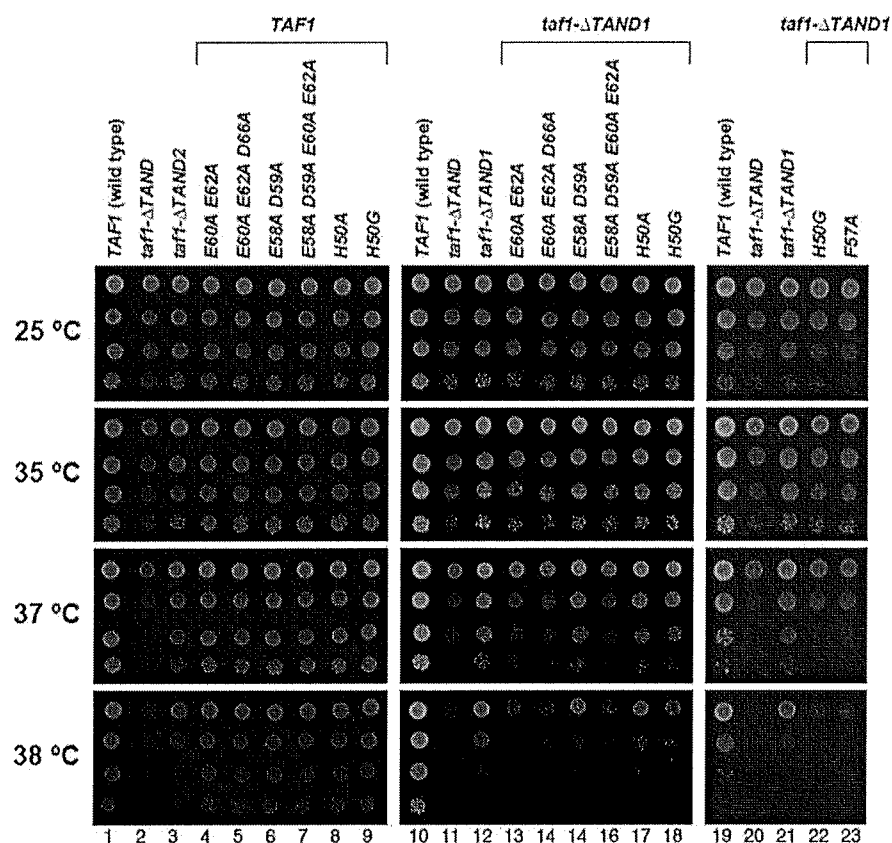


Fig. 3, TAND2変異体を持つ酵母の生育

写真上に示した各種のTAF1を持つ酵母株を、図の各温度にて合成培地上で3日間培養した。

することが明らかになりつつある。

これらの知見に基づいて、我々はTFIIDによる転写開始の制御機構として以下のモデルを考えている。

TAND-TBPに（結合は動的なものであると考えられる）アクチベーターが近づくと、TBPはTANDからアクチベーターへと結合相手を換える。このアクチベーター-TBPの結合がコアプロモーター至近で起こると（この結合も動的なものであると考えられる）、

TBPはアクチベーター

から（TFIIA-）TATA-boxへと再び結合相手を換える。これらの反応において、TFIIDの他のコンポーネントはアクチベーターとともにTBPがTANDからTATA-boxへと結合相手

を換える反応を促進させているものと予測している（TATA-boxに結合したTBPはTFIIAなど他の基本転写因子とともに、pol IIをコアプロモーターにリクルートし、転写を開始すると一般に考えられている）。現在、TBPとアクチベーターの結合様式の解明に重点を置いて研究を続けており、上記の仮説の検証・改訂を進めて行きたいと考えている。

② 生体におけるTFIIDの機能解析

出芽酵母ではTAF1の変異によりmRNAをコードする遺伝子の9割で転写が低下することが報告されており、生体内での転写制御においてTFIIDが普遍的に働くことを示唆している。一方、高等真核生物においてはTFIIDのコンポーネントに複数の変種（バリエーション）が存在することが報告されている。これらバリエーションは特定の発生段階や組織、器官で特異的に発現して亜型のTFIIDを構築し、転写を調節していることが明らかとなり始めている。すなわち、高等真核生物では転写調節因子の多様化に加えて、その受け手となるTFIIDにも複数種を存在させることにより、より複雑な転写制御システムを発達させていると考えられる。

筆者は多様化したTFIIDにおいてもその本質的な機能はTBPのコアプロモーターへの結合の制御にあると考えており、これを確かめるため、多細胞動物の胚発生で観察される一つの現象に着目した。多細胞動物では、受精直後の胚ゲノムからの転写は抑制されている。動物種により異なるものの、所定の発生段階に至り、ゲノムワイドな転写の活性化が起こる。これをZGA (zygotic genome (gene) activation)と呼ぶが、これまでにアフリカツメガエルやゼブラフィッシュにおいて、TBPとそのバリエーションのTRF2がZGAに必須の役割を果たすことが報告されている。もし、ZGAにおけるTBP/TRF2の制御にもTFIID (TAFs) が関与しているならば、TAFsの機能を阻害することでZGAを阻害できると筆者は考えた。

そこでゼブラフィッシュを用いて現在以下の計画で研究を進めている。まず、多様化したTAFsの中からZGAの前後で発現量の変動するものを選び出す（特定の発生段階や組織、器官で高発現するTAFsがその発現時期、部位での転写を制御している例が報告されている）。発現変動したTAFsに対する特異抗体を作成し、その特異抗体を発生初期のゼブラフィッシュに注入し、TAFsの機能を阻害する（現在広く用いられているアンチセンスRNAなどでタンパク質発現を阻害した場合、卵由来のタンパク質は阻害できないという問題があるが、抗体阻害ではそうした問題がない）。抗体阻害によりZGA以降の胚発生に影響が現れるのか、現れた場合、遺伝子発現にどのような影響が現れるのかについて観察する予定である。

これまでの研究から、1~14のTAFsのうち、TAF4とそのバリエーションのTAF4bが胚発生開始前からZGA後にかけて高発現し、その後の発生の進行とともに減少するという特徴的な発現変動を示すことを確認した（結果省略）。現在、このTAF4, TAF4bについて特異抗体の作成を進めているところであり、ZGAにおけるTFIIDの寄与を明らかにしたいと考えている。

（研究論文）

High-resolution structure of TBP with TAF1 reveals anchoring patterns in transcriptional regulation.
Anandapadamanaban M, Andresen C, Helander S, **Ohyama Y**, Siponen MI, Lundström P, Kokubo T, Ikura M, Moche M, Sunnerhagen M.
Nat Struct Mol Biol., 2013, 20(8), 1008-1014

横浜市の都市下水処理施設において固液分離障害とリン除去悪化を誘引する微生物の制御

横浜国立大学大学院工学研究院 特別研究教員

新田 見 匡

(研究目的)

1) 背景

活性汚泥法は約100年前に開発されて以来、種々の改良・改善、各種の変法の開発が行われ、世界的に広く普及している。しかし活性汚泥中に一定の限度を超えて糸状性微生物が増殖することによって生ずる、活性汚泥の沈降性の悪化（固液分離障害）は、未だ解決されていない。活性汚泥の固液分離障害は、放流水質の悪化、腐敗臭の発生など、維持管理上の問題のほか、病原体微生物の飛散・蔓延等の公衆衛生上の問題をもたらす。また近年では一部の糸状性細菌は、嫌気条件下で基質を摂取する代謝を有する、すなわちリン除去微生物と競合し、生物学的リン除去をも悪化させることも分かってきた。そのため糸状性微生物の異常増殖を抑制するための知見が必要である。

2) 目的

都市下水処理施設において活性汚泥の固液分離障害とリン除去悪化を引き起こす微生物（主に糸状性細菌）を明らかにし、同微生物の増殖制御方法を調べ、下水処理を効率的に行うための新たな技術基盤を確立することが最終的な目標である。研究全体の計画を下記の項目 a. ～c. に記す。助成期間においては項目 a. を実施することを目的とした。

- a. 遺伝子プローブを用いた分子生物学的手法により、都市下水処理施設における各種微生物の存在量を調べ、その存在量と廃水処理施設の固液分離、リン除去性能との相関関係を明らかにする。
- b. 相関の明らかとなった標的微生物を単離・培養し、種々の環境条件における増殖速度や生理活性を調べる。また活性汚泥中で他の微生物群と共存している状態の標的微生物について、分子生物学的手法によりその複合微生物系における生理活性を調べる。
- c. 得られた標的微生物の代謝情報をもとに、その増殖を抑制する下水処理反応槽の運転条件を明らかにする。また同微生物の増殖制御により改善される固液分離、リン除去への効果を明らかにする。

(研究方法)

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を用いて活性汚泥中の糸状性細菌の観察を行った。次に固液分離障害の原因と推測された糸状性細菌について、real-time PCRによる定量を行った。従来糸状性細菌の解析には、FISH法など顕微鏡を使った手法が主に使われてきた。しかし本研究では糸状性細菌を簡易迅速かつ正確に定量するため、FISH法に加え、real-time PCR法を使用した。

特定の糸状性細菌の量と下水処理施設が保有する活性汚泥の沈降性のデータ（SVI値）との関係を調べることで、同細菌の固液分離障害との関連性についてまとめた。

(結 果)

1) FISH法による糸状性細菌の解析

都市下水処理施設の13の反応槽より活性汚泥試料を採取し、各種プローブを用いたFISH法による顕微鏡観察を行った。その結果、固液分離障害が起きている(SVI値の高い)施設の試料においては、CHL1851プローブで検出されるEikelboom morphotype 1851の形状を有する*Chloroflexi*の糸状性細菌 (図1) が優占していることを確認した (表1)。

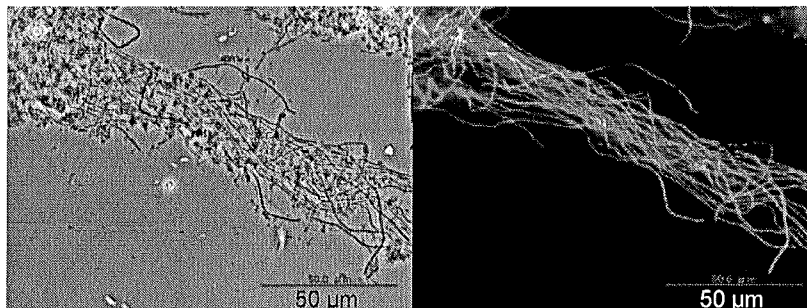


図1 Eikelboom type 1851の形態を有する*Chloroflexi*糸状性細菌の位相差顕微鏡写真 (左) とFISH画像 (右) (FISHプローブはCHL1851を使用)

表1 活性汚泥の沈降性指標SVIと各種FISHプローブを用いた糸状性細菌の観察結果

	CFX67a	CFX67b	CFX197	CHL1851	EU25-1238	T0803-0654	SVI (mL/ g-sludge)
A1	-	-	++	+++	+	++	150
A2	-	-	+++	++++	+	++++	230
A3	-	-	+	+++	+	+++	96
A4	-	-	++	+	+	+++	120
B1	+	-	+++	+++	+	++++	260
B2	+	-	++	+++	+	++++	260
B3	-	-	+++	+++	+	++++	170
B4	+	-	+++	++	+	+++	110
B5	-	-	+++	+++	+	+++	250
C1	-	-	++	++++	++	++++	240
C2	-	-	+	++++	+++	++++	370
C3	-	-	+++	++++	+	++++	310
C4	-	-	++	++++	+	++++	420

※Jenkins *et al.* (2004)の指標 (- none, + few, ++ some, +++ common, ++++ very common)に基づき、各FISHプローブで検出された糸状性細菌の多少を主観的に評価した。

2) real-time PCR法による糸状性細菌の解析

表2に示すPCRプライマーを用いてEikelboom type 1851の形態を有する*Chloroflexi*糸状性細菌に特異的なreal-time PCRを行った。CHL1851fはFISH プローブ CHL1851の配列をPCRプライマーに適用したものである。またb785rは、真性細菌の16S rRNA geneに特異的な既存のPCRプライマーである。

表2 PCRプライマーの塩基配列

Primer	Sequence (5'-3')
CHL1851f	TGG CAG AGG TTC GTG GAA TT
b785r	CTA CCA GGG TAT CTA ATC C

最初にreal-time PCR法の反応特異性について確認を行った。解離曲線解析の結果、各活性汚泥試料より得られたPCR産物のT_m値は86℃付近に収束していた。またアガロースゲル電気泳動で確認した結果、産物の塩基長は150 bp程度の長さであった(図2)。これはEikelboom type 1851の形態を有する*Chloroflexi*糸状性細菌(Type 1851 strain Ben 52)の塩基配列より予想されるPCR産物の塩基長(145 bp)に近いものであった。従ってCHL1851f-b785rのreal-time PCR法では、標的の糸状性細菌の遺伝子が特異的に増幅されたものと考えた。

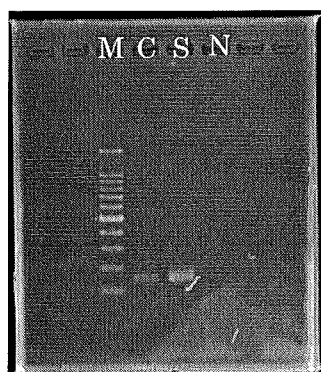


図2 アガロースゲル電気泳動によるPCR産物の塩基長の確認
プライマーはCHL1851f-b785rを使用。M: マーカー(100 bp ladder), C: Type 1851 strain Ben 52に近縁な16S rRNA geneのクローン, S: 活性汚泥試料C2, N: ネガティブコントロール。

次にreal-time PCR法による遺伝子の定量結果とFISH法による観察結果を比較した(図3)。サンプル間の比較において、real-time PCR法で求めた遺伝子コピー数の多少は、FISH法により判定した糸状性細菌の多少と傾向が似ていた。従ってFISH法により主観的に判定した細菌の多少をreal-time PCR法により定量的に評価できたものと考えた。

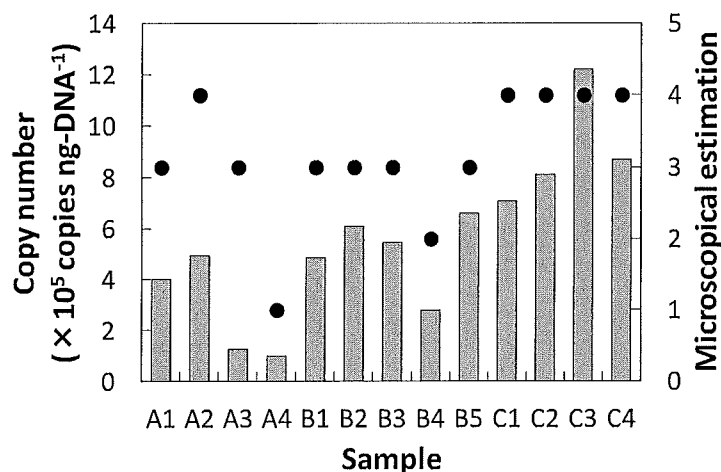


図3 real-time PCR法により定量した活性汚泥試料中の遺伝子のコピー数、およびFISH法により判定した同試料中の糸状性細菌の多少(0: none, 1: few, 2: some, 3: common, 4: very common, 5: abundant)。

図4にはreal-time PCR法で求めた遺伝子の定量値と活性汚泥の沈降性指標SVIを比較した結果を示す。図4において、遺伝子コピー数(=細菌の存在量)の増加に伴いSVIの値が上昇(活性汚泥の沈降性が悪化)していることから、Eikelboom type 1851の形態を有する*Chloroflexi*糸状性細菌は、固液分離障害を誘引する細菌であることが示唆された。

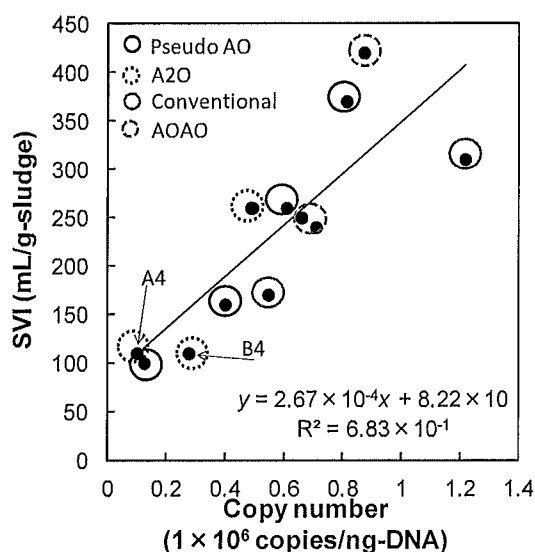


図4 Eikelboom type 1851の遺伝子コピー数と活性汚泥の沈降性指標SVIとの関係
図中の凡例 (Pseudo AO, A2O, Conventional, AOAO) は各活性汚泥試料を採取した施設の処理方式を表す。

(成果・考察) 等

図4には各試料を採取した施設の処理方式 (A2O, 疑似AO, AOAO, 標準活性汚泥法) を示した。図より, A2Oと疑似AOの施設から採取した試料は, AOAOや標準活性汚泥法の施設から採取した試料に比べ, *Chloroflexi* type 1851糸状性細菌の存在量が少ない傾向がみられた。今後多くの試料について確認をする必要はあるが, A2Oや疑似AOプロセスには同糸状性細菌の増殖を抑制する効果があるものと考えられる。また*Chloroflexi* type 1851糸状性細菌の存在量が少ないA4とB4の活性汚泥試料は, 嫌気槽における溶存酸素濃度を低く制御した施設より採取した試料であった。同じ処理方式であっても, 反応槽の運転条件の設定により, さらなる増殖抑制が可能であることを示唆する結果であった。

以上本研究では, 下水処理施設における固液分離性能の悪化と関係のある糸状性微生物をEikelboom type 1851の形態を有する*Chloroflexi*糸状性細菌に見出し, その関係を定量的に把握するに至った。また同微生物の増殖を制御するための示唆も得られた。しかし嫌気条件下で基質を摂取する代謝がある, すなわちリン除去微生物と競合し, 生物学的リン除去をも悪化させる糸状性微生物については, 本研究において知見を得ることができなかった。今後はリン除去が悪化している処理施設で優占する糸状性微生物を特定してその増殖制御方法を検討し, 下水処理施設の固液分離障害とリン除去の悪化を解決していく必要がある。

雑誌論文

Nittami T., Speirs L., Fukuda J., Watanabe M., Seviour R. (2014) FISH probes targeting members of the phylum *Candidatus* Saccharibacteria falsely target Eikelboom type 1851 filaments and other *Chloroflexi* members. Environ Microbiol Rep, in press. (IF:2.708)

学会発表

新田見 匡, 山田 拓也, 鈴木市郎, 福田淳二, 渡邊 昌俊 (2014.3) Real-time PCR法によるEikelboom type 1851糸状性細菌の解析, 第48回日本水環境学会年会, 仙台

Nittami T., et al. (2014.9) Correlation between abundance of *Chloroflexi* type 1851 filaments and sludge sedimentation properties. IWA World Water Congress & Exhibition, Lisbon, Portugal. (予定)

バリアハイトイメージング法を用いた 有機分子内静電ポテンシャルの直接計測

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 博士課程前期 2 年
青木琢朗

(研究目的)

物質の電氣的、光学生性質の多くは、量子力学に基づいており、物質中にある電子波が受ける静電ポテンシャルによって決定づけられている。結晶の内部では、そのポテンシャルを直接計測することは難しいが、結晶表面では走査型トンネル顕微鏡 (STM) を利用することで可能になることが我々の研究で分かってきた。

走査型トンネル顕微鏡 (STM) は、先鋭化した探針と試料間にバイアス電圧を印加し、その間を流れるわずかなトンネル電流を一定にして走査する。トンネル電流は、探針－試料間距離に対して指数関数的に変化し、その変化量は探針と試料の仕事関数に依存する。そして、各走査位置で、探針－試料間距離とトンネル電流の関係を測定することで探針直下の局所的な仕事関数 (バリアハイト) を求めることができる。我々は、このバリアハイトの値から静電ポテンシャルを算出できることを見出し、静電ポテンシャルの空間分布測定を可能にしている。そして、この測定法をさらに発展させ、金属表面に吸着した有機分子の静電ポテンシャルの強度分布を単一分子レベルで直接的に計測することを目指している。

上述した背景より、これまで我々は、その測定の対象として、ショックレー状態と呼ばれる 2 次元電子ガスの表面状態を持ち、なおかつ表面超構造を持つ Au(111) を用いてきた。これまでは、液体窒素を冷媒とした 77K の低温温度下で実験を行ってきたが、本研究では、より精密で安定した測定のために液体ヘリウム (4K) を冷却媒体として実験を行い、静電ポテンシャルの微弱な変化を安定して測定することを試みた。

(研究方法)

研究は以下の 3 点を主軸として行った。

- (1) 4K の低温環境で、より高精度な測定を行うための測定条件の最適化
- (2) 4K における Au(111) 表面のステップ付近のポテンシャル変化の測定
- (3) 4K における Au(111) 上の表面超構造によって形成した周期ポテンシャルの測定

(1)に関しては、より高精度な測定が可能となるように、局所的な仕事関数(バリアハイト)の探針-試料間距離依存性やバイアス電圧依存性を調べることで、最適な測定条件を調べた。

(2)に関しては、ショックレー状態にある電子波は、表面に存在する単原子ステップなどによって、その電子波は散乱され、入射波と散乱波が干渉することで電子定在波を形成する。そこで、ステップ付近でポテンシャルの変化をバリアハイト測定によって調べた。

(3)に関しては、Au(111)表面に形成した表面超構造によって形成する周期ポテンシャルをバリアハイト測定から試みた。

(結果)

(1) 4K の低温環境で、より高精度な測定を行うための測定条件の最適化

Au(111)表面上で、バリアハイトと探針試料間距離依存性やバイアス電圧依存性を調べ、測定条件の最適化を行った。

(a) 探針試料間距離依存性: トンネル電流が 500pA、バイアス電圧が 50mV の状態では、探針試料間距離が 0~0.2nm の範囲においてバリアハイトの変化ほとんどなかった。

(b) バリアハイトのバイアス電圧依存性: トンネル電流が 500pA のとき、バリアハイトは-1.0V ~1.0V の範囲ではほとんど一定となることが分かった。ただ、-1.0V 以下の電圧になると、バリアハイトがわずかに小さくなった。そこで、本研究での測定条件では、-0.5V~0.5V の範囲で行うことで、より正確な測定が可能となることが分かった。

(2) 4K における Au(111)表面の電荷密度の再分布によるポテンシャル変化の測定

Au(111)表面のステップ周辺でバリアハイト測定を行い、その結果からポテンシャルの変化を調べた。

(a) Au(111)表面のステップ: Au(111)表面のステップのポテンシャルは、上下に大きく変化することが分かった。その変化は、ステップの上端で小さく、下端ではポテンシャルが大きかった。これは、表面ダイポールによるものであると考えられる。また、この結果を、77K のときに得られたものと比較したところ、4K で得られたものの方がその変化はより大きかった。このことから、表面ダイポールには温度依存性があることが明らかとなった。

(b) Au(111)表面のステップ周辺: Au(111)表面のステップ付近には、周期的な振動があり、ステップから離れるにしたがって、その振動が減衰している様子が観察された。このときの

周期は、約 1.8nm であり、Au(111)のフェルミ波長の半分の値とほぼ一致していた。これは、電子定在波形成によるものであると考えられる。上述したように、Au(111)表面に存在するショックレー表面状態にある電子が散乱・干渉することで電子定在波を形成する。そのような電子定在波の形成は、表面の電荷密度を変化させ、さらに表面の静電ポテンシャルの変化を誘起する。いわゆるこれがポテンシャルのフリーデル振動と呼ばれるものであり、バリアハイト測定からその振動を観察することに成功した。また、この結果は、計算によって算出したポテンシャル分布とおおよそ一致していた。

さらに、この 4K で得られた結果と 77K で得られた結果を比較したところ、4K で得られたフリーデル振動の方が、その振動の振幅が大きいことが分かった。これは、熱エネルギーによる揺らぎが 4K の極低温で観察することによって抑えられたからであると考えられる。

以上のように、Au(111)表面のステップ付近のポテンシャルを 4K の低温環境で観察することによって、より正確なポテンシャル変化を捉えることが可能となった。

(3) 4K における Au(111)上の表面超構造によって形成した周期ポテンシャルの測定
周期ポテンシャルの測定:バリアハイト測定から得られたポテンシャル分布より、先行研究や 77K で得られたものと同様に、波形の周期ポテンシャルを測定することができた。ただ。

4K で得られたそのポテンシャル分布は、そのエネルギーが少し大きいものとなった。これは、ステップ付近と同様に、熱エネルギーによる揺らぎの問題であると考えられる。このポテンシャルの測定を別の方法で検証したところ、4K のバリアハイト測定によって得られたものとよく似ていた。このことから、バリアハイト測定によって正確にポテンシャルの変化が測定できることが明らかとなった。

(考察)

以上のように、本研究では、Au(111)表面のポテンシャル変化について、4K のバリアハイト測定によって正確に計測することが可能となった。現在、この内容については、論文雑誌に投稿中である。また、この他にも、ほとんど同じ格子定数である Ag(111)表面に Au を蒸着したときの表面について、同様のポテンシャル測定を行い、Au の膜厚とポテンシャルの変化の詳細などを明らかにしている。これらの成果から、今後は単一分子レベルで有機分子内静電ポテンシャルの直接計測に応用することが期待される。

(主な発表論文など)

学会発表(計 2 件)

“Potential distribution for surface-state electrons of Au(111) derived from barrie-height imaging with STM”

Takuro Aoki, Takashi Yokoyama ACSIN-12 & ICSPM21

“バリアハイト測定による Au(111) 表面電子に対するポテンシャル分布の直接観察”

青木琢朗、横山 崇 第 33 回表面科学学術講演会

遺伝子破壊細胞を用いたヒト iPS 細胞ライブラリーの構築と ゲノム安定性維持に関わる遺伝子の細胞特異的機能の解析

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 特任助教

黒沢 綾

(研究目的)

ゲノム DNA は、内的・外的要因によって常に損傷を受けている。ゲノム情報を正確に維持するため、細胞には DNA 損傷を認識し、修復するための機構、ゲノム安定性維持機構、が備わっており、ヒトの体を構成するほぼ全ての細胞において働いている。ゲノム安定性維持に関わる遺伝子の異常は、神経細胞や血球細胞の分化や働きに影響をもたらすことがある。そのため、神経細胞や血球細胞の分化におけるゲノム安定性維持の重要性が示唆されるが、その詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では、遺伝子ターゲティング法によって作製した遺伝子破壊細胞を利用して、神経細胞や血球細胞の分化におけるゲノム安定性維持機構の重要性を明らかにすることを目的とした。そのため、まず、高効率で遺伝子ターゲティング可能なヒト細胞である Nalm-6 細胞を用いて、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) ライブラリーの作製を試みた。こうした細胞を系統的に作製しライブラリー化できれば、ゲノム安定性維持の異常が分化時あるいは分化後において、細胞の生存や細胞固有の働きにどのような影響を及ぼすかを明らかにすることが可能になる。

(研究方法)

細胞と培地 ヒトブレ B 細胞由来 Nalm-6 細胞は、10% 仔ウシ血清 (Thermo fisher scientific) もしくは 10% ES 細胞グレード ウシ胎児血清 (16141-079, Life technologies) と 50 μ M メルカプトエタノールを加えた ES 培地 (ニッスイ) で培養した。ヒト正常線維芽細胞 TIG-3 は、10%ウシ胎児血清 (Thermo fisher scientific) を加えた MEM 培地 (ニッスイ) で培養した。

接着の検討 Geltrex または VTN-N (A14700, Life technologies)、CELLStart (A1014201, Life technologies)、0.1%ゼラチン (G2500, Sigma-Aldrich) で、12 ウェルディッシュ (353043, BD Falcon) をコーティングした。その後、アスピレーターでコーティング剤を除去し、1 ml の ES 培地を添加した。そこへ対数増殖期にあるヒト Nalm-6 細胞を 10^3 、 10^4 、 10^5 個となるように播種した。細胞を CO₂ インキュベーターで 4~14 日培養した後、培地を除去し、クリスタルバイオレット染色を行った。

増殖阻害試験 Nalm-6 細胞を 4×10^4 個の密度で 24 ウェルプレートに植え込み、MEK 阻害剤、GSK-3 β 阻害剤、ALK 阻害剤を単独もしくは組み合わせて添加した培地中で培養し、24 時間毎に細胞密度を測定した。

iPS 細胞の樹立 2x10⁶個の Nalm-6 細胞に 20 µg の Episomal iPSC reprogramming vectors (A14703, Life technologies) をエレクトロポレーション法により導入した。細胞を 10⁶ 個ずつ φ 90 mm ディッシュ (150350, Thermo fisher scientific) もしくは φ 60 mm ディッシュに播種し、24~48 時間培養した。その後、bFGF と MEK 阻害剤等を含む N2B27 培地を用いて、14 日間培養を続けた。この間、一日おきに培地交換を行った。その後、Essential 8 培地に交換し、一日おきに培地交換を続けながら、さらに 14 日間培養を続けた。

(結果)

現在、広く用いられている iPS 細胞樹立法は、樹立までに一日おきに行う培地交換や、コロニー（一個の細胞を由来とする細胞集団）の形成を必要とする。そのため、iPS 細胞の樹立には、培養ディッシュの底に接着して増殖する正常線維芽細胞などが用いられる。しかし、本研究で使用するヒト Nalm-6 細胞は血球由来の浮遊細胞であるため、培養ディッシュに接着せずに増殖する。したがって、Nalm-6 細胞から iPS 細胞を樹立するためには、Nalm-6 細胞を培養ディッシュに接着させる必要がある。そこで、本研究ではヒト iPS 細胞の培養方法に着目した。ヒト iPS 細胞の培養方法にはフィーダー細胞を用いるオンフィーダー培養とフィーダー細胞を用いないフィーダーレス（フィーダーフリー）培養がある。iPS 細胞自身は接着細胞であるが培養ディッシュへの接着率は低く、オンフィーダー培養においてはゼラチン溶液を、フィーダーレス培養においてはラミニンやビトロネクチンなどの細胞外マトリックスを主成分とするコーティング剤で予めコートした培養ディッシュを用いる。このコーティング剤は iPS 細胞をフィーダーフリーで樹立する際にも用いられる。もし、iPS 細胞の培養に用いるコーティング剤で Nalm-6 細胞の接着培養が可能になれば、Nalm-6 細胞から iPS 細胞を樹立する上でも都合が良い。そこで、様々な組成のコーティング剤を用いて Nalm-6 細胞を培養ディッシュに接着させることが可能かどうかを調べた。

コーティング剤（Geltrex または VTN-N、CELLStart、0.1% ゼラチン溶液）でコートした培養ディッシュに、ヒト Nalm-6 細胞を様々な密度で播種し、4~14 日間培養した。その後、クリスタルバイオレットで染色し、接着した細胞を可視化した。その結果、Nalm-6 細胞は Geltrex や Vitronectin、ゼラチン溶液でコートした培養ディッシュには接着しなかったが、CELLStart でコートした培養ディッシュには接着できることがわかった。

次に、Nalm-6 細胞の増殖抑制について検討した。iPS 細胞樹立用の遺伝子発現ベクター（Episomal iPSC reprogramming vectors）を用いたヒト正常線維芽細胞からの iPS 細胞樹立効率は約 0.003%であり、ほとんどの細胞は iPS 細胞にならずに接触阻害により増殖を停止する。一方、正常線維芽細胞が iPS 細胞に変化すると、無限増殖能を獲得し盛んに増殖する。このような細胞増殖の違いにより、樹立効率が低くても、線維芽細胞が混在する培養ディッシュ中において iPS 細胞のみを増殖させ、単離することができる。しかし、Nalm-6 細胞はがん細胞であるため無限増殖能を有している。このため、ベクター導入後、iPS 細胞と

ならなかった細胞も増殖を続けてしまい、樹立した iPS 細胞を単離できない可能性がある。一般に、細胞の増殖には MAP キナーゼなどのタンパク質が関与している。また、これらのタンパク質の活性阻害剤は iPS 細胞の樹立効率を促進することが知られている。そのため、これらの増殖阻害剤による Nalm-6 細胞の増殖抑制できれば、iPS 細胞を樹立する上で都合がよい。そこで、MAP キナーゼや GSK-3 β 、ALK に対する阻害剤を単独もしくは混合した培地中で Nalm-6 細胞を培養し、その増殖能を調べたところ、いずれの阻害剤も Nalm-6 細胞の増殖を抑制すること、特に GSK-3 β 阻害剤が高い増殖抑制効果を示すことがわかった。

そこで、エピソーマル iPSC リプログラミングベクターをエレクトロポレーション法により導入した Nalm-6 細胞を、CELLStart でコートした培養ディッシュ上で培養し、iPS 細胞の樹立を試みた。しかし、Nalm-6 細胞を培養シャーレに接着させることはできたものの増殖はみられず、培地交換を重ねるごとに細胞数はむしろ減少した。これは、N2B27 培地に添加した増殖阻害剤が Nalm-6 細胞の増殖を強く抑制したことが原因であると考え、エピソーマル iPSC リプログラミングベクター導入後、阻害剤を含む N2B27 培地に交換するまでの培養時間を 24 時間から 48 時間に延長したところ、阻害剤を含む N2B27 培地においてもわずかながら Nalm-6 細胞の増殖を確認することができた。しかし、阻害剤を含まない Essential 8 培地に交換すると、増殖抑制が解除され Nalm-6 細胞は再び増殖した。正常線維芽細胞を用いて iPS 細胞を樹立する場合、N2B27 培地で培養を開始した後 7~14 日の間に小型細胞、すなわち iPS 細胞が出現し、Essential 8 培地への培地変更後にコロニー形成を確認できる。しかし、iPS 細胞樹立用の遺伝子発現ベクターを導入した Nalm-6 細胞において、小型細胞の出現を確認することはできず、多能性幹細胞のマーカーであるアルカリホスファターゼの発現も確認できなかった (図)。

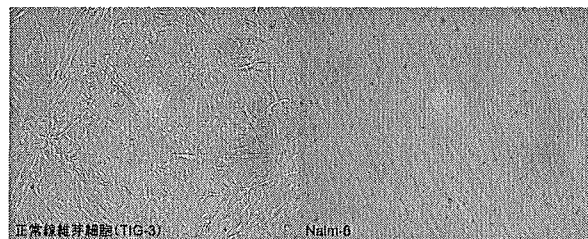


図. エピソーマル iPSC リプログラミングベクター導入による細胞形態の変化

エピソーマル iPSC リプログラミングベクターを導入し、N2B27 培地で培養を開始して 10 日目のヒト正常線維芽細胞 (TIG-3 : 左) および Nalm-6 細胞 (右)。TIG-3 細胞では小型細胞 (iPS 細胞) が出現するが、Nalm-6 細胞では形態の異なる細胞は出現しなかった。

(成果・考察)

ゲノム安定性維持に関わる遺伝子の異常は神経細胞や血球細胞の分化や働きに影響をもたらすことがある。代表的な例として、Artemis をコードする *DCLRE1C* 遺伝子の異常を原因とする重症複合型免疫不全症 (リンパ球の発達不全) や *ATM* 遺伝子の異常を原因とする毛細血管拡張性運動失調症 (神経系の異常および免疫不全) などが挙げられる (表)。しかし、ゲノム安定性維持に関わる個々の遺伝子が、ヒトの神経細胞や血球細胞の分化においてどのように働いているかの詳細については明らかになっていない。私の所属する研究室では、ヒ

ト Nalm-6 細胞を用いて多数の遺伝子破壊株の作製に成功している。しかし、プレ B リンパ球由来である Nalm-6 細胞では、T リンパ球など他の血球細胞やプレ B 細胞よりも前の分化ステージにおける遺伝子機能解析することはできない。また、神経細胞の分化にお

表: ゲノム安定性維持に関わる遺伝子の異常を原因とする疾患と神経細胞および血液細胞への影響の有無

原因遺伝子	疾患名	神経細胞	血液細胞
<i>DCLRE1C</i>	放射線感受性型重症複合型免疫不全	×	○
<i>LIG4</i>	放射線感受性型重症複合型免疫不全症、 LIG4症候群	○	○
<i>XLFI</i> / <i>CERNUNNOS</i>	複合型免疫不全症	○	○
<i>ATM</i>	毛細血管拡張性運動失調症	○	○
<i>ATR</i>	セッケル症候群	○	×
<i>MRE11</i>	毛細血管拡張性運動失調症様疾患	○	○
<i>NBS1</i>	ナイミーヘン症候群	○	○
<i>BLM</i>	ブルーム症候群	○	○

ける遺伝子の役割を明らかにすることは不可能である。そこで、ヒト Nalm-6 細胞および Nalm-6 細胞より作製した遺伝子破壊株から iPS 細胞を樹立し、神経細胞や血球細胞への分化過程におけるゲノム安定性維持の役割を調べることを目指し、本研究に着手した。

線維芽細胞をはじめとする正常なヒト体細胞を用いた iPS 細胞樹立法は確立されているが、Nalm-6 細胞のような血球細胞由来の浮遊系がん細胞を用いた iPS 細胞の樹立方法は確立されていない。本研究ではまず、Nalm-6 細胞からの iPS 細胞の樹立を目指し、(1)Nalm-6 細胞の培養ディッシュへの接着、および(2)Nalm-6 細胞の増殖抑制のための方法を検討し、好条件を見いだすことに成功した。しかし、正常線維芽細胞とは異なり、Nalm-6 細胞にエピソーマル iPSC リプログラミングベクターを導入しても形態的变化や多能性幹細胞マーカーであるアルカリホスファターゼの発現を確認できなかった。Nalm-6 細胞の接着培養に用いたコーティング剤 (CELLStart) は、Nalm-6 細胞と既製のヒト iPS 細胞の両方に使用可能であり、それ自身は Nalm-6 細胞の増殖には影響を及ぼさない。また、Nalm-6 細胞の増殖抑制に用いた阻害剤はヒト iPS 細胞の樹立効率の促進剤として広く用いられている。そのため、本研究で用いたコーティング剤や阻害剤が iPS 細胞の樹立に至らなかった直接の原因であるとは考えにくい。したがって、Nalm-6 細胞を用いた iPS 細胞の樹立には、細胞増殖の抑制や山中因子の過剰発現に加え、さらなる操作が必要である可能性が示唆される。その候補として、細胞種特異的に発現する転写因子をコードする遺伝子の発現抑制が挙げられる。興味深いことに、マウス成熟 B 細胞から iPS 細胞を樹立する際には、B 細胞特異的転写因子 Pax5 の発現抑制が重要であることが報告されている (Hanna et al. Cell (2008) 133:250-264)。Nalm-6 細胞はプレ B 細胞に由来するため、プレ B 細胞特異的に発現する遺伝子、特に転写因子をコードする遺伝子、の発現抑制が iPS 細胞の樹立の要となるかもしれない。今後は、Nalm-6 細胞を用いた iPS 細胞の樹立法をさらに検討し、遺伝子改変ヒト iPS 細胞ライブラリーの構築を目指したいと考えている。

(謝辞)

本研究は、公益財団法人横浜学術教育振興財団の助成を受けて行われました。また本研究の遂行にあたり、ご教示をいただきました横浜市立大学 足立典隆教授に感謝申し上げます。

在宅終末期がん療養者の家族介護者における QOLの実態と関連要因の検討

横浜市立大学医学部看護学科 地域看護学領域
助教 宮崎 絵梨子

I. 緒言

がんは、1981年よりわが国の死因順位第1位であり、2012年には年間36万人がなくなり、3人に1人ががんにより死亡している¹⁾。がんは加齢に伴い発症リスクが高まること、今後も人口の高齢化が進行することを踏まえると、がんによる死亡者数は一貫して増加していくことが推測される。わが国のがん対策は、がん対策基本法に基づき策定された「がん対策推進基本計画」において、「すべてのがん患者及びその家族の苦痛の軽減並びに療養生活の質の向上」が目標に掲げられ、住み慣れた家庭や地域での療養を可能にする在宅療養が推進されている。実際に、国民の終末期療養に対するニーズも高まっており、一般住民およびがんにより死亡した遺族の半数以上が、がんになった際の終末期療養と死亡の場所に自宅を希望していることが明らかとなっている²⁻³⁾。また、終末期がん療養者にとって自宅での死亡は病院での死亡と比較して、より望ましい死であることも報告されている⁴⁾。しかしながら、実際のわが国のがんによる自宅での死亡割合は8.9%であり、1割に満たない現状が続いている⁵⁾。この背景の1つには、家族介護者に生じる課題が在宅療養の継続を困難にしていることが指摘される。在宅終末期がん療養者への介護の役割には、ADLの介助、医療処置の実施、情緒的支援などがあり、それらの役割は、介護者の心身の健康の低下、社会的役割との葛藤、活動の制限など様々な課題を生じることとなる⁶⁾。これらの課題は身体的、精神的、社会的など、多面的なWell-beingからなる生活の質を脅かし⁷⁾、ひいては、在宅における質の高い終末期療養の継続、ならびに看取り後も続く家族介護者自身の健康と生活に影響を与えると考えられる。すなわち、質の高い在宅療養の継続、家族介護者の生活ならびに看取り後も続く人生を支えるためには、生活全体を多面的にとらえるQOL支援が重要である。

そこで本研究は、在宅終末期がん療養者の家族介護者（以下、家族介護者）におけるQOLとその関連要因を明らかにし、在宅終末期がん療養者の家族介護者におけるQOL向上のための支援を検討することを目的とした。

II. 用語の操作的定義

本研究における家族介護者のQOLとは、「がん患者の家族介護者における心理的負担感、介護肯定感、経済的負担感、日常生活への支障における生活の質」と定義する。

III. 研究方法

1. 対象

研究対象者は、在宅療養支援診療所もしくは訪問看護ステーションを利用する在宅終末期がん療養者の家族介護者のうち、次の選定基準で同意の得られる者である。1) 進行がんの診断を受け余命6か月以内、20歳以上である療養者の家族介護者であり、2) 療養者と同居しており、3) 年齢は20歳以上であること、4) 身体的・精神的に研究への参加が可能であると協力機関により判断された者とする。

2. 方法

疫学研究であり、郵送法による無記名自記式質問紙調査を用いた。

3. 調査項目

家族介護者のQOL（Caregiver Quality of Life Index-Cancer（CQOLC）日本語版⁹⁾、療養者要因として人口統計学的特性（性別、年齢等）、疾患関連要因（診断、症状等）、家族介護者要因として人口統計学的特性（性別、年齢等）、健康状態（疾患の有無、抑うつ（K6⁹⁾）、在宅終末期がん療養者の家族介護における自己効力感、環境要因としてサービス利用の種類と頻度、ソーシャルサポート（日本語版ソーシャルサポート尺度¹⁰⁾）、在宅ケアサービスに対する満足度（FAMCARE Scale日本語版¹¹⁾）等である。

4. 分析方法

家族介護者のQOLと各変数間の相関を分析した上で、家族介護者のQOLを従属変数とした重回帰分析（変数減少法）を実施した。解析はSPSS 22.0 for Windowsを使用し、有意水準は、5%未満と設定した。

5. 倫理的配慮

自由意思による参加同意の得た者を対象に調査を行い、個人情報の保護に留意した。なお、本研究は横浜市立大学医学研究倫理委員会の承認を得て実施した。（承認番号：A130725017）

IV. 結果

調査対象者262名のうち、回答者数は86名（回答率32.8%）であり、そのうち60名（有効回答率69.8%）を分析対象とした。

1. 記述統計

1) 療養者要因

療養者の平均年齢は、 77.2 ± 9.8 歳、男性が55.9%であった。がんの部位は肺がんが36.7%と最も多く、症状は98.3%に見られた。ADLの介助は84.2%の療養者に必要であった。在宅療養の希望では、療養者と家族介護者双方の希望であることが49.2%と最も多くなっていた。

2) 家族介護者要因

家族介護者の平均年齢は 63.6 ± 12.3 歳、女性が80%であった。療養者との関係は、妻であることが37.3%と最も多く、居住形態では夫婦のみ世帯が40%で最も多くなっていた。健康状態について、何らかの慢性疾患を有する者は70%、抑うつの有無では、61.7%が抑うつ状態であった。在宅終末期がん療養者の家族介護における自己効力感得点は平均 22.6 ± 4.3 点であった。

3) 環境要因

手段的サポートでは、副介護者がいる者は60%、往診医の利用は78.3%、訪問介護の利用は26.7%であった。情緒的サポートであるソーシャルサポート総得点は 5.3 ± 1.2 点であった。情報的サポートでは、利用可能な地域の資源やサービスについて獲得できていると答えたものは、療養者に関する情報については68.4%、家族介護者については54.4%であった。在宅ケアサービスに対する満足度は 71.1 ± 13.5 点であった。

4) 家族介護者のQOL

家族介護者のQOL総得点は 77.4 ± 16.7 点、下位尺度である心理的負担感は 28.2 ± 8.5 点、

介護肯定感は 19.5 ± 4.3 点、経済的負担感は 11.9 ± 4.1 点、日常生活への支障は 17.8 ± 4.9 点であった。

2. 家族介護者のQOL得点と各要因の相関分析

相関分析において、家族介護者のQOLと各要因間の相関は、療養者要因では、年齢 ($r = 0.290$, $p < 0.05$)、性別 ($r = 0.293$, $p < 0.05$)、家族介護者の在宅療養の希望 ($r = 0.257$, $p < 0.05$) と正の相関がみられた。家族介護者要因では、経済状態 ($r = 0.541$, $p < 0.001$)、在宅終末期がん療養者の家族介護における自己効力感 ($r = 0.699$, $p < 0.001$) と正の相関が見られ、抑うつ ($r = -0.621$, $p < 0.001$) と負の相関が見られた。環境要因では、副介護者の有無 ($r = 0.546$, $p < 0.001$)、ソーシャルサポート総得点 ($r = 0.569$, $p < 0.001$) ならびに下位項目である家族 ($r = 0.493$, $p < 0.001$)、大切な人 ($r = 0.484$, $p < 0.001$)、友達 ($r = 0.443$, $p < 0.001$)、療養者における情報の獲得度 ($r = 0.413$, $p < 0.01$) ならびに家族介護者における情報の獲得度 ($r = 0.332$, $p < 0.05$)、在宅ケアサービスに対する満足度 ($r = 0.508$, $p < 0.001$) と正の相関が見られた。

3. 家族介護者のQOL得点と各要因の重回帰分析

家族介護者のQOLを従属変数とし、単相関において有意な関連が見られた変数を投入し、変数減少法による分析を行った。変数間の多重共線性を考慮し、重回帰分析に投入した変数は、調整変数として、療養者の年齢、介護者の年齢、介護者の性別、経済状態である。有意な関連が見られた変数のうち、家族介護者要因より、抑うつの有無、在宅終末期がん療養者の家族介護における自己効力感を、環境要因より副介護者の有無、ソーシャルサポート総得点、療養者ならびに家族介護者に関する情報の獲得度、在宅ケアサービスに対する満足度を独立変数とした。その結果、家族介護者のQOLと有意に関連したのは、家族介護者要因より、経済状態 ($\beta = 0.215$, $p < 0.01$)、抑うつ ($\beta = -0.423$, $p < 0.001$)、在宅終末期がん療養者の家族介護における自己効力感 ($\beta = 0.247$, $p < 0.01$)、環境要因より副介護者の有無 ($\beta = 0.238$, $p < 0.01$)、在宅ケアサービスに対する満足度 ($\beta = 0.168$, $p < 0.05$) であった。すなわち、QOLの高い者ほど、経済状態が良く、抑うつ状態ではなく、在宅終末期がん療養者の家族介護における自己効力感が高く、副介護者がおり、在宅ケアサービスに対する満足度が高いことが示された。

V. 考察

本研究は、わが国で初めて在宅終末期がん療養者の家族介護者におけるQOLとその関連要因を検討したものである。

QOLの高い家族介護者は、家族介護者要因では、経済状態が良く、抑うつ状態ではなく、在宅終末期がん療養者の家族介護における自己効力感が高く、また環境要因では、副介護者がおり、在宅ケアサービスに対する満足度が高いことが示された。まず、家族介護者要因において、抑うつ状態の介護者は、苦痛や不安、介護負担をより感じやすく、これらの否定的な感情が介護者の健康や日常生活に影響を与え、QOLの低さに関連したと考えられる。自己効力感が高い介護者は否定的な感情を減少させ、肯定的な感情を増加させることが報告されている。療養者への介護をしながら、自身の生活（健康管理、役割の調整）をより良く遂行できること、さらには介護に対する自信をもちながらの介護の継続により達成感や満足感が生じたと考えられる。よって、介護における自信が苦悩などの否定的感情を緩和させ、自身に対する肯定的な感情がQOLの高さに関連したと考える。

次いで、環境要因において、副介護者の存在は健康や日常生活への影響に関連し、より良

い精神的健康に関連することから、手段的サポートとして主介護者自身の生活や休息などを可能にし、情緒的サポートとして介護に関する苦悩や不安に共感することで否定的な影響を緩和し、QOLの高さに関連したと考えられる。そして、在宅ケアサービスに対する満足度では、ケアの質が介護満足感に関連し、療養者の満たされないニーズは介護者の高いストレスに関連することより、往診医や訪問看護師のケアが療養者の症状を緩和し、家族介護者への精神的ケアにより、否定的な影響を緩和し、QOLの高さに関連したことが考えられる。

以上を踏まえ、今後は、在宅終末期がん療養者と家族介護者にとって質の高い在宅療養の継続ならびに家族介護者のQOL向上を達成するために、家族介護者個々の能力を高めるための介入と、家族介護者を支える在宅ケアシステムの開発が必要であることが示唆された。

謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援いただきました横浜学術教育振興財団に心より御礼申し上げます。また、ご協力をいただきました家族介護者の皆様ならびに在宅療養支援診療所、訪問看護ステーションスタッフの皆様心より御礼申し上げます。さらに、研究計画から論文作成の全ての過程において、詳細かつ徹底したご指導およびご高配を賜りました指導教員の田高悦子教授に深謝いたします。論文作成にあたり、ご指導下さいました副指導教員の臺有桂准教授ならびに地域看護学教室の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 国民衛生の動向,2013/2014;60(9):56-66.
- 2) Sanjo M, Miyashita M et.al. Preferences regarding end-of-life cancer care and associations with good-death concepts: a population-based survey in Japan. *Annals of Oncology* 2007;18:1539-1547.
- 3) Choi J, Miyashita M, Hirai K, Sato K et al. Preference of place for end-of-life cancer care and death among bereaved Japanese families who experienced home hospice care and death of a loved one. *Support Care Cancer* 2010;18:1445-1453.
- 4) Yao CA, Hu WY, Lai YF, et al. Does Dying at Home Influence the Good Death of Terminal Cancer Patients? *Journal of Pain and Symptom Management* 2007;34(5):497-504.
- 5) 厚生労働省,人口動態調査,死亡の場所別にみた主な死因の性・年次別死亡数及び百分率,2012
http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/GL08020103.do?_toGL08020103_&listID=000001108739&requestSender=dsearch 引用 2013 年 11 月 26 日
- 6) Given BA, Given CW, Kozachik S. Family support on advanced cancer. *CA Cancer J Clin* 2001;51:213-231.
- 7) Kim Y, Given BA. Quality of Life of Family Caregivers of Cancer Survivors Across the Trajectory of the illness. *Cancer Supplement* 2008;112(11):2556-2568.
- 8) 安藤早希,原田真理子, Weitzner MA ら. Caregiver Quality of Life Index-Cancer (CQOLC)日本語版の信頼性・妥当性の検証. *Palliative Care Research* 2013;8(2):286-92.
- 9) Furukawa TA, Kawakami N, Saitoh M, et al. The performance of the Japanese version of the K6 and K10 in the World Mental Health Survey Japan. *Int J Methods Psychiar Res* 2008;17(3):152-158.
- 10) 岩佐一, 榎藤恭之ら. 日本語版「ソーシャルサポート尺度」の信頼性ならびに妥当性・中高年を対象とした検討. *厚生の指標* 2007;54(6):26-33.
- 11) 研究代表者 下妻晃二郎, 他職種関与による適切な在宅緩和ケアシステムの開発. 2006-2007年度 科学研究費補助金 基礎研究 (c) 研究成果報告書 2008年5月

骨格筋における新規 cAMP 活性化因子 Epac の生理機能の解明

鶴見大学歯学部 講師
大貫 芳樹

(研究目的)

βアドレナリン受容体 (β-AR) シグナル伝達経路は、種々の細胞、組織において、様々な生理機能に関与することが報告されている (Nature. 15, 206-212, 2002; Circ Res. 109, 231-244, 2011)。しかしながら、骨格筋におけるβ-ARシグナル伝達経路の解析は未だ不十分であり、また、その生理的役割も不明な点が多い。特に、骨格筋の主要なサブタイプであるβ₂-ARへの慢性刺激が筋肥大および速筋化 (短縮縮速が速く、易疲労性の筋線維タイプへ変化すること) を誘発することは以前から報告されているが、その分子レベルでの作用機序 (シグナル伝達経路) は一定のコンセンサスを得るまでには至っていない (Physiol Rev. 88, 729-767, 2008; Am J Physiol Endocrinol Metab. 303, E1-17, 2012)。

一方、β-ARシグナル伝達経路の主要な構成成分である アデニル酸シクラーゼ (AC) により産生されるセカンドメッセンジャーcyclic AMP (cAMP) で活性化される因子として、protein kinase A (PKA) がよく知られているが、PKA以外にEpac (exchange protein activated by cAMP) と呼ばれる新規cAMP活性化因子が最近報告された (Nature 396, 474-477, 1998; Science 282, 2275-2279, 1998)。Epacには2種類のアイソフォーム (Epac1, Epac2) が存在し、いずれのアイソフォームも低分子量Gタンパク質であるRap1を 非活性型 (GDP結合型) から活性型 (GTP結合型) に変換する作用を持つ。これまでEpacは種々の細胞において分泌、増殖、細胞接着等に関与することが示唆されている (Br J Pharmacol. 159, 265-284, 2010; Pharmacol Rev. 65, 670-709, 2013)。しかしながら、筋組織における役割については、Epac1が心筋肥大作用に関与することがin vitroの実験で報告されているが (Circ Res. 97, 1296-1304, 2005; Circ Res. 102, 959-965, 2008)、骨格筋におけるEpacの役割は不明である (図1)。

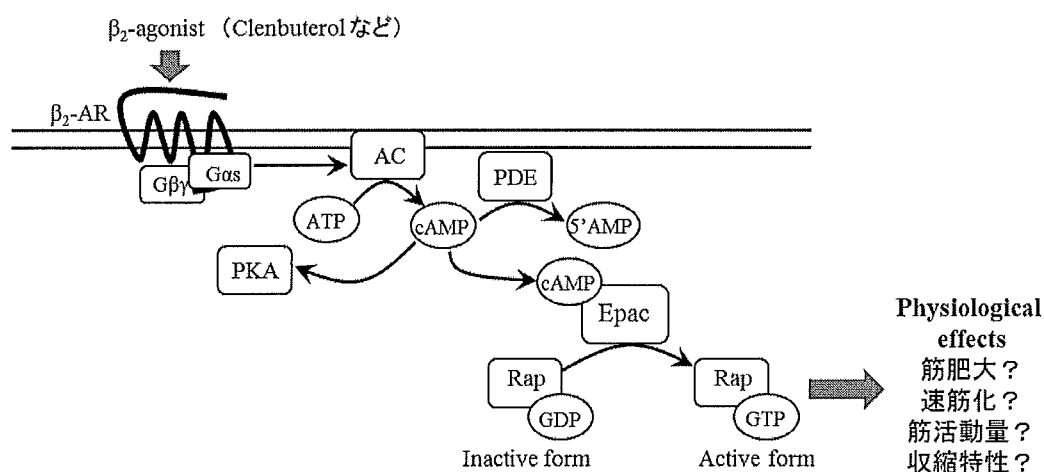


図1、β₂-ARシグナル伝達経路と新規cAMP活性化因子Epac

近年、 β_2 -ARの慢性刺激で誘発される骨格筋肥大にAkt/mTORシグナル伝達経路が重要な役割を果たすことが示唆されている (J Appl Physiol. 102, 740-747, 2007; J Cardiovasc Trans Res. 3, 688-695, 2010)。また、種々の細胞で、Akt/mTOR経路の活性化におけるEpacの重要性が報告されている (Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 377, 345-357, 2008; J Cell Physiol. 227, 3756-3767, 2012)。このことから、我々は「 β_2 -ARの慢性刺激で誘発される筋肥大には、 β_2 -AR/cAMP/Epac/Akt/mTOR経路が重要である」という仮説を立てた。この仮説を検証するため、本研究では、実験動物として既に作製済みであるEpac1遺伝子欠損マウスを用い、 β_2 -AR慢性刺激により誘発される筋肥大に対するEpac1欠損の影響を詳細に解析した。

(研究方法)

鶴見大学動物実験委員会承認番号：25A018 (2013年4月22日)

実験動物として、Wild type マウス (WT) およびEpac1遺伝子欠損マウス (Epac1KO、既に作製済み) を用い、それぞれ対照群とクレンプテロール (CB、 β_2 -AR作動薬) 投与群 (2 mg/kg/day) の2群に分け、計4群 (WT群、WT+CB群、KO群、KO+CB群) とする。3週間飼育後に咬筋、前脛骨筋、ヒラメ筋を摘出し、筋重量を測定した。また、摘出した筋標本を用いて、以下の解析を行った。

- 1) 組織化学的手法にて筋の横断切片を作製し、筋線維の直径および横断面積 (CSA) を解析した。また、ミオシンATPase染色法およびNADH-TR染色法を用いて筋線維タイプを分類し、その構成比を解析した。
- 2) SDS-PAGE法にてミオシン重鎖アイソフォーム (MHC I、IIa、IIb/x、IIb) を分離し、その構成比をデンストメーターを用いて定量的に解析した。
- 3) Epac下流のシグナル伝達経路で骨格筋の表現型に関与する可能性のある因子Akt (protein kinase B), S6K1 (70-kDa ribosomal S6 kinase 1), 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1), GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β), ERK1/2 (extracellular signaling regulated kinase 1/2), CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II), HDAC4 (histone deacetylase 4), NFAT (nuclear factor of activated T cells) のリン酸化レベルをウェスタンブロッティング法にて定量的に解析し、CB投与で活性化されるシグナル伝達経路に対するEpac欠損の影響を調べた。

(結 果)

- 1) CB投与がWTおよびEpac1KOマウスの筋重量と筋線維サイズに与える影響

CB投与により、WTおよびEpac1KOマウスの体重は変化しなかった。一方、CB投与により、WTでは咬筋、前脛骨筋の重量および重量/頸骨が有意に増加したのに対し、Epac1KOでは有意な増加は観察されなかった。同様に、WTでは、CB投与により、咬筋、前脛骨筋の筋線維の直径および横断面積が有意に増加したのに対し、Epac1KOでは有意な増加は観察されなかった。ヒラメ筋では、WTとEpac1KO共に、CB投与により、重量、重量/頸骨、筋線維の直径および横断面積の有意な増加は観察されなかった。これらの結果から、 β_2 -ARの慢性刺激で誘発される咬筋と前脛骨筋の肥大に対し、Epac1が重要な役割を果たすことが示唆される。

2) CB投与がWTおよびEpac1KOマウスの筋線維タイプに与える影響

筋の横断切片のミオシンATPase染色およびNADH-TR染色を用いて筋線維タイプを分類し、その構成比を解析した結果、咬筋はWTとEpac1KO共に、タイプIID/XとタイプIIBの筋線維で構成されているが、CB投与により、WTとEpac1KO共にタイプIID/Xの減少とタイプIIBの増加を伴う速筋化が観察された。また、SDS-PAGE法にてミオシン重鎖アイソフォーム（MHC I、IIa、IIc/x、IIB）を分離し、その構成比を定量的に解析した結果、組織化学の結果と同様に、咬筋はWTとEpac1KO共に、MHC IIc/xとIIBで構成されているが、CB投与により、WTとEpac1KO共にIIc/xの減少とIIBの増加を伴う速筋化が観察された。一方、WTとEpac1KO共に、前脛骨筋はMHC IIc/xとIIB、ヒラメ筋はMHC I、IIa、IIc/xおよびIIBで構成されているが、CB投与により、それらの構成比に有意な変化は観察されなかった。これらの結果は、Epac1が β_2 -ARの慢性刺激で誘発される咬筋の速筋化に関与しないことを示唆する。

3) CB投与がWTおよびEpac1KOマウスのAktシグナル伝達経路に与える影響

咬筋において、骨格筋肥大に関与することが示唆されているAktシグナル伝達経路の活性化を調べるため、Aktおよびその下流のシグナル因子S6K1、4E-BP-1、GSK-3 β のリン酸化レベルをウエスタンブロッティング法にて定量的に解析した結果、CB投与により、WTではこれらの因子のリン酸化レベルが有意に増加したのに対し、Epac1KOでは有意な増加は観察されなかった。これらの結果は、 β_2 -ARの慢性刺激がEpac1を介してAktシグナル伝達経路を活性化し、咬筋の肥大を誘発することを示唆する。

4) CB投与がWTおよびEpac1KOマウスのERK1/2シグナル伝達経路に与える影響

咬筋において、ERK1/2のリン酸化レベルをウエスタンブロッティング法にて定量的に解析した結果、CB投与により、WTではリン酸化レベルに有意な変化は見られなかったが、Epac1KOでは有意な増加が観察された。これらの結果は、 β_2 -ARの慢性刺激がEpac1を介して筋肥大に対する抑制因子であるERK1/2シグナル伝達経路を不活性化し、咬筋の肥大を誘発することを示唆する。

5) CB投与がWTおよびEpac1KOマウスのCaMKII/HDAC4シグナル伝達経路に与える影響

咬筋において、CaMKIIおよびその標的シグナル因子HDAC4のリン酸化レベルをウエスタンブロッティング法にて定量的に解析した結果、CB投与により、WTではこれらの因子のリン酸化レベルが有意に増加したのに対し、Epac1KOでは有意な増加は観察されなかった。これらの結果は、 β_2 -ARの慢性刺激がEpac1を介して筋肥大に対する抑制経路であるCaMKII/HDAC4シグナル伝達経路を活性化し、咬筋の肥大を誘発することを示唆する。

6) CB投与がWTおよびEpac1KOマウスのNFATシグナル伝達経路に与える影響

咬筋において、NFATc1およびNFATc3のリン酸化レベルをウエスタンブロッティング法にて定量的に解析した結果、CB投与により、WTとEpac1KO共に、これらのリン酸化レベルに有意な変化は観察されなかった。これらの結果は、NFATシグナル伝達経路が β_2 -ARの慢性刺激により誘発される咬筋の肥大に関与しないことを示唆する。

（成果・考察） 等

今回我々は、Epac1KOマウスを用いたin vivoにおける研究によって初めて、 β_2 -ARの慢性刺激で誘発される骨格筋（咬筋、前脛骨筋）の肥大に対し、Epac1が重要な役割を果たすことを示唆する結果を示した。一方、Epac1が β_2 -ARの慢性刺激で誘発される咬筋の速筋化には

関与しないことも示唆された。また、Epac下流のシグナル伝達経路で骨格筋の表現型に関与する可能性のある因子のリン酸化レベルをウェスタンブロッティング法にて定量的に解析し、CB投与で活性化されるシグナル伝達経路に対するEpac欠損の影響を調べた結果、 β_2 -ARの慢性刺激は、Epac1を介してAktおよびCaMKIIシグナル伝達経路を活性化し、咬筋の肥大を誘発することが示唆された。

これまでに我々は実験動物としてラットを用い、喘息の治療薬として処方されるクレンプテロール (CB、 β_2 -AR作動薬) の慢性投与が咬筋の肥大および速筋化を誘発することを明らかにした (Arai C, Ohnuki Y, Umeki D et al. *J Physiol Sci.* 56, 205-209, 2006)。また、心筋の β_1 -ARへの慢性刺激で通常観察されるようなリモデリング (線維化、アポトーシス、炎症細胞浸潤) (*Cardiovasc Res.* 37, 115-122, 1998) はみられず、筋線維の肥大以外は正常構造を維持していた。さらに、テレメトリーシステムによる筋電図記録を用いて自由行動下におけるラットの咀嚼筋の筋活動量を定量的に解析した結果、CBの慢性投与により咬筋のdaily duty time (1日あたりの筋活動時間) が増加すること (生理機能が亢進すること) も明らかにした (Ohnuki Y, Umeki D et al. *J Pharmacol Sci.* 123, 36-46, 2013)。以上の結果から、CBは筋萎縮症の治療薬としての可能性を持つことが示唆される。しかしながら、その効果や有用性の評価・検討はまだ不十分であり、またその作用機序は不明な点が多い。

高齢化社会を迎えて、骨格筋の加齢性および廃用性萎縮に伴う運動機能障害患者は近年増加傾向にある。筋の萎縮、筋力の低下により自立した生活を営むことが困難となることから、筋萎縮症の有効な予防・治療法の開発は、健康寿命の延長やQOL (Quality of Life) 向上の観点からも極めて重要な課題である。現在、リハビリテーションや栄養療法による治療が主流であるが、十分な効果が得られるまで長期間を要することや効果に個人差もあるため、筋萎縮の抑制・改善に直結する積極的な治療法を確立する必要がある。今回、Epac1KOマウスを用いたin vivoにおける研究によって初めて、 β_2 -AR作動薬が、Epac1を介してAktおよびCaMKIIシグナル伝達経路を活性化し、骨格筋 (咬筋) の肥大を誘発することが示唆された。このことから、本研究の結果は、副作用の可能性のある β_2 -AR作動薬だけでなく、Epac1、Akt、CaMKIIなどの β_2 -ARシグナル伝達経路における様々な因子をターゲットとした筋萎縮症の有用な治療法の開発に非常に役立つものと思われる。

新規内因性軸索伸長促進因子 LOTUS の

脳虚血における生体応答解析

横浜市立大学大学院医学研究科 博士課程 4 年

高瀬 創

(研究目的)

中枢神経の再生は、長きにわたり不可能とされてきた。しかし近年、神経栄養因子、軸索伸長阻害因子、各種幹細胞系に関する研究が大きな進歩をみせ、再生医療技術の開発の可能性が示されつつあり、社会的関心も高い研究分野となっている。その中で、研究分担者の竹居らは、中枢神経系の再生を阻む主要因と考えられている Nogo 受容体 (NgR) に拮抗作用を示す、新規の内因性蛋白質 LOTUS を発見した。

本研究では、中大脳動脈一過性虚血動物モデルを作製し、LOTUS や Nogo 受容体の虚血負荷後の発現変動を、分子生物学的・生化学的に解析し、LOTUS の補充療法の意義を検証する。LOTUS や NgR の神経損傷後の生体応答を解明することで、将来の LOTUS リコンビナント蛋白や LOTUS 遺伝子導入による神経再生治療への臨床応用に向けた基盤を構築する。

(研究方法)

研究内容：

脳虚血動物モデルを用いて、虚血負荷後の、脳における軸索伸長因子の発現変動を追跡し、虚血に対する同蛋白を介した生体応答を考察する。

研究の進め方：

本研究では、ラットの中大脳動脈閉塞による部分虚血再灌流モデル (Chen et al., 1986) を用いる。動物実験系は、虚血作製手術中のレーザードップラーを用いた血流量低下を確認し、虚血負荷 24 時間後の採取脳の 2%TTC 染色で、虚血巣の安定的な出現との関連を検討し、血流閾値が一定以下になった動物を用いる。虚血効果判定として、虚血負荷前と 1 週後に運動機能検査 (握力測定・Rota-Rod Test・Stair-Case Test) を施行し、一定条件を満たした動物を採用する。偽手術ラットと脳虚血ラットの髄液と大脳半球を採取し、Western Blotting 法を用いて検体中の LOTUS と NgR の発現を解析し、その時間的变化を解明する。特に、虚血側と健常側における細胞体 (大脳皮質) と神経線維 (錐体路) について詳細な解析を行う。

以上より、虚血負荷における中枢神経系の LOTUS 及び NgR の発現変動を明らかにし、脳内局所の発現変動と、その時間的变化について詳細な検討を加えることにより、虚血に対する LOTUS を介する生体応答について考察を行う。

(横浜市立大学医学部臨床研究倫理委員会 承認番号：B120906006 承認日：平成 24 年 10 月 1 日)

(結果)

脳梗塞モデル作製

対象動物は、行動解析に優れるとされる Long-Evans Rat (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) の、雄性、8-9 週齢 ($300 \pm 20\text{g}$) を採用した。虚血モデルは、虚血作製手術後死亡率が低く、かつ、脳への虚血負荷の大きい Chen らのモデル (一側総頸・中大脳動脈永久閉塞、対側総頸動脈 1 時間閉塞) を採用した (Chen, *Stroke*, 1986)。

まず、虚血群と偽手術群において虚血作製前後と虚血負荷中のバイタルサインと動脈血ガス測定を行い、一定

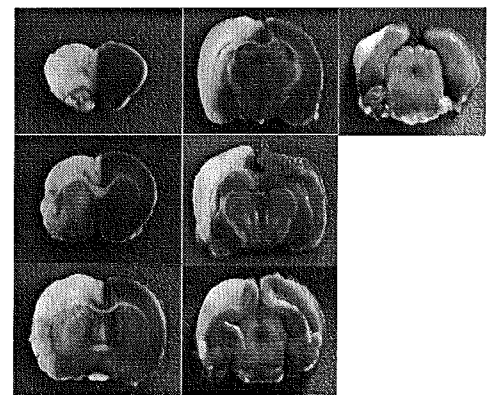


Fig. 1

の手術環境・生体内条件下で虚血負荷が行われていることを確認した (Table 1)。

次に、レーザードップラーを用いて測定した虚血作製前後と術中の脳血流量値と、虚血負荷後48時間後採取脳2mmスライスを2% TTC染色し間接法 (Swanson, *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990) を用いて算出した脳梗塞体積の関係を検討し、安定的な脳虚血巣を作製するための条件を血管閉塞中の脳血流量閾値を閉塞前値の10%以下に設定し、条件を満たした動物のみを採用した (Fig. 1)。虚血効果判定として、虚血負荷前と1週後に運動機能検査 (握力測定・Rota-Rod Test) を施行し (Fig. 2, 3)、一定条件 (握力・Rota-Rod: いずれも手術前基礎値の80%以下) を満たした動物を最終的に採用することとした。

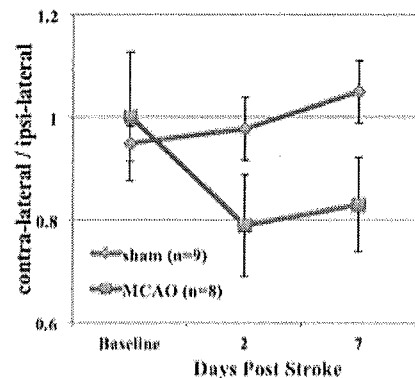


Fig. 2 Grip Strength Test

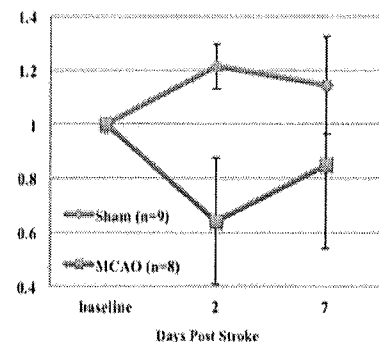


Fig. 3 Accelerating Rota-Rod

Table 1 Physiological parameters in the 60-min. MCAO and Sham op.

	Pre-ischemia		On occlusion		Post-ischemia	
	Sham	MCAO	Sham	MCAO	Sham	MCAO
Rectal Temperature(°C)	36.9 ± 0.13	37.1 ± 0.14	37.0 ± 0.12	37.0 ± 0.18	37.0 ± 0.13	37.1 ± 0.12
MABP (mmHg)	90.0 ± 9.0	93.9 ± 9.1	89.3 ± 9.0	89.9 ± 8.8	86.1 ± 6.6	89.1 ± 8.9
pH	7.39 ± 0.04	7.42 ± 0.03	7.39 ± 0.04	7.41 ± 0.02	7.39 ± 0.02	7.40 ± 0.02
pCO2 (mmHg)	39.3 ± 4.1	40.6 ± 4.9	37.1 ± 4.4	37.8 ± 5.2	37.4 ± 4.4	35.9 ± 4.9
pO2 (mmHg)	81.6 ± 13.8	82.3 ± 13.0	84.6 ± 16.6	80.8 ± 12.4	81.6 ± 14.9	77.4 ± 4.8
HCO3 (mEq/l)	23.6 ± 4.1	25.8 ± 1.9	22.4 ± 2.6	23.3 ± 3.0	22.0 ± 2.9	22.0 ± 3.7
BE (mEq/l)	-0.6 ± 4.2	1.6 ± 1.7	-1.7 ± 2.8	-0.6 ± 2.7	-1.7 ± 2.4	-1.8 ± 3.5

Values are mean ± SD; n=8; MABP mean arterial blood pressure

部位別の虚血脳検体採取

前述の脳虚血実験系において、2mm 冠状断における梗塞領域を slice 毎に測定し、最もばらつきの小さかった slice (Bregma 後方 0-2mm) を同定した。脳虚血手術／偽手術動物をそれぞれ 30 体作製して所定時期（手術後 1, 2, 4, 8, 16 週後, 各 n=6）に sacrifice し、前述の slice における皮質脊髄路 (CST) 近傍の脳実質を、細胞体が主成分の大脳皮質と、線維成分が主体の基底核領域として部位別に採取した (Fig. 4)。

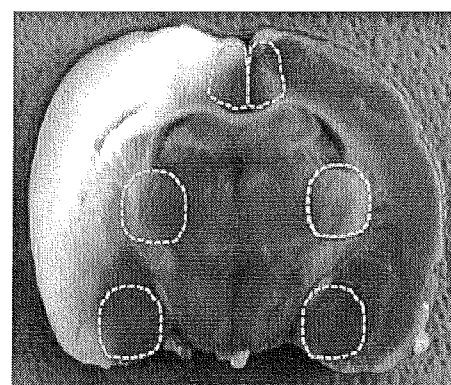


Fig. 4

同様に、梗塞領域のばらつきの小さい slice (Bregma 後方 2-4mm) において、大脳を一塊として採取した。また、それぞれの個体において、sacrifice 前に大槽より髄液を採取した。

蛋白定量：虚血負荷後の LOTUS の時間的空間的発現変動解析

本来、蛋白の空間的な発現変動解析に用いる手法は免疫学的組織染色が望ましいが、現在 LOTUS を含めた NgR 関連分子の免染は確立しておらず、

Western-Blotting (WB) 法を用いることとした。WB 用いる一次抗体は、抗 rat-Crtac1B/LOTUS 抗体が市販されていないため、代用として、種間における LOTUS の sequence homology が高く、先行研究で使用されている抗 mouse 抗体中から反応性の高いものを選択することとした。しかしながら、3 種の抗体において rat

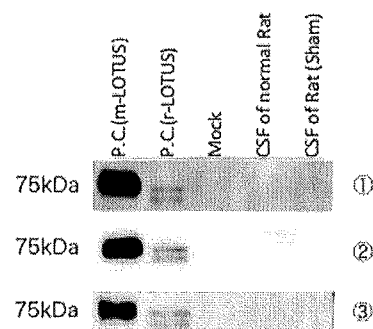


Fig. 5

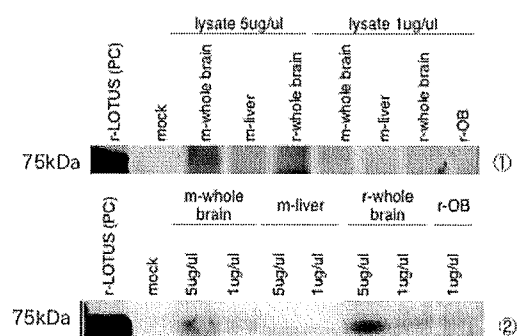


Fig. 6

CSF 中の LOTUS は検出できず (Fig. 5:①② guinea pig, ③ rabbit)、抗 human においても、実際の使用は現実的ではないと考えられた (Fig. 6:① sheep, ②rabbit)。

(考察)

rat-LOTUS に対する mus musculus と human の塩基配列相同性は何れも 95%以上と高く、また、前述二種の抗体が複数種市販されていることから、当初は rat-LOTUS の検出には問題が生じることはないと考えていたが、実際には検出困難であった。その理由としては、以下の二つが仮説として挙げられる。

- ・ 既存の抗体の認識配列が、種に特異的であった
- ・ rat 脳における LOTUS の発現動態が他の二種と異なる (重合体で存在)

後者に関しては、WB にて、時に分子量で二倍

(Fig. 7)・四倍の付近に band を認めることがあり、同バンドが peptide block で消失することから、可能性があると考えられる。同分子が S-S 結合を介さない形で強く結合し、二量体、四量体、それ以上の重合体として存在した場合は、従来の WB プロトコルでは検出できず、サンプルの調整条件や、SDS-PAGE の泳動条件を検討する必要があるかもしれない。

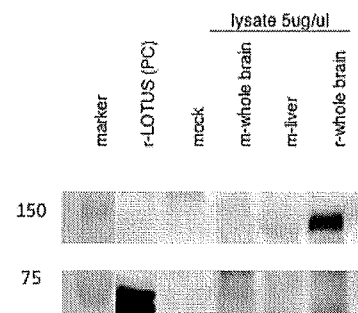


Fig. 7

(成果と課題)

所定の期間においては、動物実験モデルを確立し、実際の脳虚血動物の作製と、目標数の検体サンプリングを達成することができた。一方で、WB において 1 次抗体の問題が生じ、LOTUS と関連蛋白の定量には至らなかった。

今後は、サンプル調整条件や WB プロトコルの見直しを行い、重合体である可能性を検討するとともに、精度の高い抗 rat monoclonal 抗体を用いて (既に外部発注済)、改めて虚血脳における NgR 刺激バランスの解析に取り組む予定である。

都市部在住高齢者の社会関連性の実態と関連要因の検討

横浜市瀬谷区福祉保健センター 高齢・障害支援課
紅林 奈津美

I. 緒言

わが国の高齢化率は、2012 年の 24.1%から、今後 2030 年には 31.6%に達すると予測されているが、その傾向は都市部で顕著である¹⁾。国の推計によれば、2010 年から 2025 年までの 15 年間の後期高齢者の増加数 760 万人のうち、上位 6 都府県は都市部（東京都、神奈川県、大阪府、埼玉県、千葉県、愛知県）であり、その増加数は 373 万人とわが国全体の増加数の半分程度を占める²⁾。

このような中で高齢者の「孤立死」が頻繁に報道されている。孤立死とは、社会から孤立した結果、長時間放置されるような死³⁾である。高齢者の孤立死の直前には社会的孤立が存在すると考えられる。社会的孤立とは、家族や地域社会との交流が著しく乏しい状態⁴⁾である。わけても都市部では生活産業や社会保障などの発達により、高齢者が自立している間は地域との関わりや人間関係が希薄でも生活することが可能である⁵⁾。

高齢者の社会的孤立を巡っては、高齢者全体における孤立の有無（割合）とその関連要因⁶⁾が検討されており、高齢者の生活機能や生命予後との関連があることが縦断研究⁷⁾によって報告されているが、社会的孤立に至る前の自立した健康な高齢者の社会関連性の実態とその関連要因は検討されていない。高齢者は、他の年代に比して⁸⁾社会的孤立のリスクがある。

このような社会背景のなかで、2007 年、厚生労働省の「高齢者等が一人でも安心して暮らせる地域コミュニティづくり」⁹⁾において高齢者の社会的孤立を防ぐためには、高齢者が社会と関わる「社会関連性」をもつこと¹⁰⁾が重要であるとされている。

安梅は、高齢者における社会関連性とは、地域社会の中での人間関係の有無や環境との関わりや頻度など、人間と環境との関わりや量的側面¹¹⁾であるとした。高齢者の社会関連性について一定の先行研究¹⁰⁾¹¹⁾が存在し、自身の健康、地域、友人・知人といった他者への 3 つの関心が関与していることなどが報告されている¹²⁾が、これらの多面的な個人特性を同時に捉え、都市部の高齢者で検証したものは限られている。

また高齢者の社会関連性は、環境との関わり¹³⁾でもあるとされており、なんらかのサポートがある¹³⁾¹⁴⁾といった環境に関連していることが報告されている。国際生活機能分類（International Classification of Functioning, Disability and Health=ICF）¹⁵⁾によると、環境とは人々が生活し、人生を送っている物的な環境や社会的環境、人々の社会的な態度による環境であり、地域で生活する人々と地域環境は直接的、間接的に関連¹⁶⁾している。しかしながら高齢者の社会関連性と地域環境について、都市部のみならず、検討されている先行研究はほとんどみられない。

以上より本研究の目的は、まず都市部に在住する自立高齢者の社会関連性の実態を把握し、それに関連する要因について、高齢者の個人特性と地域環境特性の双方の観点から明らかにし、今後の都市部における高齢者の社会的孤立を予防するための地域看護実践への示唆を得ることである。なお、本研究における都市部とは、人口 200 万人以上の地域とした。

II. 方法

1. 研究デザイン

本研究は、疫学研究（横断研究）である。

2. 対象

本研究の対象者は、A 政令市 B 区老人福祉センターを 2013 年 8 月 6 日～8 月 16 日までの間に利

用している 65 歳以上の男女であり、介護保険における要介護認定を受けていない者とした。

3.調査方法

調査は無記名自記式質問紙調査法で行った。

4.調査項目

調査項目は、基本属性（年齢、性別、世帯状況など）、社会関連性評価、個人特性（抑うつ¹⁷⁾、主観的健康管理能力¹⁸⁾、地域コミットメント¹⁹⁾、高齢者見守り効力感²⁰⁾、地域環境特性（包括的環境要因²¹⁾、健康情報希求行動のための情報源の種類²²⁾、地域の住み心地）である。

5.分析方法

全変数における記述統計を行った。次いで、相関分析により社会関連性指標と各変数との相関係数（Spearman の順位相関係数）を算出した。また各独立変数同士の多重共線性（ $\rho \geq 0.5$ ）を考慮し、社会関連性指標と関連のみられた変数（ $\rho \geq 0.2$ ）を選択し、投入する独立変数を決定した。そして社会関連性指標を従属変数、対象者の基本属性、個人特性、地域環境特性を独立変数とし、変数減少法による重回帰分析を行った。検定は両側検定とし、有意水準は両側 5%未満とした。解析には、統計パッケージ SPSS ver.22.0 for Windows を使用した。

6.倫理的配慮

本研究は、平成 25 年横浜市立大学医学研究倫理審査委員会の承認（A130725016）を得た。

III.結果

調査票配布数は 331 票で、回収数は 308 票（回収率 93.1%）であった。回収した調査票のうち、要介護認定を受けている者、年齢が未記入もしくは 65 歳未満である者、性別が無回答のものを除き、基本属性および従属変数について全て回答があるもの 156 票を有効回答（有効回答率 50.6%）とし分析対象とした。なお、欠損値は分析ごとに除外した。

1.対象者の概要

1) 基本属性（表 1）、社会関連性（表 2）

対象者の平均年齢は 73.0 ± 5.7 歳であり、女性 91 名（58.3%）であった。世帯状況は夫婦のみ世帯が 89 名（57.1%）、一人暮らし 31 名（19.9%）などであった。経済状態は「ゆとりがある」「ややゆとりがある」合わせて 127 名（81.4%）、主観的健康感については「非常に健康だと思う」「まあ健康だと思う」合わせて 139 名（89.1%）、対象者全体の社会関連性指標の平均点は 15.3 ± 2.7 点であった。

2) 個人特性（表 3）

対象者全体の抑うつについて、平均点は、 0.6 ± 1.0 点であり、2 点未満が 126 名（84.6%）、であった。主観的健康管理能力の平均点は、 28.0 ± 5.5 点、地域コミットメント尺度全体の平均点は 15.0 ± 3.9 点であり、下位項目の平均点は、つきあい 7.7 ± 2.5 点、帰属感 7.2 ± 2.3 点であった。地域高齢者見守り自己効力感尺度全体の平均点は 11.5 ± 4.9 点であり、下位項目の平均点は地域ネットワーク 5.9 ± 2.7 点、近隣の見守り 5.6 ± 2.7 点であった。

3) 地域環境特性（表 3）

包括的環境要因全体の平均点は 41.8 ± 7.2 点、下位項目の平均点は安心安全が 18.1 ± 3.3 点、相互交流が 17.6 ± 3.4 点、家族が 6.0 ± 1.5 点であった。住み心地について「とてもよい」「まあまあよい」146 名（95.4%）であり、健康情報希求行動のための情報源は、平均 4.9 ± 1.6 個から情報を得ていた。

2.社会関連性と各要因との関連（単相関分析）

社会関連性指標の合計点と有意な関連がみられた要因は、基本属性では職歴、最終学歴、経済状態、主観的健康感であった。また相関分析において、社会関連性指標の得点と各要因間の相関は、基本属性では経済状態、主観的健康感と正の相関がみられた。個人特性では、抑うつと負の相関がみられ、

主観的健康管理能力、地域コミットメント尺度の合計点、高齢者見守り自己効力感尺度の合計点と正の相関がみられた。地域環境特性では、包括的環境要因の安心安全、相互交流、家族、住み心地、健康情報希求行動のための情報源の種類と正の相関がみられた。

3. 社会関連性の関連要因の検討（重回帰分析）（表 4）

社会関連性指標の合計点を従属変数とした重回帰分析を行った。

高齢者の社会関連性への関連要因としては、年齢が低いこと（ $\beta = -.151$, $p = .021$ ）、主観的健康管理能力が高いこと（ $\beta = .230$, $p = .001$ ）、地域コミットメントが高いこと（ $\beta = .156$, $p = .048$ ）、地域高齢者の見守り効力感が高いこと（ $\beta = .199$, $p = .008$ ）、包括的環境要因における安心安全を強く感じていること（ $\beta = .243$, $p < .001$ ）、健康情報希求行動のための情報源の種類が多いこと（ $\beta = .299$, $p < .001$ ）が有意に関連していた。なお本モデルによる調整済み決定係数は.487であった。

IV. 考察

本研究は都市部在住高齢者の社会関連性の高さには、年齢が低いこと、主観的管理能力、地域コミットメント、高齢者見守り効力感が高いこと、包括的環境要因における安心安全があると感じていること、健康情報希求行動の情報源の種類が多いことが有意に関連していることが明らかになった。

主観的健康管理能力については、高齢者が自身の身体の変化を認識し、自らの身体状態にあった健康行動²³⁾をとり、心身の健康を管理していくことで、疾病や障害はもとより外出のための心身の機能を保つなど、社会関連性の資本となる生活機能を維持することができるため、社会関連性が高まると考える。地域コミットメントについては、地域社会への関心や愛着といった社会への心理的な感覚¹⁹⁾であり、地域社会に住む人々の間の相互関係に焦点を当てている¹⁹⁾。すなわち高齢者が地域への関心や愛着をもっていることは、近所の人に声をかけたり、あいさつ等の活動を積極的にを行い、地域での人付き合いや活動に肯定的な感情をもっていることが考えられるため、社会関連性が高まると考えられる。高齢者見守り自己効力感については、高齢者見守り自己効力感があると感じている者は日頃から自分以外の他者への関心をもっていること²⁴⁾で、地域に住んでいる人々へ積極的に目を向けたり、地域の中での役割を担ったりすることができる。ゆえに社会関連性と関連すると考えられる。

次いで包括的環境要因における安心安全環境について、安心安全環境があると感じている者は健康であり²⁵⁾、健康で精神的に安心して暮らせる場所があることを意味している。これは社会関連性を持つための前提となる環境が整っており、社会関連性をもちやすい環境であると考えられる。健康情報希求行動のための情報源の種類については、高齢者は自身の健康の維持・向上のため、積極的に情報を入手するとともにその情報を入手するための様々な活動を通して社会関連性を高めると考えられる。

これらを踏まえ、高齢者の社会的孤立予防の一助として社会関連性を高めるには、健康への関心を高めるための支援としては、高齢者が自らの身体や心身の状態を適切に把握するとともに、それらに応じたライフスタイルの確立を行えるための支援を行っていくこと、地域への関心を持てるための支援として、地域の中に高齢者が気軽に集まれる場所をつくることと有用であると考えられる。また高齢者が安心して生活を送れるための地域づくりも重要である。安心安全への支援としては、セーフティプロモーションを意識した地域づくりをすることや、高齢者への情報提供を様々な方法で行うこと、高齢者自身が情報を獲得するための支援を行っていくことも有用であると考えられる。

以上のことから、高齢者の社会関連性が高まることによって、地域、社会、人とのつながり、さらに地域環境を通しての地域、社会とのつながりをもつこととなり、高齢者の社会関連性が高まり、ひいては高齢者の社会的孤立予防の一助となりうる。

なお本研究は横断研究であり、因果関係を結論づけることはできない。また調査対象はA政令市B区老人福祉センター1施設の利用者のため、一般化には限界がある。

また本研究は、公益財団法人横浜学術教育振興財団の助成を受けて行われた。

VII.引用文献

1. 厚生労働統計協会. 厚生 の 指標 国民衛生の動向. 2013 ; 60(9) : 44-46
2. 厚生労働省. 都市部の高齢化対策に関する検討会報告書について <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/0000024314.html> (2013 年 12 月 28 日アクセス可能)
3. 厚生労働省. 高齢者等が一人でも安心して暮らせるコミュニティづくり 推進会議(「孤立死」ゼロを目指して) 報告書. <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/03/h0328-8.html> (2012 年 12 月 24 日アクセス可能)
4. 内閣府. 平成 22 年版高齢社会白書. http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2010/zenbun/22pdf_index.html (2013 年 12 月 26 日アクセス可能)
5. Nicholas R. A Review of Social Isolation: A Important but Underassessed Condition in Older Adults. *J Primary Prevent* 2012; 33: 137-152
6. 斉藤雅茂, 近藤尚己, 近藤克則, 他. 高齢者の社会的孤立とその後の要介護・死亡との関連—AGES プロジェクト 4 年間の追跡研究—. *老年社会科学* 2010 ; 第 32 卷, 第 2 号 : 167
7. Jürschik P, Nunin C, Botigué T, et al. Prevalence of frailty and factors associated with frailty in the elderly population of Lleida, Spain: the FRALLE survey. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2012; 55(3): 625-631
8. 渋井優, 村山洋史, 河島貴子, 他. 都市部高齢者における閉じこもり予備群の類型化 介護予防対策の具体化に向けて. *日本公衆衛生雑誌* 2011 ; 58(11) : 935-947
9. 安梅勲江. 高齢者の社会関連性評価と 3 年後の機能低下との関連性に関する保健福祉学的研究. *日本公衆衛生雑誌* 1997 ; 44(3) : 159-166
10. Gignac MA, Backman CL, Davis AM, et al. Understanding social role participation: what matters to people with arthritis?. *J Rheumatol*. 2008; 35(8): 1655-63
11. Fujiwara Y, Shinkai S, Kumagai S, et al. Longitudinal changes in higher-level functional capacity of an older population living in a Japanese urban community. *Arch Gerontol Geriatr* 2003;36(2):141-153
12. 平野美千代. 日本の「高齢者の社会活動」: 概念分析. *日本保健科学学会誌* 2011 ; Vol.14, No.3 : 121-128
13. 成田香織, 田高悦子, 金川克子, 他. 農村部の高齢者における介護予防事業の参加者と不参加者の特徴. *日本地域看護学会* 2011 ; 13 卷, 2 号 : 16-22
14. 古田加代子, 流石ゆり子, 伊藤康児. 在宅高齢者の外出頻度に関連する要因の検討. *老年看護学* 2004 ; 9 卷, 1 号 : 12-20
15. 厚生労働省. 「国際生活機能分類—国際障害分類改訂版—」(日本語版). <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/08/h0805-1.html> (2013 年 4 月 9 日アクセス可能)
16. エリザベス T. アンダーソン, ジュディ ス マクフラーレン, (金川克子, 早川和生監訳) 『コミュニティ・アズ・パートナー地域看護学の理論と実践』, 医学書院, 2007
17. 町田綾子, 平田文, 柳田幸, 他. 簡易鬱スケール GDS5 の本邦における信頼性、妥当性の検討. *日本老年医学会雑誌* 2002 ; 39 : 104
18. 戸ヶ里泰典, 山崎善比古, 小出昭太郎, 他. 修正版修正版 Perceived Health Competence Scale (PHCS) 日本語版の信頼性と妥当性の検討. *日本公衆衛生雑誌* 2006 ; 53(1) : 51-57
19. Kono A, Tadaka E, Kanaya Y, et al. Development of a Community Commitment Scale with Cross-sectional Survey Validation for Preventing Social Isolation in Older Japanese People. *BMC Public Health* 2012; 4: 903-910
20. Tadaka E, Kono A, Kanaya Y, et al. Scale development of Self-Efficacy Scale for preventing and alleviating social isolation among the community-dwelling elderly people(SES-PAS): community volunteers. *The gerontological society of America* 2013: 88
21. Yabuwaki K, Yamada T, Shigeta M. Reliability and validity of a comprehensive environmental questionnaire for community-living elderly with healthcare needs. *Psychogeriatrics* 2008; 8:66-72
22. Hurst G, Wilson P, Dickinson A. Older people: how do they find out about their health? A pilot study. *British Journal Community Nursing* 2013; 18(1):34-9
23. 酒井優, 永田智子, 渡邊麻衣子, 他. 農村・山間地域に居住する前期高齢者の膝関節痛に対する保健行動 膝関節痛の有無と性差に焦点を当てて. *日本公衆衛生雑誌* 2012 ; 59(1) : 19-30
24. 佐藤秀紀, 佐藤秀一, 山下弘二. 地域在宅高齢者における活動能力と社会活動の関連性. *日本保健福祉学会誌* 2002 ; 8(2) : 3-15
25. Giraldez-Garcia C, JoãoForjaz M, Prieto-Flores ME, et al. Individual's perspective of local community environment and health indicators in older adults. *Geriatrics & gerontology international* 2013; 13(1):130-138