

2020 年度

井上円了記念研究助成

研究報告書

東洋大学

2021 年 3 月 31 日

目 次

【大学院生 研究報告書】

No	氏名	研究課題名	ページ
1	小林 栄輝	唐後半期の武官と政治	1
2	程 楽	清末における京張鉄道とモンゴル地域の近代化政策	4
3	蘇 雨青	犯罪発生地点に対するリスク評価変化のアプローチ-環境要因がリスク評価に及ぼす影響-	8
4	滝口 雄大	他者に対する疑わしさの知覚に関する検討 -欺瞞についての信念と欺瞞を知覚させる手がかりに着目して-	12
5	倉矢 匠	ジェンダーステレオタイプを反映した職業におけるジェンダー不均衡の原因帰属と役割変容	15
6	沓澤 岳	目標表象活性化の反復がセルフコントロールの向上に与える影響の検討	18
7	大前 周平	アナモックス反応における必須微量元素及び適正濃度条件の解明	21
8	小豆畑 隼	カビ毒トリコテセンの MS/MS ライブラリーの作成 ～カビ毒汚染小麦から食の安全を守る～	24
9	小宮山 寿紗	紫外線抵抗性好塩性古細菌の紫外線耐性評価および諸性質解析	28
10	明間 大輝	治水構造物の河川環境機能評価 ―魚類の生息状況を例に―	31
11	水藤 飛来	トレッドミル走運動による発育期ラット膝蓋靱帯付着部の構造変化に対するアイシングの影響	34
12	関口 茉樹	植物二次代謝選択的阻害剤の開発を目的とした基質の有機合成とクラリ骨格形成における鍵酵素の構造活性相関	37
13	福嶋 彩加	イネの栄養素吸収能力に関する量的形質遺伝子座解析	41
14	佐藤 友里	骨格筋分泌因子を介した暑熱依存的な皮膚機能制御の解明	44
15	大牧 創	魚類における hand 遺伝子の多様化と機能	47
16	橋本 奈々美	ボイセンベリー葉成分が培養細胞に及ぼす機能性評価	50
17	堀口 元気	網羅的遺伝子発現解析による水陸両生植物における水中順応の分子メカニズムの解明	53
18	塩野 鈴佳	自閉症の性差に関する「性ステロイド仮説」を自閉症モデルマウスを使って検証する	56
19	片野 亘	心臓再生を目指した Sall の機能解析	61
20	加藤 萌	HT22 細胞における暑熱ストレス応答のメカニズムの解析	64
21	澤辺 舞衣	ドレブリン欠損マウスにおける行動表現型とシナプス形態異常に関する研究	67
22	沖田 圭介	成熟ティラピアで GnRH3 ニューロンが嗅上皮から発生するか または KT はそれを促進するか？	71

23	齊藤 可剛	カフェイン耐性乳酸菌におけるカフェイン耐性機構の解明	74
24	諏訪 浩貴	ウミネコはどうやってハダカイワシを利用しているのか？－夜間採餌行動の解明	77
25	河野 翔	低酸素培養モデルを用いた機能性食素材アナトー由来トリエンールの抗中皮腫作用の解析および中皮腫細胞に対するビタミンEの生物学的利用能の比較	80
26	長竹 舞子	Ⅱ型糖尿病合併症としての乳がんの発症メカニズムの解析および食品機能性素材による新たな予防法構築の可能性	84
27	山崎 倫生	一過性有酸素運動後に抗酸化能を発揮する栄養素の探索	88
28	芹澤 奈保	δ -トコトリエノールによるヒト血中 LDL コレステロール低下の検討	91
29	遠藤 大輝	NK 細胞による新規がん予防法の構築を目指した悪性中皮腫スフェア集団のがん幹細胞性解析	94
30	山本 かおり	地域在住高齢者の認知機能と睡眠の質に対する多様な食品摂取を目的とした栄養プログラムの効果検証：ランダム化比較試験	97
31	Asma Ben Salah	Patterns formed by magnetic particles in fluctuating magnetic fields	101
32	SHUKUROV IBROHIMJON	A Comparative Investigation on the Anti-Cancer Effects of Chaga Mushroom Extracts from Uzbekistan and Japan	105
33	田沼 友理	Experimental and theoretical studies of endohedral fullerene functionalisation and growth	113
34	EDEN MARIAM JACOB	SYNTHESIS OF POLYSACCHARIDE BASED NANOPARTICLES FOR THE ORAL DELIVERY OF QUERCETIN IN TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES(炎症性腸疾患の治療におけるケルセチンの経口送達のための、多糖類ベースのナノ粒子の合成)	119

【校友 研究報告書】

No	氏名	研究課題名	ページ
1	上村 正裕	平安期王権構造の総合的研究	132
2	松野 聡子	秋田地域の信仰圏と在地宗教者	135
3	松井 宏介	Fusarium 属菌の生産するトリコテセンの新規配糖体の同定、およびその食へのリスクの検証	140
4	佐川 まこと	精神障害者の ACT における家族支援に関する研究－経年に渡る家族からの聞き取り調査から－	143

【専任教員（個人研究）研究報告書】

No	氏名	研究課題名	ページ
1	佐々木 啓介	地方公営企業法の改正と公営企業の効率性改善について	146
2	金子 友裕	デジタル経済を想定した場合の課税所得計算	149
3	井沢 泰樹	社会的マイノリティにおけるメンタルヘルスとセーフティネット構築に関する研究	152
4	伊藤 大将	クラウドソーシングと公募型パネルを用いたウェブサーベイデータの質の調査	156
5	市川 顕	ユンカー欧州委員会における EU エネルギー同盟の政治過程	160
6	高岩 裕也	炭素繊維複合材料による耐震補強を適応した既存木造建築物における長期耐久性の解明	163
7	青木 宗之	急勾配な水路式魚道における魚類の遡上率向上を目指した粗度要素や配置に関する研究	168
8	藤井 修治	バイオプローブを利用した細胞核内動的構造秩序の基本原理解索	171
9	吉永 淳	炭素窒素安定同位体比に基づく現代日本人の食性解析	174
10	井ノ口 繭	トラザメの胚期に特有の塩類細胞から謎多き軟骨魚類のイオン調節機構を解明する	177
11	谷 智子	「利害」が生じる日中異文化接触場面におけるイン/ポライトネス研究	180
12	本多 泰理	関数解析的手法のネットワーク解析への応用	183
13	神場 知成	創造性を高めるオフィス実現に向けた環境自動制御の研究	187
14	加知 範康	非居住地域へのグリーンインフラ導入による都市域縮退の実現可能性	190
15	伊藤 健彦	第二言語使用を抑制・促進する社会生態学的基盤の解明：関係流動性に着目して	194

【専任教員（共同研究）研究報告書】

No	氏名	研究課題名	ページ
1	大野 裕之	個人投資家の証券投資に関する行動・意思決定の総合的研究	197
2	山口 裕之	ビジネスモデルの漸進的逸脱プロセスの追跡	200
3	井上 貴也	珠海デルタ地域における会社法の展開について	203
4	北脇 秀敏	開発途上国における廃棄物発電の導入可能性評価指標の開発に関する実証的研究	206
5	吉岡 勉	観光サービスにおける労働生産性の向上に関する研究	210
6	井坂 和一	特殊菌を利用した 1,4-ジオキサン処理における微量元素種と最低濃度条件の解明	213
7	吉田 泰彦	iPS 細胞に基づくマイクロ腫瘍モデルの構築とナノ薬剤評価への応用	216
8	後藤 顕一	「科学の有用性」を実感し、探究型の学びの実現を目指す学習モデルに関する研究	219

【専任教員（海外協定校）研究報告書】

No	氏名	研究課題名	ページ
1	伊吹 敦	中国人民大学（中国）・金剛大学校（韓国）と結んだ交流協定に基づく国際シンポジウム「東アジア仏教における生活規範一戒律・大乘戒・清規・非僧非俗」の共同開催	223
2	太矢 一彦	高齢者の住まい及び高齢者の生活資金融資に関する日韓比較研究	228
3	山本 須美子	中国浙江省出身の若者にみるトランスナショナリズムに関する教育人類学的研究	231
4	金子 律子	脳の性差や性転換に及ぼす性ステロイドの影響	235
5	廣津 直樹	スリランカにおけるイネ収量および亜鉛吸収効率向上のための遺伝構造解析	239
6	矢野 友啓	ヒトメラノーマ予防法開発のためのモデルとしてのイヌメラノーマの可能性	242

【専任教員（研究所プロジェクト）研究報告書】

No	氏名	研究課題名	ページ
1	長津 一史	東南アジアにおける帰還移民の社会経済的再統合 -日本就労経験者を中心に	245
2	宮越 雄一	大腸がん幹細胞を標的とした新たな大腸がん予防法の構築	250
3	千葉 正史	東洋大学に所蔵される中国語諸史資料のデータベース構築と活用開発	253
4	渡辺 章悟	初期大乘仏教の成立と展開ーテキスト・ことば・思想ー	258
5	後藤 武秀	珠江デルタ地帯における民事法統一化傾向の研究	261
6	森田 明美	被災地における子どもと子育て家庭の居場所づくりに関する継続的な取り組み支援研究 ー当事者参加型支援モデルを手掛かりにして	265
7	山本 須美子	首都圏在住アジア系の若者にみるトランスナショナリズムに関する比較研究	269
8	蒲生（西谷） 美香	新規球状ナノ炭素材料「マリモカーボン」の合成と用途探索ーエネルギー・環境・生体分野への応用を目指してー	273

【2020 年度 井上円了記念研究助成執行一覧】

表題	ページ
2020 年度井上円了記念研究助成執行一覧	巻末

唐後半期の武官と政治

Study of Military Officers and Politics in the Latter Half of the Tang Dynasty

研究代表者 小林 栄輝(文学研究科史学専攻)

指導教員 西村 陽子

研究期間／2020年4月10日～2021年2月15日

キーワード／①唐 Tang Dynasty

②武官 Military Officers

③藩鎮 Fanzhen

④統治構造 Governance Structure

⑤江南 Jiangnan

2020年度交付額／ 630000 円

研究発表／学会および口頭発表

2021年度に発表する予定

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

唐代の武官研究は、武官はどのように官僚となり、そして昇遷（出世）していったか、あるいは武官が保持する官職の地位・職権、例えば幕職官（武僚佐）の職級の分析など、制度及び職級の追究に重点が置かれ、武官の一般化により個々人の存在が消え、その存在意義は不明瞭なものとなっている。また唐後半期の地方統治機関である藩鎮（藩鎮体制）の研究を見ると、すべての藩鎮（藩鎮の支配方法）を単一に捉えるのではなく、唐朝は地域ごとに藩鎮の役割（使命）をそれぞれ与えて、統治をおこなっていたことが明らかとなっている。一方で藩鎮の地域ごとに役割があることは明らかとなっているが、異なる役割を与えられた地域をまたいで移動する官僚（ここでは特に順地藩鎮の武官）、藩鎮内の具体的運用者である官僚がなぜそこに派遣（配置）されたか、これにより当地の藩鎮はどのような影響があったのかについて考察の余地がある。

そこで唐後半期の政治の中心地である長安・洛陽の政権と、南方地域における地方の軍事的な勢力として中央の威令を受けていた武官との具体的な関係を明らかにしていく。この分析によって、地方の武官が任用される時に期待された役割と、実際の動きを詳細に跡づけていくことで、唐後半期における順地藩鎮が、当時の動乱の政治状況（地方分離化傾向）の中で果たした役割を明らかにするとともに、従来は「中央の威令に従う順地」としてのみ認識されてきた諸藩鎮が、唐王朝の中で果たしてきた具体的な役割（とくに軍事的参与）とその影響を明らかにする。また、南方地域を離れた後の状況（中央軍職あるいは他藩への移動）を分析することで、唐朝の威令に服する武官をどのように任用し活用したかを明らかにし、唐後半期の統治構造の一端を提示する。

2. 研究経過および成果の概要

筆者が注目したのは、江南藩鎮（浙西・浙東・江西など）を経て、北方の軍事的要衝に任用された人物である。李長栄（李元淳（739～804））と王栖曜（？～802）は、安史の乱（755～763）の

際、尚衡の義挙に応じ、安史軍に抵抗し、出仕する。王璵の（淮南・浙東への）出鎮に従い（＝辟召される）、治安が低下していた江南に赴く。袁晁の乱（762～763）が発生すると、乱鎮圧に活躍し、浙西節度使管轄下の軍職を授かる。以後、浙西の藩帥は幾人か交代するものの歴代藩帥に任用され、次第に地位を上昇させていった。李希烈の乱（782～786）時、藩帥の韓滉の命により反乱鎮定に参与し、中心的役割を果たす。この功績により藩帥の韓滉は中央に召還され、両人もこれに随い中央の軍事職を授かる。その後、李長栄は唐朝と軍事的緊張関係にあった河朔三鎮と対峙し副都洛陽を防衛する地域、河陽節度使（後に昭義節度使）任命され、王栖曜は吐蕃の脅威などから首都長安を守る鄜坊節度使に任命され、いずれも10年を超す長期任用となり、在官中に死去する。

柏良器（743～803）は、安史の乱の際（柏良器が12歳の時）、父の柏造が反乱軍に殺害される。17歳の時、汝州龍興の尉を授かる。後に父の友人である王奂が李光弼の幕府に従事した際、柏良器を推薦した。李光弼は柏良器に兵を授け、軍を率いて江南に赴き、浙西の軍に所属させた。その後は李長栄・王栖曜とともに浙西において地位を上昇させていき、李希烈の乱平定の功績により、中央軍事職を授かる。以後は前述の二人と異なり、地方に派遣されることはなく中央の將軍職を歴任した。

唐朝は北方の戦場ですでに実績のある少壮な武人を盗賊の跋扈などにより不安定化していた江南地域（浙西・浙東・宣歙）に派遣し、治安回復とともに長期任官（＝少壮であるため長期間実部隊として活動できる）による当地の軍事力の底上げをする目的（戦略）をもっていた。また、三人が任官していた浙西は大運河の起点にあり、運河を通じて軍事的緊張関係にあった河朔三鎮と対する河南地域に派兵できる位置関係にあり、運河沿いで発生した李希烈の乱では中心的役割を果たすことになる。李希烈の乱平定により、浙西藩鎮の軍事の中核を担っていた三人が離任し、浙西地域の軍事組織も再編され低減する一方で、中央は実績のある優秀な人材を地方より吸収し中央軍を強化した。このことは李長栄が右神策軍將軍・知軍事、柏良器が左神策軍將軍・知軍事と連携した配置をしていることから明らかであり、一つの勢力（群体）として把握されていたといえる。また後に李長栄が長安の東に位置し副都洛陽を守護する河陽および昭義、王栖曜が長安の北面に位置する鄜坊、そして柏良器が中央將軍職（神策軍大將軍など）に任命されていたが、この任命には軍事的能力に秀で軍内や周辺の事情に通じ、管轄の軍隊の指揮が速やかに遂行できる能力は勿論のことであるが、関係性の深い三者を長安・洛陽間の線状に配置することでより安定した統治を実現しようとした唐朝の軍事的戦略があったと考えられる。

3. 今後の研究における課題または問題点

武官の経歴と軍事的役割に限定してその任用背景と唐朝の統治構造の把握を試みているが、今後事例をさらに増やす必要がある。また現行の事例では安史の乱勃発から徳宗・憲宗期頃までに活躍をした人物を重点的に取り上げているが、このような動きはどの時期まで見られるのか、今後検討する必要があると考える。

Summary

Most of the studies on military officers in the Tang dynasty were mainly focused on the system clarification but did not pay much attention to the appointment background of each military officers mentioned in the case studies. Thus, there are rooms of examination on what

are the reasons and expectations towards for example military officer A's appointment.

This study focuses on three military officers whose had very similar backgrounds, Li Changrong (李長榮) later named as Li Yuanchun (李元淳), Wang Qiyao (王栖曜), and Bai Liangqi (柏良器), and attempted to elucidate the ruling structure from the outbreak of the An-Shi Rebellion (安史の乱 (755-63)) to the De Zong (德宗(779- 805)) period.

Referring to the biographies of the three military officers mentioned above, it indicated that the Tang Dynasty had a strategy of dispatching young and energetic military officers who had experienced the northern battlefields to the Jiangnan region(江南地域), where public security was deteriorating to restore public security and to increase military strength through long-term appointments. During the Li Xilie Rebellion (李希烈の乱(782-86)), these three military officers as a long-term investiture led a well-trained army to pacify the rebellion and this contribution and achievement leading them to gain a central military posts. From the newly appointed positions, it showed that they were recognized as a single military force and incorporated into the central army. Li Changrong was appointed as the Provincial Commander ((藩帥)Fanshuai) of Heyang(河陽) and Zhaoyi(昭義), who responsible to the protection of the sub-capital Luoyang(洛陽) where was located at the East of Changan(長安). Wang Qiyao was appointed as the Provincial Commander of Fufang(鄜坊), where was located at the north of Changan. And Bai Liangqi was appointed as the Central General. These appointments were made not only because of their military abilities, the ability to command the armies quickly by judging the situation within or around the military, but also because of the military strategy of the Tang Dynasty to achieve more stable government by placing three military officers who had close relationship along the line between Changan and Luoyang.

清末における京張鉄道とモンゴル地域の近代化政策

Modernization Policies towards Jingzhang Railway and Mongo region during late Qing Dynasty

研究代表者 程 楽 (院生)

指導 教授 千葉 正史

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①光緒新政 Guangxu New Policy

②治外法権 Extraterritoriality

③京張鉄道 Jingzhang Railway

④モンゴル地域 Mongo Region

⑤貿易 Trade

2020 年度交付額／560,000 円

研究発表／学会および口頭発表

〔口頭発表〕

・「清末新政期における京張鉄道と張家口貿易について」

東洋大学院生研究発表会、2020 年 10 月 3 日、東洋大学白山校舎 6 号館

研究経過および成果の概要

1、研究方法

本研究課題を遂行するにあたり、最も重要であるのが一次史料の入手である。こうした一次史料は大きく分類すると二種類ある。①は関係する国家の檔案史料、②は現在編集された史料集である。

まず、一次史料調査（国外）の必要性を説明する。①を入手しようとするれば、関係する国家の檔案館に所蔵されている檔案の調査を行う必要がある。そもそも、2020 年度の夏休みを利用して中国・ロシア（例えば、ロシア帝国外交アルヒーフに所蔵されている中国関係の外交文書 ファイル番号：1519～1623、時代：1881-1915、件名：在華鉄道敷設等）に行って現地の檔案館に所蔵されている史料を調査する予定であったが、コロナ禍のため、外国への史料調査は不可能となった。

また、国内で申請者は主に東洋文庫・国会図書館などの史資料を利用する。ただしコロナ禍のため、今年度現地に直接赴き史資料を調査することが困難であり、多くの場合史資料の遠隔複写にたよることになった。

このほか、申請者の研究が清末における鉄道の研究であるため、中国で出版された史料集、或は研究書を買求める必要性があった。今年度は、中国に行き直接購入する機会がなかったため、中国ネットの本屋（当当や孔夫子など）で必要な書籍を注文し、日本に郵送してもらったことで代用した。その他、中国では既に入手が難しい本もあり、日本の古本屋も活用し史料を収集した。

2、研究経過および成果の概要

本研究は、まず光緒新政期に清朝政府が藩部（蒙古地域）に向けて建設した京張鉄道の建設決定の経緯を考察する。さらに清朝政府による京張鉄道の建設と辺境地域の統合との関係を解明する。今年度における口頭発表「清末新政期における京張鉄道と張家口貿易について」はその研究の一部である。

周知の通り、アヘン戦争以降、不平等条約によって中国における条約港は相次いで設置された。こうした条約港で「英語を話す中国人」と中国にやってきた外国商人との商業貿易は、中国における商業貿易を繁栄させたが、一方で「英語を話す中国人」と外国商人が結託して、治外法権を利用して伝統的な商業組織を切り崩していく傾向がみられた（本野英一、『伝統中国商業秩序の崩壊 - 不平等条約と「英語を話す中国人」』名古屋大学出版社、2004年）。もしこのような状態が継続していくと、清朝政府の統治基盤は崩壊する恐れがあった。そのため義和団事件以降、清朝政府は統治強固・利権維持のため、積極的に問題解決に取り組んだ（光緒新政）。

従来から張家口は内地と蒙古地域、さらに中国とロシアとの貿易の要衝地であった。義和団事件以降、蒙古・ロシアとの貿易だけではなく、西洋諸国（日本を含める）との貿易も始まった。こうした状況に直面した清朝政府は京張鉄道の建設を開始して間もなく、商人を纏める組織である張家口商会の設置に着手し始めた。その後、察哈爾都統誠勳が張家口を条約港と同じく対外開放することを提案したが、清朝政府に拒否された。清朝政府は、張家口を開放した場合、現地中国商人が治外法権を利用して清朝政府の管理下から離脱するものと懸念していたためと推察される。また、清朝政府は張家口を橋頭堡として蒙古地域への進出（あるいは統治強固）も視野に入れた。つまり京張鉄道の建設によって、清朝政府は現地商人に対しての管理を強固にし、張家口における貿易秩序を整えた上で、近代的「商戦」を通してその統治基盤を強固する意義があったといえる。

3、今後の研究における課題または問題点

先述したように、京張鉄道の建設によって清朝政府は、張家口における商業の管理・統制組織を再編成し、その統治基盤をより強固にする意義があった。ただし以上の意義は、あくまで中国内地（あるいは漢人）の視点であり、統治者の視点から考察したものである。そのため、被統治者側である蒙古地域の人々の目を通してみる政策の様相については、いまだ言及していないため、多角的視点で考察が出来ていない状態にある。そして、より詳しく考察

するため、少なくとも次の二つの問題点を突き止める必要がある。①京張鉄道の建設により、どの程度蒙古地域の統治が強固になったか、その具体的な事例を挙げる必要がある。②蒙古地域の人々は、京張鉄道の建設に対してどのような評価をしていたのか。これらの問題点に関する実証研究は不足している。

そのため、より詳細にこの時期の清朝政府が実施した藩部政策を多角的に評価できるよう、史料方面では漢文史料のほか、蒙古史料あるいは当時蒙古と緊密な関係にあったロシア・日本の史料を精査する必要がある。

Summary

The research topic is “Modernization Policies towards Jingzhang Railway and Mongo region during late Qing Dynasty”. As a part of the research, in 2020, applicant mainly researched on the relationship between the construction of Jingzhang Railway and the trade in Zhangjiakou.

It is well known that in traditional Chinese society, merchants were the lowest among the four social classes. The government did not emphasis on commerce. However, after,

After opening the treaty ports, those Chinese merchants who could speak English the First Opium War, under the unequal treaties, China had to open some ports (treaty ports) for foreign trade and this generated some changes, started trading with foreign merchants. On the one hand, the commercial activities flourished the local economies; on the other hand, it seriously affected the existing commercial rules and influenced the governing base of Qing Dynasty. For example, many of the Chinese merchants who could speak English always make use of extraterritoriality and sidestepped the control of Qing government. As a result, it directly damaged the judicial power of Qing government. Therefore, after the Boxer Rebellion, the Qing government decided to strengthen the control towards commercial organizations and merchants.

Since late Ming Dynasty, Zhangjiakou was the key area of trade between China and Mongolia. From Qing Dynasty, following the flourishing of trade between China and Russia, the position of Zhangjiakou became more important. In 1900, after the Boxer Rebellion, many foreign countries started to do trading in Zhangjiakou. With this situation, Qing government decided to construct Jingzhang Railway.

Following the construction of Jingzhang Railway, in order to strengthen the competing power in commerce, Qing government quickly united the local merchants and established Zhangjiakou chambers of commerce. After that, Chengxun, the Chahar Tutung proposed to the Qing government to open Zhangjiakou port to foreigners like a treaty port, but it was rejected. It was speculated that the Qing government worried the

local Chinese merchants would make use of extraterritoriality to escape the control of the Qing government once opened the Zhangjiakou port. Besides, the Qing government was considering expanding its influence to Mongolia through Zhangjiakou as a bridgehead. In other words, the construction of Jingzhang Railway was meaningful for the Qing government as to strengthen the foundation of governance through a modern “trade war”. At the same time, it helped to strengthen the control on local Chinese merchants and to reorganize the trade order at Zhangjiakou.

犯罪発生地点に対するリスク評価変化のアプローチ

ー環境要因がリスク評価に及ぼす影響ー

Approach to risk assessment for crime site Influence of environmental factors affecting risk assessment.

研究代表者 蘇 雨青(社会学研究科 社会心理学専攻)

指導教員 桐生 正幸

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①リスク評価 risk assessment

②犯罪不安 fear of crime

③特性不安 trait anxiety

④環境要因 environmental factor

⑤子ども被害 crimes against children

2020 年度交付額／ 700,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- 1) 蘇 雨青・桐生 正幸・滝口 雄太 (2020). 犯罪発生場所が犯罪不安と被害リスク評価に及ぼす影響. 日本心理学第 84 回大会
- 2) Su,Y & Kiri,M (2021). Difference in Risk Assessment and Environmental Factors at the Occurrence of Crimes against Children. Society for Personality and Social Psychology. Online. 14th. FEB. 2021
- 3) 蘇 雨青 (印刷中). 未成年者の犯罪被害に関する実態と特徴の類型化 東洋大学大学院紀要第 57 集

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究課題では、犯罪発生地点の環境要因がリスク評価変化に及ぼす影響について検証することを目的として予備調査および本調査を実施した。罪種別に犯罪発生地点と犯罪の発生が認知されていない地点の環境要因がリスク評価に及ぼす影響という点を明らかにし、異なる犯罪が発生した地点に対するリスク評価と環境要因の違いがあるかどうかを検討した。

予備調査では、犯罪に関する住環境評価尺度 (羽生, 2011) と環境評定尺度 (池間, 2014) を参考にし、環境評価尺度を作成した。また、環境評価尺度を用いて、「道路特徴」, 「無作法性」, 「防犯」, 「危険箇所」の評価視点から子どもが被害者となった前兆事案 (卑わいな内容のある声かけ事案) と性犯罪が発生した地点, それぞれ 20 か所の環境を評定し、前兆事案と性犯罪におけるリスク評価の違いと犯罪発生地点の環境特徴の差異を検討した。そして、予備調査の結果を踏まえて、本調査で使用する地点を選出して刺激を作成した。

本調査では、犯罪発生地点の環境要因の区別とリスク評価の違いについて検討することを目的とした。ここでは、状態ー特性不安尺度 (STAI) (肥田野・福原・岩脇・曾我 & Spielberger, 2000)

から特性不安を測定する 20 項目を用いて「ほとんどない」から「ほとんどいつも」までの 4 段階評定を求めた。さらに、罪種ごとについて、それぞれ被害に遭う可能性を求めた。回答は「可能性はある」から「可能性はない」までの 5 段階評定にて求めた。そして、实际的に犯罪が発生したかどうかの有無を予想させ（リスク評価）、判断理由となる環境要因に対して自由記述の形で回答を求めた。

2. 研究経過および成果の概要

予備調査経過および成果の概要

地点情報として、警察が配信される防犯メールサービスの情報と警察 HP 上に公表している犯罪情報マップについて、2017 年～2018 年の間に発生した子供が被害対象となった犯罪のうち、「丁目」以上の精度で記録された情報から前兆事案（71 件）と性犯罪（85 件）に関連する情報を収集し、児童被害の多発時間帯である「15 時～18 時」に基づき、前兆事案の発生が認知された地点 20 か所と性犯罪の発生が認知された地点 20 か所を選出した。

前兆事案発生地点と性犯罪発生地点に対する環境評定項目をダミー変数化してカイ二乗検定と判別分析を行った結果、道路特徴と危険箇所の評定項目について有意な違いが見られ、判別率は 75.6%であったため、罪種別の犯罪発生地点の間に環境要因が異なることが確認された。特に、人が通れない狭い道や見通しの悪い所、暗がりなど、道路特徴と危険箇所である環境要因が有意に違いを示した。このような結果を踏まえて、道路特徴と危険箇所の変数を用いて刺激作成のための前兆事案発生地点と性犯罪発生地点それぞれ 2 か所を選出した。

本調査経過および成果の概要

本調査の調査対象者は 2 通りの方法によって募集してオンライン調査を行った。

まず、大学生を対象としてオンライン調査ソフトウェア（Qualtrics）を通して調査を実施した。調査 1 では、東京都の T 私立大学の大学生 205 名に対して調査を実施したところ、回答に不備があった回答者を除外し、男性 49 名、女性 100 名、計 149 名（ $M = 20.08$ 歳、 $SD = 1.19$ 、全体有効回答率 72.68%）のデータを用いて分析を行った。

また、大学生とは異なるサンプルとして、20 代～60 代までの一般社会人を調査対象として選定し、同様の調査内容に回答を求めた。調査 2 の実施については、オンライン調査会社へ委託した。調査 2 では、750 名の回答者に対して調査を実施したところ、回答に不備があった回答者を除外し、男性 309 名、女性 328 名、計 637 名（ $M = 44.75$ 歳、 $SD = 13.77$ 、全体有効回答率 84.93%）のデータを用いて分析を行った。

本調査の結果から見ると、各地点の環境評価項目の得点を用いて Ward 法による階層的クラスター分析を実施したところ、犯罪発生なし地点・前兆事案発生地点・性犯罪発生地点の 3 つのクラスターに分類され、リスク評価を比較すると 3 つのクラスター間に有意な差が示唆された。また、分散分析を行ったところ、特性不安感の高まりは、声かけ・つきまとい・暴力犯罪に対するリスク評価に抑制効果があることが確認され、環境評価項目についてリスク評価に及ぼす影響も明らかにしたが、多年齢層における画像刺激に関するリスク評価と環境評価の結果に基づき、性差により、リスク評価と特性不安の違いが見られなかったが、青年群（20 代・30 代）と中年群（40 代・50 代）、高齢者群（60 代）の間に違いを示した。

3. 今後の研究における課題または問題点

子どもの防犯を考えると、子どもは「守られる」立場であり、大人自身が考える危険な場所などへ近寄らないといった指導を受けている。しかし、実際の犯罪場面は、大人の想定していないところで起こっていたりしている。また、子ども自身が危機管理を行い、適切な防犯意識によって犯罪リスクの評価を行うことができるよう促すことも重要であろう。

本課題では、犯罪が認知された場所の画像刺激を用いて、環境評価やリスク評価の異同を検討したが、子どもに対する防犯教育や防犯対策を構築ときには、子どもの防犯に携わる人（指導者や保護者）が犯罪発生地点におけるリスク評価や環境特徴を把握できるだけでなく、子どもの被害リスク認知を適切に理解する必要があると考えられる。今後として、本研究で作成した犯罪地点の画像刺激を用いて、同じ環境下にいる大人と子どものリスク評価の違いや異なる環境要因が不安喚起などに与える影響を検討する必要があると思われる。

Summary

In this study, a preliminary survey and a main survey were conducted to examine the influence of environmental factors for different crime sites in risk assessment.

In the preliminary survey, based on the crime data published by the police, we selected 20 locations where the occurrence of precursor crimes and 20 locations where the occurrence of sexual crimes were recognized during the "15:00-18:00" period, which is the frequent time for child victimization, and conducted an environmental assessment of the locations. As a result of the environmental evaluation of the selected sites, it was confirmed that the environmental factors like road features and danger spots were different between the sites where crimes of different types occurred.

In the main survey, we made 3 images from each site as stimulus through the preliminary survey, using them to explore the environmental factors that caused the difference in crime risk assessment. The participants for the main study were recruited and surveyed online in two ways. In Survey 1, excluding respondents with missing or incomplete answers, the data of 149 participants were used for analysis (205 undergraduate participants were surveyed in total). In Survey 2, after excluding respondents with missing or incomplete answers, the data of 637 participants whose age between 20s to 60s (750 participants were surveyed in total) were used for analysis. Results showed that there were three clusters of different sites, and differences from environmental factors were found in precursor crime cluster, sexual crime cluster and no crime cluster. On the other hand, based on the results of risk assessment and environmental assessment of image stimulus in multiple-age groups, no difference in risk assessment and trait anxiety were found between sexes, but differences were found between adolescents (age of 20s and 30s), middle-aged (age of 40s and 50s), and elderly (age of 60s) groups.

Based on the above results, this study examined the dissimilarities in environmental factors and risk assessment using image stimuli of crimes sites. However, to implement child crime prevention education and measures, it is necessary for those working in child crime prevention as well as guardians to assess the risk and environmental characteristics of the place of crime

and to correctly understand the children's perceived risk of victimization. Therefore, in the future, it will be necessary to use the pictorial stimulus of the crime sites created in this study to investigate differences in risk assessment between adults and children in the same environment and the influence of different environmental factors on fear of crime.

他者に対する疑わしきの知覚に関する検討

ー欺瞞についての信念と欺瞞を知覚させる手がかりに着目してー

The examination of the perception related to suspiciousness:

Focusing on the belief about deception and the perceived cues to deception

研究代表者 滝口 雄太 (社会学研究科 社会心理学専攻)

指導教員 桐生 正幸

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①虚偽知覚 the perception of deception
②猜疑心 suspicion
③欺瞞手がかり cues to deception
④欺瞞的信念 the belief about deception
⑤処理状態 processing mode

2020 年度交付額／630,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- 1) 岩本 慧悟・沓澤 岳・滝口 雄太・尾崎 由香 (2020) . 会社は、変えられるか? 「会社マインドセット」と自己研鑽的な学習行動・組織変革的な学習行動との関連. 日本心理学会第 84 回大会 ポスター発表
- 2) 蘇 雨青・滝口 雄太・桐生 正幸 (2020) . 犯罪発生場所が犯罪不安と被害リスク認知に及ぼす影響. 日本心理学会第 84 回大会 ポスター発表
- 3) 滝口 雄太・石橋 加帆・岩本 慧悟・桐生 正幸 (2020) . 虚偽に関する顕在的信念の差異は存在するのかー猜疑心と主観的な手がかりに対する確信度に着目してー. 日本心理学会第 84 回大会 ポスター発表
- 4) 滝口 雄太 (印刷中) . 人はどのようにして嘘を見抜くのかー嘘についての信念との乖離ー. 東洋大学大学院紀要論文第 57 集

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

なぜ人は他者の嘘に正確に反応することができないのか、という問題は虚偽検出において重要な問題として扱われている。特に、他者とコミュニケーションを取るときに、その人物が話していることは本当であるという想定がデフォルトになっていることが指摘されている (Levine, 2014)。このようなデフォルトは、非常にコミュニケーションを取る際に適応的であるが、同時に、嘘を認識することを妨げている (Levine, Serota, et al., 2011)。したがって、他者の嘘を認識するためには、真実バイアスを捨て去り、嘘の可能性を考慮するような疑わしさを喚起させる必要がある。

本研究では、1 本の調査と 2 本の実験が実施された。最初に行った調査は、日常的な場面における虚偽検出を調べた Park, Levine, et al. (2002) に基づき、虚偽検出の時の手がかりと、嘘を知覚させた時の手がかりの異同を検討した。加えて、ある特定の信念によって、これらの認識状態を

作り出されているかを調べるため、自己報告式により質問紙に回答を求め、各手がかりの関連を検証した。実験では、真実バイアスの移行性に影響を及ぼす要因について、個人特性である猜疑心に着目して、真偽性判断課題のパフォーマンスを観察した。同様に、次の実験では、他者を疑わしく思う傾向だけでなく、状況的に他者を疑うような場面設定を行うことで、真偽判断課題における真実判断と虚偽判断の切り替わりについて検討した。それぞれの実験はオンライン上で実施し、より広範な年齢にわたるサンプルを用いて、様々なタイプの疑わしさと、特定他者や一般他者に対する信頼感の効果と対比させた。

2. 研究経過および成果の概要

日常場面の欺瞞性認知について調べた調査では、大学生の自由回答を先行研究と同様にコーディングを行った。その結果、欺瞞性認知は複数の手がかりを組み合わせること ($N=47, 28.0\%$) で喚起されていることが示唆された。細分化した手がかりごとにみると、嘘の根拠は外的証拠と同じくらい、言語的行動や非言語的行動に基づいていた。特に、言語的行動はその手がかりのみではあまり利用されていないが ($N=5, 3.0\%$)、他の手がかりとは頻繁に組み合わせられていた ($N=19, 8.8\%$)。処理プロセスとして、客観性の高い手がかりから嘘の可能性が知覚され、相手の言語的行動を注意深く観察することにより、欺瞞性認知を高めるようなフローが考えられる。その一方で、欺瞞についての信念は幅広く抱かれており、視線行動が嘘の手がかりとなることは最も顕著に現れていたけれども (31.7%)、感じの悪さのような統合的な印象 (10.2%) が新たに見出された。これらの信念によって、日常場面で他者の嘘を認識しているかを決定づけることはできなかったが、信念として抱かれている行動はいずれも利用係数が高い手がかりであることが明らかになった。

続いて、欺瞞性認知を引き起こすために、真実バイアスを低減させる要因について着目した 2 つの実験を行った。Reimer, Blair, and Levine (2014) は、虚偽検出では 2 種類の一貫性が用いられており、発言内容における一貫性や、その他の情報との対応性に矛盾があると、欺瞞の可能性を喚起させるとした。また、Levine and McCornack (1991) や Bond and Lee (2005) は、他者を疑う傾向には個人差があり、特性的な疑わしさと状態的な疑わしさは相互作用して、虚偽判断に影響を与えると報告した。これらのことから、2 種類の疑わしさが虚偽判断に及ぼす影響 (実験 1) と疑わしさと送り手の信用性が虚偽判断に及ぼす影響 (実験 2) について検討した。2 つの実験では、真偽性の異なる映像を視聴し、真偽判断を求めた。その結果、実験 1 において、真偽性判断を行う前に、嘘の可能性を示唆する情報を与えた条件の参加者は、より多くの虚偽判断を行っていた。また、特性的な疑わしさの単独の効果は小さかったが、話し手の嘘の可能性がわかっていると、その効果が大きくなるという間接効果がみられた。真実バイアスの減少は確認されたものの、明白な教示を行ったため、自発的な状況とは言えなかった。そのため、実験 2 では、嘘をつくこと以外の付加情報を用いることで、話し手の信用性を操作した。話し手の信用性が低い条件では、話し手が嘘をつく可能性を高く見積もっており、わずかに虚偽判断が多かった。しかしながら、信用性に基づく真偽性の意思決定では、真実バイアスはそこまで低減されていなかった。これらのことから、欺瞞性認知を引き起こす要因における階層性が部分的に示された。

3. 今後の研究における課題または問題点

欺瞞についての信念に関する調査では、言語的・非言語的行動によって、参加者は嘘の可能性について考えるようになっていることが示されたが、特定の信念をもつことは、その手がかりに対す

る注意を促しているかどうかは明らかになっていない。また、2つの実験を通して、状況的に喚起された疑念状態や個人特性である猜疑心は、虚偽判断に影響を及ぼしており、嘘の可能性が第三者から伝えられることで、真実バイアスは低減していた。今後は、真実バイアスを低減させる際に、送りの態度と表出する行動がどのように影響しているかについて検討されることが望まれる。

Summary

In deception detection research, it has been important to understand why people couldn't correctly perceive others' deception. According to Levine (2014), when people communicate with other people, they tend to presume that what others say is basically honest. This was referred to "truth-default," and this presumption of honesty is seen as highly adaptive (Levine, Serota, et al., 2011). These researches have suggested that a various trigger events led people to abandon the truth-default state. Because of this, they became the mode to infer to the possibility of deception.

Based on previous research, we conducted one investigation and two experiments. In the survey of the perception related to deception, we asked the participants to complete the belief about cues to deception and the experiences that they perceive other people as lying. Then, we examined whether self-reported the belief about cues to deception was associated with the perceived deception. As in previous research (Park, Levine, et al., 2002), it was revealed that most of deception were perceived through the combination of verbal and nonverbal behavior and external evidences. Interestingly, verbal cues were less often used alone ($N = 5$), but there were more often found in the combination cues ($N = 19$). These findings indicated that belief about cues to deception wouldn't lead people to pay attention for specific cues, while objective cues made them more suspicion and prompted them to convince themselves. Thus, objective cues and unstable cognitive state might play role of trigger which perceive the possibility of deception.

In a series of experiments, we sought to observe the performance for veracity judgments with regard to the personal trait of suspiciousness, which has an effect on transferability of truth bias. In addition, by manipulating the state of suspecting to others and settings, we examined whether truthfulness judgments based on truth-bias and believability of sender would be shifted to lie judgments. Levine and McCornack (1991) found that there were individual differences among the tendency to suspect others, and therefore, differently response to potential deception. We asked participants to watch videos which were either truth or deceptive, and make veracity judgments. In first experiment, participants who were informed information regarding the highly possibility of deception before watching videos made more deceptive judgments. The effect of state-suspicion mediated the effect of trait-suspicion on deceptive judgments. In second experiment, we obtained the similar results. The believability of sender were consistent with the direct instruction associated with lying. However, the believability may require cognitive resource, because the decrease in truth-bias was smaller than that in the first experiment. For future research, the relationship between the continuous processing and the decrease in truth-bias should be examined.

ジェンダーステレオタイプを反映した職業におけるジェンダー不均衡の原因
帰属と役割変容

Attributions to Gender Imbalances in Male/Female-Dominated Career and
Changing Gender Roles (英題)

研究代表者 倉矢 匠 (社会学研究科社会心理学専攻)

指導教員 安藤 清志

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／① ジェンダー不均衡 Gender Imbalance

② ジェンダー平等 Gender Equality

③ ジェンダーステレオタイプ Gender Stereotype

④ バックラッシュ効果 Backlash Effect

⑤ 原因帰属 Attribution

2020 年度交付額／ 630,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- 1) Kuraya T. (2020). "Endorsement of gender clichés that exaggerate gender dissimilarities: Men perceive them as a feminine pseudoscience." The 20th annual convention of the Association for Psychological Science (APS 2020), May 21-24, 2020, in Chicago, IL, USA.
- 2) 職業におけるジェンダー不均衡の原因帰属 2021 年度東洋大学大学院紀要(2022 年予定)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

近年、日本国内でも多様性受容の議論が活発化しているが(e.g., 「一億総活躍社会」), 性役割や規範的なジェンダーステレオタイプから逸脱した男女がもう片方の性別のものよりも否定的に判断され偏見や差別を被るバックラッシュ効果という現象が存在しており, 個々人の望む多様な在り方が性別によらず等しく認められる社会の実現に対する問題意識が高まり, 男女格差や性差別を解消しジェンダー平等を実現することが重要な課題となっている。しかし, 男性役割や男性優位領域への女性の進出と, 女性役割や女性優位領域への男性の進出を比べると, 概して, ジェンダー不均衡な状況の改善は前者においての方が顕著に見られることが指摘されている。これは, 男性領域でのジェンダー不均衡よりも女性領域での不均衡の方が人々から問題として軽視され, 改善を進めようとする動きが支持されていないことによるものなのであろうか。また, もし人々が女性領域での不均衡を問題として軽視しているのであれば, それはなぜなのであろうか。

本研究では, 男性領域と女性領域におけるジェンダー不均衡に対する人々の問題意識およびサポート意図の程度を比較し, 両者に隔たりがあることを検証することを第一の目的とした。さらに, 両者に差をもたらす可能性のある要因として, 原因帰属理論の知見を採用し, 不均衡な状況に対す

る原因を人々がどのように認識し帰属しているのかを検証することを第二の目的とした。原因帰属理論では内的帰属と外的帰属の2つに原因帰属は大別されるが、集団間差異に関してはその原因が内的に帰属される場合に、その差異は正当化されやすく、状況の変容に対する支持が生じにくいことが知られている。そこで、本研究においては、内的帰属として、「動機・関心の欠如」(e.g., 女性/男性はその手の仕事に興味がないから)、「能力・資質の欠如」(e.g., その職に必要な能力を男性/女性が有していないから)という2つを、外的帰属として、「社会的規範による抑制」(e.g., その職に女性/男性が付くべきではないと思う人々から差別を受けるから)を、それぞれ想定した。

まず職種とその男女比に関するデータを元に、就業者の男女比率に不均衡が生じている職業を複数取り上げ、予備調査を行い、人々がそれらの職種をどの程度認知しているか、そして男女比をどの程度であると認識しているか、また理想的な比率をどの程度であると考えているのかを調べた。また、ジェンダー不均衡の改善に対するサポート意図についても回答を求めた。

次に、予備調査の結果、認知度が低い職業を選び、その職業の就業者の男女比および年収に関する架空の情報を作成した。なお、架空の情報は、「男女比」(男性8割 vs. 女性8割) × 「年収」(高収入 vs. 低収入)の4パターンを用意した。さらに、その職業に転職を希望する人物に関してシナリオを作成した。シナリオは、「人物の性別」(男性 vs. 女性) × 「ジェンダーステレオタイプに沿う特性」(男性的/作動的 vs. 女性的/共同的)の4パターンを用意した。

提示する刺激材料を作成したのち、日本全国の20代~50代を対象としてオンライン調査を実施した。調査の実施および回答の回収はオンライン調査会社(楽天インサイト株式会社)に委託した。調査では、就業者の男女比率が不均衡である架空の職業のデータ4パターンのうちランダムに1つが調査回答者に提示され、不均衡の原因をどのように認知しているのかについて回答を求め、さらに、不均衡状態の改善をサポートする意図についても回答を求めた。その後、架空人物に関するシナリオについても、4つの中から1つをランダムに提示し、登場人物の性格特性評価およびその人物への態度について回答を求めた。これは、職種の男女比と年収(社会的地位)の高さがバックラッシュ効果に与える影響を検証するものであった。

2. 研究経過および成果の概要

調査/実験の結果、女性割合が多い職業として情報が提示された場合、男性割合が多い職業として情報が提示された場合に比べ、男性/女性が少ない原因を人々は内的なものとしてより強く帰属していることが示された。すなわち、男性が女性優位領域で少ない理由が、差別や偏見など外的な理由によるのではなく、男性自身にその職種への興味が薄く不得手であることと認知されていた。そして、不均衡を解消するためのサポート意図も、女性割合が多い職業として情報が提示された場合の方が少ない結果であった。ただし、低収入な職種として情報が提示された場合においては、男性が女性優位領域で少ない理由として差別や偏見など外的な理由も強く認知されており、男性は高い社会的地位・年収を追い求めるべきであるという社会的規範の影響が示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究からは、人々がジェンダー不均衡改善をサポートしようとするのは女性の問題に対してのみで、ジェンダー平等を実現しようとする際に“女性の問題”だけを解決すれば良いと考えている可能性が示唆された。しかし、ジェンダーの問題を解決するためには女性だけではなく男性の問題にも焦点を当てる必要がある。今後、男性の問題に焦点を当てた研究を増やすことが望まれる。

Summary

In Japan, there are growing calls for gender equality. However, not all instances of gender inequality are equally concerning. Especially, almost everyone is talking about not men issues but women issues. The current research was conducted to investigate whether and why people perceive gender imbalances in male-dominated careers as more problematic than gender imbalances in female-dominated careers and, also, to examine the theoretical proposition that asymmetries in support for social change between male- and female- dominated careers stem from the different lay attributions that people make for gender imbalances in those different fields. It was hypothesized that people should be less inclined to support efforts to boost the representation of men in female-dominated careers as compared efforts to boost the representation of women in male-dominated careers, to the extent that they perceive external factors (e.g., discrimination and social norms) as more essential, and internal factors (e.g., lack of motivation and/or ability) as less essential drivers of the given gender imbalance.

One thousand, two hundred and twenty eight participants (619 male, 609 female) were recruited to participate in an online survey of “people's beliefs, opinions about gender and career”. First, participants saw one of the four pie charts showing the fictitious gender distribution and salary information in a career which is not well-known. The information accompanying the career title and description constituted the key manipulations in a 2 (Salary) \times 2 (Gender Representation) between-subjects design. Specifically, the career fact sheet described the career as either male-dominated (84% male) or female-dominated (84% female), and described the median salary as either high (8,500,000 yen) or low (\$3,000,000 yen). After that, they completed the attributions measures and indicated their support for social action for that career. Participants next read one of the four vignettes about a fictitious target who wants to change jobs to the career of which they saw the chart in advance: 2 (Target's gender) \times 2 (Style: agentic vs. communal) between-subjects design. After reading that, participants rated about the target's masculine and feminine traits, likability, competence, and hireability. Lastly, participants completed measures of traditional gender role attitudes.

Consistent with the hypothesis, results showed a tendency to more strongly support the inclusion of women in male-dominated careers, compared to the inclusion of men in female-dominated careers. Also, this asymmetry in support for social action towards change is predicted by the perceived causes of gender imbalances in each career type.

目標表象活性化の反復がセルフコントロールの向上に与える影響の検討

An examination of the effect of repeating goal representation activation on improving self-control

研究代表者 沓澤 岳(社会学研究科社会心理学専攻)

指導教員 尾崎 由佳 (社会学部)

研究期間／2020年4月10日～2021年2月15日

キーワード／①自己統制 Self-control

②トレーニング Training

③目標表象 Goal representation

④誘惑 Temptation

⑤枠組み Bracketing

2020年度交付額／630,000円

研究発表／学会および口頭発表

1. 2021年度開催の日本社会心理学会にて発表予定(開催時期・開催期間は未定)
2. 22th Annual Convention of Society for Personality and Social Psychology. February 17-19, 2022. San Francisco, CA で発表予定

※両者共に抄録の登録期間外のため、予定している学会名および大会名のみを記載

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

セルフコントロール (self-control; 以降, SC) のトレーニングに関する研究では, あるひとつの自動的な反応の抑制を含む行為を繰り返すことで, SCを向上させることを明らかにしてきた(e.g., Gailliot et al.; 2007)。それでは, 自動的な反応の抑制以外の行為を繰り返すことでも同様にSCを向上させることは可能なのだろうか。そこで本研究は, 特に目標表象の活性化の反復に焦点を当て, これを含む行為を反復することがSCの向上に与える影響を検討した。

本研究の概要として, 1ヶ月間目標活性化を反復するトレーニングに従事し, その前後でSCの測定に取り組む。トレーニングの内容として, スマートフォンの使用を控えたい大学生を対象にスマートフォンを使用する度に, 使用頻度減少目標の活性化を行う。これにより, 後続のスマートフォン使用に葛藤を感じさせることが可能になる。介入の効果を調べるために, 統制条件として, トレーニング期間前に使用頻度減少目標を立ててもらいが, 調査期間は特に目標の活性化を行わない群を設け, 2つの条件でトレーニング期間前後のSC変化の程度を比較する。

2. 研究経過および成果の概要

本助成金の助成期間は, コロナウィルスによる緊急事態宣言期間並びに自粛要請期間であった。それに伴い, 対面での実験が不可であったため, オンラインを介した実験の実施が求められた。そこで事前に予備調査を実施し, オンライン上での介入実験の実施が可能であるかを調べた結果, オンライン上ではトレーニングの操作や測定課題への取り組みの教示が十分に行き渡らず, 実験を成

立させることが困難であった。そのため、当初予定していた実験の実施は見送ることが賢明であることが考えられた。

そこで、他のSC実行促進をもたらす要素を探索する目的として、コロナ禍における誘惑（大人数で飲み会や旅行など）の捉え方がSCの実行に与える影響に関するオンライン実験を実施した。これまでの先行研究(e.g., Sheldon & Fishbach, 2015)では、誘惑をより広く捉える（例：時間的・視覚的など）がSCの実行を促すことが示されている。また、この効果は事前に誘惑に対する予期をさせることにより、その効果が最も強く示されることが明らかとなっている。以上を総括すると、事前に誘惑に対する予期をした上で、コロナ禍における誘惑（大人数で飲み会や旅行など）を広く捉えることが、SCの実行を促すことが考えられる。

オンライン調査会社に登録している165名（男性78名、女性87名、平均年齢37.10歳、 $SD=11.69$ ）が調査に参加した。参加者は、a)誘惑予期&誘惑を広く捉える条件、b)誘惑予期&誘惑を狭く捉える条件、c)誘惑予期なし&誘惑を広く捉える条件、d)誘惑予期なし&誘惑を狭く捉える、の4つの条件のうち1つ割り振られ、アンケートに回答を行った。誘惑予期の方法として、誘惑予期条件の参加者は「ルールを無視した結果、得した経験（例：赤信号を無視して渡ったら、仕事に遅刻せず済んだ）」を書き出してもらい、誘惑予期なし条件の参加者は「事前の準備が有効だった経験（例：バックアップを取っていたことで不測の事態に対応できた）」を書き出した。SCの測定として、参加者はコロナ禍における道徳的に疑わしい行動（誘惑に相当）を今、もしくは半年後に行う場合にどれぐらいためらいを感じるかを評価した。誘惑の捉え方の操作として、広く捉える条件では“今”と“半年後”の評価を同時に行った。一方で狭く捉える条件では“今”と“半年後”を別々に評価した。本研究の仮説として、誘惑予期&誘惑を広く捉える条件が他の条件に比べ最もSCの実行を促すことが考えられた。その結果、誘惑の捉え方による違いがSCの実行に与える効果は確認されなかった。また、事前に誘惑の予期をすることによる、SC実行の促進効果も確認されなかった。

3. 今後の研究における課題・展望

本研究における課題として、まず実験操作が不適切であった可能性が考えられる。特に誘惑の予期の操作は、先行研究(Sheldon & Fishbach, 2015)を参考に行ったが、多くの参加者が「そのような経験はない」という回答をしていた。したがって、前提となっている実験操作が機能していなかった可能性がある。そこで今後は、より参加者に身近な経験に対する記述を求める必要があるだろう。

また、実施をした期間が緊急事態宣言期間と同時期となっていた。そのため、既に日本国民全体のコロナ禍における誘惑行動への自制心が非常に高くなり、この点が実験の操作よりも強い影響を及ぼしていた可能性がある。特にSCの実行に関連する一部の指標で天井効果（強いためらいを感じる）が見られた点からも、この見解が支持されていると言えよう。したがって今後同様の実験を行う際には、操作方法を変更する、実施期間を考慮するなどの必要性があるだろう。

今後の展望として、まず誘惑の捉え方によるSCの実行の促進に関して、先述した考察を参考に操作方法などを再考していくことが求められるだろう。また、本研究の当初の目的を達成するために、オンライン上での実験実施方法の確立が求められるだろう。現状を踏まえると、今後即時に対面の実験実施が再開される可能性は低い。そのため、オンライン上での介入実験の方法を確立することで、情勢に左右されない実験実施を行うことができるようにするべきであろう。これらの点を改善していくことで本研究が目的としていた自動的な反応の抑制以外の方法による、SCの介入方法に関して提言することができるようになることが考えられる。

Summary

Self-control can be improved by training. Prior research proved that repeating inhibition of automatic responses makes us improve our self-control. This study investigated whether self-control can be improved by methods different from previous studies. Especially, we focused on the effect of repeating goal representation activation for improving self-control.

Due to the COVID-19, however, it was difficult to conduct this experiment. Therefore, we conducted alternative survey to investigate another factor which facilitate self-control. In particular, we focused on the effect of temptations bracketing on facilitating self-control at the COVID-19 pandemic situation. In previous study proved, we can facilitate self-control, when we broad (e.g., temporal and visual) view of temptation. Additionally, this effect can be facilitated by anticipating temptations before confronting it. Taken together, it has the potential to facilitate self-control at the COVID-19 pandemic situation. (e.g., avoiding drinking at a pub), if person who broad viewed of temptation and anticipated temptations before confronting it.

One-hundred and sixty-five participants (78 males, 87 females, age: $M=37.10$, $SD=11.69$) were randomly assigned to one of the four conditions: a) anticipating temptations and broad bracketing of temptation, b) anticipating temptations and narrow bracketing of temptation, c) no anticipation of temptations and broad bracketing of temptation, d) no anticipation of temptations and narrow bracketing of temptation. We used two versions of priming for anticipating temptation. In one version (anticipating temptation condition), these participants were prompted to recall and write about a time in their lives “*when bending the rules was useful, at least in the short run.*” In an alternate version (no anticipating temptation condition), they were prompted to recall and write about a time in their lives “*when having a contingency (i.e., back-up) plan was useful.*” These conducted before measuring the self-control.

The self-control was measured by ratings how much feel conflict about an ethically questionable behavior at the COVID-19 pandemic situation (i.e., temptation), when if participants did it now and would do six months later. We used two types of questionnaire for manipulating of bracketing. In one type (broad bracketing condition), half of participants assessed these ratings at once. In an alternate version (narrow bracketing condition), half of participants assessed these ratings in isolation from each other. The hypothesis of this study is that Self-control can be facilitated by anticipating temptations and broad bracketing of temptation than others.

Results showed all conditions did not facilitate self-control. As a reason for these results that it was possible that these manipulations and survey period were inadequate. Future prospects in this study state that firstly, it needs to reconsider manipulations to investigate our hypotheses. Secondly, it needs to develop online experimental methods to investigate primary study goal. If those types of domains could be researched, more methods for effective training could result.

アナモックス反応における必須微量元素及び適正濃度条件の解明

Effect of Trace Element Limitation on Anammox Activity

研究代表者 大前 周平(理工学研究科 応用化学専攻)

指導教員 井坂 和一(理工学研究科 応用化学専攻)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①窒素 Nitrogen

②細菌 Bacteria

③排水処理 Wastewater Treatment

④アナモックス Anammox

⑤微量元素 Trace Element

2020 年度交付額／ 690,000 円

研究発表／学会および口頭発表

・大前周平（菅原大地，山崎宏史，見島伊織，井坂和一）微量元素制限が及ぼすアナモックス活性と N₂O 排出量への影響，日本水環境学会，2021 年 3 月発表予定

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

窒素排水に関する規制も年々厳しくなっており，水環境保全・規制強化の観点から窒素排水処理技術の開発は喫緊の課題である。現在，窒素処理としては硝化脱窒法が主流であるが，薬剤コストや余剰汚泥の大量発生、多大な電力消費などの様々な課題を抱えている。嫌気性アンモニア酸化（アナモックス）は 1990 年に発見された新しい窒素処理技術であり，NH₄⁺、NO₂⁻を基質として独立栄養的に N₂ ガスに無害化する反応である。硝化脱窒法と比較して処理効率が格段に高く，有機物添加などの薬剤コストや余剰汚泥発生量が大幅に削減されることから，次世代の窒素処理技術として期待されている。アナモックスプロセスを担うアナモックス細菌は，外部環境の影響を受けやすいという課題があり，pH や溶存酸素，有機物濃度など排水条件に注意する必要がある。中でも Fe や Zn などをはじめとした微量元素（TE）は，アナモックス細菌の代謝や増殖に不可欠な栄養素であり，微量元素濃度の適正化は重要な課題である。しかし，アナモックス反応における TE の制限影響に関する知見は無く，必須微量元素の特定及び添加条件の適正化の解明が必要である。

超純水に各微量元素を添加した合成排水を用い，数か月間の長期連続通水試験を実施した。このとき，添加する微量元素種（Fe,Cu,Zn,Co,B,Mn,Ni,Mo）8 種類のうち 1 元素ずつ制限し，必須微量元素の特定を行った。この際，アナモックス細菌の流出を防止するため，包括固定化技術により，アナモックス細菌をポリエチレングリコール系のゲル内部に固定化し，試験に用いた。なお，試験時間短縮のため，3 系並列で運転を行い，平行して運転した。また，微量元素の混入を防止するため，ガラスや金属製器具を排除し，アクリル製のリアクターを利用し，リアクターや合成排水を入れたタンクは，すべてクリーンブース内に設置した。本試験では，各微量元素の制限時には 0.001mg/L 以下を維持する。そのため精度管理が必須であり，ICP-MS を用いた微量元素分析を実施し，試験系の精度管理を適切に行った。

2. 研究経過および成果の概要

連続試験系において Zn 制限および回復試験を行った。運転開始時の Zn 添加濃度は 0.097 mg L^{-1} と設定した。運転開始 7 日目の担体当たりの窒素負荷が $4.4 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ となり、処理活性の上昇傾向が確認されたため Zn 添加濃度を 0 mg L^{-1} と設定し、制限試験を開始した。その後、処理活性に合わせて、窒素負荷を上げたところ運転開始 27 日目から 36 日目は処理水の NH_4^+ と NO_2^- の低下は顕著に確認されたが、運転開始 36 日目に処理水の $\text{NO}_2^- \text{--N}$ が 30.6 mg L^{-1} と最小値を得て以来、処理水の NO_2^- はほとんど一定の値を示した。その後、Zn 制限を継続したところ、運転開始 58 日目以降から、処理水の $\text{NO}_2^- \text{--N}$ は上昇傾向を示し、運転開始 70 日目の処理水の $\text{NO}_2^- \text{--N}$ は 69.2 mg L^{-1} まで上昇し、処理活性の低下が確認された。添加濃度 0 mg L^{-1} 条件において、原水中の Zn 濃度の測定結果は、 0.001 mg L^{-1} 以下になっており、試験中の Zn 制限が行われていた。

運転開始 70 日目より Zn 添加濃度 0.005 mg L^{-1} に設定し、運転開始 80 日目までこの設定で運転した。運転開始 71 日目より 80 日目で処理水の NO_2^- は、変化がなく、活性の低下止まらなかった。71 日目から 80 日目の処理水の $\text{NO}_2^- \text{--N}$: 62.3 mg L^{-1} から 79.6 mg L^{-1} に上昇した。添加濃度 0.005 mg L^{-1} 条件において、原水中の Zn 濃度の測定結果は、平均で 0.004 mg L^{-1} になっており、添加濃度とほとんど同等であった。

また、Zn 添加濃度を 0.005 mg L^{-1} にしても活性の回復傾向が確認されなかったため、運転開始 80 日目より 114 日まで、Zn 添加濃度を 0.020 mg L^{-1} に設定した。運転開始 83 日目より 90 日目で処理水の NO_2^- と NH_4^+ は、低下していき、処理活性の上昇が確認された。運転開始 83 日目より 95 日目の処理水の $\text{NO}_2^- \text{--N}$: 72.0 mg L^{-1} から 24.0 mg L^{-1} に減少し、処理活性の回復が確認された。その後も処理水の濃度は低い値を示し、安定して高い処理活性を維持した。添加濃度 0.020 mg L^{-1} 条件において、原水中の Zn 濃度の測定結果は、平均で 0.023 mg L^{-1} になっており、添加濃度とほとんど同等であった。この結果より処理性能の維持には、Zn 添加濃度 0.020 mg L^{-1} 必要であることが分かった。また、同様に Cu, Fe 制限回復試験を行った結果、Cu, Fe 制限下ではアナモックス活性の低下が確認され、Cu は 0.020 mg L^{-1} 、Fe は 0.020 mg L^{-1} で活性の回復し、最適添加濃度であった。

3. 今後の研究における課題または問題点

今後の課題については、コロナウイルス流行による緊急事態宣言の発令下であっても、微量元素影響の 3 種の試験を完了した。今後残り 5 種について試験をすることで、必須微量元素の種類および濃度決定を完了する。また、微量金属制限を行うと各種によって、温室効果ガスである亜酸化窒素 (N_2O) の発生の仕方に差異があり、この影響についてさらに詳細に評価する必要がある。

Summary

Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) is a novel nitrogen wastewater treatment process, which is one of the cost effective way compared with the conventional nitrification-denitrification process. Recently, anammox process is to put into practical use such as digester supernatant treatment. In the future, anammox process is also expected in application to various industrial wastewater such as semiconductor or ammonia synthesis wastewater. However, anammox activity may decrease due to lack of Trace Elements (TE), since industrial nitrogen wastewater frequently includes ultra-pure water. Trace elements are indispensable nutrients in the metabolism and growth of microorganisms, and mainly act as coenzymes and cofactors of enzymes. It has been

suggested that it requires the addition of nine trace elements such as Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Mo, Co, B and Se for the cultivation of anammox bacteria. Fe is an important element in anammox metabolism, and nitrite reductase (NirS), hydrazine synthase (HS) and hydrazine oxidoreductase (HZO) are known to contain heme c in the active site. Zn is also essential component of enzymes and coenzymes, it is involved in metal protease FTS Hare and Zn-type dehydrogenase.

In recent years, the effects of trace metals at high concentration on anammox activity has been mainly reported. But as far as our best knowledge, there are no reports on essential trace elements and its minimum concentration conditions to anammox activity, so it is necessary to clarify the addition conditions.

In the present study, we operated lab-scale anammox reactors using gel entrapping technology in continuous feeding test. In order to control each trace element concentration, ultra-pure water was used as synthetic wastewater. And then, we evaluated the effect of Zn, Cu and Fe limitation on anammox activity because these metals are mainly used for the cultivation of anammox bacteria. We also investigated their concentration levels for the stable operation of the anammox process.

Effect of Zn limitation on effluent nitrogen concentrations were investigated. Zn addition in the influent was stopped from day 7. Consequently, nitrogen removal performance was decreased from day 27 and the effluent nitrite concentration was increased up to 69.2 mg-N L⁻¹. The increase of effluent nitrite concentration was stopped when influent Zn concentration was set at 5 µg L⁻¹, however nitrogen removal performance was not recovered. When influent Zn concentration was set at 20 µg L⁻¹, effluent nitrite concentration was decreased to 20 µg L⁻¹, indicating recovery of anammox activity. After that, stable nitrogen removal performance was observed. These results suggested that Zn is required to maintain the anammox activity and influent Zn concentration of 20 µg L⁻¹ is required to maintain anammox activity.

Effects of Cu and Fe limitation on the anammox activity were also investigated, individually. As a result, Cu and Fe were both required for maintaining the anammox activity and 20 and 100 µg L⁻¹ were required to obtain stable nitrogen removal performance, respectively.

カビ毒トリコテセンの MS/MS ライブラリーの作成

～カビ毒汚染小麦から食の安全を守る～

Creating a MS / MS library of mycotoxin trichothecenes ～For protection of food safety against mycotoxins-contaminated wheat～

研究代表者 小豆畑 隼(理工学研究科 応用科学専攻)

指導教員 安藤 直子

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①T-2 toxin 類縁体

②アンモニア処理

③15-deacetyl NEO

④15-deacetyl T-2 toxin

⑤毒性評価

2020 年度交付額／ 630,000 円

研究発表／学会および口頭発表

1. 安藤 直子、松井 宏介、鈴木 将、貞松 和樹、小豆畑 隼、岡田 彩希、松尾 元暉、武田 博音、小泉 慶明、木村 真「トリコテセン耐性に関わる側鎖修飾と異種異属のトリコテセン生産菌を利用したトリコテセンライブラリーの構築」日本マイコトキシン学会誌 70 巻 2 号 p. 67-74.(2020) DOI <https://doi.org/10.2520/myco.70-2-3>
2. 小豆畑 隼、安藤 華蓮、滝田 和己、水口 拓海、安藤 直子「A 型トリコテセンのアンモニア処理による T-2 toxin 類縁体の創製」2020 年度工業技術研究所研究発表会 東洋大学川越キャンパス (2021 年 2 月 24-25 日)
3. 松尾 元暉、小豆畑 隼、安藤 華蓮、安藤 直子「トリコテセン C-4 位アセチル化酵素探索のための *Trichoderma brevicompactum* の生産物解析」2020 年度工業技術研究所研究発表会 東洋大学川越キャンパス (2021 年 2 月 24-25 日)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

トリコテセンとは *Fusarium* 属菌などの糸状菌が生産するカビ毒の一群であり、重要穀類を汚染するため、食の安全を脅かす存在として恐れられている。糸状菌の進化は早いため、新規のトリコテセンの出現も報告されている。*Fusarium sporotrichioides* の生産する T-2 toxin の毒性は強く、その類縁体の存在は警戒すべきものと言える。そこで新規トリコテセン創製、主に T-2 toxin 類縁体の創製のために、*F. sporotrichioides* の生合成経路の利用することを考えた。圃場で見つかっているトリコテセン類で、構造決定はされていないが、MS 解析より存在を示唆されている複数の T-2 toxin 類縁体を中心にターゲットとした。

本研究では、カビ毒トリコテセンの MS/MS ライブラリーの作成のため、A 型トリコテセンである T-2

toxin を生産し、これをスタンダードとした。培養方法は SYEP 培地に菌糸を植菌し、7 日間培養した。次に、*Tri13* 酵素遺伝子破壊株 ($Fs\Delta Tri13$ 株) を GYEP 培地で培養し 4-deoxy T-2 toxin を生産し、*Tri16* 酵素遺伝子破壊株 ($Fs\Delta Tri16$ 株) を GYEP 培地で培養し neosolaniol (NEO) を生産した。さらに feeding 培養によって *Tri5* 酵素遺伝子破壊株 ($Fs\Delta Tri5$ 株) と *Tri5, Tri13* 酵素遺伝子二重破壊株 ($Fs\Delta Tri5\Delta Tri13$ 株) をそれぞれ YG-60 培地に植菌し、基質として掻き取りによって精製した 7-hydroxyisotricodermin (7-HIT) をそれぞれ 1 mg 添加し、T-2 toxin の C-7 位に水酸基がついた非天然型トリコテセンである 7-hydroxy T-2 toxin (7-H T-2 toxin) 及び、T-2 toxin の C-4 位が外れて C-7 位に水酸基がついた非天然型トリコテセンである 4-deoxy-7-hydroxy T-2 toxin (4-deoxy-7-H T-2 toxin) の生産を行った。さらに 4-deoxy-7-H T-2 toxin は過去の研究において構造決定がされていないため、サンプルを大量に集め NMR 解析によって構造決定を行った。培養によって回収したこれらのサンプルを用いて毒性評価を行いそれぞれの毒性の比較を行った。

次に、生産した NEO と T-2 toxin を用いたアンモニア処理により、本研究室ではライブラリーにない A 型トリコテセンであり且つ T-2 toxin 類縁体である 15-deacetyl NEO (4-A T-2 tetraol) と 15-deacetyl T-2 toxin (isoHT-2 toxin) の創製を試みた。反応条件はアンモニアの最終濃度を 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%、反応時間を 0, 0.5, 1, 3, 6, 24, 48h、反応温度を 37°C として反応を行った。各濃度、各時間で少量抽出後、TLC、HPLC、LC-MS/MS 解析を行い、生産物及び変換率を確認した。

2. 研究経過および成果の概要

精製した 7-HIT を用いて添加実験を行い、HPLC 解析によりこれまで得られなかったピークが確認された。このピークを収集し、LC-MS/MS で解析した結果、4-deoxy-7-H T-2 toxin と m/z が一致したピークの MS/MS パターンを得られた。そのパターンは 7-H T-2 toxin と 4-deoxy T-2 toxin と比較したところ、矛盾が見られず、さらに NMR 解析が行える量(今回は 4.5 mg)を集め、精製し解析を行った。その結果、4-deoxy-7-H T-2 toxin と同定することができた。次に、同定した 4-deoxy-7-H T-2 toxin の毒性評価を行った結果、4-deoxy-7-H T-2 toxin の IC_{50} は 0.988 μM であった。さらに生産した A 型トリコテセンと比較したところ毒性の強さは、T-2 toxin > 7-H T-2 toxin > NEO > 4-deoxy T-2 toxin > 3-A NEO > 4-deoxy-7-H T-2 toxin であった。この結果から C-4 位及びイソバレル基が外れる、または C-7 位に水酸基が入るのみだけでなく、C-4 位が外れて、C-7 位に水酸基が入るとさらに弱毒化できることがわかった。

次に、今回行ったアンモニア処理による脱アシル化反応では NEO は TLC 解析により、スタンダードスポットの下に新たなスポットが確認された。HPLC 解析では、NEO の tR の前と後ろに主要なピークが見られ、LC-MS/MS で解析した結果、NEO より前に溶出されたピークは T-2 tetraol にアセチル基がついた化合物であり、そのパターンは T-2 triol (=15-acetyl T-2 tetraol) と比較したところ MS/MS パターンが一致しなかった為、この物質は 4-acetyl T-2 tetraol と考えられた。一方、T-2 toxin のアンモニア処理では TLC 解析により、スタンダードスポットの下に新たなスポットが確認され、HPLC 解析では T-2 toxin の tR よりも前にピークが出現し、LC-MS/MS で解析した結果、HT-2 toxin (4-deacetyl T-2 toxin) と同じ m/z の MS ピークをもつものが得られた。HT-2 toxin 比較したところ、MS/MS パターンが一致しなかった為、15-deacetyl T-2 toxin と考えられた。これらの結果から、NEO のアンモニア処理により 4-acetyl T-2 tetraol が、T-2 toxin のアンモニア処理により 15-deacetyl T-2 toxin が生産されたと考えら

れる。また、HPLCの結果から NEO から 15-deacetyl NEO に変換する条最適条件はアンモニア濃度が 0.5%の 24h、また、T-2 toxin から 15-deacetyl T-2 toxin に変換する条最適条件はアンモニア濃度が 2%で 24h であった。

3. 今後の研究における課題または問題点

今後の課題として、未だ構造決定及び毒性評価がされていない T-2 toxin 類縁体の模索と創製を繰り返し行い、既存のサンプルと比較し、ライブラリーに追加していくことで食の安全に寄与していくことを目指す。アンモニア処理による T-2 toxin 類縁体の生産では HPLC と LC-MS/MS 解析により NEO と T-2 toxin がそれぞれ 15-deacetyl NEO、15-deacetyl T-2 toxin に変換されたと考えられる。しかし、NMR 解析により構造決定を行っていないため、サンプルを集めて構造を決定する必要がある。また構造決定後、毒性評価を行い弱毒化されているのか検証を行っていく。

Summary

Trichothecenes, a group of notorious mycotoxins, are secondary metabolites produced when important grains are infected by filamentous fungi such as *Fusarium* spp. They are sesquiterpenes which has a 12,13-epoxytrichothec-9-ene skeleton in common, and are mainly divided into A, B, C, and D types, due to their difference in chemical structures. The order of their toxicities is Type D > Type A > Type B > Type C. They are toxic to humans and other animals, and it is difficult to detoxify or remove them by cooking because these toxins are highly resistant to heat. Even if the mold is killed by pesticides or other treatments, the mycotoxins often remain in food or feed. The main symptoms caused by these mycotoxins are alimentary toxic aleukia, diarrhea, vomiting, etc.

Trichothecenes are produced by various biosynthetic pathways, and contributing enzymes are called TRI enzymes. In recent years, novel trichothecenes have been reported in fields, and people related to agriculture and food safety are seriously concerned about the emergence of these new toxins. It is generally believed that their emergence is due to the evolution of the biosynthetic enzyme genes. Therefore, if new trichothecenes that may appear in the future can be predicted beforehand, it is very useful to obtain their structural, biochemical, and toxicity information in advance. Thus, in this study, we attempted to create a trichothecene library which contains MS/MS spectrum and toxicity information. Once such a database is developed, it should be much easier to identify novel trichothecenes and prepare the treatment in early stage when they appear in a field.

In our previous study, we have succeeded in producing 7-hydroxy T-2 toxin artificially by feeding 7-hydroxyisotrichodermin (7-HIT) to *F. sporotrichioides* Δ Tri5, which lacks the biosynthetic TRI enzyme catalyzing the first reaction. In this study, we attempted to produce 4-deoxy 7-hydroxy T-2 toxin (4-deoxy-7-H T-2 toxin) by feeding 7-HIT to *F. sporotrichioides* Δ Tri5 Δ Tri13, which lacks not only *Tri5*, but also *Tri13* which encodes trichothecene hydroxylase at C-4 position. It was much less efficient to obtain 4-deoxy-7-H T-2 toxin than 7-hydroxy T-2 toxin, because of lack of hydroxy group at C-4 position, but we obtained enough amount of 4-deoxy-7-hydroxy T-2 toxin for NMR analysis.

In addition, we also attempted to produce other derivatives of T-2 toxin by ammonium treatment.

We changed the ammonia concentration and reaction time and tried to find out which condition is efficient to produce novel trichothecenes. In the end, we could obtain isoHT-2 toxin, 4-deaceylated T-2 toxin by ammonium treatment with T-2 toxin, and 4-acetyl T-2 tetraol by the same treatment with neosolaniol. We will continue to produce more T-2 toxin derivatives to improve our trichothecene library.

紫外線抵抗性好塩性古細菌の紫外線耐性評価及び諸資質解析

Characterization and analysis of ultraviolet resistant Haloarchaea

研究代表者 小宮山 寿紗(理工学研究科応用化学専攻)

指導教員 峯岸 宏明

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①好塩性古細菌 Haloarchaea

②古細菌 Archaea

③紫外線抵抗性 ultraviolet resistant

④DNA 修復 DNA repair

⑤DNA 変異 DNA mutation

2020 年度交付額／ 630,000 円

研究発表／学会および口頭発表

○：発表者

- 1) ○小宮山 寿紗、嶋根 康弘、峯岸 宏明：P07、紫外線抵抗性株 *Halorubrum* sp. 176-9, sp. 590-2 の諸性質解析、第 21 回極限環境微生物学会、2020 年 10 月 31-11 月 1 日 (Zoom オンライン大会)
- 2) ○小宮山 寿紗、嶋根 康弘、峯岸 宏明：好塩性古細菌 *Halorubrum* sp. 176-9, 590-2 の UV 耐性メカニズム解析、2021 年度日本農芸化学会、2021 年 3 月 18-21 日予定 (Zoom オンライン大会)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

国内外の市販塩サンプル 810 種類を分離源として、2 段階のスクリーニングを行った。1 次スクリーニングでは、固体培地に塩サンプルを 100 μ L 塗布し、UV-C 曝露を行い、コロニーを形成した株を 1 次候補株とした。2 次スクリーニングでは 1 次候補株を液体培養し、培養液の OD₆₀₀ を 1.5 以下に調整した。この培養液を固体培地に塗布して 1 次スクリーニングと同様に UV-C 曝露させた。2 次スクリーニングでも生存した菌株を 2 次候補株とした。2 次候補株からさらに紫外線抵抗性度が高いものを選定するために、定性的な紫外線曝露試験を行い、菌株を選定した。選定株について NRC-1 株と同条件の紫外線曝露を行ったのちに明・暗培養下による抵抗性確認を行い、NRC-1 株を基準として紫外線抵抗性が優れた 2 株を選出し、これらを研究対象とした。

最初に、得られた 2 株について系統学的位置を確認するために、16S rRNA 遺伝子および *rpoB* 遺伝子の塩基配列解析を行った。これらの結果より、2 株のうち 590-2 株は新種の菌株である可能性が高いことから規定の分類同定試験を実施した。

次に、DNA 変異原である紫外線曝露に抵抗性を示した 2 株と NRC-1 株について、紫外線以外の DNA 変異原抵抗性を確認するためにブレオマイシンとマイトマイシン C を用いた抗生物質耐性試験を実施した。まず、50 μ g/mL, 5.0 μ g/mL のブレオマイシン水溶液と、0.3 mg/mL, 10 μ g/mL のマイトマイシン C 水溶液を調製した。これら水溶液をペーパーディスク法によって 2 株の耐性試験を行った。この結果をもとに、抗生物質含有培地 CFU 耐性確認試験を行った。900 μ L の液体培地に 100 μ L の培養液を加えて 10 倍希釈系列 ($1 \times 10^0 \sim 10^5$ 希釈) を作製した。3.5 ϕ シャーレにあらかじめ濃度を振ったブレオマイシン水溶液 (0, 10, 20, 30, 40, 50 μ g/mL), マイトマイシン C 水溶液 (0, 1, 3, 5, 7 μ g/mL)

を 100 μL 滴加し、そこにオートクレーブ後室温程度まで冷ました固体培地を 4.9 mL ずつ加えた。固体培地が完全に固化したことを確認し、希釈培養液を 5 μL ずつ 3 スポットした。希釈培養液を完全に乾燥させ、37°C で 2 週間静置培養した。培養後、コロニーの形成を目視で確認した。

次に紫外線曝露後修復としてヌクレオチド除去修復に関わる *uvr* 遺伝子を 2 株が有するかどうかを PCR およびキャピラリー電気泳動法による遺伝子塩基配列解析で確認した。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) データをもとに、各 *uvr* 遺伝子 PCR 増幅用プライマーを設計し、このプライマーを用いて PCR による遺伝子増幅を行った。増幅遺伝子精製を行い、キャピラリー電気泳動法によって塩基配列解析を行った。解析の結果を BLAST で相同性検索し、既知の *uvr* 遺伝子との相同性を確認した。

また紫外線抵抗性だけでなく、過塩素酸塩類耐性試験を実施した。液体培地に 0, 200, 400, 600, 800 および 1000 mM の NaClO_4 を加え、分離株を培養し、生存曲線を作図した。

2. 研究経過および成果の概要

市販塩サンプル 810 種より紫外線抵抗性好塩性古細菌の分離を試みた結果、2 次スクリーニングで 60 株の候補株を獲得した。60 株の中からさらに紫外線抵抗性試験で 13 株を選択し、さらに明・暗培養下による抵抗性確認でフランス産海水塩「セル マリン ムリュ」から 176-9 株、日本（北海道）産海水塩「釜炊き一番塩」から 590-2 株の 2 株が優れた紫外線抵抗性能を有していることが分かった、また 2 株の 16S rRNA 遺伝子、*rpoB* 遺伝子塩基配列解析の結果、両株とも *Halorubrum* 属に近縁の株であり、590-2 株は新種の可能性が示唆された。

ブレオマイシン、マイトマイシン抵抗性試験の結果、176-9 株、590-2 株、NRC-1 株ともブレオマイシンには耐性を示し、マイトマイシンには感受性を示した。好塩性古細菌がマイトマイシンには感受性を示すのではないかと考察する。これは同時に好塩性古細菌がマイトマイシンの DNA 変異活性である、DNA 鎖架橋形成に抵抗性メカニズムを有さないことを示唆している。またブレオマイシン耐性を示すことから、ブレオマイシンの DNA 変異活性である DNA 鎖切断活性には優れた修復機構を有すると考察できる。

176-9 株および 590-2 株がヌクレオチド除去修復に関わる *uvr* 遺伝子をゲノム上に保持しているかを独自に設計したプライマーセットを用いて確認した。その結果、分離株 2 株とも *Halorubrum* 属に近縁の *uvrA*, *B*, *C*, *D* 遺伝子を有していることが分かった。また系統解析に基づいて構築した系統樹から、好塩性古細菌の *uvr* 遺伝子が目レベルでクラスター形成をすることが判明し、これは *Halobacteria* 綱の *uvr* 遺伝子は進化的保存性が高いことを示唆している。

過塩素酸塩類耐性試験では、176-9 株は 200 mM の NaClO_4 含有培地で増殖したものの、それ以上の NaClO_4 濃度では生育確認できなかった。しかし、590-2 株は 400 mM の NaClO_4 含有培地で増殖し、わずかながら 600 mM の NaClO_4 含有培地でも生育を確認することができた。

本研究の結果、既知株と比べて高い紫外線抵抗性／修復機構を有する紫外線抵抗性好塩性古細菌の分離株 2 株を市販塩から分離することに成功し、これらには、紫外線抵抗性メカニズムを示す *uvr* 遺伝子の存在を確認することができた。また両株ともにブレオマイシン耐性を有する事から、DNA 切断活性に高い抵抗性を有することを確認できた。

3. 今後の研究における課題または問題点

176-9 株、590-2 株ともに *uvr* 遺伝子を有していることが判明したが、既知の好塩性古細菌にも

uvr 遺伝子は見出されている。しかし、176-9 株と 590-2 株が既知の好塩性古細菌よりもなぜ強い紫外線抵抗性を示しているのかは未解析であり、今後の課題である。また、マイトマイシンには感受性を示すことから、架橋形成活性に感受的であることが分かったが、この活性に抵抗性を示す好塩性古細菌の存在についても要検討であると考ええる。

Summary

Halophilic archaea are microorganisms belonging to Halobacteria class that are isolated from high salt environments such as salt farms and salt lakes. Halophilic archaea are also known to be drought resistant, radiation and ultraviolet light resistant, and in recent years have been noted as polyextremophiles. Halobacterium salinarum NRC-1 is known to be resistant to ultraviolet light and radiation.

Ultraviolet light is non-ionizing radiation of invisible light having a wavelength of about 100 to 400 nm. Ultraviolet rays are classified into three types: UV-A for 315-400 nm, UV-B for 280-315 nm, and UV-C for 100-280 nm. Generally, UV-A and UV-B cause oxidative damage, and UV-C directly damages DNA. Among them, 253.7 nm, which is UV-C, is called germicidal line, and it is the ultraviolet ray with the highest germicidal ability. Sterilization refers to the fact that the nucleic acid material absorbs base radiation due to absorption of ultraviolet radiation, which causes replication to stop at cell division and to stop the organism from growing and to die and inactivate. In this study, we aimed to isolate new UV-resistant halophilic archaea and characterization of UV-resistant of isolated strains.

UV-resistant haloarchaea strains isolated from 810 types of commercially available salt samples. The isolated strain was tested UV resistance test. The test was that compared isolated strain to Halobacterium salinarum strain NRC-1. On the test of the isolates, strain 176-9 had strong UV resistance better than NRC-1. That suggest strain 176-9 had strong dark repair to DNA damage from UV-C, B than NRC-1. And strain 590-2 had fast repair of UV-B damage better than test strains. That repair speed was 7 days, against others speed was 14 days. Studies on the viability of these against mutagens that induce DNA damage confirmed resistance to bleomycin, suggesting resistance to DNA double strand break activity. But these sensitive to mitomycin C, suggesting sensitive to interstrand cross-links (ICLs). On the other hand, strain 590-2 was also resistant to 600 mM perchlorates than strain 176-9 and NRC-1.

The *uvr* genes, related to the ultraviolet-induced damage repair, were found from these strains. And furthermore, Halobacteria classes *uvr* genes was establish cluster in unit of order. That suggested it is that evolutionary conservation is highly. The strain 590-2 was estimated a new species of the genus Halorubrum by the 16S rRNA gene and *rpoB'* gene analysis.

As a future works, we would like to analyze the reason why the two strains have a stronger UV resistance mechanism than other Haloarchaea.

治水構造物の河川環境機能評価 ―魚類の生息状況を例に―

Evaluation of river environment function of flood control structures

研究代表者 明間 大輝(理工学研究科 都市環境デザイン専攻)

指導教員 青木 宗之

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①杭水制 *pile dike*

②根固め工 *foot protection*

③遊泳行動 *fish behavior*

④治水構造物 *flood control structures*

⑤ウグイ *Tribolodon hakonensis*

2020 年度交付額／560,000 円

研究発表／学会および口頭発表

【論文（査読あり）】

明間大輝，青木宗之：平常時における杭水制周辺でのウグイの遊泳行動について，土木学会論文集 G（環境），Vol.76, No.7, pp.III_19-III_25, 2020.

Daiki AKEMA and Muneyuki AOKI : THE FLOW CHARACTERISTICS AROUND THE SPUR DIKES AND SWIMMING BEHAVIOR OF FISH TO IT, Proceedings of the 22nd IAHR-APD Congress 2020, Vol.22, 3-1-14, pp.1-8, 2020.

【口頭発表（○が発表者）】

○明間大輝，青木宗之：平常時における杭水制周辺でのウグイの遊泳行動について，土木学会第 56 回環境工学フォーラム，A03, 2020.12，オンライン.

○細川真央，村松里穂，新田将之，青木宗之，明間大輝：越流状態の角柱群周辺の流れとウグイの遊泳行動について，土木学会関東支部第 48 回技術研究発表会，II-64, 2021.3，オンライン.

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

河川には，数多くの治水構造物が存在する．治水構造物は，もちろん治水目的の構造物ではあるが，河川法改正等の時代の変化を経て，治水だけでなく，利水・環境といった機能も求められるようになってきた．そのなかで，流れが直線化した河川に水制を設置することで，自然に近い淵を形成し，魚の生息密度も天然の淵と同様の成果であったという研究報告がなされた．主に洪水時にその機能を発揮する治水構造物ではあるが，常時，環境機能を有している可能性が示唆された．そこで本研究では，魚類の生息密度にも影響する水制と機能の似ている根固め工に着目し，その生息状況や遊泳行動に着目することとした．

本研究室において，杭水制と魚を用いた研究は行われてきているが，実験に用いた疑似杭水制の直径が 0.5(cm)と魚の体副よりも小さく，十分に隠れられる状況ではなかった．また，根固め工のような角柱・水が越流する構造物と魚の遊泳行動に関する研究は，これまでなされてきていなかっ

た。そこで本研究では、治水構造物の環境機能評価として、杭水制と根固め工が有する魚類の生息場評価をより明確に実施することを目的とした。そのために、先行研究よりも直径の大きい円柱と角柱を用いて実魚を用いた挙動実験と水理実験を行った。

実験は、幅 80(cm)の水路を用い、300(cm)の観測区間を設け、右岸側に 200(cm)の疑似構造物設置区間を設けて行った。疑似杭水制には、直径 4.8(cm)、高さ 15(cm)の円柱を、疑似根固め工には、一辺 5(cm)の角柱を用いた。実験流量は 30(l/s)とし、魚が無理なく遊泳できる状況とした。本研究では、この状況を平常時と想定している。挙動実験では、体長 6.7~10.2(cm) (平均体長 8.6(cm)) のウグイを用いて、5 分間流況に慣れさせた後、30 分間観測区間を遊泳させ、その様子をビデオカメラで撮影した。水理実験では、流速と水深を細かく測定した。

2. 研究経過および成果の概要

円柱直径の小さい先行研究と本研究結果を比較すると、魚が存在した箇所が円柱の直下流であったことと、その場の流速が、魚が長時間遊泳可能な持続速度以下であったことは、同様の結果であった。一方で、魚が円柱群内に存在した平均時間は、先行研究よりも 6 倍長い結果であった。これは、円柱直径が大きくなったことで、円柱 1 本あたりに利用できる魚の尾数が増加したためだと考えられる。そのため、円柱直径が魚の体高よりも小さいと、局所的な流れに対する遊泳行動はわかるものの、魚の時間的な遊泳行動の変化は十分に観られない可能性があることが示唆された。

水が越流する角柱構造物を用いた実験においても、魚が存在した箇所とその場の流速は、円柱を用いた実験と変わりなかった。一方で、魚が疑似構造物群内に存在した平均時間は、円柱実験の 1/3 と短い結果であった。これは、円と角の違いではなく、角柱は水が越流していたため、疑似構造物の直下流においても水位によっては局所的に流速が速くなっていた。その流れを感知した魚は、よく移動しており、その場に存在し続けにくい状況であったと考えられる。

また、円柱・角柱のどちらの実験においても、疑似構造物を千鳥・整列配列と配列を変化させて実験を行った。その結果、配列によっては魚の遊泳行動に違いがみられず、疑似構造物群内に存在した時間も配列によっては変わらなかった。これは、どちらの配列においても縦断方向の疑似構造物設置間隔が、魚の体長よりも広く、魚がストレスなく存在しやすい状況であったためだと考えられる。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究は 300(cm)の観測区間内で行い、その最下流で魚を馴致させ放流した。しかし、馴致箇所内の流速差が大きく、実験開始後の魚の遊泳行動に影響する懸念があった。そのため、途中から左右岸に放流箇所をずらして実験をおこなった。その結果放流箇所によって疑似構造物群内に存在した平均時間に明確な差が生まれた。左右岸の放流箇所内に流速差はないものの、左岸と右岸では疑似構造物群の影響で流速に差があり、馴致状況で遊泳行動に差が生じた可能性がある。より、全体的な自然に近い遊泳行動を観るためには、疑似構造物による影響の少ないより下流から放流することが望まれる可能性がある。

また、本研究では主に流速に対する魚の遊泳行動に着目していたが、設置間隔での違いのような、流速以外の要因が考えられた。本実験では、特に光の加減や音など、その他自然的要因を加味していないので、そういった要因や、平常時だけでなく洪水時での状況を加味していくのが、今後の課題である。

Summary

This study focused on the fish behavior. The purposes of this study were to clarify the environmental functions of the spur dikes and the foot protection in normal flow. The columns and the cubes were used for the experiments. The experiments were to observe the behavior of real fish, and to measure the flow velocity and the water depth. The results are shown below. 1) The fish exited in same place every case. 2) There was a difference in the time the fish stayed in the pseudo-structure group depending on the discharge areas. Because there was a difference in the flow velocity at the discharge areas. 3) The time for the fish to stay in the group of columns was three times longer than for the group of cubes. Because the cubes are overflowing, a fast flow was locally formed. 4) The pseudo structure installation interval in the identical y-axis was wider than the fish's length, which made it easier for the fish to present in the pseudo structure group, we presume.

The problem is that the difference in flow velocity within the discharge points is large and affects the swimming behavior of the fish after the start of the experiment. Therefore, the experiment was conducted by shifting the discharge points to the left and right banks from the middle. As a result, there was a clear difference in the average time that existed in the pseudo-structure group depending on the release location. It is considered that this is because the flow velocity difference occurred on the left and right banks due to the influence of the pseudo structure. In order to observe the swimming behavior closer to the whole nature, it may be desirable to release it from the downstream where the influence of the pseudo structure is small.

In this study, we mainly focused on the swimming behavior of the fish with respect to the flow velocity. However, factors other than the flow velocity, such as the difference in the installation interval, were considered. In this experiment, other natural factors such as the amount of light and sound were not taken into consideration. The challenge for the future is to take into account such factors and to take into account not only normal flow but also floods.

トレッドミル走運動による発育期ラット膝蓋靱帯付着部の構造変化に対する

アイシングの影響

Effects of cooling by ice packs on structural changes of patellar tendon attaching-portion with down-hill running in growing rats

研究代表者 水藤 飛来(ライフデザイン学研究科健康スポーツ学専攻)

指導教員 大迫 正文

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①脛骨粗面 Tibial tuberosity

②冷却刺激 Cooling stimulation

③遠心性収縮 Eccentric contraction

④軟骨細胞 Chondrocyte

⑤石灰化 Calcification

2020 年度交付額／ 700,000 円

研究発表／学会および口頭発表

・ Suito H., Zeng,X.Q., Minamizono W., Fujikawa K., Nakai S., Suzuki T., Ohsako M.: Effects of cooling by ice packs on structural changes of patellar tendon attaching-portion with down-hill running in growing rats:European Collage of Sport Science(Sevilla)October,2020.

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

wistar 系雄性ラット 24 匹を用い、運動群 (EX) と対照群 (CO) に分類した。さらに、EX は下り走行のみを行う群 (RU) と下り走行後に冷却刺激を行う群 (RC) に分類し、各群 8 匹に設定した。下り走行の設定は先行研究から 17m/min、傾斜角度-15 度に設定し、60 分/日、5 日/週の実験を 3 週間行った。また、RU には毎回の走行運動終了時に麻酔下にてアイスパックを用いた冷却刺激を 1 回 20 分実施した。アイスパックは 0.3℃から 1.3℃に設定し、冷却部位の皮膚状態を 5 分毎に確認しながら実験を行った。各実験期間終了後、炭酸ガス吸引によって安楽死させた後、脛骨近位を摘出し、組織学的に観察した。

2. 研究経過および成果の概要

i. 研究経過

実験および組織学的な解析は終了し、国際学会にてその成果を報告している。しかしながら、コロナウイルスの影響によって web 開催となったため、本来使用する予定であった旅費を、組織学的な解析のために用いる消耗品に使用した。また、実験動物は動物倫理の観点から、別の実験と共同で用いたため実際の使用数とは異なっている。

ii .成果の概要

<背景と目的>

発育期の脛骨粗面に多く発生するスポーツ傷害の1つに **Osgood-Schlatter** 病が挙げられる。OSD は、発育期の下肢骨に最も多く発生する傷害であり、その治療には長期を要する。その治療の中には冷却刺激が臨床現場で多く用いられるが、その刺激が脛骨粗面の構造に与える影響は明らかにされていない。そこで本研究は自身で作成した **OSD** 様モデルラットに対し冷却刺激を行い、その影響を組織学的に明らかにすることを目的とした。

<結果および考察>

・ポリクローム染色および **type II collagen** 免疫染色

ポリクローム染色は線維の密度によって染色性が異なり、その差を視覚的に認知する染色法である。その結果はいずれの群も脛骨粗面は膝蓋靱帯の線維が埋入されている浅層と硝子軟骨で構成されている深層部分が観察された。その深層に着目すると、**CO** と **ED** の染色性は同程度であったが **RC** は骨端の海綿骨と同様の染色性が観察された。(図 1) また、**type II collagen** 免疫染色の結果は、**RU** において広く陽性反応が観察されたが、**RC** ではほとんど観察されなかった。

type II collagen は硝子軟骨に最も多く存在し、未石灰化部位に多く存在する線維である。一方、下り走行は大腿四頭筋の遠心性収縮によってその運動が成され、その収縮力は過剰に脛骨粗面を牽引するため **OSD** の発生要因の一つとして考えられている。これらのことから、下り走行によって生じる牽引力は脛骨粗面を強く牽引し、脛骨粗面深層に **type II collagen** を多く分泌することで、深層の軟骨の石灰化を抑制し、そのメカニズムは冷却刺激によって抑制されたと考えられる。

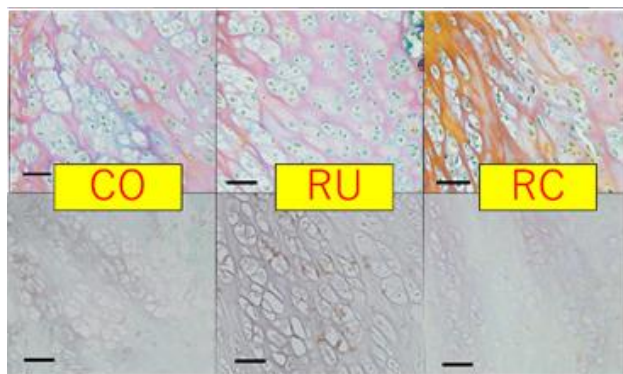


図 1.脛骨粗面深層のポリクローム染色（上段）と **type II collagen** 免疫染色（下段）の比較

CO と **RU** におけるポリクローム染色の染色性は同程度であるが、**RC** の染色性は骨端海綿骨と同程度であった。また、その部位の **type II collagen** の局在は **ED** に広く観察されたが **RC** にはほとんど観察されなかった。

<結論>

下り走運動は脛骨粗面深層にある軟骨細胞の石灰化を抑制するが、冷却刺激によってその機序が抑制されることが示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

OSD は脛骨粗面の突出し、そこに炎症や疼痛が生じるスポーツ傷害である。一般的に軟骨の炎症は **IL-1 β** が主たる要因であり、**PGE₂** の発現が誘導されることが知られている。**PGE₂** は疼痛閾値の低下を示す物質であり、この物質の発現は疼痛を間接的に証明する。今後はこれらの物質やそれらを分泌する細胞の特定を行うことが重要であると考えられる。

軟骨は分化に伴い **SOX9** や **RUNX2** を発現する。前者は未分化間葉系細胞から軟骨細胞へ分化する際に発現し、後者は軟骨細胞が肥大化および石灰化する際に発現が確認されている。一方で、軟骨は血管侵入が **VGEF** によって誘導されることで、細胞の石灰化が生じ、組織の石灰化部位には **TNAP** が発現されることが報告されている。これらの物質の特定を行うことで、脛骨粗面深層にあ

る軟骨細胞の分化と石灰化の関係性を証明することが可能であるが、本研究ではその解析が行えなかったため、今後の研究課題としたい。

Summary

Effects of cooling with ice pack on structural changes of tibial tuberosity caused by down-hill treadmill running in rats

Background and Purpose

A cooling with an ice pack is generally used for a treatment or prevention of Osgood-Schlatter disease (OSD) that is known one of the movement injuries in the growing period. However, it hadn't been cleared how the cooling after an exercise affected a structure of tibial tuberosity. On the other hand, we have already observed that a high-intensity down-hill running in growing rats caused the tibial tuberosity to protrude, and from these facts, have thought that such exercises could bring OSD-like symptoms.

Material and method

Twenty-four male rats aged 7 weeks (wistar strain), were used as materials, and were divided into a running group: EX, a running and cooling group: RC, and a control group: CO. EX and RC performed the down-hill running at an inclination angle of -15 and a speed of 17 m/min for 1 hour/day and 5 days/week for 3 weeks. In addition, the tibial tuberosity in RC was cooled for 20 minutes/time using an ice pack (0.3 to 1.3°C) under anesthesia, after completion of each running exercise. Each group, after the end of the experimental period, was euthanized and the tibia was excised after confirming the death, various specimens were prepared and were observed morphologically.

Results and discussion

The tibial tuberosity of EX was remarkably prominent than RC and CO, but the extent of protrusion of RC and CO was similar. In any group, the structure of the tibial tuberosity was basically divided into the superficial layer and the deep layer, and the fibers of the patellar ligament were mainly present in the superficial layer. The ligament fibers were more densely embedded in EX and RC than in CO. Type II collagen fibers were observed at the deep layer of EX by an immunostaining method, but they weren't almost seen in RC and CO. Many large chondrocytes existed in that layer of EX, but those cells of RC and CO were small. Thus, in RC and CO, the tibial tuberosity was calcified to the wide extent in the state where the fibers of the patellar ligament were embedded, but type II collagen fibers were present at the same region of EX, that is, cartilage-like structures remained yet. Furthermore, many large chondrocytes existed in that layer of EX, but those structure weren't observed in RC and CO. Therefore, it seems that the cooling has an effect of inhibiting the structural change of the tibial tuberosity caused by the down-hill running.

植物二次代謝選択的阻害剤の開発を目的とした基質の有機合成と

クマリン骨格形成における鍵酵素の構造活性相関

Synthesis of substrates for the development of selective inhibitors of plant secondary metabolism, and structure-activity relationship study in the substrate recognition of the ortho-hydroxylase, a key enzyme in coumarin formation in plants.

研究代表者 関口 茉樹(生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 清水 文一

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①二次代謝	Plant secondary metabolism
②基質認識	Substrate recognition
③オルト位水酸化	<i>Ortho</i> -hydroxylase
④有機合成	Organic synthesis
⑤チオエステル	Thioester

2020 年度交付額／637,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・2020 年度日本農芸化学会
令和 2 年 3 月
- ・2021 年度日本農芸化学会
令和 3 年 3 月

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

クマリン化合物は、植物界に広く分布しており *2H-1-benzopyran-2-one* を基本構造に持つ二次代謝産物である。病原の侵入や傷害で植物組織に誘導蓄積することから、植物の生体防御に関与していると考えられている。クマリン化合物の生合成は、フェニルプロパノイド経路上の各種桂皮酸類縁体の芳香環のオルト位に水酸基が導入され、側鎖のトランス-シス異性化、ラクトン化を経て、クマリン化合物が生成されることが明らかになっている。この桂皮酸類のオルト位水酸化は、クマリン生合成経路とリグニン生合成経路の分岐点として非常に重要なステップである。実際、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において、クマリン化合物の一種である *Scopoletin* の生合成におけるオルト位の水酸化酵素が 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD) の一種である *Feruloyl-CoA 6'-hydroxylase* (*AtF6'H1*) であることが明らかにされている。*AtF6'H1* はその基質に *Feruloyl-CoA* のみを認識し、遊離の *Ferulate* やその他の桂皮酸類である *p-Coumarate* などは基質としない。一方で、*AtF6'H1* の X 線結晶構造解析が *Xinxiao* らによって報告されているが、基質である *Feruloyl-CoA* との共結晶化はされておらず、*CoA* チオエステルの認識に関しては全く不明である。

そこで本研究では植物の二次代謝を標的とした薬剤開発を目指して *AtF6'H1* の基質選択性に着目し、*Feruloyl-CoA* をミミックとした *Feruloyl* チオエステル誘導体 (*Ferulic acid* のエステルおよびチオエステルのアルコール部分に様々な置換基を導入した化合物) の有機合成を行った。2つの合成経路により 10 種類のチオエステル誘導体を合成した。

その後、コールドショック発現ベクターの一つである *pCold DST DNA* に *AtF6'H1* を挿入したプラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株にて発現させ、可溶性画分に粗酵素液として目的のタンパクを回収した。続いて、合成したチオエステル誘導体群と目的の酵素を 30℃で 5 分間反応させ、上清を高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) にて成分分析することで酵素活性測定を行った。

2. 研究結果および成果の概要

先述した通り、*Feruloyl* チオエステル誘導体は 2つの合成経路にて合成を行った。1つめの合成経路として、*Ferulic acid* を出発原料としてカルボキシ基を酸クロライド化させ、*Feruloyl-Cl* を合成した。その後、各チオール類 (*Ethanthiol*、*1-Propanethiol*、*2-Propanethiol*、*sec-Butyl mercaptan*、*t-Butyl mercaptane*、*Mercaptoethanol*、*3-Mercapto-1-propanol*、*6-Mercapto-1-hexanol*) とカップリングすることで *Feruloyl-ester* 誘導体 (*Fer-S-Et*、*Fer-S-1-Pro*、*Fer-S-2-Pro*、*Fer-S-sec-Butyl*、*Fer-S-tert-Butyl*、*Fer-S-EtOH*、*Fer-O-PrSH*、*Fer-O-HexSH*) を合成した。その後、シリカゲルカラムにて目的物を精製し、高純度なチオエステル誘導体群を得た。一方で *N-acetyl cysteamine*、(*R*)-*Pantetheine*、*Coenzyme A* といった強酸に対する安定性が危惧される化合物に関しては先述の手法は用いず、*Benzotriazole* (Bt) を介した合成経路にてチオエステル類を合成した。まず、*Ferulic acid* の求核性を高めるためカルボキシ基を酸クロライド化させたのち分子内に 3つの窒素原子を有する *Feruloyl-Bt* を合成した。その後、チオール類 (*N-acetyl cysteamine*、(*R*)-*Pantetheine*、*Coenzyme A*) とカップリングすることで *Feruloyl-ester* 誘導体 (*Fer-S-N-acetylcysteamine*、*Fer-S(R)-Pantetheine*、*Feruloyl-CoA*) を合成した。その後、シリカゲルカラムおよびサイズ排除クロマトグラフィーにて目的物を精製し、高純度なチオエステル誘導体群を得た。合成した全ての化合物に対して ^1H および ^{13}C 核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance : NMR) および液体クロマトグラフィー質量分析計 (Liquid chromatography-Mass Spectrometry : LC-MS) による成分分析を行った。また、チオエステル誘導体群の UV-Vis スペクトルを測定し、極大吸収波長を求めた。フェルラ酸の極大吸収波長は約 315 nm であり、フェルラ酸のエステルがチオエステルに変換されると極大吸収は長波長側にシフトすると考えられる。*Fer-S-Et*、*Fer-S-EtOH* といったチオエステル誘導体群に関しては極大吸収波長が 339~343 nm でありフェルラ酸と比較して長波長側にシフトした。一方で、*Fer-O-PrSH*、*Fer-O-HexSH* といったエステル誘導体に関しては極大吸収が 320 nm 付近であり、チオエステルではなくエステルがメジャーな化合物として得られた。

続いて、コールドショックベクターの 1つである *pCold DST DNA* に *AtF6'H1* を挿入したプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) 株にて発現させた。37℃で培養液の吸光度 (660 nm、光路長 : 1 cm) が 0.4~0.8 になるまで培養したのち、15℃で 30 分冷却し、コールドショックを与えた。IPTG を終濃度が 1 mM となるように加え、15℃で 16~20 時間培養することで目的タンパク質の誘導を行った。その後、アフィニティカラムの一種である *Glutathione Sepharose 4B* にて精製を行い、高純度な *AtF6'H1* を得た。得られた酵素液を用いて合成した *Feruloyl-thioester* 類が基質として認識されるかどうかを明らかにするために、30℃にて 5 分間酵素反応 (5 mM 2-オキシグルタル酸-2-ナトリウム、5 mM アスコルビン酸、0.2 mM 硫酸鉄 (II)、0.2 mM 基質、0.1 mM Bis-Tris (pH 7.0)、酵素液 3.7 $\mu\text{g}/\text{reaction}$) を行った。3 M 水酸化ナ

トリウム水溶液にて反応の停止を行い、3 M 酢酸水溶液にて中和した。変性したタンパク質が浮遊したことを確認し、遠心 (200,000 ×g, 10 min, 4°C) することでタンパク質を沈殿させた。この上清を HPLC にて成分分析した。結果として置換基に短い炭素鎖を有する Fer-S-Ethyl などは基質として認識されず、Feruloyl-CoA の部分構造を有する Fer-S-N-acetylcysteamine、Fer-S-(R)-Pantetheine のみが基質として認識された。酵素反応によって生成された生成物 (6'-Hydroxyferulic acid+Scopoletin) のモル数を算出するために、スコポレチンを標品として検量線を引いたのちピーク面積から酵素反応にて生成された生成物のモル数を算出した。Feruloyl-CoA の生成物のモル数は約 6.7 pmol であったのに対し、Fer-S-(R)-Pantetheine の生成物のモル数は約 1.1 pmol とおよそ 7 分の 1 に低下した。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究の合成過程における 3-Mercapto-1-propanol および 6-Mercapto-1-hexanol のカップリングについては、メインの生成物として得られた化合物はチオエステルではなくエステルとして置換基が結合した化合物が得られた。また、各化合物の収率は高くても Fer-O-PrSH の 54.1%であり使用する溶媒や、触媒等の更なる条件検討を行う必要がある。また、F6'H1 の詳細な基質認識に関しても本研究では明らかになっていない。

したがって、今後の予定としては合成時の更なる条件検討とバリエーションに富んだ化合物の合成を行い、活性測定を行う予定である。

Summary

Plant secondary metabolism produces various compounds with a large diversity in their structures. According to the substitution patterns of hydroxycoumarins and their C6–C3 structure, the respective cinnamate units are subjected to *ortho*-hydroxylation of the aromatic ring, *trans/cis* isomerization of the side chain, and lactonization during coumarin formation. *Ortho*-hydroxylation step is an irreversible step; therefore, it is thought to be the key step in coumarin formation. In Arabidopsis, feruloyl-CoA 6'-hydroxylase (F6'H1), an 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (2OGD), catalyzes the *Ortho*-hydroxylation step in the biosynthesis of scopoletin. F6'H1 recognize only feruloyl-CoA as its substrate, and does not use free ferulic acid as a substrate. X-ray structural analysis of this enzyme has been reported, whereas the substrate enzyme complex of the CoA thioester has not been crystallized, therefore recognition of the CoA moiety is still unclear. In this study, we focus on the substrate selectivity of F6'H1 to CoA thioester. For this purpose, we synthesis a series of feruloyl thioesters mimicking feruloyl-CoA to analyze the structure-activity relationship between F6'H1 and the substrates. First, we synthesized feruloyl thioester derivatives by two synthetic routes. As the first synthetic route, ferulic acid was used as a starting material to acid chloride the carboxy group to synthesize feruloyl-Cl. Then, Feruloyl-esters (Fer-S-Et, Fer-S-1-Pro, Fer-S-2-Pro, Fer-S-sec-Butyl, Fer-S-tert-Butyl, Fer-S-EtOH, Fer-O-PrSH, Fer-O-HexSH) was synthesized by coupling with each thiols (Ethanthiol, 1-Propanethiol, 2-Propanethiol, *sec*-Butyl mercaptan, *t*-Butyl mercaptane, Mercaptoethanol, 3-Mercapto-1-propanol, 6-Mercapto-1-hexanol) . On the other hand, for compounds such as N-acetyl cysteamine, (R) -Pantetheine, and Coenzyme A, which are feared to be stable against strong acids, thioesters were synthesized by a synthetic route via Benzotriazole (Bt) without using the above-mentioned method. All the synthesized thioester derivatives were subjected to component analysis by LC-MS and NMR. Subsequently, a plasmid in which AtF6'H1 was inserted into pCold DST DNA, which is one of the cold shock vectors, was expressed in *E.coli* BL21 (DE3) . Purification was carried out with Glutathione Sepharose 4B, which

is a kind of affinity column, to obtain high-purity AtF6'H1. To clarify whether Feruloyl-thioesters synthesized using the obtained enzyme solution are recognized as substrates, an enzymatic reaction (5 mM 2-sodium 2-oxoglutarate, 5 mM Ascorbate, 0.2 mM iron sulfate(II), 0.2 mM substrate, 0.1 mM Bis-Tris(pH 7.0)) was carried out at 30°C for 5 minutes. As a result, Fer-S-Ethyl having a short carbon chain as a substituent is not recognized as a substrate, and only Fer-S-N-acetylcysteamine and Fer-S- (R) -Pantetheine having a partial structure of Feruloyl-CoA are recognized. When the number of moles of the product produced by the enzymatic reaction was calculated, Ferruloyl-CoA was about 6.7 pmol, while Fer-S- (R) -Pantetheine was about 1.1 pmol, which was about one-seventh lower. In this study, it was suggested that Pantetheine and Cysteamine are important structures as substrate elements, but the detailed substrate recognition of F6'H1 is still unclear. As a future plan, we would like to synthesize a wide variety of compounds and elucidate the mechanism of substrate recognition.

イネの栄養素吸収能力に関する量的形質遺伝子座解析 Quantitative traits locus analysis regulating for nutrition uptake in rice

研究代表者 福嶋 彩加（生命科学研究科 生命科学専攻）

指導教員 廣津 直樹

研究期間/2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

2020 年度交付額/630,000 万円

研究発表/日本植物学会第 84 回大会（2020 年 9 月 21 日）

“イネのリン酸吸収に関する量的形質遺伝子座の肥料応答”

福嶋彩加、入口遥、花田真子、廣津直樹

研究経過および成果の概要/

フィチン酸 (PA) は穀物の種子に含まれるリンの主要な貯蔵形態である一方で、亜鉛や鉄などのミネラルと錯体を形成することで体内でのミネラル吸収を阻害する。また、体内にフィターゼを持たない豚などの家畜が穀物を含む飼料を摂取すると PA を分解することができないため、体外に排出された PA により富栄養化が問題となっている。そのため、穀物に含まれる PA を低下させることが望ましいが、穀物の PA 含量を制御するメカニズムはまだ明らかになっていない。

穀物の PA 含量は、根でのリン酸吸収、体内でのリン酸の輸送、種子での蓄積および合成の大きく 3 つの要因により制御されていることが考えられる。これまで、イネ遺伝資源の高・低 PA 系統の特性解析から種子の PA 含量を制御する遺伝的要因として *myo-inositol 3 phosphate synthase (INO1)* を候補遺伝子として特定した。しかしながら、リン酸過剰条件下での *INO1* 応答には系統間差があり、高・低 PA 系統の *INO1* 発現に影響を与えるその他の要因があることが示唆された。これより、種子の PA 含量は *INO1* のような遺伝的要因のみによって制御されているのではなく、リン酸吸収能力などの複数の要因によって制御されていることが考えられた。また、リン酸施肥量が種子のリン酸含量に与える影響を調査したところ、収穫期の種子のリン酸含量に系統間で違いが見られなかった一方で、開花後 10 日目の種子のリン酸含量は高 PA 系統で有意に高いことが明らかとなった。これより、種子発達初期までの種子へのリン酸の流入が種子の PA 含量に影響を与えていることが考えられた。種子へのリン酸の流入には、根でのリン酸吸収とその体内輸送

が関わっていると考えられ、リン酸吸収は種子の PA 含量を制御する最も重要な要因であると考えられる。そこで本研究では、根でのリン酸吸収と種子へのリン酸流入量との直接的な関係に着目し、根でのリン酸吸収とその体内輸送の総和であると考えられる導管溢出液を用いたリン酸吸収能力の評価により、リン酸吸収に関わる量的形質遺伝子座 (QTL) を特定することを目的とした。

コシヒカリ・カサラス染色体断片置換系統群 (CSSL) はジャポニカ型品種 Koshihikari (Ksh) の染色体の一部がインディカ型品種 Kasalath (Kal) に置換された系統群であり、これらが示す表現型の違いからその関与遺伝子を特定することができる。本研究では、CSSL39 系統とその親品種である Ksh を異なるリン酸施肥条件下 (Control、+P) で栽培し、導管溢出液のリン酸含量を定量することで各系統のリン酸吸収能力を比較した。導管溢出液の解析の結果、Control 条件において Kal 型でリン酸吸収が増加する QTL と +P 条件において Kal 型でリン酸吸収が減少する QTL を検出した。また、CSSL の種子の PA 含量を定量したところ、Kal 型で PA 含量が減少する QTL を複数検出した。これらのうち、第 7 染色体上に種子の PA 含量が減少し、かつリン酸吸収が低下する領域 (*qLPU7*) があり、この領域には PA 生合成遺伝子である *myo-inositol kinase (MIK)* が座乗していた。また、第 6 染色体上に Kal 型で Control 条件においてリン酸吸収が増加する領域 (*qHPU6*) を検出し、この領域の近傍には種子へのリン酸の優先的分配を制御する新規リン酸輸送体である *SULTR-like phosphorus distribution transporter (SPDT)* が座乗していた。そこで、*qHPU6* を有する SL217 および *qLPU7* を有する SL219 の塩基配列を親品種 Ksh および Kal と比較したところ、SL217 は Kal 型の *SPDT* を有しており、また SL219 も同様に Kal 型の *MIK* を有することが確認された。*SPDT* が導管溢出液のリン酸濃度にどのような影響を与えているのかは不明であるが、*qHPU6* に座乗するその他の既知遺伝子や未知遺伝子が SL217 の高リン酸吸収能力に関わっていることが考えられ、また SL219 の低 PA 形質は *MIK* 遺伝子の変異が影響していることが考えられる。本研究により検出した QTL を有する SL217 および SL219 を交配することで、交配種におけるリン酸吸収能力の比較や種子発達初期までの種子への Pi 流入量と *INO1* 遺伝子発現解析を通じて、これまでに明らかにした種子の PA 含量を制御する遺伝的要因の仮説を証明することができると考えられる。これにより、種子の PA 含量が低下し、イネ体内でのリン酸利用効率が向上することが期待でき、リン酸吸収と種子の PA 含量の直接的な関係を明らかにすることができると考えられる。

Summary

Phytic acid (PA) prevents absorption of minerals in human intestines and is regarded as an anti-nutrient. Addressing this issue, reducing PA content in seed is one of the important strategy for increasing zinc bioavailability. Phosphate (Pi) uptake is essential for PA biosynthesis and PA accumulation. However, we don't know how Pi uptake affect PA content in rice. Quantitative traits locus (QTL) analysis using Chromosome Segment Substitution Line (CSSL) is an effective way to identify the chromosome region containing QTL. In this study, we identified QTLs related Pi uptake and analyzed their effect on PA accumulation.

We measured Pi concentration in xylem sap using one month seedling of 39 CSSLs and parent cultivars “Koshihikari” and “Kasakath”, and identified QTL increasing or decreasing Pi concentration in xylem sap at control condition and Pi sufficient condition. We also identified QTL decreasing PA concentration. Among these QTL regions, known Pi transporter “*SULTR-like phosphorus distribution transporter (SPDT)*” and PA biosynthetic gene “*myo-inositol kinase (MIK)*” were located on the region on chromosome No. 6 (*qHPU6*) and No. 7 (*qLPU7*). These genes might be regulated Pi uptake and affected PA content in rice grain. We further need to investigate Pi uptake and transportation throughout growth stage with crossbreed lines of CSSLs containing *qHPU6* and *qLPU7*.

骨格筋分泌因子を介した暑熱依存的な皮膚機能制御の解明

Heat-dependent regulation of skin function via skeletal muscle-derived secretory factors

研究代表者 佐藤 友里(生命科学研究科 生命科学専攻)

指導教員 根建 拓

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①骨格筋 Skeletal muscle

②マイオカイン Myokines

③皮膚 Skin

④真皮線維芽細胞 Dermal fibroblasts

⑤暑熱刺激 Heat stimulation

2020 年度交付額／630,000 円

研究発表／学会および口頭発表

・ Ishiuchi-Sato Yuri and Nedachi Taku. CXCL10, an exercise-regulated myokine, controls the expression of redox enzyme gene expression in mouse dermal fibroblasts. 第 43 回 日本分子生物学会年会、2020 年 12 月

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

近年、骨格筋はタンパク質やペプチドなどを分泌することから内分泌器官としての機能が注目されてきた。これら骨格筋から分泌されるタンパク質やペプチドはマイオカインと総称され、その一部は運動などの刺激によって発現分泌が変化することが明らかにされてきた。また、このマイオカインは脂肪組織や肝臓の代謝亢進、免疫能制御など骨格筋以外の組織や器官への運動効果の伝達に寄与している可能性が示されており、実際にマイオカインの 1 つである Interleukin-6 (IL-6)は運動により骨格筋における発現分泌が上昇し、免疫能を制御することが報告されている。筆者はこれまでにマウス由来の骨格筋細胞株である C2C12 筋管細胞に電気パルス刺激 (Electrical pulse stimulation; EPS)を負荷して収縮させる C2C12-EPS 系を用いて C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10)及び C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5)の 2 つを新規の運動により発現や分泌が減少するマイオカイン (運動抑制性マイオカイン)として同定した。さらに、この CXCL10 及び CCL5 について、暑熱刺激を負荷することによっても分泌が減少することを見出している。

さらに、近年、運動は上述の組織のみならず皮膚機能を制御することも明らかにされてきた。例えば、運動による創傷治癒の促進や皮膚老化の抑制などである。また、熱による皮膚老化の促進など、暑熱刺激によっても皮膚機能が制御されることが明らかにされつつある。しかし、暑熱依存的な皮膚機能制御にマイオカインが関与しているかなどの詳細は明らかになっていない。そこで、本研究においては、上述の運動抑制性マイオカインのうち、真皮線維芽細胞におけるコラーゲン合成制御に寄与することを見出している CXCL10 について、皮膚機能制御に関与しているかを明らか

にすることを目的とした。

まず、マウスより単離した初代培養真皮線維芽細胞に EPS を負荷した、あるいはしていない C2C12 筋管細胞由来の培養上清 (EPS-CM, Ctrl-CM) を添加した際に発現が変化する遺伝子について網羅的な解析を行った。このうち、EPS-CM を添加することにより発現が変化する事がわかった遺伝子については、qPCR による確認を実施した。さらに、qPCR によって発現が変化する事が確認された遺伝子について、CXCL10 の受容体である CXCR3 のアンタゴニストである NBI74330 や recombinant CXCL10 を用いて CXCL10 の関与について検討を行った。

2. 研究経過および成果の概要

まず、Ctrl-CM 及び EPS-CM を初代培養真皮線維芽細胞に添加して 24 時間培養し、どのような遺伝子群の発現が変化するかを網羅的に調べた。その結果、EPS-CM 添加により oxidative-reduction process や response to oxidative stress のような酸化ストレス関連遺伝子群の発現が上昇した。また、qPCR による確認を実施したところ、*Blvrb*, *Pgd*, *Srxn1* の 3 遺伝子の発現が EPS-CM 添加によって有意に上昇することがわかった。そこで、これら 3 遺伝子の発現変化に CXCL10 が関与しているかを調べた。筆者はこれまでに、初代培養真皮線維芽細胞においても CXCL10 の受容体である CXCR3 が発現していることを明らかにしていたため、CXCR3 アンタゴニストである NBI74330 を添加し、上述の 3 遺伝子の発現変化を解析した。その結果、30 ng/ml NBI74330 の添加により 3 遺伝子ともに発現が有意に上昇した。さらに、Ctrl-CM, EPS-CM, EPS により減少した CXCL10 を recombinant CXCL10 により補償的に添加した EPS-CM で真皮線維芽細胞をそれぞれ処理し、各遺伝子の発現変化について調べた。その結果、EPS-CM による *Srxn1* 遺伝子発現上昇効果が recombinant CXCL10 の添加により打ち消された。先述の通り、CXCL10 は EPS の他に暑熱負荷によっても分泌が減少すること、マウスへの 2 週間の暑熱負荷によっても一部の骨格筋における *Cxcl10* 遺伝子発現減少が観察されたことを併せると、暑熱負荷により CXCL10 発現が減少することで、*Srxn1* 遺伝子などの酸化ストレス関連遺伝子の発現が制御され、真皮線維芽細胞における酸化還元状態が制御される可能性を見出した。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究においては、運動依存的に CXCL10 の発現分泌が減少することで真皮線維芽細胞における *Srxn1* 遺伝子発現が上昇し、酸化還元状態を制御している可能性を見出した。さらに、これまでに C2C12 筋管細胞に暑熱刺激を負荷することで CXCL10 分泌が減少することが明らかになっていたことに加えて、マウスへの暑熱負荷により一部の骨格筋における *Cxcl10* 遺伝子発現が減少することも観察された。これらの結果を併せると、運動のみならず暑熱刺激の負荷によっても CXCL10 が減少していたことから、暑熱刺激依存的な CXCL10 減少によっても真皮線維芽細胞において *Srxn1* をはじめとする酸化ストレス関連遺伝子の発現が変化し、酸化還元状態が制御される可能性が考えられる。しかし、本研究においては、C2C12 筋管細胞に暑熱刺激を負荷した培養上清の真皮線維芽細胞への添加実験などは実施しておらず、検討が不十分である。そこで、今後は真皮線維芽細胞に暑熱を負荷した、あるいは負荷していない培養上清を添加した際の酸化ストレス関連遺伝子の発現変化などについて検証する必要がある。さらに C2C12 筋管細胞への暑熱負荷が抗酸化酵素の発現に与える影響なども調査することで、骨格筋への暑熱刺激負荷が皮膚機能に与える影響を解明することができると考える。

Summary

Skeletal muscle secretes many proteins and peptides, termed as myokines. The secretion of several myokines are regulated by exercise, which may contribute on exercise-dependent modification of some organs and tissues. In fact, Interleukin-6 (IL-6) is known to be increased by exercise, which contributes on regulating immune systems. We recently identified C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) and C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) as novel exercise-reduced myokines using the contractile C2C12 myotube models. In addition, we also found that the secretion of CXCL10 and CCL5 from skeletal muscles is also regulated by heat stimulation.

Exercise regulates skin functions such as promoting wound healing and inhibiting skin aging. Moreover, heat stimulation also affects skin function such as promoting skin aging and regulating skin barrier. However, the detail mechanisms are not known. In this study, therefore, we investigated role of skeletal muscle-derived CXCL10 on skin functions.

Differentiated mouse C2C12 myotubes were stimulated with electrical pulse stimulation (EPS) to induce contraction and the supernatants were collected. Mouse dermal fibroblasts were treated with the conditioned medium obtained from C2C12 myotube cell culture with or without EPS (EPS-CM or Ctrl-CM, respectively), and isolated total RNA was subjected to microarray analysis. The GO analysis suggested that EPS-CM treatment increased the gene expressions that were related to oxidative-reduction process, response to oxidative stress. In detail, *Blvrb*, *Pgd* and *Srxn1* gene expression in fibroblasts were increased by EPS-CM treatment.

CXCR3 antagonists, NBI74330, blocked this EPS-CM dependent *Blvrb*, *Pgd*, and *Srxn1* gene expression, which suggested CXCR3 signaling is involved in this process. Furthermore, EPS-CM dependent *Srxn1* gene expression was abolished by adding recombinant CXCL10. A series of experiments suggested that exercise-dependent reduction of CXCL10 secretion from skeletal muscle cells may influence on dermal fibroblasts to increase *Srxn1* gene expression via CXCR3 signaling pathway.

In conclusion, our results suggested that exercise-dependent reduction of CXCL10 in skeletal muscles may control redox states in mouse dermal fibroblasts. Together with the fact that CXCL10 expression was reduced not only by exercise but also by heat stimulation in skeletal muscles, heat-dependent CXCL10 reduction in skeletal muscles may also control redox state in skin. Future studies will reveal the importance of regulation of novel myokine, CXCL10, on skin functions.

魚類における *hand* 遺伝子の多様化と機能

Comparative analyses of *hand* genes in fish

研究代表者 大牧 創(生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 小柴 和子

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①心臓 heart

②発生 development

③進化 evolution

④*hand1* *hand1*

⑤*hand2* *hand2*

2020 年度交付額／630,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・大牧創, 古川大雅, 守山裕大, 黒川大輔, 小柴和子「魚類において多様化した *hand* 遺伝子の比較」第 19 回 日本心臓血管発生研究会, 2020 年 12 月
- ・大牧創, 古川大雅, 守山裕大, 黒川大輔, 小柴和子「The number of *hand* genes is not correlated with the ventricular septation」第 43 回 日本分子生物学会, 2020 年 12 月
- ・大牧創, 古川大雅, 守山裕大, 黒川大輔, 小柴和子「魚類間における *hand* 遺伝子の比較解析」日本動物学会 第 71 回大会, 2020 年 9 月
- ・大牧創, 古川大雅, 守山裕大, 小柴和子「真骨魚類間で多様化した *hand* 遺伝子の機能解析」日本動物学会関東支部 第 72 回大会, 2020 年 3 月

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックスファミリーに属する転写因子をコードする *Hand* 遺伝子は、脊椎動物の心臓と四肢の発生に重要な遺伝子の 1 つである。マウスにおいて *Hand* 遺伝子は *Hand1* と *Hand2* が存在しており *Hand1* が左心室の発生に寄与し、*Hand2* が右心室の発生に寄与している。また単心室の心臓を有するゼブラフィッシュにおいては *hand2* のみが存在している。動物種による *Hand* 遺伝子の数の違いや、マウス心臓発生における *Hand* 遺伝子の機能から *Hand* 遺伝子の重複により心室が左右に区画化されたという進化のシナリオが考えられていた。

しかし、複数種の魚類を用いて分子系統解析を行った結果、メダカやトゲウオには *hand1* と *hand2* が存在し、ゼブラフィッシュには *hand2* のみ、フグには *hand1* のみが存在しているというように、魚類において *hand* 遺伝子は多様化していることが明らかになった。本研究では、それぞれ特徴的な多様性を示すゼブラフィッシュ・メダカ・フグの *hand* 遺伝子に着目し、心臓の発生における機能を比較することで魚類 *hand1*、*hand2* の機能の多様化と、その進化的な意味を明らかにすることを目的とした。

ゼブラフィッシュ、メダカ、フグの *hand* 遺伝子の発現様式を解析するために Whole mount *in*

situ hybridization を行った。さらに、それぞれの *hand* 遺伝子の機能を比較するためにマイクロインジェクション法を用いた機能阻害実験とレスキュー実験を行った。

2. 研究経過および成果の概要

ゼブラフィッシュ *hand2*、メダカ *hand1*, *2* はいずれも発生過程において心臓と胸鰭において発現が認められた。フグ *hand1* は発生初期において側板中胚葉で発現が認められた。フグ *hand1* 発現領域内に心臓前駆細胞が含まれているかを確認するために、心臓前駆細胞マーカーである *nkx2.5* の RNA プローブを作製し、発現様式を解析した。その結果、フグ *hand1* 発現領域内に発現が認められたことから、発生初期においてフグ *hand1* は心臓予定領域に発現することが明らかになった。さらに心筒形成以降の *hand1* 発現パターンを解析してみると、胸鰭での発現が認められた一方で、心筒の形成が予想される部位での発現は認められなかった。そこで、フグ発生過程における心臓の位置を調べるために、心筋マーカーである *tnnt2* のプローブを作製し、発現様式を調べることでフグ発生過程における心臓の位置を確認した。その結果、*tnnt2* の発現領域内にフグ *hand1* の発現が認められなかったことから、フグ *hand1* は心臓で発現していないことが示された。

ゼブラフィッシュとフグの発生過程における *hand* 遺伝子の機能を解析するために MO による機能阻害実験を行った。*hand2* を機能阻害したゼブラフィッシュ胚(*hand2* MO 胚)では、心臓低形成と胸鰭における *shh* 発現の低下が認められた。*hand1* を機能阻害したフグ胚(*hand1* MO 胚)を顕微鏡下で観察したところ受精後 8 日目まで Ctrl MO 胚と形態的に大きな差は認められなかった。さらに心臓の表現型を詳細に解析するために *cmlc2* の発現を調べた。Ctrl MO 胚では心房と心室において *cmlc2* が発現していた。*hand1* MO 胚においても同様に心房と心室で発現が認められたことから、フグ *hand1* は心臓発生に寄与しないことが示唆された。

ゼブラフィッシュ、メダカ、フグの *hand* 遺伝子の機能を比較するために、ゼブラフィッシュ *hand2* MO 胚に対し、メダカ *hand1/hand2* mRNA、または、フグ *hand1* mRNA をインジェクションすることによってそれぞれの *hand* タンパク質を発現させて、表現型のレスキューがされるか検証するレスキュー実験を行った。メダカ *hand2* mRNA でレスキューを行った実験では、ゼブラフィッシュ *hand2* mRNA をインジェクションした場合と回復の程度が同程度であったことから、心臓発生においてゼブラフィッシュ *hand2* とメダカ *hand2* は同じような機能を有していると考えられた。しかし、メダカ *hand1* mRNA、フグ *hand1* mRNA でレスキューを行った結果、ゼブラフィッシュ、メダカ *hand2* mRNA のインジェクションに比べ表現型が回復した胚の割合が著しく低下した。この結果から魚類心臓発生において、*hand1* と *hand2* が異なる機能を有していることが示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究でのフグ *hand1* 機能解析の手法は MO による機能阻害（ノックダウン）実験であったため、遺伝子の翻訳過程を完全に阻害しておらず、少ないながら発現が残っている可能性を否定できない。フグでは、ゼブラフィッシュに比べ少ない発現量でも十分に心臓発生に寄与できる可能性が考えられるため、今後は CRISPR/Cas9 システムを用いて機能を完全に欠損させた場合にどうなるか検証する必要がある。

Hand 遺伝子は心臓だけではなく、四肢の発生にも重要である。マウスにおいて四肢特異的に *Hand2* を欠損すると四肢の *Shh* の発現の低下と前肢の形成不全が認められる。この *Hand2* 欠損に

よる四肢の *Shh* の低下や前肢の形成不全は *Hand1* を過剰発現させても回復できないことから、マウスの四肢発生において *Hand1* は *Hand2* の機能を代償できないことが報告されている。ゼブラフィッシュ *hand2* MO 胚に認められる胸鰭の *shh* 発現の低下が、メダカ *hand1*, *hand2* やフグ *hand1 mRNA* のインジェクションによるレスキュー実験において回復されるか解析することにより魚類の胸鰭発生における *hand* 遺伝子の代償性についても解明したいと考えている。

Summary

Heart and neural crest-derived (Hands) are critical genes for heart and limb/fin development in vertebrates. In mouse, *Hand1* and *Hand2* are specifically expressed in the left and right ventricles respectively. On the other hand, zebrafish, which contains a single ventricle, has only *hand2*. Therefore, an evolutionary scenario that the duplication of *Hand* genes might cause the ventricular septation in vertebrate was proposed. However, our group have found that medaka and stickleback have both *hand1* and *hand2* and fugu (puffer fish) has only *hand1* by molecular phylogenetic analysis. This means that the number of *hand* genes is not correlated with the number of ventricles, but it depends on the diversity of fish. Therefore, there is a possibility that only one hand gene would be enough for fin and heart development in fish. To answer this, we tried to compare the functions of fish *hand* genes.

We first analyzed the expression patterns of zebrafish, medaka, and puffer fish *hand* genes. In medaka, both *hand1* and *hand2* were expressed in the pectoral fin bud and heart likely zebrafish *hand2*. Interestingly, the expression of fugu *hand1* was observed in the lateral plate mesoderm but not in the heart tube, although the expression in the pectoral fin was intact.

The zebrafish *hand2* knockdown experiments by using morpholino antisense oligo (MO) caused abnormality in the heart development. From this, it became clear that the zebrafish *hand 2* plays an important role in the development of the heart. The fugu *hand1* knockdown experiments by using MO caused no abnormality in the heart development unlike that of zebrafish *hand2* knockdown. Fugu *hand1* was not expressed in the heart, and even if the function was inhibited, no abnormality occurred in the heart. These results suggest that fugu *hand1* would not contribute to heart development.

We next performed the rescue experiments to compare the functions of hand genes by injection of *hand2* MO with/without medaka and fugu *hand* mRNAs into zebrafish eggs. As a result, medaka *hand2* mRNA could rescue the phenotype of *hand2* MO, but medaka and fugu *hand1* mRNAs could not rescue enough. Taking the result of rescue experiments, it is indicated that *hand1* and *hand2* have different functions in the heart development in fish.

ボイセンベリー葉成分が培養細胞に及ぼす機能性評価

Functional evaluation analysis of boysenberry leaf components on cells

研究代表者 橋本 奈々美 (生命科学研究科 生命科学専攻)

指導教員 三浦 健

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①機能性食品 functional food

②バイオマス biomass

③抗酸化活性 antioxidant activity

④プレバイオティクス prebiotics

⑤抗がん性 anticancer activity

2020 年度交付額／ 616,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・○橋本奈々美、水木徹、三浦健、「ボイセンベリーの抗菌性の評価」日本農芸化学会
2020 年 3 月 (福岡大会)
- ・○橋本奈々美、水木徹、三浦健、「ボイセンベリー葉の有効利用について」日本農芸化学会
2021 年 3 月予定 (オンライン開催)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

近年、世界的にみられる健康志向は上昇傾向にあり、食物中に含まれる有効成分の研究が盛んになっている。その中で「健康食品」への応用を目指す研究が多く為されている。これらを普段の食生活へ取り入れることによって、個人が生活習慣を見直し疾患を予防・改善していくという意識が高まっている。当研究室では、大学近隣の地域である群馬県館林市で生産されている希少価値が高いボイセンベリー果実の研究を進めている。この果実にはアントシアニンやエラグ酸、葉酸などといった有効成分がブルーベリーよりも豊富に含まれていることから、機能性食品として注目を浴びている。しかし、ボイセンベリーの葉は利用されることなく、果実の収穫の際に全て廃棄処分されているのが現状である。そこで本研究では、ボイセンベリーの新たな有効活用法を視野に入れた機能性評価を行うことを目的とした。

本実験では、ボイセンベリーの凍結乾燥葉粉末を用いて 2 種類の抽出方法 (熱水抽出・EtOH 抽出) を行い、その上清を凍結乾燥または減圧濃縮することにより抽出物を得た。これらを用いて以後の実験を実施した。

まず、ボイセンベリー葉抽出物の抗酸化活性を評価するために、DPPH ラジカル消去活性法を行って DPPH ラジカル消去活性 ($\mu\text{mol}\cdot\text{Trolox}$ 相当量/g dry) を算出し、葉と果実の数値を比較した。

次に、がん細胞の細胞毒性・細胞生育抑制評価を行うために、Presto Blue assay を用いて、がん化した細胞・正常細胞にサンプルを添加して培養し、蛍光測定を行うことにより細胞の生存

率を算出した。本実験では血球がん細胞 (IM-9)、脳腫瘍細胞 2 種類 (A1207、LNZ-308)、脳正常細胞 2 種類 (BEC、HCN-1A)、結腸がん細胞 (DLD-1) について検討した。また、ボイセンベリー葉抽出物 (W1、E1) と有機溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行うことにより、熱水抽出物の精製成分 (W2~W5) と EtOH 抽出物の精製成分 (E2~E5) を作製した。得られた精製成分と結腸がん細胞 (DLD-1) または結腸正常細胞 (CCD841CoN) を用いて同様の操作を行った。

2. 研究経過および成果の概要

① 抗酸化活性測定

熱水抽出物と EtOH 抽出物の抗酸化活性は高い値を示し、いずれも先行研究の乾燥果実の値をはるかに上回った。このことから、葉は非常に高い抗酸化活性を有することが示された。これまでのボイセンベリー葉含有成分に関する報告や溶媒への溶解性を考えると、熱水抽出物に含有される成分は主にカテキン類やタンニン類であり、EtOH 抽出物に含有される成分は主にエラグ酸やケンフェロール、ケルセチン等のポリフェノール類である可能性が高いと示唆された。

② 細胞毒性・細胞生育抑制評価

各培養細胞に熱水抽出物を添加して培養したところ、全てのがん細胞において細胞毒性がみられた。一方で、全ての脳正常細胞においても細胞毒性がみられた。DLD-1 に対して各抽出物を添加して 3 時間培養した場合、EtOH 抽出物においてがん細胞の細胞毒性がみられた。また、72 時間培養した場合、熱水抽出物と EtOH 抽出物の両方においてがん細胞の生育抑制がみられた。精製成分 (W2~W5、E2~E5) を DLD-1 と CCD841CoN に添加して 72 時間培養したところ、各分画が示す効果は異なっていた。

3. 今後の研究における課題または問題点

今後は、がん細胞の生育に影響を及ぼしたメカニズムの解析を行っていく必要がある。また、本実験でも示されたが、正常細胞に対して細胞毒性・細胞生育抑制効果を示す可能性もあることが考えられ、今後の実験で検証していく必要がある。ヒトの体内でのがん細胞とボイセンベリー葉成分の反応性を想定し、Drug Delivery System (DDS) への応用や、マウスを用いた実験をはじめとする in vivo でのデータを得ていく必要がある。

Summary

Recently, health consciousness has been increasing worldwide, and research on beneficial components in food has been actively conducted. This also applies to Boysenberry fruits cultivated in Tatebayashi City, where is near the university. This fruit contains many beneficial nutritional components for beauty and health; such as anthocyanins, ellagic acid and folic acid. Therefore, it is attracting attention as a functional food. However, the boysenberry leaves are not used and are all disposed of at the time of harvest. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the functionality of Boysenberry leaves for a new effective utilization.

In this experiment, the subsequent experiments were carried out using the extracts obtained by two kinds of extraction methods (hot water extraction and EtOH extraction) using Freeze-dried Boysenberry leaf powder.

First, in order to evaluate the antioxidant activity of Boysenberry leaf extract, the DPPH radical scavenging activity method was performed.

Next, to evaluate the cytotoxicity and cell growth inhibition of cancer cells, samples were added to cancer cells / normal cells and cell viability was measured using the Prestoblu assay. Furthermore, by performing silica gel chromatography on the Boysenberry leaf extracts (W1, E1), the extract fractions of the hot water extract (W2-W5) and the extract fractions of the EtOH extract (E2-E5) was prepared. The same procedure was performed using the resulting extract fraction and colon cancer cells (DLD-1) or colon normal cells (CCD841CoN).

The antioxidant activity of the hot water extract and the EtOH extract showed high values, both far exceeding the values of the dried-Boysenberry fruits of the previous study. From this result, we have shown that Boysenberry leaves have very high antioxidant activity.

When Boysenberry leaf extract was added to each cells and cultured for 3 hours, cytotoxicity was observed in all cancer cells. In addition, when cultured for 72 hours, growth inhibition of cancer cells was observed in both leaf extracts. When the extracted fractions (W2-W5, E2-E5) were added to DLD-1 and CCD841CoN and cultured for 72 hours, the effects of each fraction were different. Interestingly, W2 and E2 show a growth inhibitory effect only on cancer cells without affecting the growth of normal cells.

In future studies, we will need to analyze the mechanism by which Boysenberry leaves influence the growth of cancer cells. In addition, it is thought that it may show cytotoxicity and cell growth inhibitory effect on normal cells, and it is necessary to verify it in future experiments. Assuming the human reactivity between cancer cells and Boysenberry leaf components, it is necessary to acquire in vivo data such as application to drug delivery system (DDS) and experiments using mice.

網羅的遺伝子発現解析による水陸両生植物における水中順応の

分子メカニズムの解明

Transcriptome analysis for understanding of acclimation mechanisms to submerged condition in amphibious plant

研究代表者 堀口 元気(生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 廣津 直樹

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①水陸両生植物 Amphibious plant

②環境応答 Environmental responses

③光合成 Photosynthesis

④無機炭素濃縮機構 Carbon Concentrating Mechanism

⑤トランスクリプトーム解析 Transcriptome analysis

2020 年度交付額／ 560 千円

研究発表／学会および口頭発表

堀口元気、廣津直樹 “RNA-seq による水陸両生植物の水中での HCO_3^- 利用関連遺伝子の網羅的解析” (第 62 回日本植物生理学会年会、オンライン、2021 年 3 月予定)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

申請者のこれまでの研究により、キツネノマゴ科の水陸両生植物 *Hygrophila difformis* は水中に順応するため、水没すると重炭酸イオン (HCO_3^-) を光合成に利用するようになることを明らかにした (Horiguchi ら *AoB plants* 2019)。本申請課題では、(1) *H. difformis* の HCO_3^- 利用メカニズムの構成因子、特に高等植物において未だ単離されていない HCO_3^- 輸送体を探索するため、陸上で形成された葉 (陸上葉) と水中で形成された葉 (水中葉) について RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行った。陸上葉と比較して水中葉で有意に発現が増加している遺伝子の中から、藻類や動物で既知の HCO_3^- 輸送体遺伝子と相同性のある遺伝子を候補遺伝子とした。さらに、RNA-seq により得られた断片配列を元に、候補遺伝子のゲノム配列を解析した。(2) *H. difformis* の水中順応における HCO_3^- 利用メカニズムの誘導過程を明らかにするため、液相型酸素電極を用いて水没後の陸上葉 (水没陸上葉) の水中での光合成速度の経時変化を調査した。さらに、水没陸上葉の水中での光合成メカニズムを明らかにするため、細胞膜透過性および非透過性の炭酸脱水酵素阻害剤、陰イオン交換輸送体阻害剤の水中での光合成速度への影響を調査した。

2. 研究経過および成果の概要

(1) トランスクリプトーム解析による *H. difformis* の HCO_3^- 利用メカニズム構成因子の探索

H. difformis の陸上葉と水中葉から mRNA を単離し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq

法によるトランスクリプトーム解析を実施した。陸上葉と比較して水中葉で発現が有意に増加および減少していた遺伝子についてエンリッチメント解析を行った。増加、減少どちらの遺伝子群においてもイオン輸送に関与する遺伝子が多く含まれており、陸上葉と水中葉では細胞内外におけるイオンの流れが大きく異なることが示唆された。水中葉で発現が増加した遺伝子群では、既知の HCO_3^- 輸送体遺伝子と相同性を持つ遺伝子が検出されず、*H. diffformis* は新規の HCO_3^- 輸送体を有することが考えられた。その候補として、水中葉で有意に増加しており、藻類やヒトで HCO_3^- 輸送体が属する Solute carrier (SLC) 26 family と共通のドメインを有する遺伝子 (*HdSLC26*) が得られた。トランスクリプトーム解析により得られた断片配列の情報を元に作成したプライマーを用いて、*H. diffformis* の *HdSLC26* のゲノム配列を解析した。トランスクリプトーム解析で得られた *HdSLC26* の配列はゲノム配列上ではイントロンを含む領域であった。これにより、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析が可能となった。

(2) *H. diffformis* の水中順応における HCO_3^- 利用メカニズムの誘導過程

陸上で生育した *H. diffformis* に個体全体が水没するように水没処理を行い、水没処理時の最上位完全展開葉を順次採取していき、水中での光合成速度を測定した。水没陸上葉の光合成速度は、水没 24 時間後から徐々に増加していき水没処理 120 時間 (5 日) 後に最大となった。水没処理 5 日後の水没陸上葉の光合成速度は、今回使用した 3 種類の阻害剤により有意に低下した。陰イオン交換輸送体の阻害剤により光合成速度が低下したことから、水没処理により HCO_3^- 輸送体が発現したことが示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

本申請により、*H. diffformis* の HCO_3^- 輸送体の候補遺伝子 *HdSLC26*、また、水没後の陸上葉の水中順応過程を明らかにした。今後、*HdSLC26* の更なる機能解析を進める必要がある。本申請では *HdSLC26* のゲノム配列の解析にあたり複数のプライマーセットを試したが、得られた配列の全長を増幅しようとするとのプライマーを用いても非特異的な増幅が認められた。PCR 後に電気泳動で確認した際に増幅量が多く、断片配列より 1 kb ほど大きいサイズの PCR 産物を精製して配列を解析した。しかし、断片配列と同程度のサイズの PCR 産物も解析した PCR 産物と同程度に増幅しており、偽遺伝子である可能性が考えられる。*HdSLC26* の発現解析をより正確に行うためにも、増幅が認められた PCR 産物の配列を解析する必要がある。今後は、*HdSLC26* の機能解析および水中順応への関与を明らかにするため、 CO_2 や光などの条件を変えた水没処理による遺伝子発現パターンと水中での光合成速度の関係を調査していく。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーションにより *HdSLC26* が葉のどの組織で発現しているのかを確認する。

Summary

Hygrophila diffformis, a heterophyllous amphibious plant, uses bicarbonate (HCO_3^-) for photosynthesis under submerged condition (Horiguchi *et al.*, 2019). The leaves of *H. diffformis* developed under submerged condition were assumed to use HCO_3^- by biophysical carbon concentration mechanisms (CCMs) like algae. Biophysical CCMs is constituted HCO_3^- uptake from external environment by transporter and conversion to CO_2 . In algae, some HCO_3^- transporters were identified; however, molecular mechanism of HCO_3^- uptake in higher plant

remains unclear. In this study, to identify HCO_3^- transporter in *H. difformis*, we performed transcriptome analysis of the leaves developed under terrestrial and submerged conditions. Moreover, to reveal the process of photosynthetic acclimation to submerged condition in terrestrial grown *H. difformis*, we investigated time courses for changes in underwater photosynthetic rate in the terrestrial leaves after submersion.

First, we performed transcriptome analysis of the terrestrial and submerged leaves of *H. difformis*. In the submerged leaves, the expression levels of 2,530 and 2,036 genes were significantly increased and decreased than that in the terrestrial leaves. The enrichment analysis revealed that the differentially expressed genes were enriched in ion transmembrane transporter activity in GO term of molecular function. In the submerged leaves, the expression level of gene belongs SLC26A/SulP transporter family (*HdSLC26*) significantly increased than that in the terrestrial leaves (Fold Change = 119, $p < 0.001$). Additionally, we decided the genomic DNA sequence of *HdSLC26* by sequence analysis. The SLC26/SulP family is a large family with members derived from archaea, bacteria, plants and animals. This gene family encodes anion exchangers transporting a broad range of substrates including Cl^- , HCO_3^- , SO_4^- and oxalate. Our results imply that *HdSLC26* is a HCO_3^- transporter in *H. difformis*.

Second, we investigated time courses for changes in underwater photosynthetic rate (P_n) in the terrestrial leaves after submersion. Underwater P_n of *H. difformis* tended to increase at 24 h after submersion, especially underwater P_n at 5 days after submersion was significantly higher than that in the terrestrial plants. The leaves at 5 days after submersion were inhibited underwater photosynthesis by both external and intercellular carbonic anhydrase inhibitors and anion exchanger inhibitor. These results indicate that the terrestrial leaves induce biophysical CCMs after submersion.

We successfully obtained *HdSLC26* putatively encodes HCO_3^- transporter from *H. difformis* by transcriptome analysis. Moreover, we revealed the process of acclimation to submerged condition and photosynthetic mechanism in terrestrial leaves after submersion. Elucidation of *HdSLC26* function require further investigation such as relationship between the expression pattern of *HdSLC26*, underwater P_n and environmental factors; light, CO_2 and nutrients.

自閉症の性差に関する「性ステロイド仮説」を自閉症モデルマウスを使って
検証する

Verifying the "Sex Steroid Hypothesis" on Sex Differences in Autism Using
Autism Model Mice

研究代表者 塩野 鈴佳(生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 金子 律子

研究期間／2020年4月10日～2021年2月15日

キーワード／①自閉症スペクトラム Autism spectrum disorder

②Collapsin response mediator protein 4 (CRMP4)

③性差 Sex difference

④脳 Brain

⑤行動 Behavior

2020年度交付額／ 559000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・日本動物学会 第91回大会 2020 オンライン大会ポスター発表
2020年9月

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

○ 作業仮説「周生期のTがASDの性差に影響する（ステロイド仮説）」を検証するために以下の実験を行う
出生当日、雌雄の野生型（WT）と *Crmp4* KO (Knock out) 仔マウスに雄性ホルモン・テストステロン（T）
を投与する。

コントロール群（C群）には、溶剤であるオイルを等量投与する。



その後、週令に応じて以下の(1)および(2)の実験を行う。



実験から予測される結果

ステロイド仮説が正しければ、

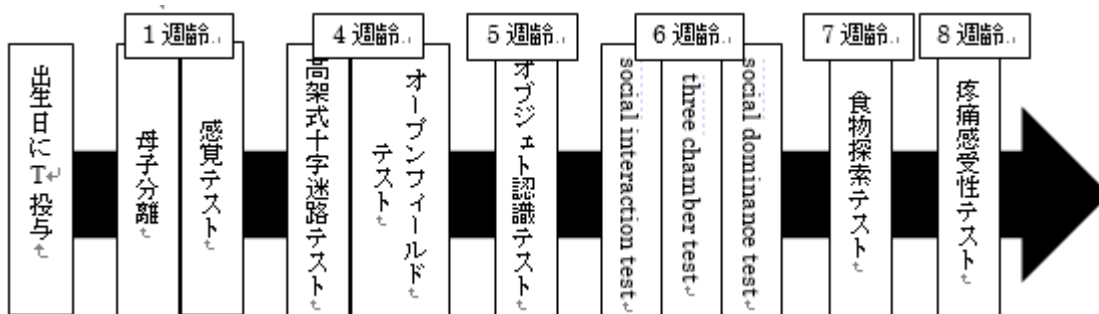
- (1) Tを投与されたメスの *Crmp4* KOマウスもオスの *Crmp4* KOマウスと同様程度、自閉症様特を
発現するようになる。
- (2) グルタミン酸受容体、グルタミン酸トランスポーター、オキシトシン受容体などについて、オス
Crmp4 KOマウスで見られた発現異常が、Tを投与されたメス欠損マウスでも見られるようになる。

【(1)の実験内容】

① 1 週齢：母子分離影響テストと感覚テストは、仔マウスの超音波発声を基に解析する。

仔マウスは母子間のコミュニケーションの一環として、超音波を発声する。母子分離刺激、巣と異なる匂い刺激及び外部温度刺激などは、野生型仔マウスの超音波発声を誘起することが知られる。*Crmp4*-KOマウスでは野生型に比べ、これらの刺激に対する超音波発声回数が低下すること、特にオスでその低下が著しいことを研究室では既に報告している。近年では、超音波発声の回数だけではなく、そのパターンや繰り返しを含むフレーズにコントロールマウスとASDモデルマウスとで差があると報告されている。本研究では、まず、*Crmp4*-KOマウス雌雄の超音波発声パターンに差があるか調べ、その後、生後0日にTを投与した個体を用いて、上記テストを行う。

②4週齢～8週齢：下記のチャートに示した行動テストバッテリーにより、不安様行動、活動性、学習能力、社会性、young adultでの嗅覚、疼痛感受性などを調べる。ASDに関連した行動テストとして最も重要な社会性試験については、social interaction test, three chamber test, social dominance testの3つのテストを実施する。



【(2)の実験内容】

注目している遺伝子の T による発現変化を、嗅球および海馬について調べる。(これらの部位については、*Crmp4*-KO による発現変化を 0 日～成体まで既に詳細に明らかにしている)。出生後各齢マウスを深麻酔下で断頭後、脳を摘出し、それぞれのマウスから嗅球および海馬を摘出する。RNAiso を用いてトータル RNA を抽出し、Transcription kit を用いて cDNA に逆転写後、得られた cDNA を用いて定量的リアルタイム RT-PCR を行い、遺伝子発現を調べる。

2. 研究経過および成果の概要

ASD の性差が性ステロイドによりもたらされるか検証するため、T を腹腔内投与後、ASD 様症状を超音波発声や行動テスト、感覚テストから評価しようとした。生まれてから腹腔内投与（注射）をしたため、そのストレスからか、野生型も ASD モデルマウス (*Crmp4*-KO マウス) も、生後 7 日目の超音波発声が酷く乱れてしまった（非常に頻回に鳴く個体や全く鳴かない個体など、個体差が激しく解析が困難になった）。そのため、コロナ感染防止によるロックアウト解除後、作用がマイルドであり脳の雄性化に影響する内分泌攪乱物質 Bisphenol A (BPA) をマウスの好物（ピーナッツバター）に混ぜて摂取させる方法をおこなっている（こちらの方法で摂取させた場合は、超音波発声の個体差が小さく解析可能なことを予備実験で確認した）。

一方、注射を行っていない個体について超音波発声解析を丹念に進めたところ、1 週齢の *Crmp4*-KO マウスの超音波発声のパターン解析により、野生型と比べて *Crmp4*-KO マウスでは異常がみられる鳴きパターンや、*Crmp4*-KO マウスの雌雄間の違いを明らかにすることができた。これについては現在、論文を執筆中である。

簡潔に結果について説明すると、*Crmp4*-KO マウスでは、母子単離を行った際の総発声数が有意に減少し、減少はオスで顕著であり、既に報告した変化が今回も再現された (Tsutiya *et al.*, 2017)。次に、WT および *Crmp4*-KO の雌雄マウスが発声した UVs の各カテゴリーの回数および割合を比較した結果、オス WT、メス WT およびメス *Crmp4*-KO マウスでは、各カテゴリーの発声回数や割合は類似していた。一方、オス *Crmp4*-KO マウスでは、特定のカテゴリー発声数の増減により、割合が変化し他の動物とは異なる発声回数や割合となっていた。これらの結果から、*Crmp4*-KO の影響や雌雄差は、UVs の詳細の解析でさらに明らかとなり、UVs の測定・解析が、ASD モデル動物の早期解析スタートに用いられることが明らかとなった。

3. 今後の研究における課題または問題点

今回の実験では、出生後の腹腔内投与（注射）によるストレスからか、野生型も ASD モデルマウス（*Crmp4*-KO マウス）も、生後 7 日目の超音波発声が酷く乱れてしまった。その点については、作用がマイルドであり脳の雄性化に影響する内分泌攪乱物質 Bisphenol A (BPA) をマウスの好物（ピーナッツバター）に混ぜて摂取させる方法をおこなうことにより問題点を補っている（予備実験で確認済）。しかし、マウスへのストレスによる、超音波発声の変動は顕著であり、これらの要因となる温度や匂い刺激、母体の飼育状況は行き届いた管理が必要である。

Summary

1. Research method

Perform the following experiments to test the working hypothesis "Perinatal T affects gender differences in ASD (steroid hypothesis)"

On the day of birth, the androgen testosterone (T) is administered to male and female wild-type (WT) and *Crmp4*-deficient pups.

An equal amount of oil, which is a solvent, is administered to the control group (C).

After that, the following experiments (1) and (2) are performed according to the age of the week.

Results predicted from experiments.

If the steroid hypothesis is correct,

(1) T-administered female *Crmp4*-KO mice have autism-like characteristics to the same extent as male *Crmp4*-KO mice.

It will be expressed.

(2) Abnormal expression of glutamate receptor, glutamate transporter, oxytocin receptor, etc., which was observed in male *Crmp4*-KO mice, will also be observed in T-administered female-deficient mice.

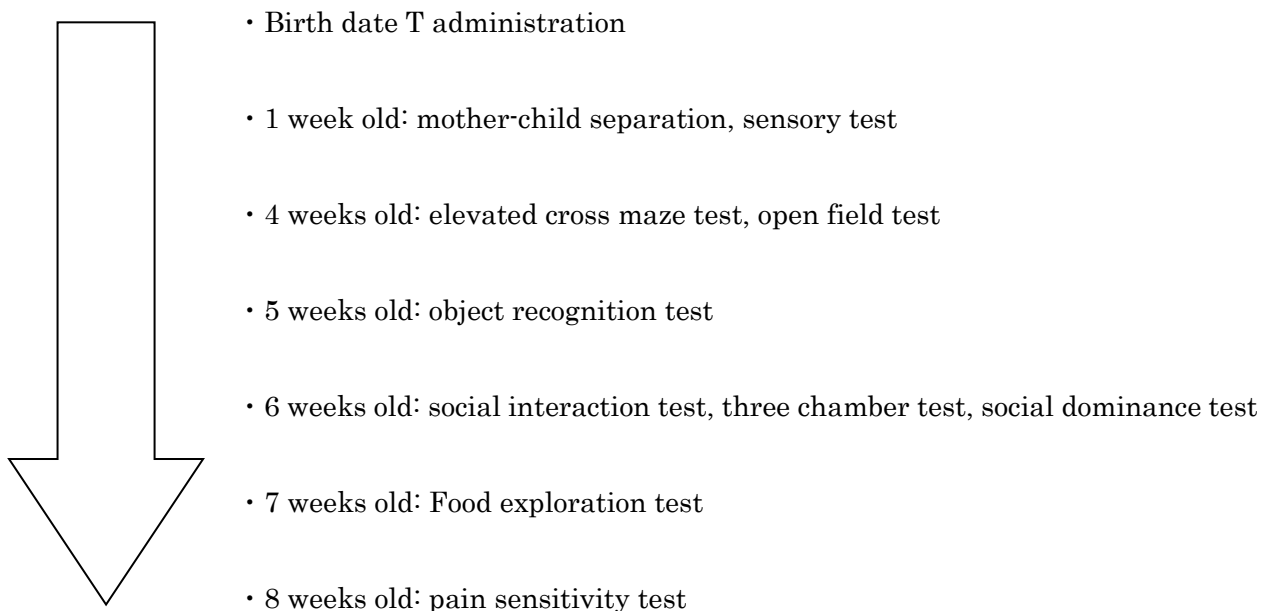
[Experimental content of (1)]

(1) 1 week old: The mother-child separation effect test and sensory test are analyzed based on ultrasonic vocalization of pups.

The pups emit ultrasonic vocalization as part of communication between the mother and child. It is known that mother-infant separation stimuli, odor stimuli different from nests, and

external temperature stimuli induce ultrasonic vocalization in WT pups. The laboratory has already reported that *Crmp4*-KO mice have a lower number of ultrasonic vocalizations in response to these stimuli than WT, especially in males. In recent years, it has been reported that there is a difference between the control mouse and the ASD model mouse not only in the number of ultrasonic vocalizations but also in the phrase including the pattern and repetition. In this study, we first investigated whether there was a difference in ultrasonic vocalization patterns between male and female *Crmp4*-KO mice, and then performed the above test using individuals who received T on the 0th day after birth.

(2) 4 to 8 weeks of age: The behavior test battery shown in the chart below is used to examine anxiety-like behavior, activity, learning ability, sociality, olfaction in young adults, and pain sensitivity. For the most important social tests related to ASD, three tests are conducted: social interaction test, three chamber test, and social dominance test.



[Experimental content of (2)]

We will investigate changes in the expression of the gene of interest due to T administration in the olfactory bulb, cerebral cortex, and hippocampus. (For these sites, changes in expression due to *Crmp4* deficiency have already been clarified in detail from day 0 to adults). After decapitation of each age mouse under deep anesthesia after birth, the brain is removed, and the olfactory bulb, cerebral cortex and hippocampus are removed from each mouse. Total RNA is extracted using RNeasy, reverse transcription is performed on cDNA using the Transcription kit, and quantitative real-time RT-PCR is performed using the obtained cDNA to examine gene expression.

2. Summary of research progress and results

In order to verify whether the sex difference of ASD is caused by sex steroids, we tried to

evaluate ASD-like symptoms by ultrasonic vocalization, behavioral test, and sensory test after intraperitoneal administration of T. Since intraperitoneal administration (injection) was performed after birth, the ultrasonic vocalization on the 7th day after birth was severely disturbed in both WT and ASD model mice (*Crmp4*-KO mice) due to the stress (very frequently. Individual differences, such as those that squeal and those that do not squeal at all, made it difficult to analyze). Therefore, after the lockdown is released by preventing corona infection, the endocrine disruptor Bisphenol A (BPA), which has a mild action and affects virilization of the brain, is mixed with the mouse's favorite food (peanut butter) and ingested. (Preliminary experiments confirmed that individual differences in ultrasonic vocalizations were small and could be analyzed when ingested by this method).

On the other hand, when ultrasonic vocal analysis was carefully carried out for individuals who had not been injected, the pattern analysis of ultrasonic vocalization in 1-week-old *Crmp4*-KO mice showed abnormalities in *Crmp4*-KO mice compared to WT. In addition, we were able to clarify the difference between males and females of *Crmp4*-KO mice. I am currently writing a treatise on this.

Briefly, the results were significantly reduced in *Crmp4*-KO mice during maternal and child isolation, with a marked decrease in males, and the previously reported changes were reproduced again (Tsutiya *et al.*, 2017). Next, as a result of comparing the number and rate of each category of UVs uttered by male and female mice of WT and *Crmp4*-KO, the number and rate of utterance of each category were similar in male WT, female WT and female *Crmp4*-KO mice. Was there. On the other hand, in male *Crmp4*-KO mice, the ratio changed as the number of vocalizations in a specific category increased or decreased, and the number and ratio of vocalizations were different from those of other animals. From these results, it was clarified that the influence of *Crmp4*-KO and the sex difference were further clarified by detailed analysis of UVs, and that the measurement and analysis of UVs was used to start the early analysis of ASD model animals.

3. Issues or problems in future research

In this experiment, the ultrasonic vocalization on the 7th day after birth was severely disturbed in both the WT and ASD model mice (*Crmp4*-KO mice), probably due to the stress caused by intraperitoneal administration (injection) after birth. In that regard, the problem is compensated for by mixing the endocrine disruptor Bisphenol A (BPA), which has a mild action and affects virilization of the brain, with the favorite food of mice (peanut butter). Confirmed in preliminary experiments). However, fluctuations in ultrasonic vocalization due to stress on mice are remarkable, and it is necessary to carefully manage the temperature, odor stimulation, and maternal rearing conditions that cause these factors.

心臓再生を目指した Sall の機能解析

Functional analysis of transcription factors Sall1/4 for heart regeneration

研究代表者 片野 亘(生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 小柴 和子

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①心臓 heart

②発生 development

③再生 regeneration

④Sall1

⑤Sall4

2020 年度交付額／560 千円

研究発表／学会および口頭発表

1. 片野 亘, 森 俊太, 多鹿 友喜, 竹内 純, 小柴 和子

「二次心臓領域形成と心筋の増殖維持における転写因子 Sall1/4 の機能解析」

日本心臓血管発生研究会 オンライン, 2020 年 12 月 (口頭発表)

2. Wataru Katano, Shunta Mori, Yuki Tajika, Jun K Takeuchi, Kazuko Koshiba-Takeuchi

「Sall1/4 are essential for heart development though regulation of *Isl1* and *Myocd* expression」

第 43 回分子生物学学会, オンライン, 2020 年 12 月 (ポスター発表)

3. 片野 亘, 森 俊太, 多鹿 友喜, 竹内 純, 小柴 和子

「二次心臓領域形成および心筋の増殖・維持における転写因子 Sall1/4 の役割」

日本動物学会第 91 回大会, オンライン, 2020 年 9 月 (ポスター発表)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

近年の研究により心臓再生機構の一端が明らかにされつつあるが、心臓に再生能を誘導できる因子については多くは知られていない。我々のグループは先天性心疾患の原因因子として報告されている転写因子 Sall1/4 着目し、Sall の機能阻害マウスでは心室壁が著しく菲薄することを見出した。本研究では、心筋分化とその増殖・維持における転写因子 Sall の詳細な役割を明らかにし、心臓再生との関連性を探ることを目的とした。

心臓特異的 Sall 機能阻害マウスは、心臓特異的に遺伝子組換え酵素 Cre を発現する *Nkx2.5^{Cre/+}* マウスと Cre 依存的に S4-R2 (Δ Sall4) を発現する *CAG-CAT- Δ Sall4* マウスを掛け合わせることで作出した。 Δ Sall4 は C 末端側の機能ドメインを欠失した短い不完全な Sall4 タンパク質であり、正常な Sall1 及び Sall4 タンパク質に対してドミナントネガティブに作用する。この Sall 機能阻害マウスを用いて、Sall1/4 が心筋に与える影響を qRT-PCR、免疫染色、*in situ* hybridization により詳細に解析した。さらに、Sall1/4 の下流ではたらく遺伝子を明らかにするために RNA-seq を実施し、発現変動のみられた心筋分化に関連する遺伝子の発現を詳細に解析した。

2. 研究経過および成果の概要

Sall1/4 が心筋分化に及ぼす影響を詳細に解析するために、心筋のミオシン重鎖をコードする *Myh6* と *Myh7* の発現を qRT-PCR で定量した結果、胎生 12.5 日目の Sall 機能阻害マウスでは *Myh7* の発現が著しく減少していた。さらに、心筋細胞の増殖・維持への影響を調べるために、Ki67 (細胞増殖マーカー) または Cleaved Caspase-3 (アポトーシスマーカー) と心筋の核に発現する Nkx2.5 の共免疫染色を行なったところ、Sall 機能阻害マウスでは増殖心筋細胞数が減少し、アポトーシスの亢進が認められた。これらの結果から、Sall1/4 が心筋分化とその増殖・維持に重要な役割を果たすことが明らかになった。

次に、Sall1/4 の心筋分化とその増殖・維持における詳細な分子機能を明らかにするために、胎生 10.5 日目の心室と流出路を用いて RNA-seq を行なった。Gene Ontology 解析の結果から、Sall 機能阻害マウスでは、細胞周期とサルコメア形成に関連する遺伝子群の発現が減少することがわかった。そして興味深いことに、Sall 機能阻害マウスではサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の *Cdkn1a* の発現が大きく上昇していた。そこで Sall1/4 がこれらの遺伝子の発現を上流で直接制御しているのではないかと考え、上流配列の解析を行ったところ、種間の保存性が高い *Cdkn1a* の上流約 7 kbp の領域に Sall4 と心臓転写因子の Nkx2.5、Gata4 の結合配列が近接して存在することがわかった。したがって、Sall4 は *Cdkn1a* の発現を他の心臓転写因子と協調して、発現量を調節することで心筋細胞数を調節している可能性が示唆された。次に、Sall 機能阻害マウスにおいて発現変化が見られた遺伝子のうち、心筋分化に重要な遺伝子に着目して解析を行なったところ、Sall 機能阻害マウスでは心筋分化に重要な転写因子である *Srf*, *Nkx2.5*, *Myocd* が著しく発現減少していることが明らかになった。*Myocd* 阻害マウスでは増殖心筋細胞数の減少とアポトーシスの亢進に伴う心室壁の菲薄化が引き起こされ、Sall 機能阻害マウスで生じる表現型に類似していたことから *Myocd* は Sall4 の標的遺伝子なのではないかと考えた。そこで、2006 年に Creemers らによって報告された *Myocd* のエンハンサー領域について転写因子結合予測データベースの JASPAR を用いて Sall4 の結合配列を探索したところ、*Myocd* エンハンサー領域には Sall4 とその近傍に心臓転写因子の Nkx2.5、Gata4、Tbx5、Mef2c の結合配列が含まれていることが見出された。これらの結果から、Sall1/4 が *Myocd* の発現を他の心臓転写因子と協調して、発現量を調節することで心筋細胞の増殖・維持に寄与している可能性が示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究により、Sall1/4 の心筋分化とその増殖・維持における役割についてその一端が明らかになり、心臓再生時にも重要な役割を担っている可能性が示された。今後は、心臓再生が可能な動物であるゼブラフィッシュやメキシコサンショウウオを用いて、心臓再生時の Sall1/4 の発現様式を明らかにすること、また培養細胞を用いて Sall1/4 の機能を阻害あるいは過剰発現させたときの心筋分化や増殖への影響を調べることで、心臓再生過程における Sall1/4 の役割を明らかにしていきたい。

Summary

The adult mammalian heart has a limited regeneration capacity and the serious heart failures lead to human death. In contrast to adult mammals, urodele amphibians, zebrafish and neonatal mice can regenerate the heart following injury. Recent studies indicate that these vertebrates,

which have high regeneration capacity, promote the cardiomyocytes proliferation by the activation of developmental gene regulatory networks during the heart regeneration process. Our group has focused on *SALL1* and *SALL4*, both coding Zn-finger transcription factors, and revealed that Sall1/4-functional inhibition mice exhibit thinner ventricular wall. In this study, we examined the roles of Sall1/4 for the cardiomyocyte differentiation, proliferation and maintenance using the heart specific Sall1/4-functional inhibition mice by forced expression of truncated form of Sall4 (Δ Sall4). In the Δ Sall4-overexpression (OE) mice, the proliferation of cardiomyocytes (CMs) was suppressed and the increase of apoptosis occurred. Adding to that, qRT-PCR analysis showed that the expression of *Myh7* which encodes cardiac myosin heavy chain was significantly reduced in Δ Sall4-OE mice. To clear the downstream genes of Sall1/4, we performed RNA-seq. Gene Ontology analysis showed that cell cycle and sarcomere organization genes were downregulated in the Δ Sall4-OE mice. Interestingly, the expression of *Cdkn1a* (cyclin dependent kinase inhibitor) was significantly upregulated and we found the Sall4 binding sequence in the highly conserved upstream region of *Cdkn1a*. These results indicate that Sall1/4 would promote the cardiomyocyte proliferation by suppress the expression of *Cdkn1a*. Next, we created a heatmap of cardiomyocyte differentiation-related genes and found that *Nkx2.5*, *Srf* and *Myocd*, which are key regulators of cardiac muscle genes, were significantly decreased in the Δ Sall4-OE mice. Then, we examined *Myocd* enhancer that is sufficient for *Myocd* expression in heart and found that it contains the Sall4 and several cardiac-transcription factors (Mef2c, Tbx5, Nkx2.5 and Gata4)-binding sequences. These results indicating that Sall4 would directly regulate *Myocd* expression through the interaction with other cardiac transcription factors.

Our data suggested that Sall1/4 play important roles for CMs differentiation, proliferation and maintenance through the regulation of *Cdkn1a* and *Myocd* expressions and these facts provide the possibility that Sall1/4 might have important function during the heart regeneration.

HT22 細胞における暑熱ストレス応答のメカニズムの解析（和題）

Analysis of the mechanism of heat stress response in HT22 cells（英題）

研究代表者 加藤 萌(生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 川口 英夫

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①暑熱ストレス	heat stress
②分子シャペロン	molecular chaperone
③ヒートショックプロテイン	heat shock proteins (HSPs)
④小胞体ストレス	Endoplasmic reticulum (ER) stress
⑤熱中症	heat stroke

2020 年度交付額／ 560,000 円

研究発表／学会および口頭発表

・第 98 回日本生理学会、2021 年 3 月 29 日開催予定、ポスター発表

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

この研究は熱射病時に脳が受ける損傷（意識障害など）に対し、対策法を確立することを目標としている。対策法として、あらかじめ弱いストレスを負荷することでその後より強いストレスに対し、耐性を獲得することができる適応的細胞保護（adaptive cytoprotection）を利用することができると考えている。また、過度な熱ストレスは細胞質、小胞体ではそれぞれ熱ショック応答、小胞体ストレス応答を引き起こすことが知られている。しかし、これら二つのストレス応答と適応的細胞保護の獲得との関係性についての研究はまだ少ない。そこで、本研究ではマウス海馬由来の細胞株である HT22 細胞を用いて、弱熱処理により HSP70 を発現させ適応的細胞保護を獲得することで、暑熱ストレス（43 °C）下において、eIF2 α のリン酸化の抑制による翻訳抑制の抑制が生じるかどうか検討した。すなわち、適応的細胞保護における熱ショック応答と小胞体ストレス応答の関係の検討である。本研究は、引いては熱中症における中枢神経系の重症化の予防法に繋がることを期待できる。具体的には以下の流れで行った。

・使用細胞：HT22 細胞（マウス脳海馬由来神経様細胞）

・解析方法：HSP70 の経時的発現量の測定（real-time RT-PCR、Western Blotting）

暑熱ストレス処理時における小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現量測定
（real-time RT-PCR）

暑熱ストレス処理時における PERK および eIF2 α のリン酸化測定
（Western Blotting）

2. 研究経過および成果の概要

弱熱処理が HSPs とは別の分子シャペロンに与える影響を調べることで適応的細胞保護の効果を小胞体ストレス応答に与える影響に着目し、調べた。弱熱処理により HSP70 が発現されることで eIF2 α のリン酸化は起こらなかったが、弱熱処理を行わず暑熱ストレスを負荷したところ、暑熱ストレス処理 6 時間後には PERK にリン酸化の促進の傾向が見られた。また、弱熱処理後、暑熱ストレス処理 24 時間後において eIF2 α にリン酸化に有意差は見られなかった。これは HSP70 の発現による保護効果が働いているため、細胞が eIF2 α のリン酸化による翻訳抑制を行う必要がないと判断したためであると考ええる。また、別の可能性として、HSP70 の機能阻害を行い、弱熱処理を行ったものは、阻害をせずに弱熱処理したものと比較して、暑熱ストレス負荷 6 時間後に PERK および eIF2 α でリン酸化が促進されたが、有意差は見られなかった。このことから HSP70 以外の分子シャペロンである HSP90 や GRP78 などが働くことによって小胞体へのストレスが軽減されたと考えられる。

以上より、弱熱処理によりあらかじめ HSP70 の発現量を上昇させることによる適応的細胞保護の獲得は、eIF2 α のリン酸化を抑制することで熱ショック応答の抑制を引き起こさず、暑熱ストレス下でも HT22 細胞が生存できることが示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究では、HT22 細胞において適応的細胞保護の獲得は eIF2 α のリン酸化の抑制をすることで、翻訳抑制の抑制を引き起こし、熱ショック応答を促進する可能性があることが分かった。しかし、本研究では暑熱ストレス負荷初期における eIF2 α のリン酸化の経時的変化を調査していない。そのため、eIF2 α のリン酸化の経時変化を追うことで HSPs との発現バランスを検討する必要がある。また、翻訳抑制の抑制により、新たな HSP70 の発現への影響を見る必要があると考える。このことから、HSP70 の発現を様々な段階で制御し、その際の eIF2 α のリン酸化を見る必要があると考える。HSP70 を制御している HSF1 の抑制を Triptolide を用いて eIF2 α への影響を検証する必要がある。また、今回は Pifithrin mu を用いた HSP70 の機能阻害を行ったが、siRNA による RNA 干渉により、HSP70 の遺伝子発現をノックダウンする方法が適しているのではないかと考える。また、今回は HT22 細胞におけるストレス応答を解析したが、他の中枢神経系の細胞である Glia 細胞での同様の検討を行う必要がある。また、適応的細胞保護の獲得は細胞レベルから個体レベルでも確認できることから、共培養や成体での検討も進める必要がある。

以上の実験を行うことで適応的細胞保護の獲得における要因解明となり、個体レベルでの対策法の確立につながる可能性がある。

Summary

【Background and purpose】

The most severe heat stroke among heat strokes may cause sequelae due to abnormalities of the central nervous system in addition to dysfunction of various organs, so it is necessary to establish a preventive method. Organisms live under various stresses. It is known that when cells receive heat stress, they provoke both heat shock response and endoplasmic reticulum stress response, but excessive heat stress causes translational repression by phosphorylation of the endoplasmic reticulum-related protein eIF2 α . There is a report that it suppresses the action

of heat shock response by HSPs. In addition, when weak stress is applied to cells in advance, there is an effect called adaptive cytoprotection that can withstand stronger stress, and there are many reports that HSPs are involved in this protective effect. However, there are still few studies on the relationship between these two stress responses and adaptive cell protection. Therefore, in this study, we used HT22 cells, which are cell lines derived from the mouse hippocampus, to express HSP70 by weak heat treatment to obtain adaptive cell protection, thereby phosphorylating eIF2 α under heat stress (43 ° C). We examined whether suppression of translation suppression would occur. That is, the relationship between the heat shock response and the endoplasmic reticulum stress response in adaptive cell protection is examined. This study is expected to lead to a preventive method for the aggravation of the central nervous system in heat stroke.

【Method】

The effect of HSP70 expressed by weak heat treatment on HT22 cells under heat stress loading was investigated focusing on endoplasmic reticulum stress-related genes. After the weak heat treatment, the expression level of the endoplasmic reticulum stress-related gene 24 hours after the heat stress load was measured by qPCR. In addition, after weak heat treatment, the expression level of endoplasmic reticulum stress-related protein after 6 hours and 24 hours of heat stress loading was measured by Western Blotting. In addition, HSP70 was functionally inhibited by Pifithrin mu before loading with low heat stress, and the expression of endoplasmic reticulum stress-related genes and proteins was measured by qPCR and Western Blotting, respectively.

【Results and discussion】

When the weakly heat-treated HT22 cells were subjected to heat stress, a significant difference was observed in the expression level of the weakly heat-treated eIF2 α . In addition, due to the weak heat treatment, phosphorylation of eIF2 α was not observed after 6 hours of heat stress loading. Furthermore, when the function of HSP70 was inhibited, phosphorylation of eIF2 α was observed after 6 hours of heat stress loading, indicating that weak heat treatment can suppress phosphorylation of eIF2 α . From the above, it was suggested that adaptive cell protection suppresses the phosphorylation of eIF2 α and thus survives without causing suppression of the heat shock response.

ドレブリン欠損マウスにおける行動表現型とシナプス形態異常に関する研究

Behavioral phenotype and synaptic morphology in drebrin knockout mice.

研究代表者 澤辺 舞衣 (生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 児島 伸彦

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①ドレブリン Drebrin

②動物行動表現型 Animal behavior

③シナプス構造可塑性 synaptic structural plasticity

④樹状突起スパイン dendritic spine

⑤Homer Homer

2020 年度交付額／ 552000 円

研究発表／学会および口頭発表

・「Changes in spine morphology and learning behavior in drebrin knockout mice.」

澤辺舞衣-児島伸彦 第 98 回日本生理学会 (2021 年 3 月 28 日発表予定)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

興奮性シナプスの後部構造は樹状突起スパイン (以下、スパイン) と呼ばれ、その形態は神経活動に伴ってダイナミックに変化することが知られている。精神遅滞や認知症など認知機能障害を伴う精神疾患では、その形態に異常がみられることから、スパインの形態は認知機能と密接な関係にあると考えられている。従って、スパイン形態制御のメカニズムの解明は、認知機能のしくみの理解のみならず、精神疾患のしくみの解明や、治療薬開発につながると考えられる。

スパイン形態はアクチン細胞骨格によって制御されており、アクチン線維結合タンパク質ドレブリンが鍵分子として考えられている。ドレブリンは F-アクチンに結合し、アクチンを安定化させる働きがある。学習記憶の基盤と考えられている LTP、LTD はスパイン形態変化を伴うが、LTP の誘導に伴うドレブリンの増加も報告されている。また、ドレブリンはアクチン細胞骨格のみならず、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の足場タンパク質 Homer との結合部位を持つため、mGluR 活性がドレブリン-Homer 相互作用を介してスパイン形態を制御している可能性も考えられる。しかし、ドレブリンが動物の学習行動や *in vivo* でのスパイン形態制御にどのように関わっているか、スパイン形態変化におけるドレブリン-Homer 相互作用の関与については不明な点が多い。そこで、本研究では次の点について明らかにすることを目的とした。①ドレブリンの欠損によるスパイン形態への影響、②ドレブリンの欠損による動物の行動表現型への影響、③スパイン形態変化におけるドレブリン-Homer 相互作用の役割。以上、3 点を明らかにするために、ドレブリン欠損 (DXKO) マウスを用いた行動表現型の解析と初代培養ニューロンの細胞生物学的解析を行った。実験内容は次の通りである。

①ドレブリンの欠損によるスパイン形態への影響: DXKO マウスの同腹マウスの野生型 (以下、WT マウス)、ホモマウス (以下、KO マウス) を用いた。麻酔下で断頭を行い脳摘出後、FD Rapid

GolgiStain™ Kit（コスモ・バイオ株式会社）を用いてゴルジ染色を行った。染色後、海馬を含む 50 μm 厚の切片を作製し、海馬 CA1 錐体細胞先端樹状突起上のスパイン密度及びスパイン形態の解析を実施した。

②ドレブリンの欠損による動物の行動表現型への影響：DXKO マウスの同腹マウスの WT マウス、KO マウスを用いた。行動表現型の解析として、マウスの不安様行動を評価するオープンフィールドテスト及び明暗選択テスト、マウスの社会性相互作用を評価する 3 チャンバー社会性相互作用テスト、マウスの学習記憶能力を評価する新規物体識別テスト、マウスの常同行動を評価するガラス玉覆い隠しテスト、マウスの抑うつ行動を評価する強制水泳テストを記述順に行った。

③スパイン形態変化におけるドレブリン-Homer 相互作用の役割：海馬初代培養ニューロンの培養 7 日目に Myc-tag で標識したドレブリン-Homer 結合モチーフ（PPATF）を含むカルボキシル基末端（C 末端）配列の発現ベクター（Myc-HBM）を導入した。対照として Homer 結合モチーフを点変異した（PKATF）同配列の発現ベクター（Myc-mHBM）を用いた。培養 21 日目に抗 Myc 抗体と抗ドレブリン抗体による二重免疫染色を行い、蛍光顕微鏡によって各タンパク質の局在解析及びドレブリンクラスター数の解析を行った。

2. 研究経過および成果の概要

①ドレブリンの欠損によるスパイン形態への影響

KO マウスの場合、WT マウスと比較しスパインの密度が有意に小さかった。各スパイン形態を計測すると、KO マウスでは成熟したスパインが少なく、一方、未熟な形態（フィロポディア）が多いことが確認できた。

②ドレブリンの欠損による動物の行動表現型への影響

オープンフィールドテスト及び明暗選択テストより、ドレブリンの欠損ではマウスの不安様行動の亢進が確認できた。次に 3 チャンバー社会性相互作用テストおよび新規物体識別テストより、ドレブリンの欠損によるマウスの記憶能力の低下が確認できた。最後に、強制水泳テストより抑うつ行動が確認できた。

①と②の結果より、ドレブリンの欠損はスパイン形態に異常をもたらすのみならず、行動表現型にも影響することが明らかとなった。

③ドレブリン-Homer 結合の役割

各タンパク質の局在解析の結果、Myc-mHBM 発現ニューロンでは、ドレブリンと Myc-tag の局在が一致した。一方、Myc-HBM 発現ニューロンでは、ドレブリンと Myc-tag の局在は一致しなかった。このことから、ドレブリンの局在の一部は Homer 結合部位に依存することが示唆された。次に、各ベクター発現ニューロンにおける、ドレブリンクラスター数を解析した結果、Myc-HBM 発現ニューロンでは、ドレブリンクラスター数が有意に増加していることが確認できた。以上の結果より、ドレブリン-Homer 結合はドレブリンの局在を制御している可能性が考えられる。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究では、ドレブリンの欠損がスパイン密度の低下とスパイン形態の異常といった組織学的な変化と不安様行動および学習記憶能力の低下、抑うつ行動といった行動表現型へ影響を見出すことができた。また、ドレブリンと Homer の結合を阻害した場合、ドレブリンがスパインに集積することが分かった。しかし、そのメカニズムは本研究では検討できていない。ドレブリン-Homer 結

合阻害によるdrebrinの集積は次の2つのメカニズムが考えられる。1、Homerとdrebrinの結合によってdrebrinのスパイン集積が抑制されており、結合阻害によってその抑制が解除される。2、Homerとdrebrinの結合阻害によって、drebrinの働きが弱くなり、その結果、代償的にスパインにdrebrinを供給する作用が働くという考えであり、2つの可能性を検証する研究をしていく必要があると考えている。その方法として、Homer過剰発現によるdrebrinクラスター数の計測やdrebrinの働きを阻害する実験が必要と考える。また、いずれの場合においてもdrebrinタンパク量が増加したのか、細胞内分布が変化しただけなのかも検証する必要がある。以上の研究を行うことにより、drebrin-Homer結合の役割を明らかにすることができると考えている。

Summary

Dendritic spine morphology is known to change dynamically with neural activity and related to higher brain functions. It has been suggested that drebrin is a key protein for spine morphogenesis and plasticity. Spine morphology is regulated by the actin cytoskeleton, and the actin binding protein drebrin is thought to be a key molecule. In addition, drebrin has a binding motif with the metabotropic glutamate receptor (mGluR) scaffolding protein Homer, suggesting that mGluR activity may regulate spine morphology via the drebrin-Homer interaction. However, it remains unclear how drebrin is involved in learning behavior and in vivo regulation of spine morphology in animals, and the involvement of the drebrin-Homer interaction in spine morphological changes. In this study, we examined to elucidate the following points.

(1) the effect of drebrin knockout on spine morphology, (2) the effect of drebrin knockout on behavioral phenotype of animals, and (3) the role of drebrin-Homer interaction in spine morphological changes. To clarify these three points, we analyzed behavioral phenotypes using drebrin-knockout (DXKO) mice and cell biological analysis of primary cultured neurons.

The results showed a decrease in hippocampal spine density and an increase in immature spines in the KO mice of DXKO. In addition, KO mice showed increased anxiety-like behaviors, decreased learning and memory abilities, and depressive behaviors. Inhibition of drebrin-Homer binding by Myc-HBM resulted in coincident localization of drebrin and Myc-tag. Furthermore, the number of drebrin clusters was increased.

These results indicate that the knockout of drebrin not only causes abnormalities in spine morphology, but also affects behavioral phenotypes. In addition, the drebrin-Homer interaction may regulate the localization of drebrin in the spine.

Abnormalities in spine morphology have been reported in neuropsychiatric disorders associated with cognitive dysfunction. It is also known to be associated with autistic-like behaviors such as anxiety disorders and learning memory impairment. However, the relationship between spine morphology and behavioral phenotype has not been focused on. In this study, we found that the drebrin knockout not only causes abnormalities in spine morphology but also affects the behavioral phenotype of animals. It has been reported that

accumulation of drebrin in the spine is necessary for spine maturation. In addition, Homer is required for the localization of drebrin in the spine, and this study revealed that the drebrin-Homer interaction is the key to the localization of drebrin in the spine.

成熟ティラピアで GnRH3 ニューロンが嗅上皮から発生するか

また 11-KT はそれを促進するか？

Whether GnRH3 neurons develop from the olfactory epithelium in mature tilapia? Does 11-KT promote this process?

研究代表者 沖田 圭介(生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 金子 律子

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①脳の性転換

②神経細胞

③細胞増殖

④嗅上皮

⑤移動

2020 年度交付額／ 556,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・ 11-KT 投与により新生する成熟雌ティラピア GnRH3 ニューロンはどこから来るか？

沖田圭介、金子豊二、村上志津子、大谷 - 金子律子

(日本動物学会 第 91 回 オンライン大会 ポスター発表)

- ・ 11-ketotestosterone (11-KT) 投与により新生する成熟雌ティラピア GnRH3 ニューロンの由来はどこか？

(2020 年度 3 月修了生命科学研究科修士論文発表会 口頭発表)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

(1)成熟雌ティラピアの嗅上皮を片側焼却する実験：成熟雌ティラピア (*Oreochromis mossambicus*：体重 15～30 g) を用い、成熟雌ティラピアの片側嗅上部（嗅上皮）を電気メスで焼却した。その後、11-ketotestosterone (11-KT) 投与群には 99.5% エタノールで溶解した 11-KT 溶液 (5 µg/g) と sesame oil を 1:9 の割合で混合した 11-KT/sesame oil を体重当たり 5 µl/g 腹腔内投与し、Control 群には sesame oil を体重当たり 5 µl/g 腹腔内投与した。1 週間後麻酔下で灌流固定を行い、嗅覚部を含む頭部および脳を摘出した。頭部は脱灰後、クリオスタット切片 (30 µm 厚) を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。脳は 16 µm の厚さで 3 シリーズのクリオスタット切片を作製した。1 シリーズの切片を用いて、抗 salmon GnRH (sGnRH) 抗体 (×3000) を用いた免疫染色と核染色の二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

(2)鼻腔へのトレーサー投与実験：成熟雌ティラピア (体重 16～25 g) を用いて実験を行った。トレーサーには、①DiI (0.5% in N,N-ジメチルホルムアミド)、②CFDA-SE (10 mM in ジメチルスルホキシド)、③BrdU (100 µM in 0.9% 生理食塩水) の 3 種類を用いた。11-KT 投与群には 99.5% エタノールで溶解した 11-KT 溶液 (5 µg/g) と sesame oil を 1:9 の割合で混合した 11-KT/sesame

oil を体重当たり 5 μ l/g 腹腔内投与し、Control 群には sesame oil を体重当たり 5 μ l/g 腹腔内投与した。その後、各トレーサーを片側鼻腔に投与した。1 週間後麻酔下で灌流固定を行い、嗅上皮を含む頭部および脳を摘出した。頭部は脱灰後、クリオスタット切片 (30 μ m 厚) を作製し免疫染色を行った。脳は 20 μ m の厚さで 3 シリーズのクリオスタット切片を作成した。1 シリーズの切片を用いて免疫染色を行った。①と②は抗 salmon GnRH (sGnRH) 抗体 ($\times 7000$) を用いた免疫染色と核染色の二重染色を行い、③については抗 sGnRH 抗体 ($\times 7000$) を用いた免疫染色を行った後、抗 BrdU 抗体 ($\times 400$) を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

2. 研究経過および成果の概要

(1)の実験：11-KT 投与群では Control 群に比べ、Intact 側の GnRH3 ニューロン数が有意に増加した。また嗅上皮の焼却により、Control 群でも 11-KT 群でも、GnRH3 ニューロン数の減少が見られた。その際、11-KT 投与群での GnRH3 ニューロン数の減少が著しく、11-KT による GnRH3 ニューロンの増加が消失し Control 群の焼却側とほぼ同じレベルまで数が減少した。このことから、GnRH3 ニューロン数の維持や 11-KT による増加には、嗅上皮あるいはその周辺組織が必要であることが分かった。

(2)の実験：①細胞体が標識されるが、逆行性や順行性にも拡散し軸索や樹状突起も標識する DiI、②細胞体内で安定型に変換され、逆行性や順行性に運ばれる可能性が低い CFDA-SE、③増殖細胞マーカーであり、新生した細胞の核 (DNA) を標識する BrdU、の 3 種類のトレーサーをそれぞれ別個体の片側鼻腔に投与し、嗅上皮の細胞に取り込ませた。そしてこれらのトレーサーを取り込んだ細胞を脳切片上で観察し、標識細胞数や標識 GnRH3 ニューロン数を定量化した。その結果、3 つのトレーサーのいずれを投与した場合も、標識された GnRH3 ニューロンが Control 群と 11-KT 群の終神経節内で観察された。またいずれのトレーサーを用いた場合でも、Control 群に比べて 11-KT 群の方が、標識された GnRH3 ニューロン数が有意に高かった。3 種類のトレーサーによって脳内 (終神経節内) の GnRH3 ニューロンが標識されたことから、嗅上皮でトレーサーを取り込んだ細胞が、嗅上皮から脳内まで移動し、GnRH3 ニューロンに分化したことが強く示唆された。さらに、標識された GnRH3 ニューロン数が 11-KT 投与により増加したことから、11-KT は嗅上皮での神経幹細胞の増殖や脳への移動、GnRH3 ニューロンへの分化を促進させる可能性が示唆された。

本研究とこれまでの報告により、11-KT 投与により新生する GnRH3 ニューロンの由来は嗅上皮である可能性が示唆された。これまで成体での神経新生は、哺乳類では海馬と脳室下帯、魚類ではその 2 つの部位に加えて脳室周囲で起こると報告されている (Migaud M. *et al.*, 2016, Ekström P. *et al.*, 2001)。嗅上皮から脳内へ神経細胞が移動することが明らかになれば、末梢組織で新生した神経細胞が脳へと移動することになり、全く新しい発見となる。

3. 今後の研究における課題または問題点

現在、(2)のトレーサー実験では 2 つの問題点が存在している。1 つ目は①で使用した DiI トレーサーが嗅上皮から脳内へ逆行的に取り込まれた可能性がある点、2 つ目は③で使用した BrdU が血管を通過して脳内へ取り込まれた可能性がある点である。これらの問題点を解決するために上記の 2 種類のトレーサーの同時投与を行いたいと考えている。この実験方法であれば、DiI が仮に血管を通過しても脳に到達するより前の段階で DiI が拡散すると考えられる。また、BrdU に関しては逆行

性輸送で核に取り込まれることはないと考えられる。そのため、2つのトレーサーに標識された細胞はおそらく嗅上皮から脳へと移動した細胞であると考えられる。この方法を用いて2種類のトレーサーで標識された GnRH3 ニューロン、あるいは嗅上皮から脳の間を移動中の標識細胞を検出したいと考えている。

Summary

Tilapia show sexual dimorphism with males having a greater number of GnRH3 neurons than females. Treatment with androgens such as 11-ketotestosterone (KT), but not 17 β -estradiol, increases the number of GnRH3 neurons in mature females to a level similar to that observed in mature males. In our previous study, we revealed that 11-KT, a non-aromatizable androgen, induced the cellular proliferation in the brain near the terminal nerve (TN) which is known to control male sexual behavior. In addition, 11-KT was shown to induce adult neurogenesis, generation of newly-proliferated GnRH3 neurons, and increased expression of cell cycle-related genes in the brain region near TN. However, GnRH3 neurons labeled with cell proliferation markers in intraventricular administration experiments and slice culture experiments was not observed. From this result, I thought that it is unlikely that new GnRH3 neurons would be born from stem cells around the ventricles. In fish, GnRH3 neurons are known to develop from nasal placodes during embryogenesis. Therefore, I thought that GnRH3 neurons might be generated from the olfactory epithelium when 11-KT was administered even in adults.

In this study, to investigate whether the olfactory epithelium is involved in the increase in the number GnRH3 neurons were burned unilateral olfactory epithelium. In the 11-KT-administered group, the number of GnRH3 neurons on the Intact side increased significantly compared to the Control group. Incineration of the olfactory epithelium also reduced the number of GnRH3 neurons in both the Control group and the 11-KT group. At that time, the number of GnRH3 neurons decreased significantly in the 11-KT administration group, and the increase in GnRH3 neurons by 11-KT disappeared, and the number decreased to almost the same level as the incineration side of the control group. From this, it was found that the olfactory epithelium or its surrounding tissues are required for the maintenance of the number of GnRH3 neurons and the increase by 11-KT.

Next, a tracer was used to investigate whether GnRH3 neurons actually migrated from the olfactory epithelium. As a result, when the tracer was administered, GnRH3 neurons labeled in the terminal ganglia of the control group and the 11-KT group were observed. In addition, the number of labeled GnRH3 neurons was significantly higher in the 11-KT group than in the control group. Since GnRH3 neurons in the brain (terminal ganglia) are labeled with tracers, it is strongly suggested that cells that have taken up tracers in the olfactory epithelium migrated from the olfactory epithelium to the brain and differentiated into GnRH3 neurons. In addition, the number of labeled GnRH3 neurons is increased by administration of 11-KT, which may promote neural stem cell proliferation in the olfactory epithelium, migration to the brain, and differentiation into GnRH3 neurons.

カフェイン耐性乳酸菌におけるカフェイン耐性機構の解明

Analysis of caffeine-resistant mechanism on lactic acid bacteria

研究代表者 齊藤 可剛 (生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 三浦 健

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／① 乳酸菌	Lactic acid bacteria
② プロバイオティクス	Probiotics
③ コーヒー	Coffee
④ カフェイン	Caffeine
⑤ ゲノム解析	Genome analysis

2020 年度交付額／480,000 円

研究発表／学会および口頭発表

農芸化学会 2021 年度仙台大会

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

世界で広く日常的に飲用されているコーヒーにはカフェインやポリフェノールなど様々な化合物が多量に含まれ、人間に対する健康への効果のほか、カフェインにおいては、大腸菌や緑膿菌といった病原菌に対して抗菌活性がある。一方、人間にとって有益な乳酸菌の生育に対するカフェインによる悪影響も懸念される。そこで自然界からカフェイン耐性を有する乳酸菌の単離を行った。本研究では、自然界から単離したカフェイン耐性乳酸菌におけるカフェイン耐性機構の解明することを目的とした。走査型電子顕微鏡 (SEM) における菌体表面の観察を行った結果、カフェイン耐性乳酸菌においては、菌体表面に対する影響は観察されなかったが、対照として用いた *Lb. paracasei* NBRC 15889^T カフェインによる影響が生じていたため、タンパク質に着目し検証した。カフェイン耐性乳酸菌単離株 YSAK1 株および *Lb. paracasei* NBRC 15889^T を 1.0% カフェイン含有 MRS 液体培地で培養 (30℃、24 h) 後、タンパク質の抽出を行い、二次元電気泳動を用いてタンパク質を分離した。ゲル内消化を行い、タンパク質をペプチド化、MALDI-TOF/MS を用いて得られたペプチドの質量分析のピークを Mascot server にて検索し、タンパク質の同定を行った。また YSAK1 株からメタンスルホン酸エチルが終濃度 4% となるように 2 時間暴露させ作出したカフェイン感受性変異株における変異箇所の特定制を行った。カフェイン感受性作出株 (Y1.1 株、Y1.2 株、Y1.3 株、Y1.4 株) を MRS 液体培地 5 mL で培養 (30℃、24 h) した。培養後、集菌し、NucleoBond Buffer Set III および NucleoBond AXG 20 を使用し、ゲノム DNA の抽出を行った。ゲノム DNA の比較解析は、口腔常在微生物叢解析センターに委託した。

2. 研究経過および成果の概要

カフェイン存在下における菌体の表面を、SEM を用いて観察したところ、YSAK1 株に対する影響はなかったが、*Lb. paracasei* NBRC 15889^T の菌体の伸長および穿孔様が観察できた。大腸菌においてカフェインによって菌体の伸長が生じたと報告されており、乳酸菌においても同様に菌体伸長が観察された。この結果は、カフェインによって細胞分裂の過程が阻害された結果だと考えられた。これらの結果から、カフェインによる影響は、菌体表層に関与していると考えられたことから、膜タンパク質に着目し、検証を行った。実際に、*Lb. paracasei* NBRC 15889^T と YSAK1 株の両株において、カフェインの有無によっていくつかのタンパク質の発現量に変化が生じた。YSAK1 株において、Enolase や L-lactate dehydrogenase といった糖代謝にかかわる酵素や、Trigger factor や Chaperone protein といったストレスによって変化したタンパク質に対するリフォールディングなどにかかわる酵素が同定された。これらのタンパク質は、*Lactobacillus* 属のいくつかの乳酸菌において、熱や酸ストレス、飢餓ストレスなどによって発現量に変化したと報告されている。本研究におけるカフェインによるタンパク質の発現量の変化は、熱や低 pH などのストレスに対する応答と類似していることが示唆された。また、カフェインの存在によって脂質の構成に変化が生じたことがわかった。今回の結果より、カフェイン耐性には、タンパク質のリフォールディングや細胞膜の変化、代謝の活性化など、いくつかの機構が関与していることが示唆された。またカフェイン感受性作出株におけるゲノム DNA 解析を行ったところ、4 株に共通する変異が少なく、カフェイン耐性は様々な遺伝子が関与していることが示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

ゲノム解析において、YSAK1 株から作出したカフェイン感受性の 4 株の変異株における共通する変異が 6 か所あり、うち、アミノ酸置換が生じた変異が 1 か所あった。この変異は、機能未知である hypothetical protein をコードする遺伝子において生じていた。この hypothetical protein は機能未知であり、*Lactobacillus paracasei* においては構造解析も行われていない。このタンパク質を詳細に研究することで、カフェイン耐性機構の解明につながると考えられる。また、作出したカフェイン感受性変異株における変異箇所が、株によってユニークであったが、これらの様々な変異箇所において、どの遺伝子がカフェイン耐性に関与しているか特定などを行うことによって、より詳細なカフェイン耐性の機構の解明につながると考えられる。また本研究で自然界から単離したカフェイン耐性乳酸菌による、人間の健康に対する効果を検証することで、プロバイオティクスとしての使用につながると考えられる。一方、腸上皮細胞への接着率が、他の研究報告と比較して低い値となっていた。*n*-ヘキサデカンといった非極性溶媒を用いた菌体表面の疎水性を検証する必要があると考えられる。

1. Summary

Currently, consumption of caffeine is increasing due to drinking coffee or addition caffeine to energy drinks. Intestinal bacteria grow by obtaining energy from undigested foods ingested by humans. Sudden dietary changes, for example, changes from a vegetable-based diet to a protein-based diet have been reported to alter the composition of intestinal flora. In this study, we focused on coffee, which is widely consumed on a daily in

the world. Coffee is rich in various bioactive substances such as polyphenols and caffeine. Caffeine has physiological activities such as wakefulness but has a negative effect on microorganisms. The probiotic bacteria in the intestine such as lactic acid bacteria growth is inhibited by caffeine. We isolated the caffeine-resistant strain YSAK1 from Sakekasu. In this study, we analysis of caffeine-resistant mechanism on strain YSAK1.

There was not affect by caffein on caffeine-resistant strain YSAK1. However, the effect of the cell surface on *Lb. paracasei* NBRC 15889^T could be observed under scanning electron microscope. Filamentation in *E. coli* has been reported to be caused by caffeine. Filamentation by caffeine in *Lb. paracasei* NBRC 15889^T was observed in this study.

Protein extracted from caffeine-resistant strain YSAK1 cultured in the presence of caffeine were different compared to type strain *Lb. paracasei* NBRC 15889^T. Identified proteins through both its intact molecular mass and peptide mass fingerprint (PMF) by MALDI-TOF/MS. Enolase and L-lactate dehydrogenase were upregulated by caffeine on YSAK1. Trigger factor and chaperone protein were upregulated by caffeine. Expression levels of trigger factor and chaperone protein was change by stress (pH, heat, or pressure). These proteins may be involved in caffeine resistance.

When the genome of the caffeine-sensitive mutant strain was analyzed, 6 gene mutations common to the 3 strains were thought to be involved in caffeine resistance. In particular, the gene encoding the hypothetical protein with the amino acid substitution may be involved in caffeine sensitivity.

In the future, it will be necessary to verify the effects of *Lb. paracasei* YSAK1 strain on human health. In the mutation sites identified in the caffeine-sensitive strains, identify the genes that are involved in caffeine resistance. By elucidating caffeine sensitivity and tolerance, we can mitigate the effects of caffeine, which has been increasingly consumed in recent years, on intestinal bacteria.

ウミネコはどうやってハダカイワシを利用しているのか？

—夜間採餌行動の解明—

How Black-tailed gull use lanternfish? - clarification of nocturnal foraging behavior -

研究代表者 諏訪 浩貴(生命科学研究科生命科学専攻)

指導教員 吉永 淳

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①ウミネコ black-tailed gull

②中深層性マイクロネクトン mesopelagic micronekton

③ハダカイワシ lanternfish

④採餌生態 nocturnal foraging

⑤夜間採餌 foraging behavior

2020 年度交付額／ 560 千円

研究発表／学会および口頭発表

- ・ ウミネコの夜間採餌と中深層性マイクロネクトン
諏訪浩貴・佐藤信彦・渡邊俊・北川貴士・伊藤元裕
口頭発表、2020 年度日本バイオロギング研究会シンポジウム サテライトワークシ
ョップ【海鳥研究ワークショップ】、2020 年 11 月
- ・ DIET FROM DEEP-SEA —utilization of mesopelagic micronekton by
Black-tailed gull—
Motohiro Ito, Hiroki Suwa, Hikari Ozawa, Nobuhiko Sato
口頭発表、Pacific Seabird Group 2021 Annual Meeting, 2021 年 2 月

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

食性解析は、胃内容物をくくり罌による捕獲と踏査によって、本種の胃内容物を吐き戻しと乾燥したペリットを、岩手県上閉伊郡大槌町の二才島と、青森県下北郡大間町弁天島において採取し、目視査定と DNA 解析により種同定、重量等の計測を行い、利用していたハダカイワシを含む中深層性マイクロネクトンの生物種を明らかにするとともに、本種の糞および餌生物の筋肉片を用いた安定同位体比分析を行うことで、通年を通したハダカイワシの利用度を明らかにした。

さらに、非繁殖期を含む通年を通した行動追跡を行うために、UHF アンテナによる遠隔ダウンロードが可能であり、ソーラーパネルを搭載することで長期的なデータ記録が可能な GPS ロガーを、大槌町の漁港と二才島で罌を用いて捕獲した 13 個体に GPS ロガーを装着した後、再度放鳥した。その後、設置した UHF アンテナにより、測位点データを収集し、夜間に表層に上がってくることによって利用度の高まる中深層性マイクロネクトン採餌の活発さを調査するために、夜間の採餌活動について明らかにした。

2. 研究経過および成果の概要

二才島と弁天島における吐き戻しの調査の結果、繁殖中のウミネコは、マイワシを主要な餌としていたが、中深層性マイクロネクトンも二才島（IRI%:41.2%）と弁天島（IRI%:1.6%）の両島で利用が確認された。DNA 種同定によって、これらはセッキハダカ、ゴコウハダカ、ヒカリエソ、ニセテカギイカ、シンカイエビであることが明らかになった。世界的に見ても極めてまれである沿岸性の非潜水性海鳥類の中深層性マイクロネクトンの利用が明らかになった。

今まで、ハダカイワシの利用がみられなかった一因として、大陸棚斜面域（200-1000m）がウミネコの採餌範囲（半径 60km）に入る場所でウミネコの調査が行われていなかったことが挙げられる。沿岸及び大陸棚を利用する海鳥より、大陸棚辺縁部や海盆地を利用する海鳥の方が、ハダカイワシ類を多く捕食する傾向があるという報告がなされている。さらに、青森県の弁天島と比べて岩手県の二才島において、ウミネコによる中深層性生物の利用が多くみられた。これは、弁天島と比べて、二才島はリアス式海岸が広がる三陸沿岸に位置しているため、大陸棚辺縁部が非常に近く、急深の大陸棚斜面がウミネコの採餌範囲内に広く分布していることが原因であると考えられた。また、主要な餌がマイワシであったことから、三陸沿岸においても近年日本周辺で起こっているとされるレジームシフトと呼ばれる急激な海洋環境変動と生息する魚類相の変化が起こっていることが伺われ、こうした海洋環境変動に対するウミネコの応答も、今回、中深層性マイクロネクトンが多数発見された原因ではないかと考えられた。

GPS ロガーを用いた採餌行動の調査によって、ウミネコは、繁殖期を通して大陸棚斜面域（200 m 以深）を利用しており、特に 2019 年においてその傾向が強く、大槌湾や沿岸部より利用割合は少なかったものの、沖合を利用する個体が多く存在することが確認でき、それとともに、夜間採餌を行っていることが分かった。夜間採餌を行った個体のトリップは、他のトリップと比べて、コロニーからの距離が遠く水深の深い海域に出かけていることが明らかとなった。これは、中深層性マイクロネクトンの多くが行う日周鉛直移動によって、表層へ浮上する時間帯と一致し、同じく非潜水性のカモメの仲間であるアカアシミツユビカモメと同様に、夜間採餌によってハダカイワシを捕食している可能性が考えられた。

一方で、安定同位体比分析による食性解析においては、ウミネコの糞の安定同位体比は、セッキハダカの年間を通じた利用を示さなかった。セッキハダカの窒素安定同位体比値は特に高く、ウミネコの糞の安定同位体比値との間に大きな値の差がみられた。ついでみ採餌であるウミネコが中深層性魚類を捕食できるのは、表層に上ってくる夜間であると考えられるが、ウミネコの夜間採餌の頻度は昼間の採餌と比較すれば少なく、また、今まで中深層性マイクロネクトンの捕食が全く確認されていない青森県八戸市蕪島のウミネコによる夜間採餌の頻度と比較しても大きな差はなかった。今回ウミネコの中深層性マイクロネクトンの捕食がみられたものの、ハダカイワシを含めた中深層性魚類を全体的に見れば利用量はさほど多くないのかもしれない。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究では、岩手県二才島および、弁天島におけるウミネコの中深層性マイクロネクトンの利用と、その実態を明らかにすることができた。今後は、本種を含めた沿岸域に生息する海鳥の夜間採餌や中深層性マイクロネクトンの利用と繁殖成績への影響や、周辺海域のレジームシフトといった海洋環境変化との関連を明らかにする必要があると考えられる。そのため、今後、胃内容物サンプル量を増やすとともに、長期間の調査に向けて、安定同位体比分析を含めた定量的な調査を継続し

で行っていく必要があると考えられる。さらに、ウミネコによる中深層性マイクロネクトンの採餌についての理解を深めるために、中深層性魚類の捕食方法について把握することは重要であると考えられるものの、複数の仮説が立てられるなかで実際にどのような経路で捕食しているのかは GPS のデータでは明らかにできない、そのため、映像を録画できるビデオロガーを用いた調査を今後行っていくべき調査として提案する。

Summary

The black-tailed gull *Larus crassirostris* is a coastal related, diurnal surface-fishing gull, that breeds in the Far East region and especially in Japan. Previous study revealed that black-tailed gulls forage mainly on pelagic fish species such as anchovy, sardine and sand lance.

In this study, however, we found substantial usage of the deep-sea living mesopelagic micronekton species from the diet of black-tailed gulls. We collected the stomach contents of Black-tailed gulls from two islands in the Tohoku region (Nisai Island, Iwate Prefecture, and Benten Island, Aomori Prefecture, Japan) in June and July, 2019. We conducted conventional stomach content analysis and DNA analysis for detailed species identification for the samples. Along with that, stable isotope ratio analysis was performed using feces from 2018-2020. We also obtained GPS tracks from breeding Black-tailed gulls (N=13) simultaneously on Nisai Island.

Stomach contents revealed the major prey species of the breeding gulls in both islands were Japanese sardines *Sardinops melanostictus* (IRI: 49% in Nisai Island, 94% in Benten Island), the second most prevalent diet species was mesopelagic micronekton species such as garnet lanternfish *Stenobrachius nannochir*, Dogtooth lanternfish *Ceratoscopelus townsendi*, spotted barracudina *Arctozenus risso*, deep-sea shrimp *Bentheogennema borealis* and mesopelagic living squid *Eogonatus tinro*, especially on Nisai Island (IRI: 41.2%). GPS tracks revealed that the gulls conducted trips not only to the coastal area, but also far pelagic areas ranging from 1000-3000m in bathymetric depth. The tracks also revealed their substantial amount of night time trips during the study period. Those behavioral characteristics might be closely related to their mesopelagic micronekton use.

However, On the other hand, stable isotope ratios of feces did not indicate year-round utilization by garnet lanternfish. Further the frequency of nocturnal foraging by gull is low compared to daytime foraging, and There was no big difference in the frequency of nocturnal foraging by the petrels of Kabu Island, Hachinohe City, Aomori Prefecture, where predation on mesopelagic micronekton has never been confirmed. Therefore, it was considered that the foraging opportunities of mesopelagic organisms may be too limited for the black-tailed gull to use them as their primary food source. Further investigation for ecological significance of utilization of mesopelagic micronekton by coastal seabirds is needed.

低酸素培養モデルを用いた
機能性食素材アナトー由来トコトリエノールの抗中皮腫作用の解析
および中皮腫細胞に対するビタミン E の生物学的利用能の比較
Analysis of anti-tumor effect and bioavailability of Tocotrienol-Rich
Fraction from Annatto against malignant mesothelioma cells using *in vitro*
hypoxia culture model

研究代表者 河野 翔（食環境科学研究科食環境科学専攻博士後期課程）
指導教員 矢野 友啓（食環境科学研究科食環境科学専攻）

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①トコトリエノール（Tocotrienols）

②悪性胸膜中皮腫（Malignant pleural mesothelioma）

③低酸素（Hypoxia）

④低酸素誘導性因子（Hypoxia inducible factors）

⑤小胞体ストレス（Endoplasmic reticulum stress）

2020 年度交付額／ 700,000 円

研究発表／学会および口頭発表

(1)学会発表（口頭）

河野翔，荒井恒毅，太田昌子，矢野友啓．低酸素誘導性因子 HIFs と低酸素誘導性小胞体ストレスに着目したアナトー由来トコトリエノールの抗中皮腫作用解析．日本ビタミン学会第 73 回大会，2021.06.19-20. 東京（発表予定）

河野翔，土屋洸太，荒井恒毅，遠藤大輝，伏木桃花，太田昌子，矢野友啓．悪性中皮腫細胞株における低酸素誘導性 HIF を標的としたアナトー由来トコトリエノールの腫瘍抑制作用解析．日本ビタミン学会第 72 回大会，2020.09.04-13.（WEB 開催）

研究経過および成果の概要

1. 研究背景

わが国は世界トップレベルの長寿国として広く知られているが，健康で生活できる期間を指す健康寿命と平均寿命の差は男女平均して約 10 年もあり，今後は健康寿命を延ばし，10 年という差をいかに縮めていくかが急務な課題となっている。

一方，平均寿命の増加に伴い，わが国の死因第 1 位である悪性新生物（がん）の罹患者数も年々増加の一途を辿っている。近年のがん治療分野における研究の発展は目覚ましいものがあるが，従来の化学療法や放射線療法の副作用には未だに課題もあり，QOL（Quality of Life）を低下させるリスクとして懸念され，健康寿命を縮める要因となっている。このような現状から，近年では抗がん剤と一緒に補助剤；Adjuvant を併用することで QOL の低下のリスクを減らし，より効果的な治療が可能になるとされ，その補助剤になり得る素材の開発に関する研究が広がりを見せている（Constantinou, C., et al., 2008）。本研究で注目したビタミン E 同族体のトコトリエノール（T3s）も早くからその機能性が注目されている栄養素の 1 つである。

ビタミン E は強い抗酸化活性を持つことで知られている微量栄養素であるが、T3s はその抗酸化活性に加え、抗酸化活性とは独立した多様な薬理作用を持つことが明らかになって来ている (Peh, H. Y., et al., 2016)。中でも T3s の抗がん作用は早くから注目されている機能性であり、がんの種類を問わず広く研究が行われているが、その多くは罹患者数の多いメジャーがんに分類されるがんである。そこで本研究では、罹患者数が少なく研究の発展が望まれている希少がんに分類されている悪性胸膜中皮腫を対象とし、また、がんの治療抵抗性に関わる腫瘍内低酸素領域に着目をして、*in vitro* 低酸素培養モデルを用いた解析を通して希少がんに対する T3s の抗腫瘍作用を検証した。

2. 研究経過および成果の概要

本研究では、T3s の中でもより強い抗がん活性を示すとされる δ -T3 を豊富に含んだ機能性食素材であるアナトー由来の Tocotrienol-Rich Fraction (以下、TRF) の抗腫瘍効果を検証した。昨年度までの検証では、TRF が低酸素環境下 (Hyp) で生育するヒト MPM 由来細胞株 H2452 の生存活性を強く抑制することを明らかにした。一方で、昨年度の成果として報告した低酸素適応因子：HIFs に対する TRF の作用について、その後の検証において培養条件が不適切であったことが明らかとなったことから、本年度は改めて HIFs タンパクに対する影響を検証した。その結果、Hyp の H2452 においては通常酸素環境 (Nor) 培養群と比較して HIF-1 α , HIF-2 α いずれも高レベルであり、一方で、生存活性抑制作用を示した濃度の TRF 処理群においては、HIF-1 α /HIF-2 α 共にタンパクレベルが低いことが明らかになった。

また、この結果を受け、TRF の HIFs タンパクへの作用と H2452 の生存活性に対する作用の関連性を明らかにするため、低酸素誘導性小胞体 (ER) ストレスに着目した。

Hyp の腫瘍細胞では、酸素の不足によってタンパク質の合成や翻訳語の折りたたみ機能が制限され、正常に折りたたまれなかったタンパク質などが小胞体 (ER) に蓄積し、しばしば ER ストレスの亢進が見られる (Bartoszewska, S. and J. F. Collawn, 2020)。さらに持続的な ER ストレス下ではアポトーシスを誘導することも明らかになっている (Asada, R. and K. Imaizumi, 2013)。このことから、TRF は HIFs のタンパクレベルを抑制することで低酸素適応機構の破綻を招き、ER ストレスの更なる亢進によって H2452 に対して細胞死を誘導している可能性が考えられた。

そこで、ER ストレスセンサーである Bip, ER ストレス誘導性アポトーシスマーカーである CHOP を指標にして Hyp の H2452 におけるストレス適応とそれに対する TRF の作用を検証した。その結果、Hyp 培養群 (TRF(-)) において Bip, CHOP のタンパク発現はいずれも Nor 培養群より増加傾向を示し、本検証で再現した Hyp でも ER ストレスが誘導されていることが確認できた。その一方で、HIFs のタンパクレベルが抑制されていた Hyp の TRF 処理群では、Bip, CHOP の発現は Hyp 培養群 (TRF(-)) よりも低いことが明らかとなり、HIFs タンパクの抑制によって ER ストレスが亢進し、CHOP の発現が強く誘導されるといった我々の仮説は証明されなかった。また、Nor 培養群での解析では、TRF 処理群において CHOP 発現が強く誘導されることが確認された。

以上より、TRF は Nor では ER ストレスセンサーとして機能し、H2452 に対して抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。また Hyp の H2452 に対しても生存活性抑制作用を示したが、その作用点は Nor とは異なることが推察された。

一方、細胞生存活性を指標にした昨年度までの検証において、 α -, γ -TP, α -, γ -, δ -T3 の 5 つの V.E 同族体の単独での抗腫瘍効果を比較した結果、Nor, Hyp のいずれの培養条件においても γ -T3 および δ -T3 は H2452 の細胞生存活性を強く抑制し、TP 類の処理群では細胞生存活性の変化は見られなかった。そこ

で、この作用の差をV.E同族体の細胞内蓄積量の観点から明らかにするため、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（蛍光検出）を用いて各V.E同族体処理時の細胞内蓄積量を測定した。5種類のV.E同族体の濃度は一律10 µg/mLとして、24時間処理後に細胞回収を行いHPLCにより検出した結果、α-TP処理群のH2452からは約1 µg/mLのα-TPが検出され、γ-TP処理群のH2452では約3 µg/mL、α-, γ-, δ-T3処理群のH2452からは約3.5-4 µg/mLの範囲でそれぞれ検出された。このように5種類全てのV.E同族体において蓄積濃度は処理濃度よりも低かったが、α-TPと比較するとγ-TPおよび3種類のT3sの蓄積濃度は有意に高く、またγ-TPと3種類のT3sを比較すると3種類のT3sの蓄積濃度は有意に高い結果となった。細胞生存活性に影響を及ぼさなかったα-TPと細胞生存活性を抑制したT3sの間で蓄積量に差が出たことは、V.E同族体の細胞生存活性に対する作用は細胞への蓄積濃度に依存している可能性が考えられた。その一方で、T3sだけの結果を比較してみると、細胞生存活性抑制作用を示したγ-T3およびδ-T3と細胞生存活性に影響を及ぼさなかったα-T3とでは蓄積濃度に差はなく、T3sの同族体間における細胞生存活性に対する作用の差は細胞内蓄積濃度に依存しない可能性が考えられた。

3. 今後の研究における課題または問題点

これまでの低酸素環境とERストレスに関する知見について、ストレス惹起後のUPRシグナルの動きに焦点を当てた報告は多く存在する一方で、腫瘍細胞の低酸素環境におけるストレスの発端（低酸素そのものなのか、HIFsの関与があるのか）に関する報告は少なく、低酸素環境と小胞体ストレスに焦点を当てた本研究をさらに追求していくことは低酸素領域で生育する腫瘍細胞の生存プロセスの解明および治療戦略の基礎的知見として貢献できると考える。しかしながら、低酸素という環境では、細胞は酸素不足そのものによる生存プロセスの妨げに対するストレスと、低酸素誘導性ERストレスといった異なるタイプのストレスが混在しているとされ複雑であること（Delbrel, E., et al., 2018）、また、そのような評価系にERストレスラーとしての作用を有するTRFを加えることにより、ERストレスの原因も複数混在することになるため、更なる追求と解明のためにはより綿密に培養条件を検討していくことが必要である。

また、各V.E同族体の細胞内蓄積濃度を指標にして細胞生存活性に対する作用の差を検証し、TPsとT3sではH2452の細胞内蓄積濃度に差がある傾向が確認されたが、今回の検証は単一濃度、単一時間における同族体間の比較であったため、濃度や時間の影響を考慮した結果ではない。TPsとT3sの生存活性抑制作用の差を細胞内蓄積濃度から根拠を持って説明するには、投与量ごとの蓄積濃度の変化や蓄積濃度の継時的変化を検証することも必要である。

Summary

Objectives: Malignant mesothelioma (MM) is an aggressive cancer with no effective treatment options. Endoplasmic reticulum (ER) stresses are frequently induced in tumor cells under hypoxic conditions. To overcome these stress condition, cells have regulated unfolded protein response (UPR) signaling, hypoxia inducible factors (HIFs) independent pathway and apoptosis. It has been reported that tocotrienols (T3s) exhibit cytotoxic effect against various tumor cells. However, the mechanisms of these effects in T3s targeting hypoxia-induced ER stresses remain unclear. Here, we have investigated effects of tocotrienol-rich fraction from annatto (TRF) on hypoxia-induced ER stress or HIFs protein levels in MM cells under hypoxia. Further, we have previously showed that

γ -T3 and δ -T3 decreased cell viability, while tocopherols (TPs) unaffected. In this study, we have also compared bioavailability of T3s and TPs in MM cells.

Methods: Human MM cell lines, H2452 were cultured in medium containing 5 or 15 μ g/mL TRF for 24 hours under hypoxia. To demonstrate the relationship between cytotoxic effect of TRF and hypoxia-induced ER stresses or hypoxia inducible factors (HIFs), levels of proteins associated with ER stress and hypoxia adaptation were analyzed by western blotting. Hypoxic condition ($O_2 < 1\%$) was controlled by using an anaerobic jar. Furthermore, to compare the bioavailability of T3s and TPs in H2452, after 24 hours of treatment with 10 μ g/mL T3s and TPs, cellular accumulations were analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorometric detection.

Results: In the TRF treatment group under normoxia, Bip (an ER stress sensor) and CHOP (an ER stress-induced apoptosis marker) were up-regulated compared with non-treated control group. In the hypoxia culture groups, the protein level of HIFs in the TRF treatment groups were lower than that of the hypoxia control groups (TRF non-treated groups). Further, ER stress was also not induced by TRF under same hypoxia conditions. On the other hand, the results of HPLC assay were shown that cellular accumulation of T3s was greater than α -TP, while among the T3 analogs (α -, γ -, δ -T3) were no difference.

Conclusion: Our findings suggested that TRF decreased H2452 cell viability through inducing ER stresses under normoxia. In the hypoxia conditions, TRF also induced reduction of cell viability. This reduction could cause by attenuation of hypoxia adaptation. However, the level of ER stresses by TRF under hypoxia was lower than that of normoxia conditions. These results were suggested that the mechanism of inhibitory effect of TRF on cell viability of H2452 may differ between normoxia and hypoxia conditions. Furthermore, in the analysis of bioavailability TPs and T3s, it was suggested that the potent inhibitory effect of γ -T3 or δ -T3 on cell viability in H2452, which was not shown in TP, is dependent in cellular accumulation. On the other hand, the differences in the effects among T3s on cell viability in H2452 could be cellular accumulation-independent.

Ⅱ型糖尿病合併症としての乳がんの発症メカニズムの解析および

食品機能性素材による新たな予防法構築の可能性

A possible mechanism on the malignancy of breast cancer as a complication of type II diabetes and
a possibility of establishing new preventive methods by phytochemical

研究代表者 長竹 舞子(食環境科学研究科 食環境科学専攻)

指導教員 矢野 友啓

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①Ⅱ型糖尿病合併症 Type II diabetic complications

②乳がん Breast cancer

③終末糖化産物受容体 Receptor for advanced glycation endproducts

④トコトリエノール Tocotrienol

⑤がん予防 Cancer Prevention

2020 年度交付額／ 700,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・ 長竹舞子、中村春菜、矢野友啓、2 型糖尿病乳がんモデルの悪性化抑制及び細胞死におけるトコトリエノールの有効性、第 67 回日本栄養改善学会学術総会、2020.09.02-04 誌上開催
- ・ 長竹舞子、矢野友啓、Pathophysiological conditions of type 2 diabetes activate S100-RAGE pathway in estrogen-dependent breast cancer cells.、第 79 回日本癌学会学術総会、2020.10.01-03 オンライン開催
- ・ 長竹舞子、遠藤大輝、伊藤果穂、中村春菜、水上皓介、矢野友啓、高グルコース・高インスリン環境による乳がん細胞悪性化における終末糖化産物受容体の重要性、第 141 回日本薬学会、2021.03.26-29 オンライン開催（発表予定）

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

研究背景

Ⅱ型糖尿病合併症の一つとして近年「がん」が注目され、中でも乳がんはⅡ型糖尿病により罹患および死亡リスクが増加することが報告されている。高齢化やライフスタイルの変化によりⅡ型糖尿病および乳がんの罹患率が増加傾向にあることを考慮すると、Ⅱ型糖尿病患者から誘発される乳がんに対する予防法の構築が必要であると考えらる。

これまでの結果で、Ⅱ型糖尿病の病態である高血糖・高インスリン血症を *in vitro* で再現した高グルコース・高インスリン環境は、Ⅱ型糖尿病患者の血中濃度で高値を示す終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts: AGEs) の受容体である終末糖化産物受容体 (RAGE: Receptor for AGEs) の mRNA およびタンパク発現を誘導することが明らかとなっている。しかし、RAGE 活性化の要因および乳がん悪性化への関与や、これらを抑制する食品機能性素材は未解明であった。

以上より、本研究はⅡ型糖尿病により誘発される乳がんの悪性化予防を目指し、その悪性化メカニズムの解析および食品機能性素材による予防効果を分子生物学的観点から検証することを目的とした。

1. 細胞株と病態モデル

細胞株は、MCF-7（エストロゲン受容体陽性ヒト乳がん細胞）を用いた。*In vitro* 病態モデルとして、高グルコース（20 mM）・高インスリン（25 nM）：（HG/HI）培地培養群をⅡ型糖尿病モデル、比較対象として低グルコース（5 mM）・低インスリン（5 nM）：（LG/LI）培地培養群を非糖尿病モデルとした。

2. RAGE 活性化メカニズムの解析

RAGE を活性化する RAGE リガンドとして、先行研究から乳がんの悪性化に関与すると報告がある S100A4 に着目した。LG/LI、HG/HI 環境で 72,144 時間培養後の S100A4 発現を q-RT Real time PCR 法、Western Blotting 法で解析した。また、RAGE を介したオートクライン産生であるか検証するため、HG/HI 環境で RAGE 阻害剤（FPS-ZM1）を処理し、48 時間後の S100A4 mRNA 発現を q-RT Real time PCR 法で解析した。

3. RAGE による乳がん悪性化への影響

乳がん悪性化として、本研究では細胞増殖、細胞遊走性およびホルモン剤（タモキシフェン）耐性獲得を指標とした。これらの悪性化に RAGE が関与するか検証するため、HG/HI 環境で FPS-ZM1 処理後の細胞生存活性を WST-8 法、細胞遊走性を Wound healing assay で評価した。また、タモキシフェン耐性獲得を評価するため、FPS-ZM1（10 μ M）処理群と未処理群に分け 72 時間培養後、タモキシフェンを 0-10 μ M の濃度範囲で処理し 72,96 時間後の細胞生存活性を WST-8 法で評価した。

4. トコトリエノールによる予防効果の検証

Ⅱ型糖尿病合併症乳がんに対する食品機能性素材による予防効果を検証するため、食品機能性素材として、先行研究より強力な抗酸化成分があり多様な生理活性が報告されているビタミン E 同族体の 1 種であるトコトリエノール（T3）に着目した。本研究では、T3 の中で最も抗がん作用が高い δ -T3 が豊富に含まれるアナトー由来 Tocotrienol Rich Fraction（TRF）を用いて検証した。HG/HI 環境で 6 時間培養後、TRF 処理し 24 時間後の細胞生存活性を WST-8 法、RAGE および S100A4 の mRNA 発現を q-RT Real time PCR 法で解析した。

2. 研究経過および成果の概要

1. RAGE 活性化メカニズムの解析

LG/LI と比較して HG/HI は S100A4 の mRNA およびタンパク発現を誘導させた。また、HG/HI において FPS-ZM1 処理は、S100A4 の mRNA 発現を濃度依存的に抑制した。これらの結果から、HG/HI において、S100A4 がオートクライン機構で RAGE を活性化している可能性が示唆された。

2. RAGE による乳がん悪性化への影響

HG/HI において FPS-ZM1 処理により細胞生存活性は濃度依存的に抑制されたが、細胞遊走性に対しては抑制効果が認められなかった。また、FPS-ZM1 処理群は未処理群と比較して、タモキシフェン処理により有意に細胞生存活性が抑制された。よって、HG/HI において、RAGE は細胞増殖およびタモキシフェン耐性の獲得に寄与することが示唆された。

3. トコトリエノールによる予防効果の検証

HG/HI において TRF 処理は細胞生存活性を濃度依存的かつ有意に抑制した。また、TRF 処理により、RAGE および S100A4 mRNA 発現の抑制傾向が示された。

Ⅱ型糖尿病病態を反映した HG/HI 環境は、乳がん悪性化を亢進することが示唆された。その機序として、HG/HI 環境による RAGE および S100A4 発現の誘導に伴う RAGE シグナルの活性化が示唆された。これに対し、TRF は RAGE 発現の抑制を介し、HG/HI 環境による乳がん悪性化を抑制することが示唆された。

以上の結果より、HG/HI 環境による乳がん悪性化において RAGE シグナルの活性化が重要であること、TRF は乳がん悪性化の予防に有用な成分である可能性が得られた。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究はⅡ型糖尿病の病態として高血糖および高インスリン血症に着目し、高グルコース・高インスリン培地で乳がん細胞を培養することでⅡ型糖尿病病態における乳がんを *in vitro* で再現した。しかし、Ⅱ型糖尿病は AGEs の蓄積やエストロゲンを含むホルモンなど生体内に多くの影響をもたらす。今後は糖尿病モデルの動物を用いた実験を行うことで、より臨床レベルに近い観点からⅡ型糖尿病合併症としての乳がん悪性化および TRF による予防の有効性を評価することが必要であると考ええる。

Summary

Background and Aim

It has been reported that patients with type II diabetes are higher risk on the incidence and mortality of breast cancer than non-diabetic patients. RAGE (Receptor for advanced glycation endproducts) contributes to the occurrence in the complications of diabetes, and it also involved in malignant transformation of breast cancer. In previous studies, the high glucose / high insulin environment that reflects the pathophysiology of type II diabetes (hyperglycemia / hyperinsulinemia) elevated mRNA and protein expression of RAGE. However, it has not been established why the RAGE pathway could contribute to type II diabetes-induced malignant transformation, and it was unclear which phytochemical could be effective to suppress the transformation. In this study, we aimed to establish a preventive approach against the transformation of breast cancer induced with type II diabetes.

Material and Methods

MCF-7(estrogen receptor positive human breast cancer cells) was used. Type II diabetes model culture was performed with high glucose (20 mM) and high insulin (25 nM): (HG / HI), and non-diabetes model culture was performed with low glucose (5 mM) and low insulin(5 nM):(LG/LI). Cell viability was evaluated by WST-8 assay, and cell motility level was evaluated by wound healing assay. The expression level of mRNA and protein was determined using q-Real time PCR and Western blotting. It was used that FPS-ZM1 as RAGE inhibitor, TRF as a phytochemical.

Results

Compared with LG / LI condition, HG / HI condition induced the elevation of mRNA and protein expression in S100A4. In addition, FPS-ZM1 treatment in HG / HI condition suppressed the mRNA expression of S100A4 in a concentration-dependent manner. In HG / HI condition, FPS-ZM1 treatment inhibited cell viability in the concentration-dependent manner, but no inhibitory effect was observed on cell the motility capability. In addition, cell viability in the FPS-ZM1 treated group was significantly suppressed by tamoxifen treatment as compared with the untreated group. In HG / HI condition, TRF treatment inhibited cell viability and it showed a tendency to suppress RAGE and S100A4 mRNA expression.

Conclusion

It was suggested that the HG / HI condition, which reflects the pathophysiology of type II diabetes, promotes malignant transformation of breast cancer cells. The presumed mechanism may depend on activation of RAGE pathway associated with induction of RAGE and S100A4 expression in the HG / HI condition. On the other hand, it was suggested that TRF suppressed the malignant transformation of breast cancer caused by the HG / HI condition through the suppression of RAGE expression. Thus, it seems that the activation of the RAGE pathway contributes to breast cancer malignancy caused by the HG / HI condition. In addition, TRF may be a useful agent to prevent breast cancer malignancy.

一過性有酸素運動後に抗酸化能を発揮する栄養素の探索

Search for nutrients that exert antioxidant capacity after acute aerobic exercise

研究代表者 山崎 倫生(食環境科学研究科 食環境科学専攻)

指導教員 太田 昌子

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①ホモシステイン Homocysteine

②一過性運動 Acute Exercise

③アルブミン Albumin

④酸化ストレス Oxidative Stress

2020 年度交付額／630000 円

研究発表／学会および口頭発表

コロナウイルス流行のため 2020 年に予定していた研究発表は行えなかった。

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

ホモシステイン (Hcy) はチオール基 (SH 基) を有するアミノ酸であり、三大死因 (悪性新生物、心疾患、脳血管疾患) や、高齢者に多い骨粗鬆症やアルツハイマー病との関連が報告されている。Hcy の SH 基は反応性に富んでおり、血中 Hcy の 99% が SH 基を有するタンパク質やアミノ酸との結合体である。この結合体生成時に活性酸素 (ROS) が生成され、酸化ストレス発生の原因となり得る。また、血中に最も多く存在するタンパク質であるアルブミンはその構造内にフリーの SH 基を有している。ゆえに、酸化的修飾を受けやすく、ROS によりアルブミン自身が酸化されることで、同時に生体内物質に対しての抗酸化物質としての役割を果たしている。そのため、アルブミンの酸化型/還元型の比は血中の酸化ストレスの指標として用いられている。

運動は生活習慣病の予防や改善、健康増進、競技力向上などの目的で行われており、心身へのメリットやデメリットについて多くの議論がされている。しかし、一過性の運動が血漿 Hcy 濃度の増加要因として報告されている。また、過度な運動は運動誘発性および血漿 Hcy 増加に伴う酸化的障害を起こすことが想定される。これらのことから、一過性の高強度運動を長時間実施した場合、エネルギー代謝に関与するビタミン B (V.B) 群の不足も関連し、運動誘発性による血漿 Hcy 濃度や酸化ストレスマーカーの増加が推察される。

東洋大学ヒト試験倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: TU2019-024)。東洋大学に所属する若年男女 29 名 (男性 18 名、女性 11 名) を対象に 65%HRreserve 相当の強度、40 分間の一過性一定負荷自転車運動を実施した。また、運動と同時に安静 40 分間のコントロールを設定した。採血は運動 (or 安静) 前、運動 (or 安静) 30 分後および 90 分後の計 3 回を行い、血液試料とした。血液の測定項目としては Hcy, V.B₂, 葉酸、酸化型アルブミン比とした。

2. 研究経過および成果の概要

65%HRreserve 相当の強度、40 分間の一過性一定負荷自転車運動を行ったとき、運動 30 分後に血漿 Hcy 濃度が有意に増加し、90 分後も高濃度を維持していた。さらに、運動 90 分後には、血中酸化型アルブミン比の有意な増加が見られた。しかし、運動による V.B₂ や葉酸濃度の変動は認められなかった。高強度運動後は血漿 Hcy の増加により、生体内に SH 基が多く存在する状況となることが示唆され、そのような状況が運動 90 分後まで持続されると、血中に最も多く存在するタンパク質であるアルブミンの酸化型としての存在比を増加させることが明らかとなった。抗酸化にも関与する還元型アルブミンの割合が減少し、酸化型の割合が増加することは、生体内の抗酸化力低下を示唆している。これらのことから、一過性の高強度運動直後は、一時的に、酸化ストレスに暴露されやすい環境であることが示唆された。

成果の概要：

本研究は、65%Heart Rate Reserve の運動強度にて 40 分間の一過性自転車運動を行った場合、血漿ホモシステイン濃度が上昇し、その濃度上昇が酸化型アルブミンの増加に関与することを初めて示唆したものである。特筆すべき点は、一過性の高強度運動後 90 分間は、酸化ストレスに暴露しやすい環境であることを明確に示している点である。今後、生体内酸化ストレス軽減を目的とした栄養素や機能性成分を探索とした応用研究を実施する場合、運動直後の栄養管理が基幹となることを本研究は証明しており、採用した運動強度と手法は科学的根拠に基づいた評価手法の一つとなる。栄養科学分野において、本評価方法を元に、血漿ホモシステインの上昇を抑制する栄養素や機能性成分が見つかり、効果が期待できる摂取濃度が明確になれば、血漿ホモシステインの上昇がリスク因子となる生活習慣病の予防にもつながることが期待される。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究において、対象者の喫煙習慣等の交絡因子を考慮できていない。また、エネルギーおよび Hcy の代謝に関与しているビタミン B 群には V.B₆ や V.B₁₂ も含まれているため V.B₆ や V.B₁₂ の測定も Hcy の代謝を網羅的に評価するために必要である。加えて、抗酸化物質として抗酸化ビタミンである V.C や V.E など測定し、総合的な酸化ストレスの評価が望ましい。

Summary

Homocysteine (Hcy) is an amino acid with a thiol group (SH group), has been reported to be associated with the three major causes of death in Japan (malignant neoplasm, heart disease, and cerebrovascular disease), osteoporosis, and Alzheimer's disease. The SH group of Hcy is highly reactive, and 99% of Hcy in the blood is a conjugate with a protein or amino acid having an SH group. Active Oxygen Species (ROS) is generated during the formation of this conjugate, which can cause oxidative stress. In addition, albumin, which is the most abundant protein in blood, has a free SH group in its structure. Therefore, it is susceptible to oxidative modification, and albumin itself is oxidized by ROS, and at the same time, it plays a role as an antioxidant against substances in the living body. Therefore, the oxidized / reduced ratio of albumin is used as an index of oxidative stress in blood.

Exercise is carried out to preventing and improving lifestyle-related diseases, improving health, and improving competitiveness, and there are many discussions about the advantages and

disadvantages of mind and body. However, transient exercise has been reported as a factor in increasing plasma Hcy levels. From these facts, it is inferred that when transient high-intensity exercise is carried out for a long time, the plasma Hcy concentration and oxidative stress marker increase due to exercise induction are also associated with the deficiency of B vitamins involved in energy metabolism.

Twenty-nine young men and women (18 men and 11 women) were subjected to a 40-minute transient constant-load bicycle exercise with an intensity equivalent to 65% HR reserve. In addition, a 40-minute rest control was set at the same time as the exercise. Blood was collected three times in total, before exercise (or rest), 30 minutes after exercise (or rest), and 90 minutes later, and used as blood samples. Blood measurement items were Hcy, V. B₂, folic acid, and oxidized albumin ratio.

When a transient constant-load bicycle exercise with an intensity equivalent to 65% HR reserve was performed for 40 minutes, the plasma Hcy concentration increased significantly 30 minutes after the exercise, and the high concentration was maintained even after 90 minutes. Furthermore, after 90 minutes of exercise, a significant increase in the blood oxidized albumin ratio was observed. However, there was no change in V. B₂ or folic acid concentration due to exercise.

δ-トコトリエノールによるヒト血中 LDL コレステロール低下の検討

Lowering of LDL Cholesterol in Human Blood by δ-Tocotrienol

研究代表者 芹澤奈保 (食環境科学研究科 食環境科学専攻)

指導教員 矢野友啓

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①δ-トコトリエノール δ-tocotorienol

②LDL コレステロール LDL cholesterol

③サプリメント摂取 supplementation

④ヒト血中脂質 human blood lipids

⑤血中動態 bioavailability

2020 年度交付額／ 601,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・ 2020 年度博士学位審査論文
- ・ 日本栄養食糧学会 (2021 年開催) 共著予定

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

日本人の死因 (令和元年人口動態統計) の第 2 位は心疾患、4 位に脳血管疾患がある。これらの疾患は、高 LDL コレステロール血症の進行による動脈硬化が原因の一つでもある。壮年期以降に発症することが多い動脈硬化やそれに起因する生活習慣病は、若年期からの予防が重要となり、若年期から予防することで最終的に健康寿命の延伸につながると考えた。そこで、本研究ではコレステロール生成経路の HMG-CoA 還元酵素に作用する δ-トコトリエノール (δ-T3) に着目した。これまで、健康な若年男女を対象に δ-T3 の血中動態を明らかにした報告や、14 日間の短期摂取による δ-T3 の血中濃度変化の報告は少ない。そこで本研究では、δ-T3 (250mg/d) を摂取した場合の血中動態や脂質代謝への影響を明らかにすることを目的に介入研究を行った。本研究は、無作為化、プラセボ対照、単盲検によるクロスオーバー比較試験法を用いた研究デザインである。本研究を実施するにあたり、ヘルシンキ宣言に定められたヒトを対象とした研究に関するガイドラインに準拠して実施され、「東洋大学における人を対象とする医学系研究に関する倫理規程」に則り、東洋大学倫理研究委員会 (承認番号: TU2019-023 承認日 2019 年 10 月 21 日、承認番号 TU2020-016 承認番号 2020 年 11 月 9 日) の承認を得た。本研究遂行に際し、倫理運営委員会規定に従い、被験者個人の権利を守り、不利益が生じないよう十分に配慮した。被験者全員に書面および口頭にて説明を行い、被験者の同意を文書にて得た上で実施した。実験期間のうち、コントロール期 (C 期)・δ-T3 摂取期 (δ-T3 期) をそれぞれ 14 日間とし、その前後に採血を実施した。排尿排泄後、身体計測を実施した。身体計測、採血は東洋大学 板倉キャンパス内で実施した。C 期および α-TP、δ-T3 期の間には 28 日以上 wash-out 期間を設けた。実験期間中に摂取したサプリメントは δ-T3: 250mg/d

(Allergy Research Group, Delta-Fraction Tocotrienols; Tocotrienols [as DeltaGOLDR containing 90% Delta-Tocotrienols and 10% Gamma-Tocotrienols]) である。各ビタミン摂取開始当日の朝（サプリメント摂取直前）と、摂取終了後の翌日の朝である。被験者は、採血日に学内に設けた採血会場に集合した。およそ 12 時間絶食の早朝空腹時の採血のため、被験者には朝食の摂食なしの条件で、(水のみ摂取可能)、血液を採取した。血液の採取は上腕の静脈血採取法により実施した。

2. 研究経過および成果の概要

本研究結果で、これまでに報告の少ない健康な若年男女に δ -T3 を 14 日間投与し、短期摂取での有意な血漿 δ -T3 濃度増加の証明と、その具体的な血漿 δ -T3 濃度 ($0.40 \pm 0.19 \mu\text{mol/L}$) を見出した。したがって、本研究は 14 日間の δ -T3 の短期摂取で血漿 δ -T3 濃度を有意に増加させることが明らかとなった。このことは、 δ -T3 疾病予防効果、疾患改善効果が短期摂取でも作用する可能性を示した。さらに δ -T3 (250mg/d) 摂取した場合に、HDL に増加傾向がみられた ($p = 0.063$)。

3. 今後の研究における課題または問題点

T3 は HMG-CoA 還元酵素の転写後抑制に関与しコレステロール合成を抑制させ、T3 のなかでも δ -T3 は HMG-CoA 還元酵素への阻害が大きいため、LDL が低下すると予測した。しかし、本研究結果では、若年男女に対する δ -T3 (250 mg/d) 摂取の LDL 低下作用はみられなかった。本研究の被験者の LDL レベルは基準値内であり、有意な変動がみられなかった可能性がある。

高コレステロールの改善に処方されるスタチン系薬剤が標的とするのは HMG-CoA 還元酵素である。メバロン酸経路とコエンザイム Q10 (CoQ10) の生成経路は一部の経路を共有しているため、スタチン系薬剤は、コレステロールだけではなく、CoQ10 の生成も低下させることで、一部のスタチン服用者に認められる軽度から中等度の筋肉痛や横紋筋融解症に関与している。したがって、 δ -T3 のコレステロール低下作用と有効な摂取量を示すことは、副作用のない疾病改善や予防へ貢献できるため、今後も検討を続ける。また、 δ -T3 (250mg/d) 摂取した場合に、HDL に増加傾向がみられた。HDL の酸化は、末梢組織からの余分なコレステロールを回収する能力の低下へとつながり、動脈硬化の病態に酸化 HDL が関与していることが報告されている。LDL だけでなく HDL の酸化予防や増加は動脈硬化予防に有効であることは明らかであるため、HDL レベルを増加させる栄養素として δ -T3 に注目したい。

Summary

We thought that prevention of arteriosclerosis and lifestyle-related diseases caused by arteriosclerosis, which often occur after the age of maturity, would be important from a young age, and that prevention from a young age would ultimately lead to the extension of healthy life expectancy. Therefore, in this study, we focused on δ -tocotrienol (δ -T3), which acts on HMG-CoA reductase in the cholesterol production pathway. Until now, there have been few reports on the blood dynamics of δ -T3 in healthy young men and women, or on the changes in blood concentration of δ -T3 after short-term intake for 14 days. Therefore, the present interventional study was conducted to clarify the effects of δ -T3 (250 mg/d) intake

on hemodynamics and lipid metabolism. The study design was a randomized, placebo-controlled, single-blind, crossover comparative study method. Written and oral explanations were given to all subjects, and written consent was obtained from the subjects before conducting the study. The study was conducted at Toyo University, Itakura campus, with a wash-out period of at least 28 days between the C phase and the α -TP and δ -T3 phases. In the present study, we administered δ -T3 (250 mg/d) for 14 days to healthy young men and women, which has not been previously reported, and found evidence of a significant increase in plasma δ -T3 concentration with short-term intake, and the specific plasma δ -T3 concentration ($0.40 \pm 0.19 \mu\text{mol/L}$). Thus, the present study showed that short-term intake of δ -T3 for 14 days significantly increased plasma δ -T3 concentration. This indicates that δ -T3 disease-preventive and disease-improving effects may work even after short-term intake. In addition, there was a trend toward increased HDL when δ -T3 (250 mg/d) was consumed ($p = 0.063$). The results of this study showed no LDL-lowering effect of delta-T3 (250 mg/d) intake on young men and women. It is possible that the LDL levels of the subjects in this study were within reference values and did not vary significantly. Statins prescribed for the treatment of high cholesterol target HMG-CoA reductase. Since the mevalonic acid pathway and the coenzyme Q10 (CoQ10) production pathway share some pathways, statins contribute to the mild to moderate muscle pain and rhabdomyolysis seen in some statin users by decreasing not only cholesterol but also CoQ10 production. Since it is clear that preventing and increasing oxidation of HDL as well as LDL is effective in preventing atherosclerosis, we focused on delta-T3 as a nutrient that increases HDL levels. We would like to focus on delta-T3 as a nutrient that increases HDL levels.

NK 細胞による新規がん予防法の構築を目指した

悪性中皮腫スフェア集団のがん幹細胞性解析

Cancer Stem Cell Analysis of Malignant Mesothelioma Sphere Population Aiming to Establish a New Cancer Prevention Method Using NK Cells

研究代表者 遠藤 大輝(食環境科学研究科 食環境科学専攻)

指導教員 矢野 友啓

研究期間/2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード/① 悪性胸膜中皮腫 Malignant Pleural Mesothelioma

② 3 次元細胞培養システム Three-dimensional Cell Culture System

③ がん幹細胞 Cancer Stem Cell

④ 低酸素 Hypoxia

⑤ ビタミン C Vitamin C

2020 年度交付額/ 630,000 円

研究発表/学会および口頭発表

- ・ 遠藤 大輝、矢野 友啓、3 次元培養システムによる悪性胸膜中皮腫スフェロイドとがん幹細胞性との関連、第 79 回日本癌学会学術総会、2020.10.01-03、オンライン開催
- ・ 遠藤 大輝、長竹 舞子、河野 翔、矢野 友啓、悪性胸膜中皮腫スフェロイドの治療抵抗性上昇は低酸素ストレスに起因するか？ 日本薬学会 第 141 年会、2021.03.26-29、オンライン開催予定

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

研究背景：本研究では NK 細胞によるがん幹細胞傷害性を検証するために、悪性胸膜中皮腫(Malignant Pleural Mesothelioma: MPM) 細胞におけるがん幹様細胞集団の同定・確立と中皮腫幹様細胞(MPM Stem-like Cell: MPMSC) 集団を標的とする NK 細胞の作用機序の解析に努めてきた。しかし、MPM では NK 細胞の主要ながん幹細胞(CSC) 障害経路である TRAIL/DR5 依存経路に欠陥があるため NK 細胞が有効な傷害性を発揮せず、当初予想されていた“NK 細胞が MPMSC を優先的かつ強力に傷害する”という仮説に反する結果となった。さらに、新型コロナウイルスの影響で当初の研究計画を大幅に変更せざるを得なくなり、当該の研究費はがん幹細胞性の獲得と低酸素領域の関連性および低酸素領域で安定化される低酸素誘導因子(HIFs) の一種 HIF-1 α を標的とする治療素材ビタミン C (VitC) による抗中皮腫作用を検証するために使用した。アスベストやカーボンナノチューブといった発がん性物質の曝露と発症リスクとの関連が認められている MPM は、①発がん性物質の曝露から発症までの潜伏期間が平均 40 年と非常に長いこと、②がんの中でも予後が極めて不良であること、③既存の抗がん剤に抵抗性を示すこと、から新たな抗中皮腫療法の構築が急速に求められている。一方で、がんの発生・悪性化に関わる CSC は、自己複製能や多分化能により腫瘍を形成することや、抗がん剤・放射線へ耐性を持つことで腫瘍組織

の治療抵抗性獲得に寄与することが近年明らかにされている。また、腫瘍組織では、無秩序な血管新生や未熟な血管構造により組織内の酸素濃度に不均一性が生じ、低酸素領域が発生する。がん細胞における低酸素環境への適応は HIFs の安定化によってほぼ説明され、中でも HIF-1 α は CSC 性獲得の指標となる薬剤耐性能や転移能に関連する治療抵抗性因子である。興味深いことに、水溶性ビタミンの一種である VitC は、高用量で静脈内投与することで HIF-1 α の不安定化を引き起こし、がんの悪性を低下させることが報告されている。そこで本研究では、幹細胞研究で一般的に使用される 3 次元 (3D) 細胞培養システムを用いて作製した MPMSC における CSC 性 (低酸素適応能・薬剤耐性能) を解析し、その CSC 性が HIF-1 α に起因するか、また、VitC が HIF-1 α の不安定化と HIF-1 α に起因する薬剤耐性能を低下させるかを検証した。

細胞株と MPMSC モデルの確立: ヒト MPM 細胞 (Meso-1) を用い、1 週間の 3D 培養により形成された直径 77 μ m 以上の細胞塊 Sphere を MPMSC モデルとして解析した。比較対象は通常 MPM 細胞とした。がん幹細胞性マーカー (CD26, CD44) の遺伝子発現レベルを測定し、低酸素適応マーカー (HIF-1 α) および薬剤耐性マーカー (ALDH1A1, ABCG2) のタンパク発現レベルとその表現型として生存活性を評価した。細胞生存活性は WST-8 法、遺伝子発現レベルは qRT-real time PCR 法、タンパク発現レベル Western Blotting 法で評価した。

低酸素ストレスによる CSC 性への影響: MPMSC モデルにおける CSC 性の獲得が低酸素ストレスに起因しているかどうかを検証するため、酸素濃度を変えて培養を行った (正常酸素条件: 21 % O₂、低酸素条件: 1 % O₂)。低酸素条件で 48 h 培養後、抗がん剤 Pemetrexed および Topotecan 処理し、さらに 24 h 低酸素条件で培養した細胞の生存活性を評価した。また、72 h までの低酸素培養における HIF-1 α および薬剤耐性マーカー (ALDH1A1, ABCG2) のタンパク発現レベルを測定した。

VitC による低酸素 MPM 細胞の生存活性及び薬剤耐性マーカーの抑制: 低酸素条件で 48 h 培養後、VitC を処理し、さらに 24 h 低酸素条件で培養した細胞の生存活性及び HIF-1 α と薬剤耐性マーカー (ALDH1A1, ABCG2) のタンパク発現レベルを評価した。

2. 研究経過および成果の概要

細胞株と MPMSC モデルの確立: MPMSC において HIF-1 α の発現が安定化していた。また、MPMSC が治療抵抗性関連のがん幹細胞マーカーを高発現し、がん幹細胞表現型を獲得することが示唆された。

低酸素ストレスによる CSC 性への影響: 正常酸素培養群と比較し、低酸素培養群 (低酸素 72 h 培養) において抗がん剤 Pemetrexed と Topotecan への耐性を有意に示した。また、低酸素培養群では HIF-1 α が安定化し、薬剤耐性マーカー (ALDH1A1, ABCG2) が高発現していた。この結果は、低酸素領域で HIF-1 α 発現が安定化されること及び、HIF-1 α が薬剤耐性能を司るがん幹細胞性マーカーを高発現することを示しており、中皮腫幹様細胞におけるがん幹細胞性の獲得は HIF-1 α に起因することが推察される。

VitC による低酸素 MPM 細胞の生存活性及び薬剤耐性マーカーの抑制: 低酸素培養群において、VitC の生理的に到達可能な血中濃度の範囲 (50~100 μ M) での有意な細胞生存活性の低下がみられた。また、HIF-1 α 及び薬剤耐性マーカー (ALDH1A1, ABCG2) の VitC 濃度依存的な発現の不安定化・抑制がみられた。これらより、低酸素領域により薬剤耐性能や低酸素適応能が亢進された MPM 細胞に対して、VitC が強力に抗中皮腫作用を示すこと示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

今後の課題は、MPM 細胞における VitC の HIF-1 α 標的化メカニズムを明確化するために、HIF-1 α 阻害による薬剤耐性マーカーの発現挙動を検証し、VitC の作用点として報告される HIFs 分解タンパク (PHD2) の活性度を解析することで、低酸素領域で悪性化する MPM 細胞に対する VitC の有効性を証明することである。

Summary

Background and Aim: In tumor tissue, hypoxic regions occur due to heterogeneity in O₂ concentration due to irregular angiogenesis and immature vascular structure. Adaptation to the hypoxic environment in cancer cells has been mostly explained by stabilization of Hypoxia-Inducible Factors (HIFs), in particular HIF-1 α is a treatment resistant marker related to drug resistance and metastatic potential, which are indicators of cancer stemness acquisition. Impressively, vitamin C (VitC), a type of water-soluble vitamin, has been reported to cause destabilization of HIF-1 α and reduce malignancy of cancer when injected intravenously at high doses. On the other hand, Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) has been shown to be associated with exposure to carcinogens (Asbestos and carbon nanotubes) to carcinogenesis. In addition, the incubation period from exposure to carcinogens to carcinogenesis is about 40 years, and the prognosis is extremely poor among cancers. Furthermore, it has been reported that HIF-1 α is constitutively stabilized in MPM tissue, and since it shows resistance to existing anticancer drugs, the construction of new anti-MPM therapy is rapidly required. In this study, we aimed to clarify the effectiveness of VitC on MPM cells in the hypoxic regions involved in cancer malignancy.

Methods: We used a cell lines derived from human malignant pleural mesothelioma (Meso-1). We created spheroid-formed cell population (MPMSC) from the parental cells, using a 3D culture system. We cultivated the cells at 21.0 % O₂ (normoxic condition) or 1.0 % O₂ (hypoxic condition). We evaluated cell viability using WST-8 assay, the mRNA level through qRT-real time PCR and the protein level using Western blotting.

Results: We showed that MPMSC induced the stabilization of HIF-1 α expression levels and highly expression of drug resistance markers (ALDH1A1, ABCG2). In addition, we showed that each phenotype in MPMSC was also significantly higher than that in parental cells. Next, we revealed that HIF-1 α was stabilized and that drug resistance markers (ALDH1A1, ABCG2) were highly expressed in the group cultured in hypoxia for 72 h. In addition, the hypoxic group showed significant resistance to the anticancer drugs, Pemetrexed and Topotecan. Finally, we showed that in the hypoxic group, there was a significant reduction in cell viability in the physiologically reachable blood concentration range of VitC (50-100 μ M). We also showed that the expression levels of HIF-1 α and drug resistance markers (ALDH1A1, ABCG2) were suppressed in a VitC concentration-dependent manner.

Conclusion: We found that MPMSC showed hypoxic adaptation and drug resistance. We also clarified that stabilization of HIF-1 α regulates drug resistance and that VitC has a strong anti-MPM effect on hypoxic MPM cells.

地域在住高齢者の認知機能と睡眠の質に対する多様な食品摂取を

目的とした栄養プログラムの効果検証:ランダム化比較試験

Effect of nutritional programs on cognitive function and sleep
quality in a community-dwelling older Japanese:
A randomized-controlled trial

研究代表者 山本かおり (食環境科学研究科食環境科学専攻)

指導教員 矢野友啓

研究期間/2020 年 4 月 10 日~2021 年 2 月 15 日

キーワード/ ①高齢者

②睡眠の質

③食品摂取の多様性

④認知機能

⑤認知症

2020 年度交付額/630,000 円

研究発表/学会および口頭発表

1. 山本かおり, 本川佳子, 平野浩彦, 小原由紀, 枝広あや子, 稲垣 宏樹, 新開省二, 栗田主一, 渡邊裕: 地域在住高齢者の認知機能・生活機能に対する多様な食品摂取と睡眠の質の複合的な関連、第 79 回日本公衆衛生学会、オンライン、2020 年 10 月 20-22
2. Kaori Yamamoto, Keiko Motokawa, Takahiro Yoshizaki, Tomohiro Yano, Hirohiko Hirano, Yuki Ohara, Maki Shirobe, Misato Hayakawa, Hiroki Inagaki, Shuichi Awata, Shoji Shinkai, and Yutaka Watanabe, Dietary variety is associated with sleep efficiency in urban-dwelling older Japanese adults: a longitudinal study, Clinical Nutrition ESPEN, 2020; 41C: 391-7

研究経過および成果の概要

当初予定していた介入研究が、延期となったため、研究デザインを変更し研究を遂行した。成果の概要は下記に示す通りである。

題目名：高齢者における認知症に対する食品摂取の多様性および睡眠の質の関連

方法

対象者：65 歳以上の地域在住高齢者 7614 名

研究デザイン：横断研究（2016 年に取得したデータ）

調査項目：自記式質問票（対象者基本特性、食品摂取の多様性得点（Dietary variety score, 以下 DVS）、睡眠状況（睡眠時間、就寝時刻、起床時刻、入眠時刻）、睡眠薬使用の有無、Mini-mental state examination (以下, MMSE)、The Dementia Assessment Sheet for Community-based Integrated Care System-21 items (以下, DASC-21)

主要な調査項目：DVS は、肉、魚介類、卵、大豆・大豆製品、牛乳、緑黄色野菜、海草類、いも、果物、油を使った料理の 10 食品群の摂取頻度を評価する指標である。スコアの算出方法は、10 食品群について、1 週間の習慣的な食品摂取の頻度を尋ね、「ほぼ毎日食べている」場合を 1 点、「2 日に 1 回」、「週に 1~2 回」、「ほとんど食べない」は「それ以外」としてまとめて 0 点とした。DVS の合計点を算出し（0-10 点）、DVS が高いほど食品摂取の多様性が高いことを示している。睡眠効率の算出方法は、実際の睡眠時間を起床時間（24 時間-就寝時刻+起床時刻）で除して求めた。DASC-21 は地域住民の認知機能障害と生活機能障害を把握し、認知症の可能性がある者を検出し、認知症重症度を評価するためのアセスメントツールであり、得点が高いほど、認知症重症度が高いことを示す。

解析方法：結果は平均値±標準偏差、人数（%）、もしくは、平均値±標準誤差で示した。DVS は中央値の 4 点を、睡眠効率は先行研究を参考に 75%をそれぞれカットオフ値とし、いずれも不良群（Ⅰ群）、いずれか良好群（Ⅱ群）、いずれも良好群（Ⅲ群）の 3 群に分けた。単変量解析では、カテゴリー変数には χ^2 検定、順序尺度の変数にはグッドマン・クラスカル の γ 係数、連続変数には単回帰分析を用いた。多変量解析では重回帰分析を使用し、DVS と睡眠効率がいずれも不良群、いずれか良好群、いずれも良好群の 3 群を独立変数とし、DASC-21 の得点を従属変数とした。調整変数として性別（1 = 男性、2 = 女性）、年齢（連続変数、年齢）、BMI（連続変数、 kg/m^2 ）、飲酒習慣（0 = なし、もしくはやめた、1 = あり）、喫煙習慣（0 = なし、もしくはやめた、1 = あり）、運動習慣（0 = なし、1 = あり）、同居の有無（1 = 一人暮らし、2 = その他）、高血圧の有無（0 = なし、1 = あり）、うつ病罹患の有無（0 = なし、1 = あり）、筋骨格系疾患の有無（0 = なし、1 = あり）を投入した。全ての解析は、IBM SPSS Statistics ver24.（日本アイ・ビー・エム株式会社、東京）を用いた。検定はすべて両側検定とし、統計的有意水準は 5%とした。

結果

食品摂取の多様性と睡眠の質の関連における基本特性の特徴

解析対象者は女性 526 名、男性 422 名であり、全体の平均年齢は 77.3 ± 4.8 歳であった。Ⅰ群は 68 名、Ⅱ群は 440 名、Ⅲ群は 440 名であった。Ⅰ群からⅢ群にかけて、年齢が高く、有意に女性が多く、BMI が低く、運動習慣がある者が多く、高血圧である者は少なかった ($p < 0.05$)。飲酒習慣、喫煙習慣、同居の有無、うつ病罹患の有無、筋骨格系疾患の有無との間には有意な関連がなかった。

食品摂取の多様性と睡眠の質の関連における睡眠と栄養の特徴

Ⅰ群からⅢ群にかけて、有意に睡眠効率は高く、DVS の得点は高かった。DVS の内訳では、肉、魚介類、卵、大豆・大豆製品、牛乳、緑黄色野菜、海草類、いも、果物、油を使った料理の 10 食品全てで、Ⅰ群からⅢ群にかけて毎日摂取している者の割合が有意に高かった。

食品摂取の多様性と睡眠の質の関連における DASC-21 の内訳

Ⅰ群からⅢ群にかけて、有意に DASC-21 の総合得点は低く、下位尺度においては、有意に家庭内の IADL と基本的 ADL (着替え、入浴、排泄、身だしなみ、食事が自身でできるか、家の中の移動) が低かった。記憶、見当識、問題解決・判断力、家庭外 IADL (一人で買い物、バスや電車での外出、貯金出し入れや公共料金の支払い) との間には有意な関連はなかった。

食品摂取の多様性と睡眠の質の関連における DASC-21 との関連

単変量解析での DASC-21 の平均値 (95%CI) は、Ⅰ群は 22.9 (22.4–23.5)、Ⅱ群は 22.1 (21.9–22.4)、Ⅲ群は 22.0 (21.8–22.3) であり、有意な低下傾向が示された。年齢、性別、BMI、飲酒習慣、喫煙習慣、運動習慣、同居の有無、高血圧の有無、うつ病罹患の有無、筋骨格系疾患の有無を調整変数として投入した重回帰分析では、Ⅰ群は 22.9 (22.3–23.5)、Ⅱ群は 22.2 (22.0–22.4)、Ⅲ群は 22.0 (21.8–22.2) であり、有意な低下傾向が示された。

結論

地域在住高齢者において、多様な食品摂取と睡眠効率が共に良好であることは、認知機能と生活機能が良好であることと関連していた。今後は、認知症の発症もしくは認知機能の低下、生活機能低下に対する、食事と睡眠の縦断的な関連を明らかにする必要がある。

Summary

This study aimed to elucidate the association of risk of dementia with dietary variety and sleep quality in Japanese older adults. This cross-sectional study was conducted between October and December 2016 in a population of older Japanese adults aged ≥ 65 years. Data were collected in two steps: a mailed interview survey and an on-site survey. A total of 5341 participants completed the mailed questionnaire. The survey collected information on dietary variety, sleep quality, and risk of dementia were assessed using a Dietary Variety Score (DVS), sleep efficiency, and The Dementia Assessment Sheet for Community-based Integrated Care System-21 items (DASC-21), respectively. We defined the individuals with a sleep efficiency less than 75% as having poor sleep quality, and dietary variety score less than 4 points as having poor dietary variety. The groups were divided into one group for those who had both poor DVS and sleep efficiency, two groups for those who had one or the other, and three groups for those who had both well. In the analysis, characteristics of the study subjects and DASC-21 scores were compared in groups 1 to 3. All analyses were performed using IBM SPSS Statistics version 24.0 (Japan IBM Co., Ltd., Tokyo, Japan).

A total of 526 women and 422 men were included in the analysis. The mean age \pm standard deviation of the participants was 77.3 ± 4.8 years. From group I to group III, more likely to be older, female, lower BMI, more had exercise habits, and fewer had hypertension ($p < 0.05$). From group I to group III, more likely to be high instrumental activity of daily living (IADL) and, high Activities of daily living (ADL) ($p < 0.05$). For linear regression analysis the average (95% confidence interval [CI]) for DASC-21 from group I to group III were 22.9 (22.4–23.5), 22.1 (21.9–22.4) and 22.0 (21.8–22.3), respectively (p for trend = 0.024). In the fully adjusted model (adjusted for age (y), sex, body mass index (kg/m^2), drinking habit, smoking habit, exercise habits, residential status, medical history (hypertension, depression, arthritis)), the average (95% CI) for DASC-21 from group I to group III were 22.9 (22.3–23.5), 22.2 (22.0–22.4) and 22.0 (21.8–22.2), respectively (p for trend = 0.014).

In the community-dwelling elderly, having both good dietary variety and sleep efficiency, may associate with good cognitive and lifestyle function.

PATTERNS FORMED BY MAGNETIC PARTICLES IN FLUCTUATING MAGNETIC FIELD (英題)

研究代表者 ASMA BEN SALAH (GRADUATE SCHOOL OF INTERDISCIPLINARY NEW SCIENCE/
BIONANOSCIENCE FUSION)

指導教員 TORU MAEKAWA

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／① PATTERN FORMATION

② SELF-ASSEMBLY

③ COLLOIDS

④ MAGNETIC PARTICLES

⑤ MAGNETIC FIELD

2020 年度交付額／ 680,000 円

研究発表／学会および口頭発表

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

The purchased paramagnetic Microparticles (Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid) are used for all the experiments. The experimental procedure is as follows. For each experiment, we first mixed 30 μL of distilled water with 10 μL of the 2.8 μm paramagnetic colloids (particle density approx. $\rho = 1.6 \text{ g/cm}^3$) in a small test tube so that the total volume amounts to 40 μL . The obtained sample in the closed test tube was mixed using a compact shaker (IKA MS 3 digital) at a maximum speed of 3000 rpm for several seconds. Thereafter, we sucked up the whole 40 μL of sample solution using a micropipette and then dropped them on a hydrophilic³⁸ clean rectangular glass substrate with a width of $H_1 = 100 \mu\text{m}$. The magnetic Microparticles are suspended on the surface water and supported by surface tension. A smooth cover glass of the same shape and dimension was afterwards placed on the top of the previous glass and hence, not only causing the smooth spread of the droplet solution sample throughout but also the suppression of air to minimize the appearance of bubbles. The confined sample chamber is later placed at the center of the 3D coils system, mounted on an inverted laser microscope (TE2000-U, Nikon Eclipse), so that the magnetic field pierce normal to the surface of the cover glass. The coils generate a bi-axial magnetic field; that is, a dc field applied in a vertical direction parallel to gravity and an ac one in a horizontal direction perpendicular to gravity. The magnetic field strength is held at 2393.1 A/m. The motion of the cluster structures is monitored with the microscope and is eventually recorded on the computer. Snapshots and videos are captured when the magnetic field is applied. Typical time values for the captures are 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200 and 300s during aggregation. These images are processed by fully analyzing the dependence of the dynamics and structures of the clusters; e.g., the time variation of the growth of discs and chains, the number of discs, the length of chains, the dynamic scaling law and the pair-correlation function of the clusters. All experiments are performed at room temperature, $T = 25^\circ\text{C}$.

2. 研究経過および成果の概要

Vertical and horizontal electromagnets, which are made from enameled wires, are organised around the sample to effectuate a tri-axial magnetic field, hence the name 3-dimensional electromagnets. This magnetic field is generated by electromagnet coils (60 mm in diameter), that are able to create fluctuating magnetic fields up to 30 Oe either vertically or horizontally. The sample chamber is prepared by positioning two horizontal rectangular quartz substrates on top of each other. In the bottom substrate of 100 mm (L) x 23 mm (W) x 10 mm (H), there exists a hollow in which the thickness of the fluid containing is 100 μm . Approximately 40 μl of paramagnetic particle solution is sandwiched between the two cover slips through pipetting and steadily dispersed into the horizontal container. This cell is positioned at the centre of the electromagnets and the laser beam penetrates the magnetic system from below. A horizontal alternating (ac) magnetic field induces a sinusoidal field (up to 30 oe) $H_{ac}=H_0\sin(2\pi ft)$ where H_0 and $f=10\text{ Hz}/100\text{ Hz}$ are respectively the amplitude and the frequency of the magnetic field. In addition, a vertical stable (dc) magnetic field is applied up to 30 Oe. The control parameters ϕ and $\lambda=|m|^2/4\pi\mu_s d^3 kT$ represent respectively the volume fraction where m , μ_s , d , k and T are respectively defined as the dipole moment vector, the magnetic permeability, the diameter of a particle, the Boltzmann constant and the temperature. The generated ac magnetic field is parallel to the imaging path while the gravity acts like usual along the dc magnetic field. Originally, in the absence of any external force, particles with similar surface charges repel each other and consequently dispense themselves arbitrarily in the dispersion thus comes the name of Brownian Motion³⁹. The motion of a free particle (i.e. a particle in the absence of external magnetic field) can be written as:

$$dU/dt = -nU + A(t)$$

Where $-nU$ represents the dynamical friction that's governed by Stokes' law as U designates the instantaneous velocity of the particle whereas $A(t)$ is the fluctuating part that characterises the Brownian motion.

The aqueous suspension stretches to form a spanning-web of particles' chains. These chains agglomerate while the spanning-web coarsens, as the time progresses. Upon switching on the external magnetic fields, the progress made in condensing the suspension previously is predominantly lost. In consequence, the paramagnetic particles get magnetised and undergo strong magnetic dipole-dipole interactions. In this case, the interaction energy between two paramagnetic particles is defined as:

$$U_{dd} = \mu_0 m^2 / 4\pi r^3 [1 - 3\cos^2 \theta]$$

Where $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ N A}^{-2}$ is the magnetic permeability of free space, m is the magnetic moment, r is the distance separating the two particles and θ is the angle between the direction of the external magnetic field and the line joining the center of the two particles.

The self-assembly of colloids driven by the external magnetic field is controlled by the field-induced dipolar interactions between the particles. Eventually, a visible depercolation of the spanning web happens after around 5 seconds in the pulsed field. Snapshots of the assembled clusters formed after 5s, 10s and 300s of the fluctuating magnetic field are shown in

figure 4. When the frequency was either 10 Hz or 100 Hz, long chains were steadily formed over a period of time while paramagnetic microparticles forming the chains coagulated in a peculiar way according to the oscillation of the ac magnetic field.

3. 今後の研究における課題または問題点

One of the many problems that hinder this research subject is the repeatability. Indeed, once you obtain a new pattern, the result should remain consistent for other research groups who want to carry out the same research subject and even try to ameliorate it. Thus, for my future plans, it is adequate to repeat the same experiments multiple times. Moreover, the analysis of such physical status is indeed known very difficult as it is a must to describe in details how such a pattern came out in those specific conditions. For example, the line structures that I obtained are actually walls structures at the side view. While it is kind of impossible to observe the side view using SEM (Scanning Electron Microscope) as the solidification method seems kind of impossible to apply for this experiment, the self-assembly of these magnetic microparticles are still under reviews.

Summary

The prospect of a deeper understanding of the nature of the dynamic self-assembly has driven a resurgence of interest in pattern formation at the micro and the nano scale. From a practical point of view, this phenomena not only aim at the construction of nano/micro structures on the surface of substrates and devices but also at the development of biomedical and environmental devices for medical diagnostics and water filtering. . The interaction between polarizable particles can effortlessly be manipulated by external fields, which could lead to the understanding of the atomic and molecular systems. For example, a novel nanosurgery method of brain tumors has been developed using the interactions between the membrane of tumor cells and magnetic particles in a rotational magnetic field. It is very important to investigate the cluster structures and self-assembly induced by the oscillating magnetic fields. That's why, plenty of research groups have been trying to obtain unique patterns. Actually, there are two major categories in self-assembly of nano/micro particles; (a) passive self-assembly in the absence of an external field; and (b) active self-assembly in the presence of an external field which is exactly my research field. Experimental studies have shown an abundant variety of patterns such as chains, rings and snake-like pattern. Located in the local equilibrium, the static self-assembly does not dissipate energy unlike the dynamic one which consumes energy from an external source such as applied magnetic fields. Here, we study the patterns formed by magnetic microparticles suspended on the surface of water and energized by a fluctuating magnetic field. We observed a novel disk pattern below 2 Hz and a fine chain pattern above 2Hz. It is found that the cluster structures change depending on the control parameters such as the frequency and the volume fraction. The dependence of the dynamics and structures of the clusters; e.g., the disks number, the chains' length and the pair-correlation function of the clusters, on the control parameters is fully analyzed and clarified. The creation of such unique

patterns and understanding of the pattern formation process will provide us with not only new insight into physical, chemical and biological phenomena but also an extensive range of applications in the fields of nano/micro technology, bionano fusion technology and biotechnology. The new patterns and pattern formation process will make a great contribution to the development of a novel bottom-up materials fabrication methodology as well as soft matter science. Hence, I will show some new methodology for constructing nano/micro structures on the surface of substrates and devices, which will lead to the development of biomedical and environmental devices for medical diagnostics and water filtering.

A Comparative Investigation on the Anti-Cancer Effects of Chaga Mushroom Extracts from Uzbekistan and Japan

研究代表者 学際・融合科学研究科
バイオナノサイエンス融合専攻
SHUKUROV IBROHIMJON
指導教員 M. SHEIKH MOHAMED

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／① Chaga Mushroom

② Gold Nanoparticles

③ Anti-Cancer Effect

④ Photothermal Therapy

⑤ Water extract of *Inonotus Obliquus*

2020 年度交付額／630,000 円

研究発表／学会および口頭発表

“Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Inonotus obliquus* (Chaga Mushroom) and Their Photothermal Effects Against Human Brain Cancer Cells” 2021 年予定

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

Introduction. *Inonotus obliquus*, also known as chaga, is a parasitic mushroom found in birch trees in Siberia, North America, Northern Europe, China, Asia and Uzbekistan, and is known for its usefulness in the treatment of cancer and other diseases. One of the main research themes in the field of therapeutic natural products is medicinal mushrooms, including Chaga mushrooms. As a consequence, numerous biological benefits, including anti-proliferative, anti-cancer, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, and antibacterial effects, have been revealed. The synthesis of nanoparticles using medicinal flora-originated compounds has recently been extensively researched in order to increase distribution performance and optimize the characteristics of therapeutic natural products. In terms of the medicinal effects of the natural substance itself, these nanoparticles have benefits. In this study, an aqueous extract of the medicinal mushroom *Inonotus Obliquus*, was used to synthesize gold nanoparticles, and the so obtained nanoparticles were used as efficient photothermal therapy agents against brain cancer cells.

Sample Collection & Extraction of Chaga Mushroom Extract. The Chaga mushroom (*Inonotus Obliquus*) for this research was kindly provided by Mr. Gobuki, Sakura Farm, Sapporo, Hokkaido. The Dried chaga mushroom was broken down and grinded in a mortar and pestle and stored at 4°C. 50g of chaga powder was extracted with 250ml of Milli-Q water in a waring blender. Then, extraction was carried out in a cold room (4°C) for 1min at high speed followed by a 5 min rest.

This cycle was repeated 5 times. The resultant thick solution was then filtered with 0.2µm vacuum filter unit (TPP) to separate out the solid and liquid fractions. The filtration process was continued for 24h due to the thick nature of the solution. The final extract was dark brown in color. This extract was stored at 4°C until further use.

Synthesis of Chaga-Gold Nanoparticles. The Ch-AuNPs synthesis involved the reaction of 5mL Chaga extract with different concentrations of 0.001M aqueous solution of HAuCl₃.3H₂O (Sigma). The reactions were performed in a shaking incubator (BioShaker, Taitec) at 150rpm set at 30-70°C for 24h. Two different concentration ratios of extract and gold chloride solution, 1:1 and 1:2 respectively were selected for this purpose (**Table 1**). The solutions, post reaction were centrifuged at 15,000rpm for 30min at room temperature to collect the Ch-AuNPs. The Ch-AuNPs were further resuspended in Milli-Q water and vortexed for approximately 1min and centrifuged again at 15,000rpm for 10min. This process was repeated 3 times to remove the excess unreacted components of both the extract and the HAuCl₃.3H₂O. The final washed Ch-AuNPs were dispersed in Milli-Q water and stored at room temperature for further use.

Table 1. Ch-AuNPs synthesis conditions and parameters

Sample	Extract : Gold Chloride (ratio)	Temperature (°C)
Ch-AuNPI	1:1	30
Ch-AuNP II	1:2	30
Ch-AuNP III	1:1	40
Ch-AuNP IV	1:2	40
Ch-AuNP V	1:1	50
Ch-AuNP VI	1:2	50
Ch-AuNP VII	1:1	60
Ch-AuNP VIII	1:2	60
Ch-AuNP IX	1:1	70
Ch-AuNP X	1:2	70

Cytocompatibility of Extract and Chaga-Gold Nanoparticles. For the cytotoxicity/compatibility analysis 4 mammalian cell lines were chosen - Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBEC), Human Cortical Neurons (HCN-1A) and Brain Cancer (glioblastoma) Cells (U87, LN2308, A1207). Cytotoxicity was assayed with the help of PrestoBlue HS reagent (ThermoFisher Scientific). The principle of the assay involves the conversion of non-fluorescent dye into a fluorescent moiety, which can be read at 560 nm for metabolically active cells.

Photothermal properties of Chaga-Gold Nanoparticles. A highly monochromatic, collimated beam of NIR range (800 nm) [Chameleon Ultra diode-Pumped Mode Locked-Sub 200 Femtosecond Laser (Coherent 80 MHz repetition rate)] with a power of 2.027 W cm⁻² (Laser power meter: VEGA, OPHIR, Japan) was utilized. The temperature variations were measured and analyzed with an infra-red (IR) thermometer [Thermal imager test 881-2 (Testo AG, Germany)]. Ch-AuNPs (I-X) were dispersed in 1ml phosphate buffered saline (PBS) at a

concentration of 1mg/ml. To determine the photothermal responsiveness of Ch-AuNPs, they were irradiated using the NIR laser of wavelength and power mentioned above for 60sec.

Anti-Cancer Photothermal Therapy. A highly monochromatic, collimated beam of NIR range (800 nm) [Chameleon Ultra diode-Pumped Mode Locked-Sub 200 Femtosecond Laser (Coherent 80 MHz repetition rate)] with a power of 2.027 W cm^{-2} (Laser power meter: VEGA, OPHIR, Japan) was utilized. The temperature variations were measured and analyzed with an infra-red (IR) thermometer [Thermal imager test 881-2 (Testo AG, Germany)].

A1207, U87 and LNZ308 cells were trypsinized, pelleted and approximately 10,000 cells were added to each well in the 96-well plates (TPP) and approximately 50,000 cells to 35mm glass base dishes (Iwaki), and cultured for 24 h prior to nanoparticle (Ch-AuNP) exposure. All the experiments were conducted in triplicates. The controls were maintained devoid of any treatment, whereas test groups were treated with 100 μL of 250 $\mu\text{g/ml}$ concentration of Ch-AuNP in PBS. The plates were incubated for 24h, after which the spent media was aspirated and fresh media was supplemented. Then they were irradiated with the NIR laser for 1min. Fluorescence intensity of the final product was analyzed with a microplate spectrofluorimeter (SpectraMax i3x Microplate Reader) using the PrestoBlue HS dye. The viable percentage of cells was calculated for each group and plotted against the concentration of the NCs. The cells in the 35mm glass base dishes were on the other hand stained with LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay Kit (Invitrogen) to distinguish the live and dead cells at 494 excitation and 517 emission wavelengths for calcein and at 528 excitation and 617 emission wavelength for Ethidium homodimer.

2. 研究経過および成果の概要

Analysis of Chaga water extract. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and chemical

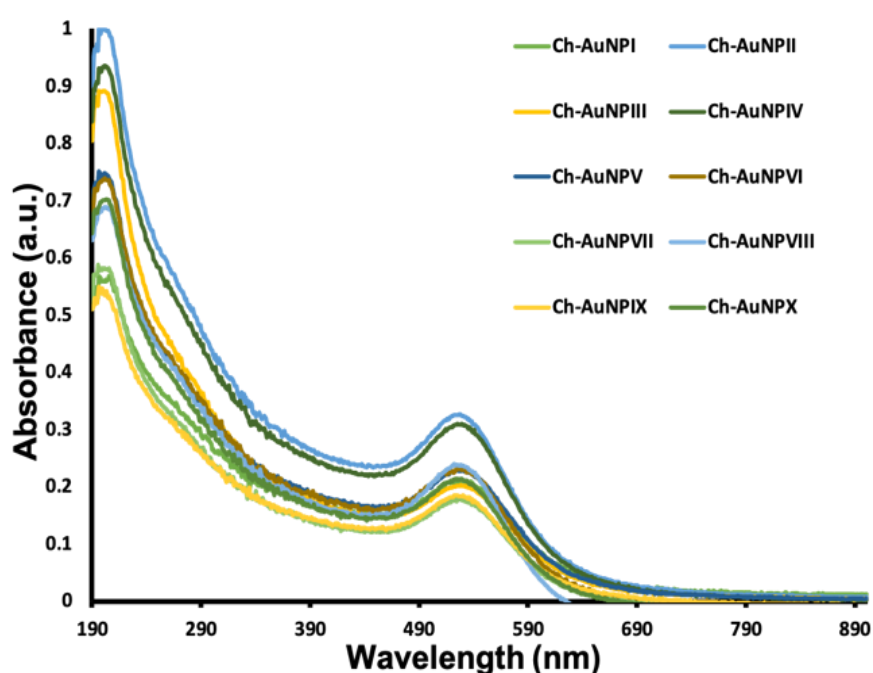


Figure 1. UV/Vis spectra of Ch-AuNPs

constituent analysis were performed with chaga water extract. Ascorbic acid, protein and tannins concentration in the extract was confirmed with chemical analysis. the XPS spectra of the chaga extract, where the survey spectra shows the presence of C1s, N1s, O1s, Si2p/2s and K2p3/K2s. The deconvoluted spectra of carbon could be fitted into three components, C-C at 284.8 eV, C-O at 286.5 eV, and C=O at 287.9 eV. The N1s peak at 400 eV may be attributed to the neutral amino group -NH_2 or the N-H bonds. The peak intensities at the O1s core level, 529.5 eV and 531.5 eV may be assigned to the $\text{O}=\text{C}-\text{OH}$ and OH respectively. Chemical constituent analysis confirmed that the content of tannin was 1.5mg/ml, the content of ascorbic acid was 2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the content of protein was 1.6mg/ml in the extract.

Characterization of Gold Nanoparticles. UV-Visible (UV/Vis) Spectroscopic Studies, TransmissionElectron Microscope (TEM) Analysis, DLS Analysis, XPS Analysis, and Chemical

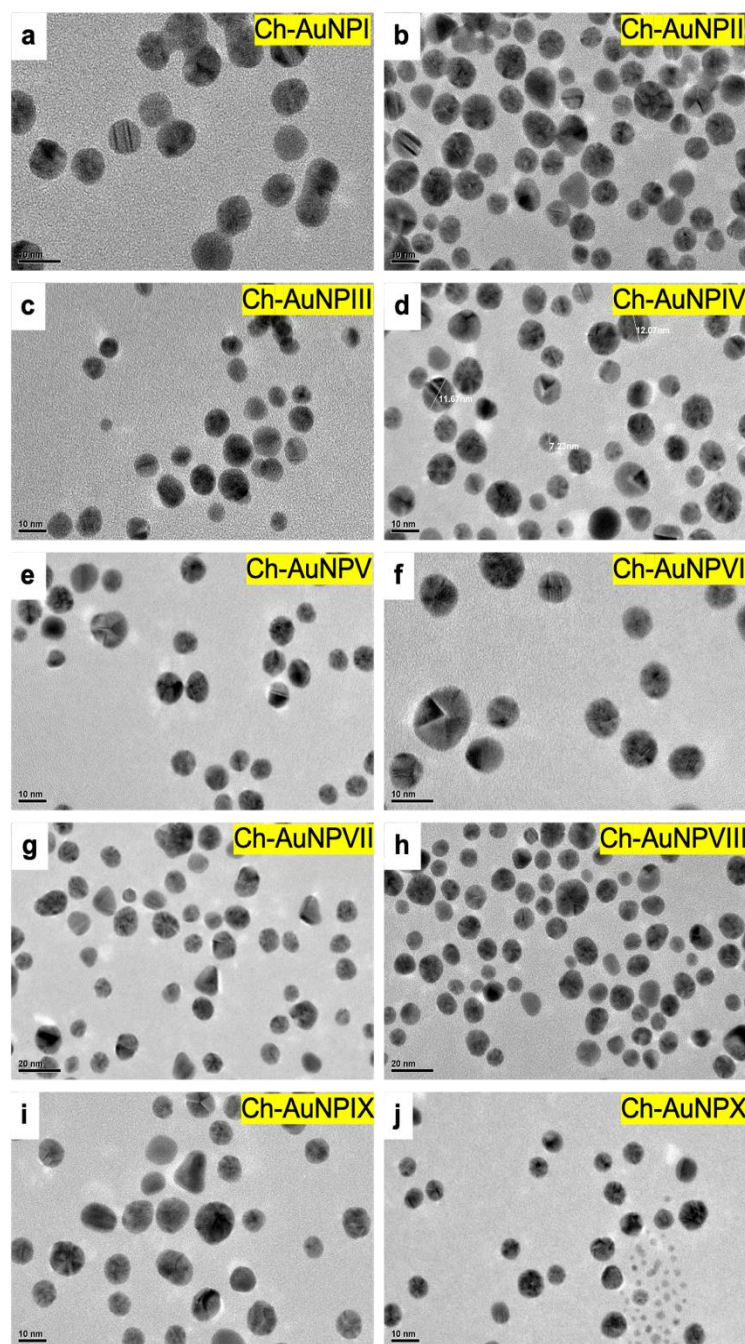


Figure 2. Transmission electron micrographs of as synthesized

Table 2. DLS analysis data of Ch-AuNPs and Chaga extract

Sample	Zeta-potential (mV)	Z-Average (nm)	PdI
Ch-AuNPI	-24.8	41.4	0.852
Ch-AuNPII	-25.7	40.523	0.689
Ch-AuNPIII	-24.8	41.407	0.795
Ch-AuNPIV	-27.1	24.117	0.353
Ch-AuNPV	-26.7	33.087	0.468
Ch-AuNPVI	-23.3	27.253	0.4
Ch-AuNPVII	-23.2	53.08	0.856
Ch-AuNPVIII	-21.4	22.7	0.327
Ch-AuNPIX	-20.5	32.397	0.603
Ch-AuNPX	-20.9	32.897	0.545
Extract	-40.1	--	--

Constituent Analysis were performed with chaga-gold nanoparticles. The UV/Vis spectra of the suspension displayed a characteristic absorption in the visible region (500 nm-600nm) with peak maxima centered around 520nm which is a signature for surface plasmon resonance (SPR) band of the AuNPs (**Fig. 1**). TEM images revealed differently shaped nanoparticles which included triangles, spherical and ellipsoidal particles. It was however observed that most of the obtained nanoparticles were spherical in shape. Interestingly, the size of nanoparticles was less than 20nm (**Fig. 2**). DLS analysis (**Table 2**) showed hydrodynamic size of all nanoparticles were below 50nm. The zeta potential measurements indicated values around -25mV for all the nanoparticles (**Table 2**). The XPS survey spectrum shows the presence of gold, carbon, oxygen, nitrogen, and potassium. The chemical constituent measurement showed that the Ch-AuNPs

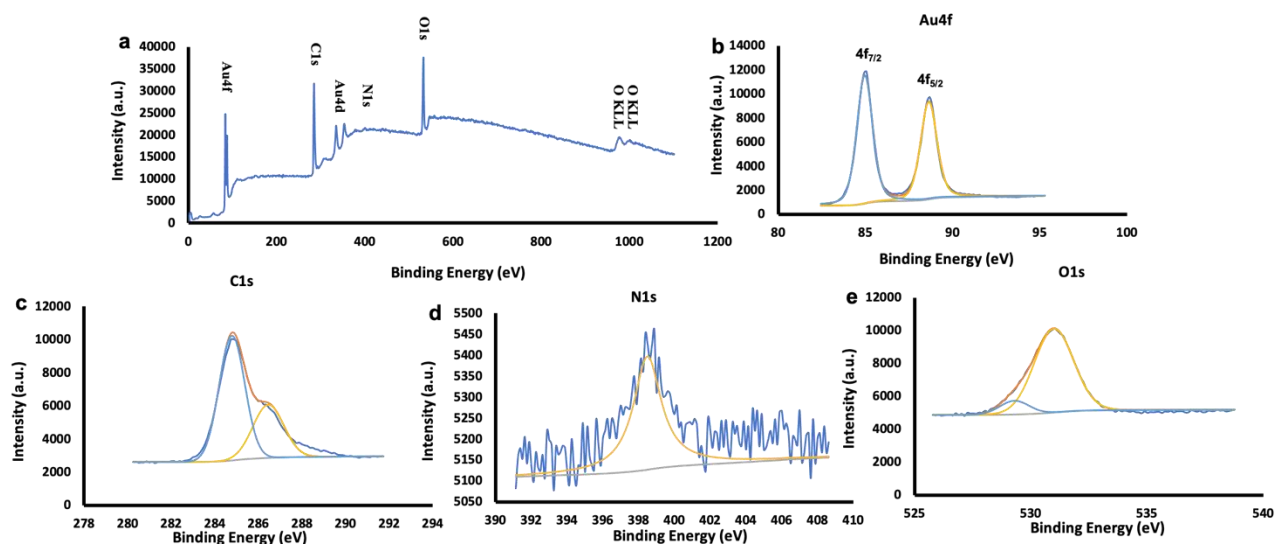


Figure 3. XPS analysis of Ch-AuNPIV. a. wide spectra, b. gold spectra, c. carbon spectra, d. nitrogen spectra, e. oxygen spectra

also contain compounds such as tannins, proteins and ascorbic acid. Based on the observations Ch-AuNPIV was chosen as the candidate nanoparticle for further bio-related studies due to its size and overall uniformity in shape.

Cytocompatibility of Extract and Chaga-Gold Nanoparticles Results. The Ch-AuNPiV and extract elicited significant toxicity to the normal cells (HBEC and HCN-1A). The viability of HCN-1A, post 48h was found to be ~30% and ~40% for Ch-AuNPiV and extract, respectively at 500µg/ml concentration. In the case of brain cancer cell lines, LNZ308 was the most resistant with the viability near to ~60% even at 500µg/ml of Ch-AuNPiV with U87 being the most sensitive (~30%) after 48h of treatment.

Photothermal Properties of Ch-AuNPs. The Ch- AuNPs responded very well to the laser irradiation and exhibited a temperature rise in the range of 43-78°C (**Fig. 4**). Samples Ch-AuNPV and Ch-AuNPiX showed a final temperature of 44.2°C and 43.2°C. It has to be mentioned here that for an effective anti-cancer therapy by PTT, a constant localized high temperature is enough to destroy cancer cells. Therefore even though Ch-AuNPV and Ch-AuNPiX showed lower final temperatures, still, they are enough to be used as effective PTT agents. Irradiation of PBS alone, to eliminate any effects from the solvent system, did not elicit any thermal response and the temperature remained unchanged.

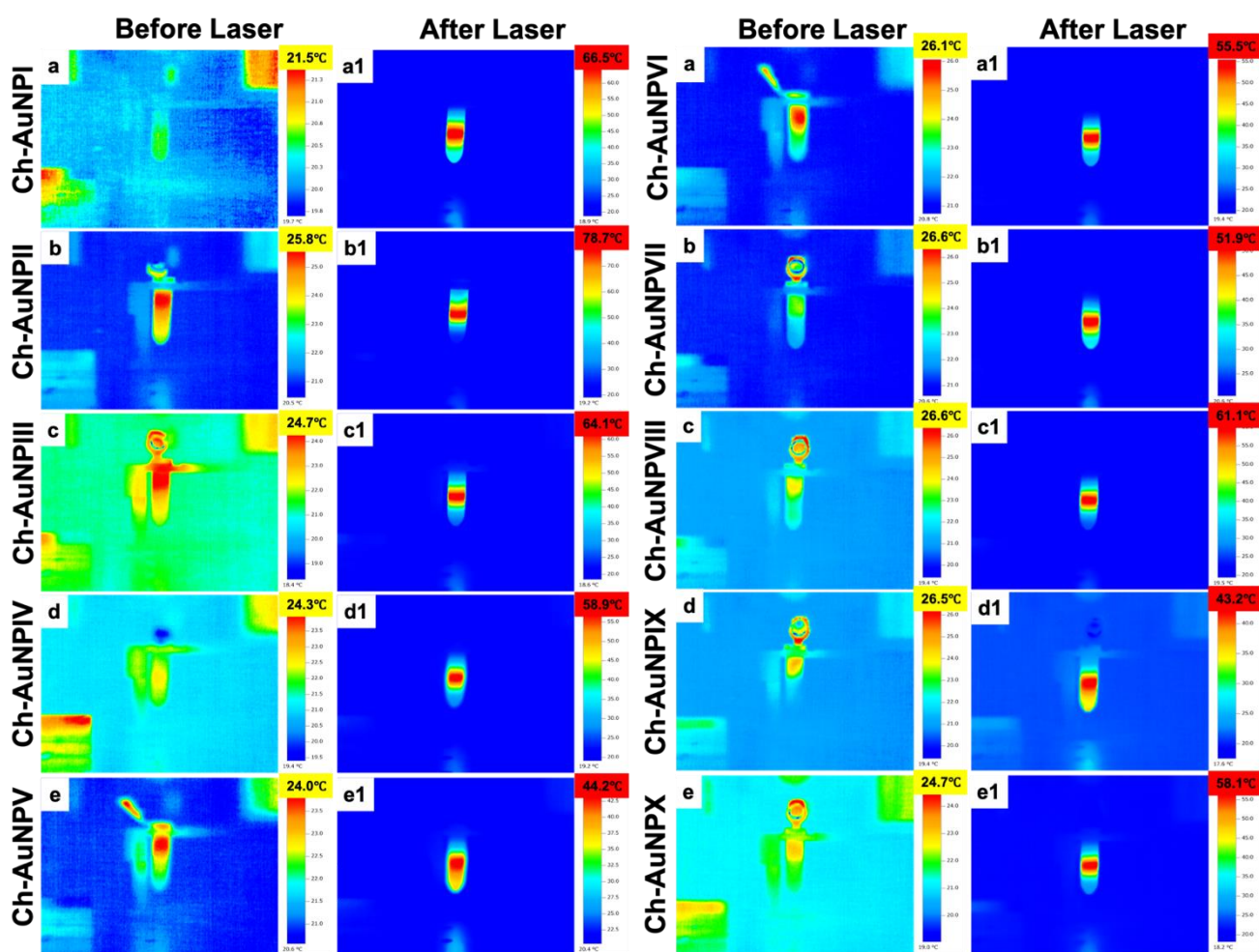


Figure 4. NIR laser induced photothermal properties of Ch-AuNPs (I-X)

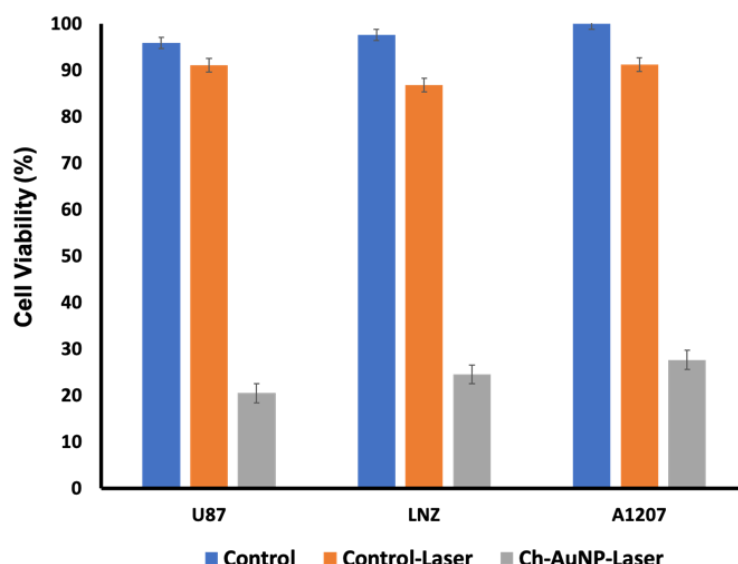


Figure 5. Cell viability post-NIR laser induced photothermal therapy of human brain cancer cells by Ch-AuNP

Anti-cancer Photothermal therapy results. The temperature in the Ch-AuNP-treated cells rose rapidly, which was confirmed from the IR thermal images. After irradiation with NIR laser viable cell concentration was less than 30% for all three cancer cell lines with U87 being the most sensitive cell line (Fig. 5).

3. 今後の研究における課題または問題点

With the foundation of research on chaga laid down with this thesis, further work needs to be conducted in relation to the much detailed analysis of the Ch-AuNPs with analytical instruments as high resolution transmission electron microscope (HR-TEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscope (FT-IR), Raman spectroscopy, Atomic force microscopy (AFM) etc. Further biological analysis of the biomolecules adhered on the surface of Ch-AuNPs need to be performed using molecular biological and chromatographic techniques. Only with these and more characterizations will the full potential of the Ch-AuNPs be revealed for future biomedical applications. In addition, the supply of Uzbekistan origin Chaga mushroom has been suspended due to the postponement of planned cooperation with Uzbekistan because of the global spread of COVID19 infection.

Summary

Cancer is a global menace which has till now evaded being eradicated from society. It is one of the most prominent causes of mortality in adults and children alike. Moreover even after receiving the first line of therapy such as surgery, chemotherapy and radiation therapy, the side-effects are severe and long-lasting, having a disastrous effect of the patients lifestyle and mental wellbeing thereafter.

Chaga has been used in folk and traditional medicine in many parts of the world. It is said to treat many ailments, including cancer. Chaga tea is a very good source of anti-oxidants and has been known to boost immunity. Additionally, with the advent of nanotechnology in the area of biomedical sciences, newer strategies to combat cancer have been developed such as targeted drug delivery systems, and other exciting modules such as photothermal therapy, photodynamic therapy, ultrasound assisted therapy etc.

Therefore, an attempt was made in this research to utilize this natural source as an alternative to the conventional chemicals, used to synthesize nanomaterials. The idea was that some of the active components of chaga would adhere to the nanoparticles and could in turn impart compatibility against normal cells and toxicity against cancer cells. Subsequently, chaga's potential to initiate the synthesis of gold nanoparticles was tested. Gold nanoparticles were chosen due to their intriguing property of absorbing light in the NIR region and efficiently converting it into thermal energy, which could be directed towards killing cancer cells by hyperthermia. Accordingly, gold nanoparticles of less than 50nm size were successfully synthesized and efficiently utilized for anti-cancer therapy against human glioblastoma cell lines. The present research showed that *Inonotus Obliquus* extract and nanoparticles have anti-cancer properties. It was observed that the extract and Ch-AuNP-IV had a negative effect on the cell viability of almost all the cell lines. The effect with Ch-AuNP-IV could be attributed to the presence of biomolecules on their surface from the extract and also due to the high concentration of treatment. The toxicity was concentration-dependent, therefore if the concentration of Ch-AuNP-IV is reduced, a more compatible observation is possible. In conclusion, this thesis, through the research results obtained herein, proposes Ch-AuNPs as efficient anti-cancer photothermal therapy agents.

Experimental and theoretical studies of endohedral fullerene functionalisation and growth

研究代表者 Yuri Tanuma (Interdisciplinary New Science)

指導教員 Toru Maekawa

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／① Supercritical fluids

② Cycloparaphenylenes

③ Density functional theory

④ Carbon nanobelts

⑤ Polycyclic aromatic hydrocarbons

2020 年度交付額／ 560,000 円

研究発表／学会および口頭発表

Publication: Yuri Tanuma, Paul Dunk, Toru Maekawa, Chris. P. Ewels, “Chain and fullerene formation during hydrogen loss and reconstruction in non-planar polyaromatic hydrocarbons” (in preparation, 2021)

Publication: Y. Tanuma, A. Stergiou, A. Bužan Bobnar, M. Gaboardi, H. A. Wegner, N. Tagmatarchis, C. P. Ewels, D. Arčon, “Stable azafullerene radicals entrapped in cycloparaphenylene rings – a route towards complex qubit circuits” (submitted, 2021)

Oral presentation: Yuri Tanuma, Paul Dunk, Toru Maekawa, Chris Ewels, “Theoretical approach to carbon chain formation in carbon nanobelts”, Journées Scientifiques Pôle Ouest, Université de Nantes, France (December 2020)

Video presentation: Yuri Tanuma, Paul Dunk, Toru Maekawa, Chris Ewels, “Élimination de l'hydrogène des carbone nanobelts”, Carb-ON.fr, France (November 2020)

Video presentation: Chris Ewels, Yuri Tanuma, Jérémy Rio, “Trapping Carbon Radicals”, Carb-ON.fr, France (November 2020)

Oral presentation: Yuri Tanuma, Paul Dunk, Toru Maekawa, Chris Ewels, “Hydrogen removal from carbon nanobelts”, NanoteC20, University of Surrey, Surrey, UK (August 2020)

研究経過および成果の概要

This project concerns the overlap of three areas of molecular carbon nanoscience: fullerenes, curved polyaromatics; carbon nanobelt (CNB) and cycloparaphenylene (CPP), and azafullerenes to reveal the mystery of carbon cycle in the space. We are investigated how fullerene and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) behave in extreme environments under strong UV and high pressure, which demonstrate astrochemical environments.

1. Self-assembly of 10-cycloparaphenylene in supercritical fluid

Method

I prepared a liquid sample of [10]CPP dispersed in toluene with a concentration of 1 mg/mL and dropped 10 μ L of it on Si, glass, and highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) substrates. After drying it up in air at room temperature, I fixed the substrate in a pressure resistant container. After that the container was filled with liquid CO₂, sealed, and heated at 35°C for 1 hour. The substrate was collected after cooling down to room temperature. For comparison, another sample on HOPG substrate without supercritical treatment (SC) was prepared. The samples were observed by scanning electron microscopy (SEM).

Results

Several unique structures such as “needles” and “rugby balls” were observed in the both samples on HOPG substrates particularly at edge area of the evaporated drop which is so-called “coffee ring”. Obtained SEM images taken at the coffee ring areas of the sample with SC and the one without SC are respectively shown in **Figure 1** and **2**. In the case of the samples on HOPG, length of the needles and rugbyballs are approximately 6.4 μ m and 2.5 μ m for with SC, and 9 μ m and 2 μ m for without SC. The size of rugbyball particles is larger and number of these particles are greater in the sample with SC. As for the needles, the shapes are slightly different between two samples and the length is shorter in the sample with SC. Therefore SC is expected to encourage rather the growth of rugbyball particles than needles. These particles were not observed in the samples on Si and glass substrates, instead, irregular-shaped structures were formed (**Figure 3** and **4**). Since the reaction temperature is 35°C which does not decompose the [10]CPP and the structures are observed only in the both samples on HOPG, it is supposed that six-membered-rings in HOPG surface interacted with the six-membered-rings of [10]CPP and it resulted in the formation of the needles and rugbyball particles. While glass and Si with low orientation surface and with no aromatic rings helped random stacking into irregular-shaped particles.

I will be carrying out detailed analysis of the particles by scanning tunneling microscope to experimentally investigate its molecular alignment and testing stable structural arrangement of [10]CPP and HOPG surface by the density functional theory (DFT) calculations.

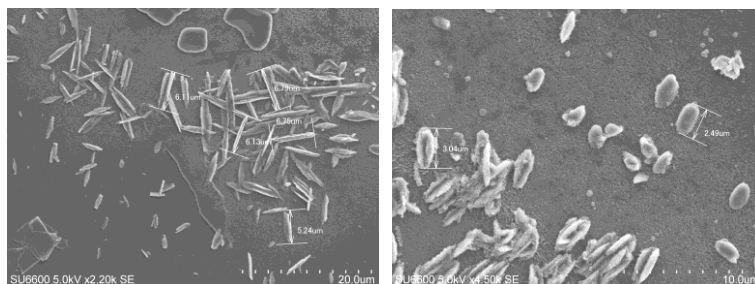


Figure 1. SEM images taken at the coffee ring area of the sample on HOPG substrate with supercritical CO₂ treatment. Needle-shaped (left) and rugbyball-shaped (right) structures were observed.

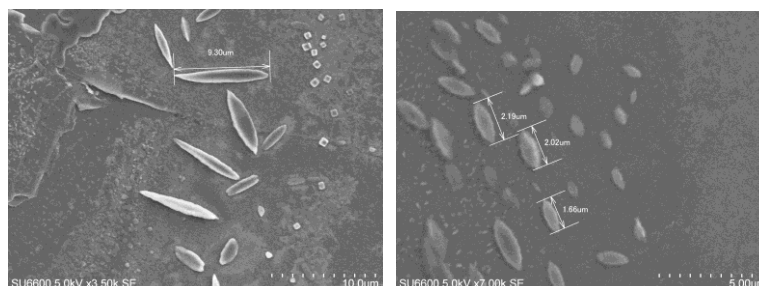


Figure 2. SEM images taken at the coffee ring area of the sample on HOPG substrate without supercritical CO₂ treatment. Needle-shaped (left) and rugbyball-shaped (right) structures were observed.

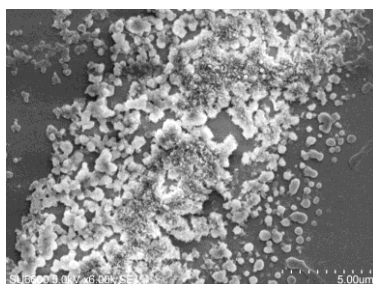


Figure 3. SEM image taken at the coffee ring area of the sample on glass substrate with supercritical CO₂ treatment

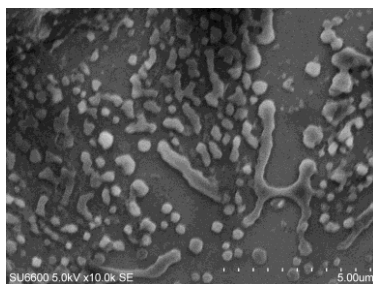


Figure 4. SEM image taken at the coffee ring area of the sample on Si substrate with supercritical CO₂ treatment

2. Carbon chain formation by cyclodehydrogenation of curved polyaromatics

Method

Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS) with laser ionisation (<15 mJ) was carried out for [12]CNB in a system of ultrahigh vacuum, and collision-induced dissociation (CID) was employed to check dissociated fragment ions. The experimental part was carried out by a research collaborator Dr. Paul Dunk at Florida State University in the US. In order to support the experimental results, DFT calculations with the local density approximation (LDA) was also carried out using the AIMPRO code. A basis set of Gaussian type orbitals were used; 38 independent functions for carbon and 12 for hydrogen atoms, where the Hartwigsen, Goedecker, and Hutter (HGH) pseudo potentials were employed. 300 Ha cut-off was used for the charge density. Spin was polarised ($\mu_B=1$) in odd numbered electron systems and averaged in even numbered ones. The electron temperature was set by Fermi function at 0.04 eV to converge calculations. Geometric optimisations for molecular structures were carried out until the system energy and atomic positions converged within 10^{-7} Ha and 10^{-7} atomic units. The enthalpy difference ΔH was calculated by **Equation 1**

$$\Delta H = E(C_{48}H_{n-1}) + \frac{1}{2}E(H_2) - E(C_{48}H_n) \quad \dots (1)$$

where E is the total energy of each isolated molecule.

Results

Experimentally obtained mass spectra before and after CID showed that CNBs were dissociated into several specific fragment ions, such as, $2nH$ ($n \leq 3$), nCH ($n \leq 2$), and $2C(n \leq 2)$, in which particularly signals from dissociation by a 2H unit were strong among the detected ions.

In order to support the experimental results, I carried out DFT calculations with a charge state of +1 per overall volume of a unit cell to demonstrate the CID-MS analysis system. From an optimised CNB structure I removed 1 H atom and then there would be 2 structural isomers of $C_{48}H_{23}$ considering molecular symmetry, i.e., from an interior or exterior carbon edge. Also another candidate of 1H-loss isomer was constructed from the interior 1H-loss structure; Stone-Wales rotation was performed at the dehydrogenated carbon atoms and formed pentagon-heptagon structure in the CNB. Next, I removed 1H again from each optimised $C_{48}H_{23}$ structure considering the symmetry and optimised the $C_{48}H_{22}$. In the same way, this process was repeated for the next nH-loss structures ($C_{48}H_{24-n}$) from the most stable structure in each isomer group, up to 8H-loss structures ($n=1, \dots, 8$) and optimised them. As a result, it was found that there are three possible routes; that is, (a) zipping the ring open into two carbon chains, (b) closing into a fullerene-like cage, and (c) opening into two parallel carbon chains with pentagon ends. (a) and (b) depend on the site of the first H removal, i.e., when an exterior H is the first site, the route (a) would be chosen, but in the case of an interior one, the route (b) would be selected, while the route (c) would be energetically preferred to (a) and (b). For all of the cases, the ΔH plots showed that the dehydrogenation proceeds by 2H unit due to stabilisation by forming carbyne chains in the case of the routes (a) and (c), and a carbon square for (b), instead having dangling bonds. In addition, their total energy plots indicated that (b) is the most stable in the 1 to 3 H-loss structures, however, after 3H-loss (c) is the most stable. Note that there is only a small difference in the energy required to remove the first 1H atom and the energy of the molecular (multi-)collision used in the experimental was strong enough, and therefore it is supposed to be possible to overcome the energy barriers to shift from the route (b) to (c). This kind of carbon chains formation often can be observed in between separating graphene nanoribbon by strain, and graphene sheets exposed to electron beams. After 6H-loss, it is considered that the extension of the carbon chains would be experimentally difficult due to a steric problem caused by the ring structure and kinetic problems of the experimental systems such as molecular collisions and detection range and path length. Hence, it can be concluded that theoretically the hydrogen desorption from a CNB proceeds following the route (b) up to 3H-loss, and after that it shifts to the route (c) which well explains the experimental results.

In the future, I will be simulating infrared spectra so that this study will cover the fundamental features of a CNB as one of the typical examples of curved

PAHs which is a novel key to reveal the compositions and carbon cycle system in the space.

Summary

Self-assembly of [10]CPP by supercritical CO₂ and hydrogen desorption from carbon nanobelts were studied in order to reveal carbon cycle and growth in extreme conditions under high pressure, strong UV or electron irradiations.

As for the former case, I investigated behaviour of [10]CPP on HOPG, Si, and glass substrates with and without SCCO₂. In the case of the experiments with HOPG substrate, needle-like and rugbyball-like particles were synthesised. The size and number of rugbyball particles were greater in the sample with SC and therefore SC is expected to encourage the growth of the particles. In addition the other samples with SC on Si and glass substrates formed irregular-shaped structures and no needles and rugbyball particles were observed. These difference of particle formation can be attributed to the surface character of the substrates; HOPG has highly aligned carbon six membered rings and it can interact with CPP rings by their π electrons, while Si and glass with no π - π interactions encouraged random stacking and resulted in the irregular-shaped structures.

Furthermore for the latter case I carried out dehydrogenation study utilising experimentally CID-MS and theoretically DFT calculations. The experiments with and without molecular collision revealed that CNB dissociated by 2H unit, followed by 2C or 2CH unit removal. Quantum calculations also indicated that the hydrogen removal prefers 2H unit due to the stabilisation by the formation of carbon chains or carbon squares instead of staying as dangling bonds. By pursuing the most stable structure, the route with two parallel carbon chains between two pentagon ends formed by Stone-Wales rotation. In this study it was revealed that curved polyaromatics also can be cyclodehydrogenated and deform into two carbyne chains. I will be investigating IR spectra originated from the carbon chains and pentagon ends so that it will be one of keys to assign the unknown infrared signals from the interstellar medium.

Finally I would like to acknowledge Dr. Chris Ewels, Dr. Xiaoyang Che and Mr. Anthony Impellizzeri for their support to my numerical work, Dr. Paul Dunk for the experimental work, French Government Scholarships for financial supports, the CCIPL (Centre de Calculs Intensif Pays de la Loire) for DFT calculation systems and equipment.

SYNTHESIS OF POLYSACCHARIDE BASED NANOPARTICLES FOR THE ORAL DELIVERY OF QUERCETIN IN TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

(炎症性腸疾患の治療におけるケルセチンの経口送達のための、
多糖類ベースのナノ粒子の合成)

研究代表者 Eden Mariam Jacob (大学院学際・融合科学研究科)
指導教員 Dasappan Nair Sakthi Kumar

Keywords: 1) Biodegradable

2) pH-sensitive

3) Pectin nanoparticles

4) PLGA-Eudragit S100 nanoparticles

5) Garcinol

2020 年度交付額／ 544,000 円

Research presentation / in conferences and/or oral presentation

1. Synthesis and characterization of citrus-derived nanoparticles based on their degree of esterification. Eden Mariam Jacob, Ankita Borah, Amandeep Jindal, Sindhu C Pillai, Yohei Yamamoto, Toru Maekawa, D. Sakthi Kumar. Oral Presentation at the 15th IEEE international conference on nano/micro engineered and molecular systems (IEEE-NEMS 2020 VIRTUAL CONFERENCE), Sandiego, USA, September 2020.
2. pH-sensitive Nanoparticles Based Oral Drug Delivery for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. Eden Mariam Jacob, Ankita Borah, Sindhu C Pillai, D. Sakthi kumar. Poster Presentation at 2020 Virtual MRS fall meeting and exhibit, Boston USA, November 2020.

Publications

1. Synthesis and characterization of citrus-derived pectin nanoparticles based on their degree of esterification. Eden Mariam Jacob, Ankita Borah, Amandeep Jindal, Sindhu C Pillai, Yohei Yamamoto, Toru Maekawa, D. Sakthi Kumar, *Journal of Materials Research*, Volume 35, issue 12, pp 1514-1522, 04 June 2020 Doi:10.1557/jmr.2020.108 (Cover page article).

2. BioPerine Encapsulated Nanoformulation for Overcoming Drug-Resistant Breast Cancers Sindhu C Pillai, Ankita Borah, Amandeep Jindal, Eden Mariam Jacob, Yohei Yamamoto, D. Sakthi Kumar, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 15, Issue 6, pp 701-712, November 2020. Doi:10.1016/j.ajps.2020.04.001(Cover page article).
3. Inflammatory bowel disease: The Emergence of New Trends in Lifestyle and Nanomedicine as the Modern Tool for Pharmacotherapy. Eden Mariam Jacob, Ankita Borah, Sindhu C Pillai, D. Sakthi Kumar, *Nanomaterials* Volume 10, issue 12, pp 2460, 07 December 2020. Doi:10.3390/nano10122460.
4. Nanotechnological approach to delivering nutraceuticals as promising drug candidates for the treatment of Atherosclerosis. Sindhu C Pillai, Ankita Borah, Eden Mariam Jacob, D. Sakthi Kumar. *Drug delivery*, February 2021 (in press),
5. Garcinol encapsulated pH-sensitive biodegradable nanoparticles: A novel therapeutic strategy for the treatment of inflammatory bowel disease. Eden Mariam Jacob, Ankita Borah, Sindhu C Pillai, D. Sakthi Kumar (submitted to *Polymers*, February 2021, under peer-review process).

Outline of your research progress and result

1. 研究方法

Research method (around 700Words)

The main objective of our study is to synthesize biodegradable pH-sensitive nanoparticles (NPs) for the oral delivery of a hydrophobic drug to the colon in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). IBD is emerging as one of the global diseases of the 21st century not only in highly developed countries in North America and Europe but also conquering the newly industrialized countries in Asia as well affecting nearly 5 million people worldwide with almost \$ 6 billion spent (2017) on treatments and occurs most often in patients 15 to 30 years of age. The vast increase in IBD occurrence globally suggests the influence of environmental factors like diet, hygiene, pollutants, and microflora, along with genetic variations. Although used in the last 15 years at providing remission, conventional therapies have serious side effects. Nanomedicine therapy has been

demonstrated in experimental studies to be more resourceful in targeted therapy, reduced systemic toxicity, and minimized drug loading for oral delivery.

Initially, we wanted to synthesize and characterize pectin NPs loaded with the drug quercetin for the study. Firstly, we synthesized biodegradable NPs with three types of citrus pectin based on their degree of esterification (DE) high methoxylated pectin (HMP) DE>50%, low methoxylated pectin (LMP) DE<50% and low methoxylated amidated pectin (AMP) DE <25% through ionotropic gelation method using Magnesium (Mg^{2+}) as the divalent cation. Since three types of pectin were used, we decided to compare the size, shape, surface chemistry, physical interactions and biocompatibility of the three NPs prepared. We used various characterization techniques involving SEM, TEM, DLS, FTIR, XPS, and for the biocompatibility study, we used THP-1 cells. Later, the pectin NPs were loaded with our drug of interest, quercetin, to analyze its therapeutic efficacy against IBD. Unfortunately, due to the crystalline nature of the drug and the formed nano-drug delivery system, the NPs were unable to release the drug into the media for inducing cytotoxic effect on the cells compared to the free quercetin. Since the drug was not appropriately released, we could not continue with quercetin loaded pectin NPs for further studies in IBD treatment. Therefore, we decided to continue our research using a different perspective.

In the alternative perspective, instead of using quercetin as a drug, we decided to utilize another natural compound named garcinol (GAR) to treat IBD. GAR has been studied for its anti-cancer, anti-oxidant and anti-inflammatory properties. We formulated pH-sensitive NPs using PLGA coated with Eudragit S100 (ES100) loaded with GAR (GAR-PENP) using solvent evaporation method for the targeted delivery of GAR to the colon through oral route. Since IBD predominantly occurs at the colon, garcinol delivery to the colon must occur without hindrance. Therefore, our GAR-PENP has been designed to reach the colonic pH ≥ 7 targeting IBD through oral delivery (figure 1). The NPs were characterized using SEM and DLS to understand their physical morphology, including shape, size and surface texture. *In vitro* drug release of GAR-PENP was conducted. The cell studies were divided based on the disease pattern. In the case of IBD, we used CACO-2 cells. The cytotoxic effect of GAR-PENP at different concentration were studied using Presto blue assay. To examine the

impact of GAR-PENP in reducing inflammation in CACO-2 cells, we conducted Myeloperoxidase (MPO) assay. CACO-2 cells were also treated with proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 and lipopolysaccharide (LPS)) for studying the expression of necrosis factor-kappa B (NF- κ B).

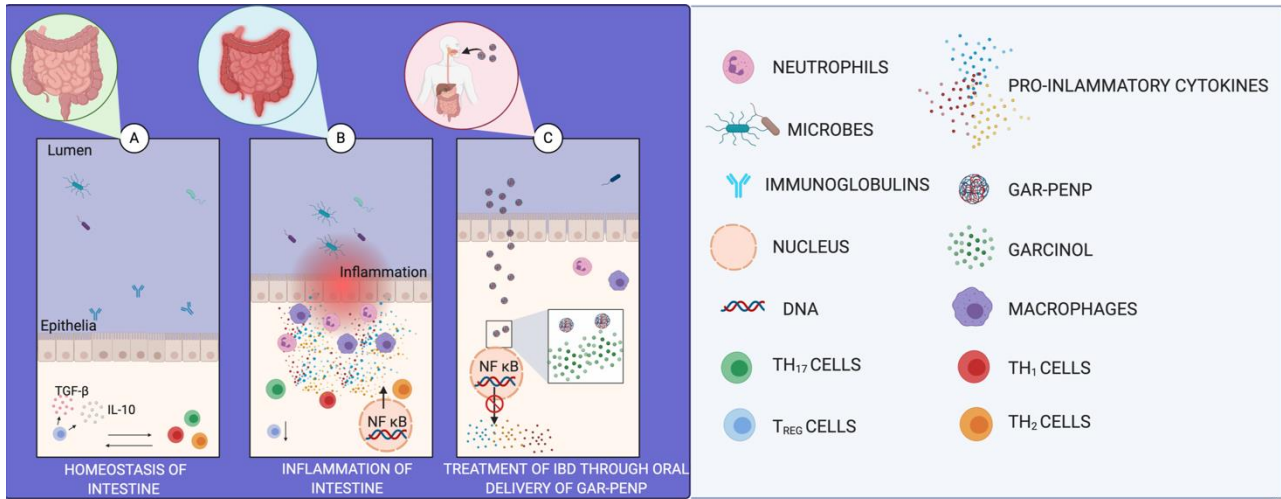


Figure 1: Schematic representation of treatment of inflammatory bowel disease through oral delivery of GAR-PENP.

2. 研究経過および成果の概要

Outline of your research progress and result

For the first study, the NPs were prepared using ionotropic gelation method using Mg^{2+} as the divalent ion crosslinking two adjacent or opposite carboxyl groups in the pectin by forming a salt bridge. This process of gelation is preferably known as the eggbox model. The three NPs formed HMP-nanoparticles (~ 850 nm), LMP-nanoparticles (~600nm), and AMP-nanoparticles (~850nm) were rod shaped and smooth surfaced using SEM and TEM characterization (figure 2). The DLS was also in corroboration with the SEM and TEM in analyzing the size of the NPs (figure 3).

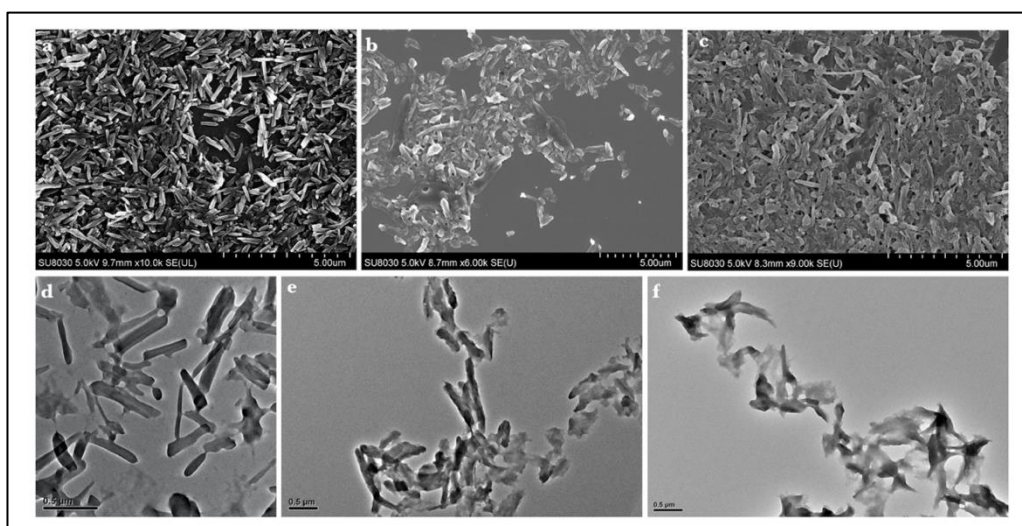


Figure 2: SEM images of pectin nanoparticles (a) HMP-nanoparticles (b) LMP-nanoparticles (c) AMP-nanoparticles (at scale 5 μm); TEM images of pectin nanoparticles (d) HMP-nanoparticles (e) LMP-nanoparticles (f) AMP-nanoparticles (at scale 0.5 μm).

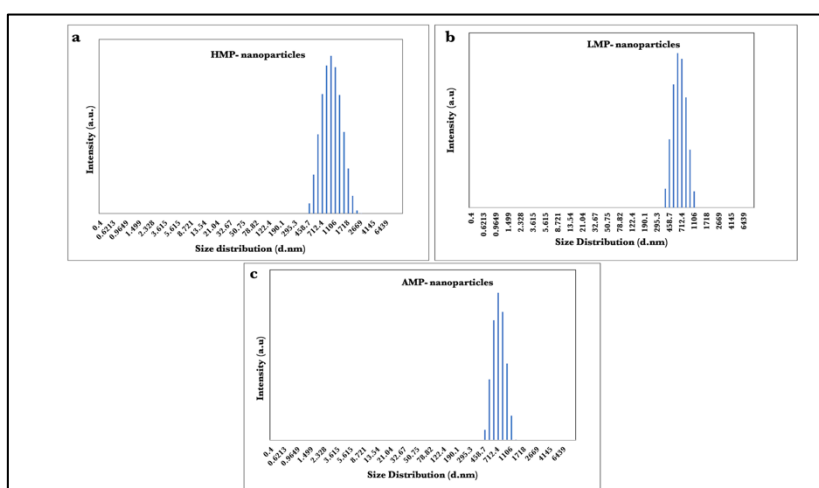


Figure 3: Size distribution of (a)HMP-nanoparticles; (b) LMP-nanoparticles; (c) AMP-nanoparticles by DLS measurement.

The zeta potential of all the three NPs were found to be around $\sim 35\text{mV}$. In figure 4 depicts the physical and chemical bonding in the three pectin powders and their respective NPs using FTIR. Mg^{2+} was important in the formation of NPs and thus with the XPS analysis, we were able to observe the peak for Mg^{2+} at 90-95 eV (figure 5 (d-f)) in all the three NPs along with carbon (C1s) and oxygen (O1s) peak in the wide spectrum (figure 5 (a-c)). The three pectin nanoparticles were found to be equally biocompatible when treated with the THP-1 cells for a period of 24-72 hours (figure 6).

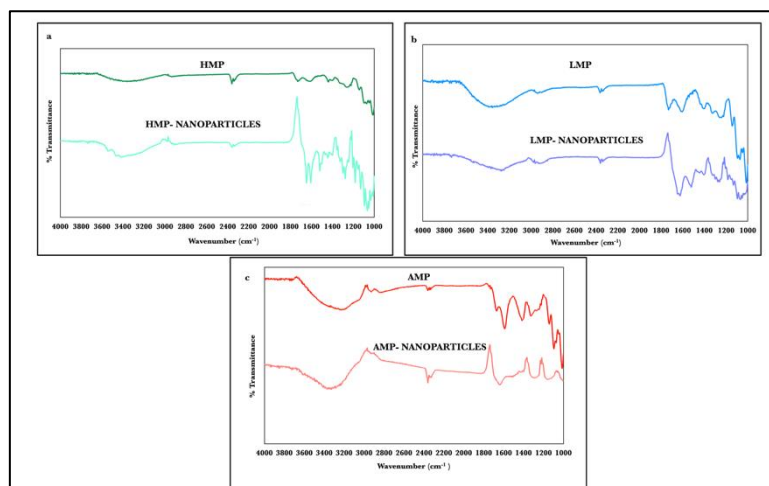


Figure 4: FTIR analysis of (a) HMP powder & HMP- nanoparticles; (b)LMP powder & LMP- nanoparticles; (c) AMP powder & AMP- nanoparticles.

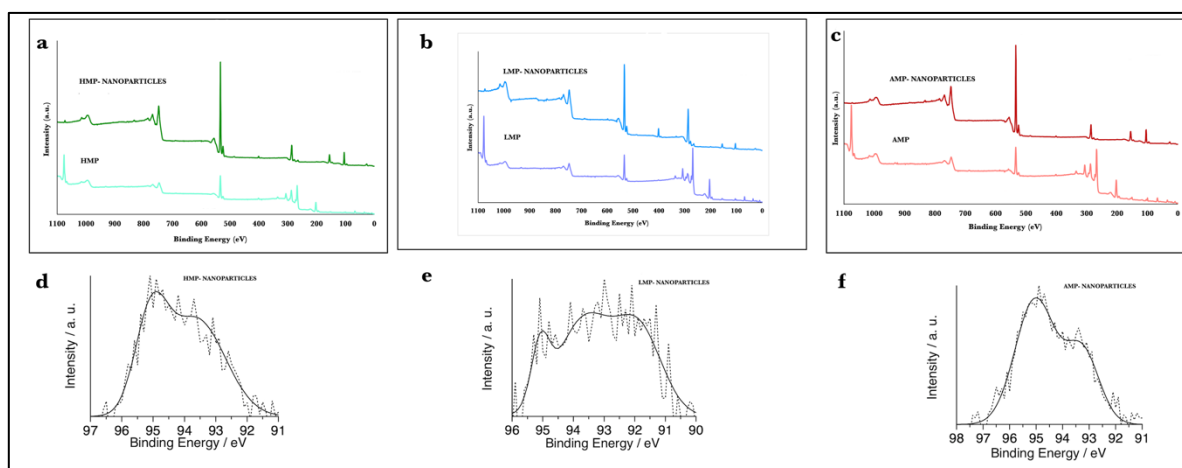


Figure 5: XPS analysis of (a) HMP powder & HMP-nanoparticles; (b) LMP powder & LMP-nanoparticles; (c) AMP powder & AMP-nanoparticles; Mg 2s peak in pectin nanoparticles (d) HMP-nanoparticles (e) LMP-nanoparticles (f) AMP-nanoparticles.

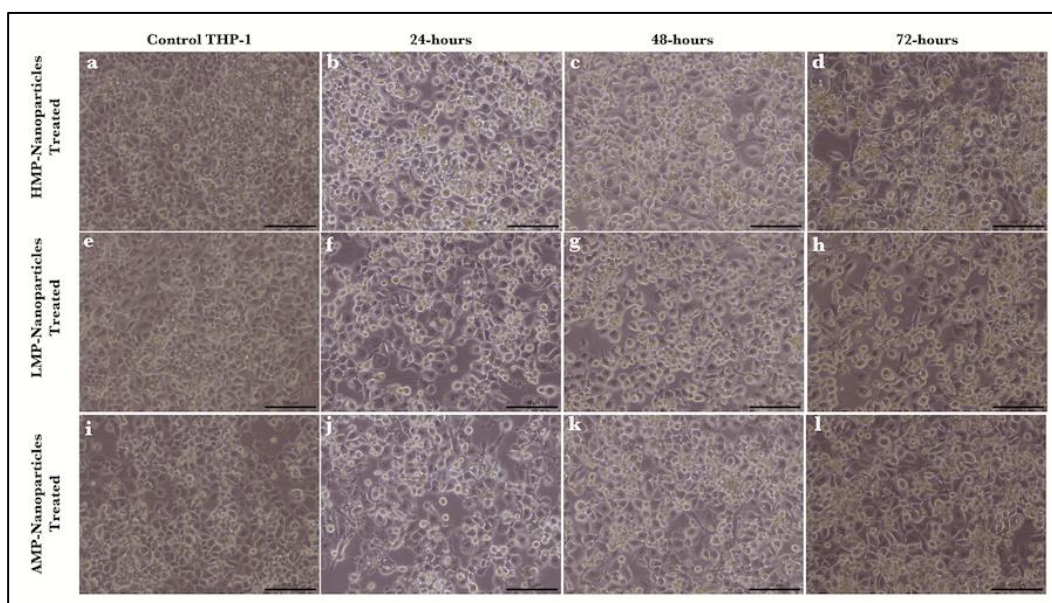


Figure 6: Bio compatibility study of pectin nanoparticles (1mg/ml) treated with THP-1 cells under optical microscopy (at scale 100 μ m): (a-d) HMP-nanoparticles treated cells 24-72 hours; (e-h) LMP-nanoparticles treated cells 24-72 hours; (i-l) AMP-nanoparticles treated cells 24-72 hours.

In conclusion, all three citrus pectin samples depicted similarity in their characterization studies and due to the high mucoadhesive nature of pectin, we believe them to be suitable carriers for oral delivery of hydrophobic drug in controlled dosage forms. We plan to conduct a detailed drug delivery studies in near future based on the developed and well characterized pectin nanoparticles.

In the second study we studied the effect of pH-sensitive NPs for the oral delivery targeting the colon for the treatment of IBD. The development of pH-sensitive NPs GAR-PENP were synthesized using solvent evaporation method where PLGA, GAR and ES100 are added to acetone (organic phase) separately and dissolved and later added drop wise to the aqueous phase (0.5% poly vinyl alcohol-PVA) sonicated for 5 minutes followed by magnetic stirring for 4-5 hours. During this evaporation process of the organic solvent, the emulsified polymeric droplets are formed that hardens to the development of NPs which is collected by centrifugation and later lyophilized for further studies. Similarly, GAR loaded in PLGA without ES100 coating (GAR-PNP), blank-PENP, and coumarin-6 loaded fluorescent NPs were also prepared in the same way.

During the characterization of the GAR-PENP the SEM images (figure 7) showed spherical shape and smooth surface with a size ranging from 200-500nm. The DLS also revealed the similar size patter of the GAR-PENP with an average size of 295nm (figure 8).

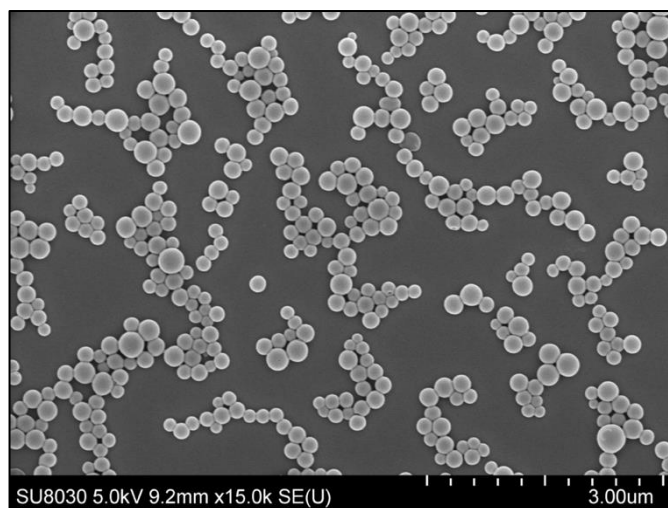


Figure 7: SEM image of GAR-PENP (at scale 3.00 μm).

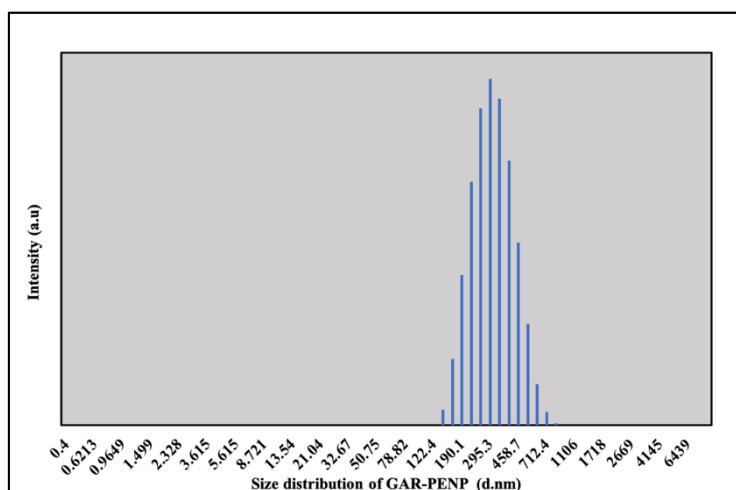


Figure 8: Size distribution of GAR-PENP by DLS measurement.

The *in vitro* release of GAR by GAR-PENP and GAR-PNP in PBS with 10 % FBS (pH 7.4) are shown in figure 9. The drugs were released from their respective NPs for a period of 2, 6, 24, and 48 hrs. The GAR-PENP was able to release the drug better in a sustained manner compared to the non-coated GAR-PNP.

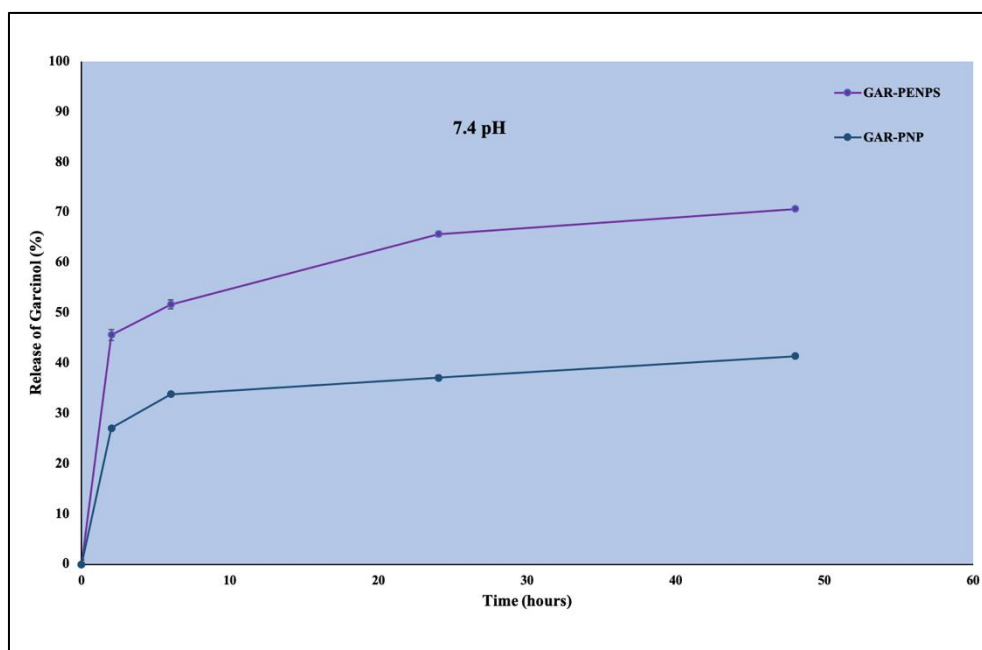


Figure 9: *In vitro* release of GAR from GAR-PENP and GAR-PNP in PBS (pH 7.4 PBS/FBS buffer) studied over 2 days at 37°C.

The cytotoxicity analysis was conducted using Presto blue assay for IBD. In the case of IBD studies, the cytotoxicity studies were conducted to establish concentration range for GAR-PENP that can be used for reducing the inflammation but doesn't completely kill the CACO-2 cells (figure 10). The GAR-PENP was found to be non-toxic at the concentrations 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$, concentration at 250 $\mu\text{g/ml}$ was found to be slightly toxic. However, GAR-PENP was highly cytotoxic at concentration 500 $\mu\text{g/ml}$ with less than 10% cell viability at 24 and 48 hours of incubation

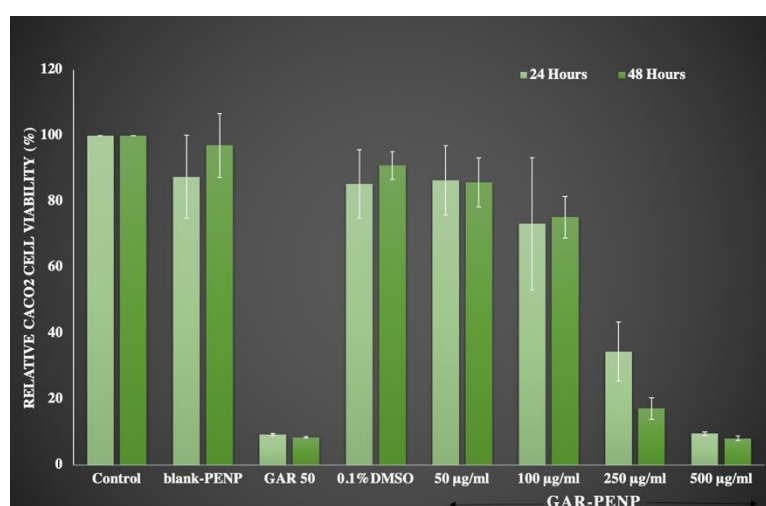


Figure 10: *In vitro* cytotoxicity assay on CACO-2 cells for 24-48 hours, blank-PENP concentration was 500 $\mu\text{g/ml}$, free GAR was 50 $\mu\text{g/ml}$ and GAR-PENP (50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, and 500 $\mu\text{g/ml}$).

The inhibition of inflammation of GAR-PENP in IBD was studied using LDH and MPO assay using the lower cytotoxic concentrations. It was noted in the both the experiments that the concentration 250 $\mu\text{g/ml}$ was able to reduce the MPO activity within 24 hours in figure 11. Since 250 $\mu\text{g/ml}$ was desirable in reducing both the enzyme activities, we decided to continue our further studies with the same concentrations.

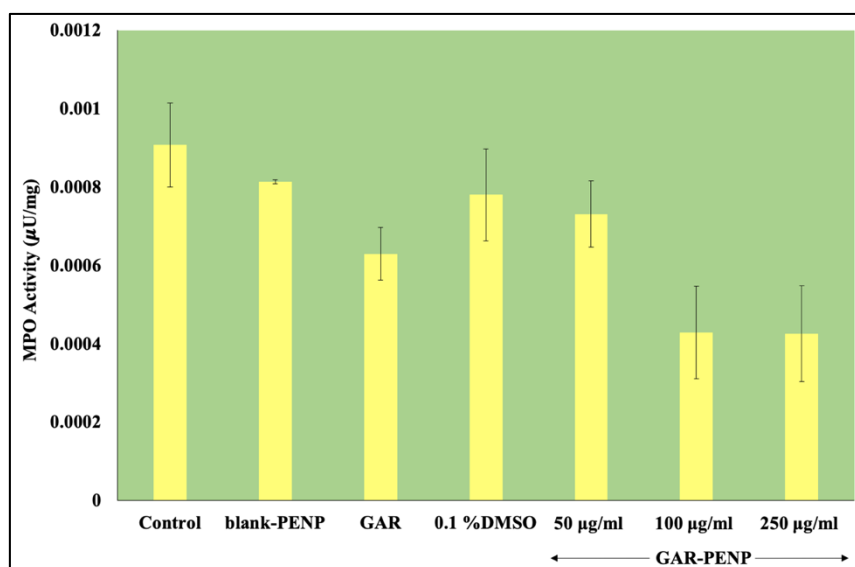


Figure 11: MPO assay on CACO-2 cells treated for 24 hours with blank-PENP concentration was 500 $\mu\text{g/ml}$, free GAR was 50 $\mu\text{g/ml}$ and GAR-PENP (50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, and 250 $\mu\text{g/ml}$).

Since inflammation occurs due to the activation of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in the GIT. We conducted an immunofluorescence assay to analyze the inhibition of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ by the drug loaded NPs. The CACO-2 cells were first treated with a proinflammatory cocktail to induce the inflammation and later with the GAR-PENP. We found out that the expression of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ reduced by GAR-PENP at 250 $\mu\text{g/ml}$ concentration within 48 hours as depicted in figure 12. Thus, demonstrating the inhibitory effect of GAR-PENP in the treatment of IBD.

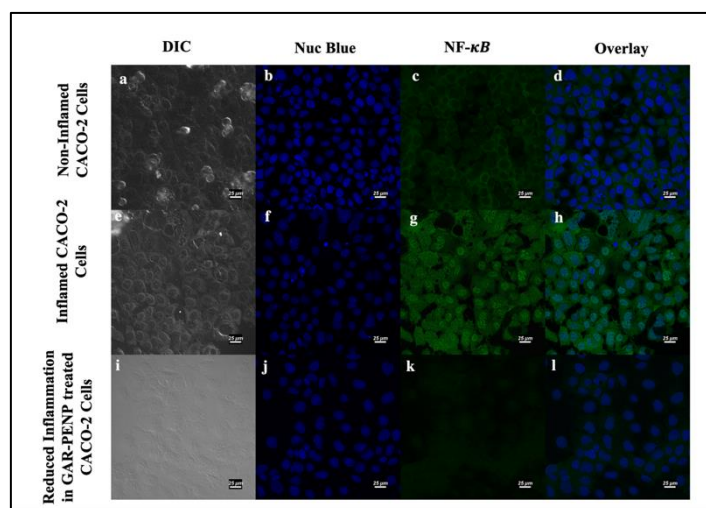


Figure 14: Induction and inhibition of NF- κ B in CACO-2 cells by confocal microscopy (at scale 25 μ m).

3. 今後の研究における課題または問題点

Challenges and problems on your research for the future

The initial challenge involved the further in vitro quercetin release from the NPs and bio-application of the quercetin pectin NPs. Due to its semi-crystalline nature, the NPs could not release the drug into the media to facilitate any cytotoxic effect on the CACO-2 cells compared to the free quercetin. Therefore, the necessity to focus on a better remedial direction in the given time constraints forced me to select a different drug, a suitable nanocarrier for IBD treatment applications.

In the first study the challenges involved the selection of the pectin since there are many sources like apple, citrus, potato commercially available. Also, when focusing on the DE the traditional types of classification needed to be understood and utilizing them based on the concentrations and the divalent cation for crosslinking was also important. Once the NPs were synthesized different characterization techniques were involved to conduct the comparative studies of the three types of citrus pectin chosen for the study. The biocompatibility studies needed to be conducted on normal cells that didn't possess any disease and also are very sensitive to their growing surroundings. In the case of the second study, the challenges that I had to face during the experiments involves the selection of the drug that has not been used in the oral delivery

nanocarriers for the treatment of IBD. GAR has been studied for its anti-cancer therapy in various cancer cell lines. But very little study has risen focusing on its application as anti-inflammatory agent especially through oral routes in IBD. GAR is a hydrophobic drug; therefore, it has limited aqueous solubility and bioavailability. Since PLGA is biocompatible biodegradable FDA approved polymer utilized for the encapsulation of many anti-cancer drugs, we hypothesized that it could be a suitable carrier for our chosen drug GAR. Next task was for improving the targeted delivery to the colon through oral routes. PLGA has the tendency to release the drug in acidic pH which was not our targeted site. Since the colonic pH is around ≥ 7 PLGA alone cannot suffice the job in hand. Therefore, we introduced the ES100 as a coating which is very pH-sensitive and only allow the releasing of the drug in the colon pH levels. To conduct the *in vitro* analyses the CACO-2 cells representing the colon cells were very crucial. For the induction of inflammation in CACO-2 cells, the right concentration of various pro-inflammatory cytokines like TNF- α , IL-1 β , IL-6 and LPS concentrations needed to be optimized. Finally, the cytotoxicity analysis was of very much importance because the main aim of our study involves the development of drug loaded nanocarriers that was used in reducing the inflammation rather than killing the cells.

Summary

The research work I have conducted involves the development of biodegradable and pH-sensitive NPs for the treatment of IBD through oral routes. The drug alone will not survive the harsh treatment in the GIT and fail to induce any anti-inflammatory effect at the targeted site which is the colon and also one of the last destinations throughout the GIT in the human body. The introduction of biodegradable and pH-sensitive nanocarriers implies here assuring the safe delivery and effective application of the hydrophobic drug at the targeted site.

Firstly, I developed a biodegradable nanoformulation with pectin that is also biocompatible, least toxic and low-cost production on large scale. We designed three types of pectin NPs based on their DE and conducted a comparative analysis among the three to find out which is the best suitable for drug delivery through oral routes. The method of preparation was done by ionotropic gelation

method where magnesium works as a divalent cation and forms an interlinking of the carboxylic group in the pectin by forming a salt bridge resulting the formation of the NPs. All the three NPs showed promising results and somewhat similar properties. All the three NPs were biocompatible with THP-1 cells and hence further studies also needs to be conducted in their application in drug delivery systems.

In the second study I focused on the importance of pH-sensitivity while targeting the colon ($\text{pH} \geq 7$) especially through oral routes for hydrophobic drug like GAR. We were able to release the drug from the NPs only at the specific pH 7.4 similar to the colon. The drug GAR has been studied for anti-cancer and anti-oxidant properties. However, very less study has come up on the utilization of GAR in targeting IBD. Hence, we have developed GAR-PENP that had improved aqueous solubility compared to the free drug and had an average size of 295 nm. With the pH-sensitive coating using ES100 the drug was released in a sustained manner particularly at the colonic pH. The LDH assay used in the study revealed that GAR-NPs were able to reduce the inflammation despite inducing inflammation into the CACO2 cells. Thus, demonstrating the potential of GAR-PENP in the IBD treatment.

平安期王権構造の総合的研究

Comprehensive research of Heian period royal right structure

研究代表者 上村 正裕

(文学研究科史学専攻／校友)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①王権構造 the Structure of Kingship

②太上天皇制 the Daijyo tenno (abdicated emperor) System

③皇后 the empress

④摂関政治 Regency Government

⑤後見 guardianship

2020 年度交付額／ 680,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・上村正裕「皇后の儒教的観念と権威一日中比較から考える一」、第 37 回東アジア后位比較史研究会、2020 年 7 月 27 日、オンライン (Webex)
- ・上村正裕「公卿の成立」、新古代史の会、2021 年 3 月 13 日、オンライン (Zoom)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

王権とは、天皇（王）の権力を円滑に発揮できるように構成された、太上天皇や皇后（皇太后）、皇太子など天皇をバックアップする存在をも含みこんだ権力体のことである。平安時代の王権を考える上で、摂関政治との関連は捨象することはできないが、清和太上天皇が譲位宣命において、藤原基経を摂政に任命したことが前期摂関政治では大きな意味を持つ。清和は幼帝の陽成天皇に代わり、基経の身分保障に関わることにのみ関与しており、清和の太上天皇としての後見機能の委託を行ったという背景があると思われる。

その後、摂関政治において画期となったのは、東三条院や上東門院の登場であった。天皇の母が天皇を後見するという母後の重要性は常々指摘されているところであるが、女院の国政関与は摂関政治を補完したとされており（古瀬奈津子「摂関政治成立の歴史的意義」『日本史研究』463、2001 年）、まさしく摂関政治の権力の源泉であったのである。

しかし、母後の権力を強調するあまり、女性の役割のみを重視するという風潮があることは否定できない。平安期王権研究には王権の多極構造という視点を十分に生かし切れていないと思われるのであり、本調査研究では男女の性差にかかわらず、王権の権力行使の実態がいかなっているかを総合的な視座で再検討するものである。

2. 研究経過および成果の概要

私は 2021 年 4 月に博士論文（『日本古代王権変質過程の研究』）を提出予定であるが、そこでは 7 世紀後半以降に確立する日本の古代国家の完成形態としての、律令体制下における王権構造の実態を探るというもので、8 世紀から 9 世紀への展開をたどったものであった。その考察により、8 世紀の天皇は

単独での権威が不十分で、太上天皇の後見や皇后・皇太后らの補佐を必要とし、合議機関である太政官も有能な官人を結集するという眼目により、平安時代の公卿ほど固定的なものではなく、流動的な様態であったことが明らかとなった。すなわち、様々な権力核によって国家運営がなされていたのが8世紀の王権のあり方なのであり、9世紀への展開のなかでそれらは解消されていくことになる。

本調査研究は、それより以後の時期にあたる10～11世紀を視野に入れた研究である。10世紀以降の王権構造を考える上で重要なのは、摂関政治の成立であると思われるが、この摂関政治は清和太上天皇が藤原基経を摂政に任命したことが歴史的画期となった。これにより、太上天皇は天皇の後見という8世紀以来の権能を放棄することとなり、王権構造に大きな変容をもたらした。それ以後、天皇の母である母后が天皇と内裏において同居し、外戚としての正統性を有する摂関政治の権力の源泉と評価されている（古瀬前掲論文）。

そうした側面を有していたことは確かであるが、服藤早苗「国母の政治文化」（同編著『平安朝の女性と政治文化』明石書店、2017年）、同『藤原彰子』（吉川弘文館、2019年）は、藤原氏内部に関わることをのみを決裁していたとする古瀬論文を批判し、藤原彰子などを題材に母后や女性の地位を強調する。

しかし、この解釈はまだ深める余地がある。例えば、『殿暦』永久2年（1114）12月27日条では、関白藤原忠実が官奏に上東門院彰子が関与した先例を持ち出しているが、服藤氏は摂関期には儀式的・観念的なものと化していたとはいえ、天皇にとって重要な官奏という政務に上東門院が関与していることを重視している。ただ、類例を9世紀の皇后・皇太后ないし母后から見いだすことはできない。『殿暦』の記事には年次の記載がなく、手がかりが少ないが、なぜこのような行為が可能であったのかという点については、史料的制約によって難しいところはあるが、説明を有する。

また、摂関期は様々な人事権の推薦といった様相が垣間見られるが、服藤氏は藤原信長（教通の子。彰子の甥）の蔵人頭任命が彰子の推薦により実現（『春記』長暦3年（1039）12月17日条。服藤氏は「女院が実質的最終決裁を行った事例」とする）しているのに対し、天皇の拒否によって実現しないケース（『春記』長久元年（1040）8月9日条）もあったとする。服藤氏がこうした事例を丹念に見つけて検討していることは重要であるが、全て女院が人事を決定したわけではないという位置づけにとどまることなく、母后・女院の人事権については、もう少し掘り下げる必要があると思われる。

したがって、これらの事例については、改めて当時の慣行や王権・摂関家内部の構造を踏まえて分析すべきものとする。王権分有の実態を示す史料を丹念に古記録類から「発見」していくことが、摂関期王権研究の有効性を探る第一歩となるだろう。それは母后だけでなく、太上天皇などの様々な王権の構成核についても同様である。こうした知見については、博士論文終章「八・九世紀王権構造の変質過程と政治史の展開」において示した。

3. 今後の研究における課題または問題点

本調査研究において、8世紀の王権構造が9世紀において変質し、それにより太上天皇や皇后・皇太后の地位が後退し、新たに母后という構成要素が登場したことが明らかとなった。一方で、王権構造の分析はひいては天皇権威の確立過程を素描することにつながるが、天皇そのものの検討を行うことはできなかった。

9世紀中盤以降、特に文徳天皇の段階になって儀式に天皇が出御しなくなったことは、大きな画期として認められる。そして、その契機は神谷正昌「九世紀の儀式と天皇」（『平安宮廷の儀式と天皇』同成社、2016年、初出1990年）が指摘しているように、文徳天皇が病弱であったという歴史的偶然であった。また、こうした病弱な文徳天皇即位と儀式への不出御・聴政への不参加といったあり方は、政務形

態のあり方にも変化をもたらした。川尻秋生「陣定の成立」(吉村武彦編『日本古代の国家と王権・社会』塙書房、2014 年)は陣定の起源を文徳朝に求め、その背景に文徳朝において、天皇抜きでも政務が滞りなく行えるよう「実験」を行い、その経験に基づいて幼帝が出現したとする。

天皇の変化に焦点を当てた興味深い指摘であるが、早川庄八「律令国家・王朝国家における天皇」(『天皇と古代国家』講談社学術文庫、2000 年、初出 1987 年)や川尻秋生『平安京遷都』(岩波新書、2011 年)によって 9 世紀における天皇の「機関化」といった点も指摘されており、天皇そのもののあり方をより深く検討していく必要があると思われる。それは今後の課題としておきたい。

Summary

“Royal authority” refers to a body of authority that allows the smooth exercise of the emperor’s authority and includes figures who support the emperor, such as the abdicated emperor, empress dowager, or crown prince. In April 2021, I intend to submit my doctoral thesis, “A Study on the Transformation Process of Royal Authority in Ancient Japan,” within which I will trace developments from the 8th to the 9th century by investigating the structure of royal authority supporting the emperor’s authority. I identify a fluid state of affairs in which the sole authority of the emperor was insufficient in the 8th century and required additional support, such as the assistance of the abdicated emperor, the empress, or empress dowager. In other words, royal authority in the 8th century was such that the state was administered through various power centers, which were then eliminated during the 9th century.

This study instead examines the 10th to 11th centuries, the period following this transformation. The establishment of regents is important in thinking about the structure of royal authority from the 10th century onwards, with the appointment of Fujiwara no Mototsune as regent by the abdicated emperor Seiwa marking the point of historical transition. The abdicated emperor thereby discarded the function of guardianship for the emperor, typical from the 8th century onward, significantly shifting the structure of royal authority. Subsequently, the emperor’s mother moved into the imperial palace as the empress dowager, which bestowed legitimacy and authority upon the regent, a maternal relative of the emperor.

However, although research in recent years has painstakingly “discovered” examples of the empress dowager and other royal women wielding political power, these investigations do not properly account for disparities in such actions, which are not seen at all among female royalty of the 9th century. This careful analysis of historical materials should likely be reattempted while taking then customary practices and the internal structure of royal authority and the regency into consideration. This is true not only for the empress dowager but also for the abdicated emperor and other structural centers of royal authority.

Furthermore, while it seems the emperor’s authority was established accompanying changes in the structure of royal authority, some point out that the “institutionalization” of the emperor began in the 9th century. The position of emperor itself remains a topic for future research, as it could not be examined in this study.

秋田地域の信仰圏と在地宗教者

Regional distribution of folk religion and activity of the local religious people in the Akita area

研究代表者 松野 聡子（校 友）

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①秋田地域	the Akita area
②修験道	<i>Shugendo</i> (the mountain ascetics)
③保呂羽山信仰圏	<i>Horoha-san-shinkoken</i> (the distribution of the faiths in Mt.Horoha)
④波宇志別神社	the <i>Hausiwake-jinja</i> Shrine
⑤承神隊	the <i>Shouzin-tai</i> army

2020 年度交付額／ 700,000 円

研究発表／学会および口頭発表

「幕末期承神隊の活動と保呂羽山信仰圏（仮）」で論文作成予定

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究は「秋田地域の信仰圏と在地宗教者」と題し、近世秋田の庶民信仰の地域分布（信仰圏）の様相とそれを担う在地宗教者（修験・神職）の動向、特に藩領域を越えたネットワークの実態と具体的な活動について検討する。具体的な研究方法は以下の通りである。

①近世秋田地域の庶民信仰の地域分布について、中近世移行期の秋田の政治状況を自治体史や「奥羽永慶軍記」などの文献史料から明らかにする。

②保呂羽山信仰圏の様相と波宇志別神社の運営状況について、自治体史や秋田県立博物館蔵「守屋家文書」の分析から明らかにする。

③慶応期、守屋造酒進が創設した「承神隊」の実態と活動について秋田県立博物館蔵「守屋家文書」の分析から明らかにする

2. 研究経過および成果の概要

上記の検討・分析による研究経過および成果について以下に列挙する。

①近世秋田地域の庶民信仰の地域分布について

秋田藩領である羽後地域には男鹿三山（真山・本山・寒風山もしくは毛無山）や大平山などの修験の道場となる霊山があり、独自の信仰圏を形成している。また秋田藩領の南域である雄勝平鹿地域、そ

して由利地域には保呂羽山、神室山、鳥海山、出羽三山の信仰圏も確認できる。羽後地域・由利地域の各信仰圏に共通しているのは修験の影響を強く受けているという点である。

中世期の秋田は様々な在地豪族が勢力を争い、群雄割拠の様相を呈していた。なかでも出羽北部と男鹿半島を所領とした秋田氏、雄勝・平鹿を所領とする小野寺氏は修験道への崇敬が深かった。そのことは、秋田氏が出羽三山と鳥海山を出羽国の鎮守と定めていたこと⁽¹⁾、小野寺氏と熊野御師との繋がり⁽²⁾からも明らかであろう。出羽三山や熊野の御師や修験者は在地豪族と師檀関係を結び、在地豪族の所領内で宗教活動を展開した。このため修験道の影響は庶民にも浸透していた。慶長7年(1602)、佐竹義宣が常陸国より秋田に移封され秋田藩が成立する。外様である佐竹氏にとって最初の課題は、庶民にも影響の深い修験者をいかに統治するかということであった。

なおこの課題は他藩においても同様であった。六郷氏も元和九年(1623)、最上氏の改易に伴い加増移封されたが、六郷氏の場合は初代藩主六郷政乗の父六郷道行が戦国期より出羽国山本郡六郷を支配しており、地域の状況をよく把握していた。そのため由利地方の豪族であった由利八郎維平と所縁のある常覚寺を代々触頭、藩主祈祷所に任じて、事ある毎に祈願を依頼するなど、積極的に修験を保護した。

(1) 戸部一閑齋著 今村義孝校注『奥羽永慶軍記(復刻版)』無明舎出版、2005年、148頁

(2) 『熊野那智大社文書 第一巻』続群書類従完成会、1977年、22頁

②保呂羽山信仰圏の様相と波宇志別神社の運営状況について

「保呂羽山信仰圏」は、羽後地域と由利地域の境、雄勝・平鹿・由利の三郡に跨がる保呂羽山を中心に形成された信仰圏である。既述の通り、秋田には多数の信仰圏が確認されているが、「保呂羽山信仰圏」は唯一、藩領域を越えてなお維持された。それは波宇志別神社の運営にも表れており、宮司である神職大友氏・守屋氏は、秋田藩の神職組織の頂点社家大頭を代々勤め、秋田藩内でも重要な地位を占めた。また亀田藩領の由利郡羽広村には、保呂羽山山頂の波宇志別神社へと続く参拝道があったため、波宇志別神社の神職遠藤和泉と保呂波山への参拝者の先達をつとめる修験慈苗坊はそれぞれ亀田藩に、社僧として神社の社務を取り仕切る別当は修験 極楽寺は矢島藩にそれぞれ属していた。波宇志別神社では神主大友・守屋両家の指揮の下、秋田藩・亀田藩・矢島藩の諸藩の神職・僧侶が藩域を超越して神事を勤めていたのである。こうした支配の錯綜状態は、元禄12年(1699)、江戸表を巻き込んだ秋田藩・亀田藩の境目諍論に発展する。紙幅の関係上、詳細は割愛するが、大友家・守屋家の居宅のある平鹿郡八澤木村と波宇志別神社は、保呂羽山は秋田藩であると主張、一方亀田藩と由利郡羽広村の村役人は保呂羽山を亀田藩領であると主張、結果として幕府は秋田藩側の主張を採用した。これは、波宇志別神社の宮司が秋田藩の神職を統制する社家大頭であったこと、平鹿郡八澤木村の大部分が秋田藩の蔵入地であったことが関係している。秋田藩が藩の勘定奉行椎名六郎左衛門と境目奉行岡三郎兵衛を江戸に遣わし、幕府に働きかけを行っていることから、秋田藩の境目諍論に対する執心が窺える。保呂羽山は信仰的にも政治的にも秋田の諸藩をつなぐ結節点であった。

《参考文献》

『本荘市史 通史編Ⅰ』本荘市、1994年／『本荘市史 通史編Ⅱ』本荘市、1994年／
『大森町郷土史』大森町 1981年／「羽陰史略 前編」(『秋田叢書 第1巻』秋田叢書刊行
会、1928年所収)

③「承神隊」の実態と活動について

幕末期、内憂外患の危機的状況を受け、各藩で諸身分・諸階層を巻き込んだ軍事動員が行われた。それは神職・僧侶・修験など在地宗教者も例外ではなく様々な理由を抱えながら軍事行動に身を投じていった。波宇志別神社神職守屋酒造進もその1人である。嘉永6年(1853)、守屋家は自家で経営していた宿屋で火事を出し、宿泊していた参拝客を死亡させるという事件を起こした。しかし当主の守屋勝貞はその事を藩に報告せず、その罪により、守屋家は近世以来代々勤めてきた社家大頭の職を解かれた。そこで酒造進は、没落した家の再興を目指して「承神隊」を結成し、藩が推し進める軍事動員に積極的に参加することで秋田藩への臣従を示した。「承神隊」に参加した神職たち約40名について詳細にみていくと、年齢は10代から30代の若者であり、多くは有力神社に奉仕する下社家やその次三男、奉仕する社を所有しない下級神職であった。彼らも酒造進同様、各自様々な事情を抱えており、軍事行動を通じて藩への臣従を誓い、自己利益を追求するために参加していたと考えられる。

3. 今後の研究における課題または問題点

①近世秋田地域の庶民信仰の地域分布について

近世の秋田地域に移封された新藩主らにとって、庶民にも影響の深い修験者をいかに統治するかが課題であった。亀田藩の修験統制策は秋田藩のものと類似している。これは藩主岩城氏の親類でもある佐竹氏が、藩政に一定度の影響力を持っていたことを示している(なお亀田藩の初代藩主岩城義隆はのちに佐竹義隆と改名し秋田藩の2代藩主に就任している。)しかし秋田藩とは異なり、亀田藩の歴代藩主と在地修験との親疎関係を示す史料は管見の限り見当たらない。このことについて佐藤久治は、岩城氏の前領主である赤尾津氏が真言宗寺院を多く建立し、城下にも真言宗寺院が多かったことなどが理由として挙げられている※が定かではない。今後の検討課題としたい。

※佐藤久治『秋田の密教寺院』秋田真宗研究会、1976年、頁

②「承神隊」の実態と活動について

在地宗教者は、藩領や地域社会で形成される関係のみならず、官途上京や遊学を通じて藩領域を越えるネットワークを形成していたと言われている。守屋家も平田国学を通じて築かれた全国規模のネットワークを有し、江戸や京の情報を得ていた。慶応4年(1868)1月、承神隊は藩命により庄内軍との戦闘のため出兵している。守屋造酒進の軍事行動に平田国学のネットワークが寄

与していたのか否か、また亀田藩や本荘藩など秋田地域の諸藩の神職や修験が関わっていたのか、本研究では秋田県立博物館蔵「守屋家文書」の閲覧、現地調査を通じて検討する予定であったが、コロナ禍によって現地への訪問をあきらめざるを得ず、明らかにできなかった点も多い。今後の課題としたい。

Summary

In this study explores the activities of the *Zaichi-syugen* (the local mountain ascetics) and Shinto priests, and the distribution of believers in the Akita area. The Akita area includes for the Akita Domain, Kameda, Yasima, Honjyo, Nikaho, Iwasaki Domain. Among them the Kameda and Honjyo Domain intricately linked Akita Domain.

The first, I will discuss the regional distribution of folk religion in Akita area. Starting ancient time there are numerous the *Reijo* (a place where a mountain ascetics practices asceticism in seeking spiritual enlightenment) in Akita area. For example, the *Reijo* is *Oga Sanzan* (Three Mountains of Oga), Mt.Taihei, Mt.Horoha, and Mt.Chokai or the like. *Shugendo* significantly contributed to the regional distribution of folk religion in Akita area.

From Muromachi period to Sengoku period, small feudal lords gained power in each region and were opposed to each other within Ugo Province. In this condition, feudal lords revered *Dewa Sanzan* (Three Mountains of Dewa) and Mt.Chokai as guardian gods, some of them worships the avatar of Buddha who is deified in three shrines in Kumano district. In Ogachi district, the Kumano faith spread because The Onodera clan (resident landholder) dedicated to build a temple to worship The Kumano Gongen deity. In 1602, Yoshinobu SATAKE was transferred from the Hitachi province to the Akita domain in the Ugo province. *Shugendo* is influenced people religiously, so it was important things for Satake clan to exercise control over the local mountain ascetics.

The governing local mountain ascetics was a common issue shared by Akita domain as well as by domains within Ugo Province. In 1623, the Rokugo clan gained more territories due to the Mogami clan being punished by being deprived of one's fief. They understood the folk beliefs from medieval Period in Akita area. A local mountain ascetics named "JYOKAKUZI" who has a lineal blood relationship with Korehira YURI (the local ruling families of Ugo Province during the Kamakura period) was appointed the *Furegashira* (a leader of local mountain ascetics) by Masanori ROKUGO (the first lord of Honjyo Domain). In addition, successive lords of the domain asked JYOKAKUZI whenever he needs to make a prayer or have a fortune-telling, they were also actively protected local mountain ascetics.

However, the Iwaki clan (the lord of Kameda Domain) displayed a negative attitude toward this movement. For Iwaki clan, Ugo Province was a land with no ties or ties, same as Satake clan. Furthermore, in the domains of the Kameda clan, there were many temples of the Shingon sect, that has been built by Akaozu clan (the membre of "Twelve Yuri" who was local ruling families of Ugo Province). Yoshitaka IWAKI (the first lord of Kameda Domain. After, He changed his name to Yoshitaka SATAKE assume the second lord of Akita Domain) considerate toward a former retainer in Akaozu clan they sought to serve as his vassals.

The second, explores the regional distribution of folk religion in Akita area, among them, this paper discusses the distribution of the faiths in Mt.Horoha called "Horoha-san-shinkoken".The distribution of the faiths in Mt.Horoha was stretching over three districts(Ogachi County, Hiraga County, Yuri County). Necessarily, between Akita Domain and domains within Ugo Province was disputing the territorial rights of the *Hausiwake-jinja* Shrine on the top of Mt.Horoha. Akita Domain especially fought to protect its the dominion of Mt.Horoha. Because, Mt.Horoha is forests for protecting the source of a stream for the directly-controlled fief of a feudal lord. Among the domains in Ugo Province, The Satake clan held influence in various fields at degree. And, in organization in the Edo bakufu, also they were predominant.

The third, examines the *Shouzin-tai* army formed by Mikinoshin MORIYA who was a Shinto priest of the *Haushiwake-jinja* Shrine. The end of Edo period, this country was facing a crisis of trouble both at home and abroad. The Tokugawa shogunate government and feudal lords encouraged to founded armed forces which had a transcend social class system for according to the conditions in each place. The religious people no exception to this trend, they were embroiled in civil war. They had to attend the war that was owing to circumstances beyond one's control, Mikinoshin MORIYA was one of them. The Moriya clan lost their position as the leader of local Shinto priests by misconduct themselves. He formed an army called "*Shouzin-tai*"for attempt to restore his clan's status. At the same time, it means of pledge one's allegiance loyalty to a feudal lord. "*Shouzin-tai*" consisted of young man between 10s and 30s who was mostly low-class Shinto priests. They also had a lot of problems and joined the army for serving themselves interests. January 1868, Akita Domain ordered to "*Shouzin-tai*" to participate in a battle with the Shonai Domains forces. The issue of the activity of "*Shouzin-tai*" members is the important problem related with the distribution of the faiths in Mt.Horoha. There is, therefore, a need to further examine this military movements and the relationship to Shinto priest domains within Ugo Province.

*Fusarium*属菌の生産するトリコテセンの新規配糖体の同定、 およびその食へのリスクの検証

Identification of novel glucosides of trichothecene produced by *Fusarium*
and verification of their dietary risks

研究代表者 松井 宏介(校友)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①*Fusarium graminearum*

②masked mycotoxin

③植物病原菌

④配糖体

2020 年度交付額／ 560,000 円

研究発表／学会および口頭発表

1. 武田博音、加瀬正浩、安藤華漣、松井宏介、木村 真、安藤直子「*Fusarium graminearum* 遺伝子破壊株への nivalenol 系トリコテセンの添加と糖抱合体生産の検証」日本マイコトキシン学会第 86 回学術講演会、Online 開催 (2021/1/8)
2. 松井宏介、武田博音、加瀬正浩、安藤華漣、中嶋祐一、安藤直子、木村 真「トリコテセン C-4 位の糖抱合に関わる UDP-glucosyltransferase 遺伝子の探索」日本マイコトキシン学会第 86 回学術講演会、Online 開催 (2021/1/8)

研究経過および成果の概要

糸状菌である *Fusarium* 属菌は重要穀類に感染することで赤カビ病を発症させ、二次代謝産物としてカビ毒トリコテセン類を生産する。トリコテセン類は生体内に取り込まれると重篤な中毒症状を引き起こすため、その防除は重要となる。*Fusarium* 属菌に感染された植物型のトリコテセン類の解毒機構として、トリコテセンに糖を結合させ、C-3 位配糖体となるケースがある。一方、*Fusarium* 属菌の解毒機構としては C-3 位アセチル化酵素である TRI101 による弱毒化が挙げられるが、本研究室では *Fusarium* 属菌自体における新たな弱毒化機構として C-4 位糖抱合が行われることを発見しており、その担当酵素は未だわかっていない。トリコテセン配糖体は通常の検出方法での発見が困難である上、生体内において加水分解され元のトリコテセンの毒性に戻ることもあるため、その精査は重要である。そこで本研究では、*F. graminearum* MAFF 111233 株の *Tri5* 遺伝子および *Tri101* 遺伝子破壊体 (*Fg Δ Tri5 Δ Tri101*) への feeding 実験においてトリコテセン配糖体の生産および解毒機構の検証を目的とした。トリコテセン骨格を形成する初酵素遺伝子である *Tri5* を破壊することで、自身はトリコテセンを生産しないものの、その他のトリコテセン生合成酵素は正常に働くため、feeding 実験に使用した。また TRI101 によってトリコテセン C-3 位をアセチル化することで弱毒化するため、この酵素遺伝子を破壊することで配糖体を獲得しやすくした。

1. 研究方法

本研究では C-3 位に修飾基のある HT-2 toxin および C-3 位アセチル基付加体を含む nivalenol (NIV) 系トリコテセン 5 種を基質として *Fg Δ Tri5 Δ Tri101* に添加し、配糖体の獲得を目指した。得られたトリコテセン配糖体を大量生産・精製を行い、NMR 解析による同定や MS/MS を取得した。さらに、動物細胞を用いた MTT assay により細胞毒性を評価した。また、過去に得られている trichodermol の C-4 位配糖体において、各 pH での加水分解の起こりやすさにより配糖体の安定性を確認した。

2. 研究経過および成果の概要

F. graminearum 二重遺伝子破壊株への HT-2 toxin 添加の結果、HT-2 toxin の C-4 位に糖抱合した配糖体である HT-2 toxin-4-glucoside (HT-2-glc) が得られた。Fg Δ *Tri5* への添加の結果では HT-2 toxin の C-3 位がアセチル化した 3-acetyl HT-2 toxin が得られていることから、*Tri101* 遺伝子破壊により TRI101 を発現できず、C-3 位アセチル化による弱毒化が働かずに代替機構として糖抱合が働いたと考えられる。HT-2-glc は大量生産・精製により、NMR による同定および動物細胞を用いた MTT assay による毒性評価を行った。その結果、アグリコンである HT-2 toxin よりもはるかに糖抱合体の方が細胞毒性が低いことが分かった。

また、C-3 位アセチル化体を含む NIV 系トリコテセン添加の結果、15-acetylNIV (15-ANIV) 添加からは 15-ANIV-4-glucoside (15-ANIV-glc)、NIV 添加からは NIV-4-glucoside (NIV-glc) が生産物として得られた。しかしながら、C-3 位アセチル基の付加した NIV 系トリコテセンである 3-acetyl NIV (3-ANIV) および 3,15-diacetyl NIV (3,15-diANIV)、3,4,15-triacetyl NIV 添加物からは C-3 位アセチル基付加の NIV 系配糖体は得られず、*F. graminearum* MAFF 111233 株の最終生産物が生産されていた。加えて、3-ANIV 添加からは NIV-glc および 15-ANIV-glc が、3,15-diANIV 添加からは 15-ANIV-glc がそれぞれ得られた。加えて Fg Δ *Tri5* への NIV 系トリコテセンの添加では、*F. graminearum* MAFF 111233 株の最終生産物である 4,15-diANIV および 4-ANIV が生産されており、生合成経路をたどっていた。以上のことから、C-3 位にアセチル基が付加している状態では C-4 位配糖体は得られにくく、糖抱合は TRI101 の代替的な第二の解毒機構として働くことが推察できた。NIV-glc および 15-ANIV-glc については大量生産・精製が難しく、NMR による同定ができていないため、本研究で得られた NIV の C-4 位糖抱合体であると推測される化合物は MS/MS パターンからの推測である。しかし、自然界には NIV の C-4 位糖抱合体と異性体の関係にある C-3 位糖抱合体である NIV-3-glucoside も存在しており、その MS/MS パターンは C-4 位 NIV 糖抱合体と酷似している。そこで LC-MS/MS を用い、溶出時間をずらすことを試み、新規ポンプメソッドにおいて溶出時間を 0.3 分ほどずらすことができた。よって、この配糖体は、既知の NIV-3-glucoside でないことが示唆された。HT-2 toxin 添加実験においても C-4 位配糖体は得られていたこともあり、得られた NIV 配糖体は C-4 位配糖体であると推測できる。

トリコテセン配糖体の安定性について、trichodermol を各 pH にて反応させた。その結果、低い pH では、トリコテセン骨格を失ったものの、C-4 位配糖体はそのままである 2,4,12-trihydroxyapotriconothecene が生産された。このことから、グルコシド結合は非常に安定であることが示唆された。この物質の毒性もまた、trichodermol より遙かに低かった。

3. 今後の研究における課題または問題点

今後の研究として、本研究で得られた NIV 系配糖体の大量生産および精製を行い、構造同定や MS/MS データの入手が挙げられる。アセトニトリルを用いて抽出し、逆相クロマトグラフィーにおいて精製を行うが、トリコテセン配糖体は集まりにくいいため、効率的な生産・精製を目指す必要がある。また、糖抱合を行う担当酵素について研究を始めており、その検証が必須と考える。さらに、配糖体の安定性や動物細胞における生理活性についてなど検証を行うことで、トリコテセンによる食の安全性を守ることができよう。

Summary

Fusarium graminearum, an infamous filamentous fungus, causes Fusarium head blight by infecting important cereals and produces trichothecene mycotoxins as secondary metabolites. Trichothecenes cause serious symptoms, such as alimentary toxic aleukia (ATA), diarrhea, vomiting, etc., when human and livestock are exposed to them, so their control is important in both agriculture and public health. When plants are exposed to them, they form glucoside conjugation with trichothecene at C-3 position in order to reduce its toxicity by increasing hydrophilicity of toxins. In contrast, fusaria detoxify trichothecenes by TRI101, a 3-*O*-transacetylase. However, in our laboratory, we found out that fusaria have an alternative detoxifying mechanism, glucoside conjugation with trichothecene at C-4 position. Hence, close examination is important, because trichothecene glucosides are difficult to detect by conventional detection methods and can be hydrolyzed *in vivo* to release its aglycon, resulting in recovery of the toxicity of original trichothecene. Therefore, the purpose of this study was to verify detoxification mechanisms of trichothecene, acetylation at C-3 position and glucosylation at C-4 position, and we performed feeding experiment of *Fusarium*-type trichothecenes to *F. graminearum* MAFF 111233 gene-deletion mutants, Fg Δ Tri5 or Fg Δ Tri5 Δ Tri101.

As a result of using HT-2 toxin as a substrate for Fg Δ Tri5, 3-acetyl HT-2 toxin was produced. However, when HT-2 toxin was fed to Fg Δ Tri5 Δ Tri101, HT-2 toxin-4-*O*-glucoside, which is a glucoside conjugate at C-4 position of HT-2 toxin, was obtained. The structural identification was performed by NMR. It is considered that TRI101 could not be expressed due to the disruption of the *Tri101* gene, and the attenuation of trichothecene toxicity by C-3 acetylation did not work, and glucoside conjugation worked as an alternative mechanism. The results of feeding of NIV-type trichothecenes were follows; 15-ANIV-glucoside was produced by feeding 15-ANIV, and NIV-glucoside was produced by feeding NIV. However, by feeding 3-ANIV, 3,15-diANIV, or 3,4,15-triacetyl NIV, glucoside conjugates with acetyl group at C-3 position of NIV-type trichothecenes were not obtained: NIV-glucoside and by feeding 3-ANIV, 15-ANIV-glucoside were produced while by feeding 3,15-diANIV, 15-ANIV-glc was obtained. Therefore, it can be inferred that glucoside conjugation at C-4 position and acetylation at C-3 position hardly occur simultaneously. It was also highly likely that C-3 acetylation by TRI101 is more dominant detoxification mechanism than C-4 glucoside conjugation.

精神障害者の A C T における家族支援に関する研究

－経年に渡る家族からの聞き取り調査から－

A study on family support in the ACT for mental illness

－From interviews with family members over the years－

研究代表者 佐川まこと（校友）

I. 研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

II. キーワード

- ① 関わり続ける Stay involved
- ② 多職種自己完結型 Multi-professional, self-contained
- ③ フラット Flat
- ④ 一緒に信じる Keep believing together

III. 2020 年度交付額 560,000 円

IV. 研究発表

- ・日本精神保健福祉学会誌『精神保健福祉学』に 2021 年 9 月に投稿予定。

V. 研究経過および成果の概要

1. 研究方法

研究目的は A C T 利用家族を時系列に調査し、当事者、家族、A C T の 3 者の関係と家族の心的態度が 7 年の経過でどのように変化したのか、またその変化の構造的要因を明らかにすることである。研究方法は、質的データ分析法で事例-コードマトリックス方式を採用。調査-I として A C T 利用家族 6 名と A C T を利用しない家族 4 名に調査、結果 A C T 利用家族 2 名と A C T を利用しない家族 1 名のインタビューと A C T を利用しない家族の 1 名のアンケート調査となった。調査-II として 3 つの A C T のスタッフに調査、結果 7 名のインタビューと 2 名のアンケートとなった。調査期間は 2020 年 11 月から 2021 年 2 月。

倫理的配慮については、本研究の調査実施は東洋大学大学院福祉社会デザイン研究科研究等倫理審査委員会の承認を得て実施した。

2. 研究経過および成果の概要

今回は筆者の博士論文「精神障害者の家族に関する研究（佐川 2019 年）」を踏まえての 3 回目の調査である。調査 I では第 1 回、2 回と同様に 6 のカテゴリー、【当事者の生活】、【当事者と ACT の関係】、【家族と ACT の関係】、【家族と当事者の関係】、【家族の社会的関係】、【家族の心的態度】に沿って行われた。この 6 つのカテゴリーから抽出した焦点的コードを基に、A C T 利用家族と

ACTを利用しない家族の第3回までの時系列変化と両グループの比較分析を行い、家族と当事者と支援者の3者の関係と家族の心的変化を分析した。結果は次の通りである。

第1にACT利用家族についてその当事者6名のうち2名はACTを卒業、2名は症状が安定、落ち着いた生活、1名は介護サービスへ移行、1名は腎臓病で入院となり、6名中4名の当事者は自立を始めていた。家族の心的態度では6名の全家族がACTと信頼関係を築き安心の心境を伝えており、心的態度においてプラスの変化を示していた。

第2にACTを利用しない家族についてその当事者4名中1名は作業所に通い、1名は引きこもりだが症状は安定し、親との意思疎通は可能で通院していた。他2名のうち1名は2年前に死亡、1名は父親死亡、母親難病となり連絡が取れず調査不可能であった。家族の心的態度では2名がサービス機関と長期に繋がり、精神的には落ち着いていた。

第3にACT利用家族とACTを利用しない家族の比較では、当事者の症状の安定、自立の点ではACT利用家族は約7割がクリアー、ACTを利用しない家族は5割であった。

家族の心的態度の点では、ACT利用家族は全員がACTと強い信頼関係にあり、ACTを利用しない家族は2名、5割の家族が精神的には落ち着いていた。この7年の両グループの歩み比較すると明らかにACT利用家族の方がACTを利用しない家族よりも当事者の自立、症状の安定、家族の心的態度において優位性を示していた。

調査Ⅱでは目的として調査Ⅰの結果であるACT利用家族の心的変化のプラス要因を明らかにすることである。調査、分析に結果6つの大カテゴリから25のカテゴリが生成された。このカテゴリからACT利用家族の心的態度変化のプラス要因に関係すると思われるカテゴリを抽出し、その相互の関係を分析した。結果は次の通りである。

第1に支援の基本は信頼関係である。ACTのスタッフは信頼がなければ嵐の最中に立てないと答えている。そこでは経験や知識による権威ではなく、1人の人と人との関係が求められる。その信頼関係に必要な条件として【多職種・自己完結型】、【期間限定せず丁寧な対応】、【生活全体を見る】、【安心して話せるフラットな関係】が有効な要因であることが検証された。

第2点に人との関わることで信頼関係が生まれるが、これで直ちに問題が解決するわけではない。なぜなら必要なサービスを利用するには【本人の理解と納得】が必要であるが、その前提となる当事者自身が【自分からサービスを求める】ことが殆どないからである。そのため自立生活へ繋がるには時間が必要となる。ACTは長い実践から【家族とぶつかり合いながらも長い関わりの中で学ぶ】ことの重要性を上げている。

第3点に当事者の自立と家族がACTと信頼と安心の関係を築くには、ACTが当事者、家族と関り続けることが不可欠である。そして、親自身の当事者が自立出来るという気持ちをACTが持ち続けることが出来るのは、【人は変わる】ことをACTが実践で学んだからである。

今回の調査ではACTが当事者、家族との【長い関わりの中で当事者に力があることを家族一緒に信じ続ける】ことが、当事者の自立に繋がり、またACT利用家族の心的態度変化のプラス要因であることが示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

今回の結論は調査対象がACT利用家族6人とACTを利用しない家族4人となったが、今後

はより多くの ACT を利用する家族、しない家族を比較調査し、ACT の生活支援の有効的実例を当事者、家族に分かりやすく伝えていくことが求められている。また ACT が日本に誕生して約 20 年、現在全国で約 20 ヶ所展開されている。Q-ACT など積極的に拡大に取り組んでいる ACT もあるが全体としては拡大の歩みは遅く、今後の拡大・展開の情報共有も不十分であり、課題解決への道も明確ではない。今後は ACT を日本社会でどのように拡大し、地域連携を進めていくのか、20 年の ACT 実践を振り返り、その具体的解決策を明らかにしていくことが求められている。

Summary

To 6 families who use ACT and 4 families who do not use ACT for the purpose of clarifying the relationship between the family using ACT, the person concerned, and ACT and the change in the mental attitude of the family. We conducted a survey for 7 years. I conducted three interviews and one questionnaire with my family. We interviewed 7 staff members and conducted 2 questionnaires. The research method was a qualitative analysis method.

Survey I: We surveyed families who use ACT and families who do not use ACT.

We investigated and analyzed according to 6 categories. There are 6 family members using ACT. Two of them completed the ACT program, two were calm, and about 70% were on their own. All six families had a relationship of trust and security with ACT. On the other hand, the two family members who did not use ACT were mentally stable. One died two years ago and one could not be contacted. 50% of the parties were stable. The two families were connected to the service organization, and 50% were calm. As a result, the family using ACT was superior to the family not using ACT in the independence of the parties and the mental attitude of the family.

Survey II A survey was conducted to clarify the factors of changes in family mental attitudes that were clarified in Survey 1. Twenty-five categories were generated and analyzed.

First, the basis of support is trust. There is a need for a person-to-person relationship. It was verified that [multi-occupation / self-contained type], [careful response without a limited period], [viewing the whole life], and [flat relationship] are effective as conditions necessary for the relationship of trust.

Secondly, it is difficult for the parties to connect to the service because it is premised on [understanding and convincing of the person], or the parties rarely request the service from themselves. It became clear that it is important for ACT to learn through long-term relationships with the parties, their families, and sometimes colliding with their families.

Third, it became clear that ACT [continuing to believe with the family that the parties have power in a long relationship] was a factor that brought about a positive change in the mental attitude of the family. The long relationship also worked as a positive factor for families who did not use ACT.

地方公営企業法の改正と公営企業の効率性改善について

Improving Efficiency in Public Firms and Amending the Local Public Enterprises Act: Empirical Insights Using Individual Data

研究分担者 佐々木 啓介（経済学部経済学科）

研究期間／2020年6月25日～2021年3月15日

キーワード／①傾向スコアマッチング法 Propensity Score Matching (PSM)

②包絡分析法 Data Envelopment Analysis (DEA)

③確率的フロンティア分析法 Stochastic Frontier Analysis (SFC)

④地方公営企業法 Local Public Enterprise Act

⑤水供給事業 Water Supply Management

2020年度交付額／ 48,1000 円

研究発表／学会および口頭発表

「Propensity Score Matching and the Estimation of Efficiency Improvements in Public Firms: Amendments to the Local Public Enterprises Act and Empirical Insights Using Individual Data」
The 57th Annual Conference of the Japan Section of the Regional Science Association International, 2020. (和文タイトル「PS マッチングと地方公営企業の効率性分析－地方公営企業法の改正と効率性改善の因果関係について－」)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究の実証分析の実施に際して、計量的評価スキームは2つのスキーム、＜Scheme 1-1、1-2＞、＜Scheme 2＞から構成されている。

＜Scheme 1-1＞地方公営企業による各事業の効率性の測定：生産組織の効率性の定義は多種あるが、本研究においては効率性測定において最も標準的な“技術的効率性”を取り扱う。また効率性の測定手法は大きく2つに分類され、経営科学分野のオペレーションズリサーチにおける線形計画法の応用として発展した包絡分析法（DEA: data envelopment analysis）と、経済科学分野の計量経済学領域において発展した確率的フロンティア分析法（SFC: stochastic frontier analysis）が代表的な測定手法とされている。また各々には異なる長所と短所があり、本研究ではノンパラメトリック指標の包絡分析法（DEA）ならびにパラメトリック指標の確率的フロンティア分析法（SFC）を用いるが、最初のステップとして DEA のパラメトリック指標を利用する。DEA は、多数派よりも少数派の改善方法を選択すると SFC と比較して効率性が高く測定される傾向があり、誤差項がないために測定誤差が考慮されない等の短所もある。また DEA を用いる際には、①規模に関して収穫一定を仮定した「CRS モデル」と、②規模に関して収穫可変（本研究では逓減）を仮定した「VRS モデル」の2つの生産関数モデルを設定する。③さらに一定の生産量を達成するための投入量が少ないほど技術的効率性が高いと仮定する「投入指向（input-oriented）モデル」、④そして一定の投入量の下で生産量が大きいほど技術的効率性が高いと

仮定する「産出指向 (output-oriented) モデル」の 2 つを仮定する。そして、これらの仮定を組み合わせた各モデル (例えば「投入指向型 VRS モデル」など) について地方公営企業の効率性を測定する。

<Scheme 1-2>本研究は、これまで施行された諸政策から「地方公営企業法の改正」、特に“改正による会計基準の見直しの適用”に重点を置く。法改正の事例として総務省の発表をあげる。「地方公営企業会計基準の見直しのため、平成 23 年度に地方公営企業法施行令等を改正し、その改正内容が平成 26 年度予算から適用となった。本年度は最初適用事業年度の決算となり、この見直しが大きく決算に影響を与えている：2015 年度 (H27 年 9 月 30 日)」この改正と適用の具体的な内訳は、①借入れ資本金制度の廃止・引当金義務付け・繰延勘定の廃止、②みなし償却制度廃止・資産の評価、③減損会計導入・リース会計導入、④キャッシュフロー計算書の導入・勘定科目等の見直し等である。

<Scheme 2>前段の [Scheme 1] において測定された公営事業の CRS モデルならびに VRS モデルから得られた効率性データと、上で述べた地方公営企業法の適用改正 (具体的には会計基準の改正等) との因果関係について、準ランダム化試験における代表的分析手法、①傾向スコアマッチング法 (PSM: propensity score matching)、②IPTW 法 (inverse probability of treatment weighting)、③回帰分断デザイン (RDD: regression discontinuity design) 等を用いて実証分析を行う。さらに、既に実施された、差分の差分法 (D-in-D: difference in differences) を用いた Sasaki(2019)の結果も合わせて法改正との因果関係を考察する。

2. 研究経過および成果の概要

本研究では、公営企業が運営する 16 区分からなる事業の中から幾つかの事業を採り上げて効率性を測定する際に、ノンパラメトリック指標として定義できる包絡分析法 (DEA: data envelopment analysis) を用いた。この測定から得られた公営事業の効率性と地方公営企業法改正 (例えば会計基準改正) の適用との因果関係について傾向スコアマッチング (PSM) を用いて分析が加えられた。DID 分析を採用した Sasaki(2019)では有意な影響が認められなかったが、本研究の分析では地方公営企業法の改正が公営企業の効率性改善に寄与していることが示されており、Sasaki (2019)とは異なる結果となっている。

3. 今後の研究における課題または問題点

今後は、実施されている公的な諸施策と<Scheme 1>において計測された効率性との因果関係の有無とその程度を明らかにし、さらに地方公営企業の効率性改善のための諸施策の有効性と地域特性との関連性を明らかにしたい。例えば、ある年度に施行された地方公営企業法の改正は地域 A には有効であるが、地域 B には無効であり、「地域特性を十分考慮したキメの細かい施策が必要」等の具体的な政策提言を試みる予定である。

<Summary>

Improving Efficiency in Public Firms and Amending the Local Public Enterprises Act: Empirical Insights Using Individual Data

(1) Outline of research

The quantitative evaluation scheme in this empirical study consists of two schemes, <Scheme 1-1 and 1-2> and <Scheme 2>.

<Scheme 1-1> This study deals with the most standard "technical efficiency," and typical measurement methods; the data envelopment analysis (DEA), which was developed as an application of linear programming, and the stochastic frontier analysis (SFC), which was developed in the field of econometrics.

<Scheme 1-2> This research focuses on the amendment of the Local Public Enterprise Act. As an example of law revision, we will deal with "amendments of accounting standards for local public enterprises" by the Ministry of Internal Affairs and Communications.

<Scheme 2> (1) Efficiency data obtained from the CRS model and the VRS model and (2) the revision of the Local Public Enterprise Act (specifically, accounting). The causal relationship between (1) and (2) will be empirically analyzed using the typical method in the quasi-randomized test; (i) PSM (propensity score matching), (ii) IPTW (inverse probability of treatment weighting), (iii) RDD (regression discontinuity design), and so on.

(2) Research results

【 Research presentation 】 “Propensity Score Matching and the Estimation of Efficiency Improvements in Public Firms: Amendments to the Local Public Enterprises Act and Empirical Insights Using Individual Data,” The 57th Annual Conference of the Japan Section of the Regional Science Association International, 2020.

【Abstract】 The present investigation considers an empirical scheme to analyze the efficiency of local public firms. Here local public firm's utility is defined as “the sum total of the water supply.” In the context of the propensity score matching (PSM), we discuss empirically whether the amendments to the law improved the efficiency of public firms. The analysis in this paper shows positive results, which are different from the negative results in Sasaki (2019). The conclusion of that paper was that the amendments of the Local Public Enterprise Act did not generate a significantly better deal of water supply.

(3) Issues in subsequent research

The effectiveness of various measures for improving the efficiency of public enterprises will be clarified by investigating the existence of a causality between the public measures and the efficiency measured in <Scheme 1>. Furthermore, I would like to discuss the relationship between the public measures and regional characteristics. For example, an amendment to the Local Public Enterprise Act may be valid for Region A but invalid for Region B. Therefore, the subsequent research will be planned to provide the policy proposals such as “detailed measures” that fully consider regional characteristics.

デジタル経済を想定した場合の課税所得計算

The Concept of Taxable Income in Digitalisation of the Economy

研究代表者 金子 友裕(経営学部会計ファイナンス学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①課税所得計算

②デジタル経済

③税務会計

④デジタル企業

⑤所得概念

2020 年度交付額／ 276,000 円

研究発表／学会および口頭発表

研究会（税務会計検討会）（2020 年 9 月 2 日、Zoom）で発表

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

理論研究

2. 研究経過および成果の概要

本研究の成果は、研究会（税務会計検討会、2020 年 9 月 2 日、Zoom）で発表した。そして、この議論を踏まえ、原稿として整理し、金子友裕編著（共著者 9 人）『課税所得計算の形成と展開』（本研究成果は、最終章（16 章）「デジタル経済における課税所得計算」）として取りまとめた。なお、この書籍は、中央経済社から 2021 年中に出版する予定となっている。

なお、本原稿の目次は、次のようになっている。

I はじめに

II デジタル経済における課税の議論

1. デジタル企業をめぐる各国の対立
2. デジタル経済における課税のこれまでの議論の経緯
3. 2019 年以降のデジタル経済における課税

III デジタル経済において検討すべき課税所得計算

1. デジタル経済における引渡しの概念の位置付け
2. デジタル経済における費用の認識
3. デジタル企業への課税方式として売上高課税採用の意義

IV おわりに

そして、本研究成果の概要は次のとおりである。

近年、ICT（Information and Communication Technology、情報通信技術）の発達により、経済のデジタル化が進展している。例えば、「令和 2 年度税制改正大綱」では、「デジタル技術は経済活動の隅々

まで浸透しつつあり、『経済のデジタル化』が急速に進展している。このような時代の変化に対し、モノを中心とした産業時代に形成された国際課税原則、すなわち『恒久的施設（PE：Permanent Establishment）なければ課税なし』や『独立企業原則』が適切に機能しないといった問題が顕在化している」（8頁）と指摘される。

このように税制改正においても重要視される経済のデジタル化であるが、経済のデジタル化に関する近年の議論に関しては、いくつかの特徴を有しているように思われる。つまり、国際課税との関連で議論されることが多いことや、GAFA（グーグル、アップル、フェイスブック、アマゾン）やGAFAM（GAFAにマイクロソフトを加えたもの）と呼ばれるデジタル企業に対する課税と関連した政治的な配慮がなされた議論になりやすいこと、等が挙げられる。

特に、デジタル企業に対する課税に関しては、OECDによる議論について、「元々はデジタルの課税ということで、典型的にはGAFAですが、それらをターゲットにしていたイギリス案というのがありました」（南（2020）335頁）等と説明されるように、GAFA等のデジタル企業に対する課税の問題として取り上げられる場合がある。しかし、GAFAを擁するアメリカがデジタル企業に対する課税を牽制する動きもあり、この配慮からデジタル企業に限定されない議論とするためにOECDの文書でも「経済のデジタル化（Digitalisation of the Economy）」と表記する等、政治的配慮が生じている。

デジタル化した経済における課税所得計算のあり方の検討を行うことを目的とする。ここでは、デジタル企業に対する課税に限定せず、デジタル化した経済を前提とした課税を議論とするため、「デジタル経済」という表記によることとする。

そして、近年OECD等でデジタル経済に対する議論が急速に展開されている。このため、本研究では、OECDの現在までの議論を概説したうえで、この議論も踏まえデジタル経済における課税所得計算のあり方を検討することとした。

デジタル経済における課税の検討は、これまで消費税等で行われていたが、課税所得計算も関わる議論は始まったばかりである。ここでは、国家管轄権やデジタル企業を擁する国家の思惑等もあり、高度に政治的な議論となりやすいものと思われる。ただし、今後の課税所得計算のあり方を考えるのであれば、課税所得計算の意義やデジタル経済の特徴を検討することで、どのような課税がありうべきものであるかを検討する必要がある。

なお、原稿執筆時においてOECDの議論の結果が明確にはなっていなかったため、OECDの議論の整理を踏まえた理念的な検討を試みた。ここでは、デジタル経済に対する課税として本来どうあるべきかについて視点（デジタル経済における引渡し概念の位置付け、デジタル経済における費用の認識、デジタル企業への課税方式として売上高課税採用の意義）で検討を行った。

3. 今後の研究における課題または問題点

デジタル経済における課税のあり方は、国際税務に関する理論的なあり方だけではなく、ICT技術の発展や国際的な情勢等の多様な要素に変化していくものと思われる。今後の研究は、このような変化を捉えつつ、課税所得のあるべき姿等を探求していく必要がある。

少なくとも、今後、課税所得の概念は従来と同様に取り扱うことが困難になることが予想されるが、課税所得に代替する課税対象は何が適切であるか、この課税対象で国際的な理解は得られるのか、等につき、理論的な検討を重ねていくことが非常に重要である。

Summary

The digital economy (e.g., GAFA: Google, Apple, Facebook, Amazon) make huge revenue in many countries, but they pay a little tax because the income of digital economy can't be recognized in each country and there is no PE (Permanent Establishment) in each countries.

The tax challenges of the digitalisation of the economy were identified as one of the main areas of focus of the OECD/G20 Base Erosion and Profit Shifting (BEPS) Project, leading to the 2015 BEPS Action 1 Report. The Action 1 Report found that the whole economy was digitalising and, as a result, it would be difficult, if not impossible, to ring-fence the digital economy. (see, OECD (2019), "Programme of Work to Develop a Consensus Solution to the Tax Challenges Arising from the Digitalisation of the Economy")

OECD made the proposals about digital taxation, but USA (GAFA are in USA) denied the proposals. The international politics has affected on the international taxation.

And this study examined that the concept of taxable income will change in the digitalisation of the economy.

It will change the concept of "delivery" in the digitalisation of the economy. The concept of "delivery" is the important concept of recognition on taxation. But we can't recognize the shipment of data. And data can be duplicated, so it's not used as a criterion of transfer.

In addition, the duplicatable of data derive the expense recognition problem. Taxable income is calculating by deducting expense form revenue, because the calculating is means to enable reproduction. If data can be duplicated, there is no reason to deduct it.

It is difficult to capture the income of digital economy, but revenue (or sales) is relatively easy to capture in each country. This idea includes the OECD's proposals. However, it is no longer income taxation, but size-based taxation. If revenue is used on income taxation, it is an indicator of the allocation of income. It is hard to reach a consensus as properly allocation of income on tax jurisdiction.

社会的マイノリティにおけるメンタルヘルスとセーフティネット構築に関する研究

Research on mental health and safety net construction in social minorities

研究代表者 井沢 泰樹(社会学部社会文化システム学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①マイノリティ Minority

②在日外国人 Foreigners living in Japan

③在日コリアン Korean in Japan

④メンタルヘルス Mental health

⑤精神障害 Mental disorder

2020 年度交付額／525,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・論文（査読付き）‘Compound Discrimination and Mental Disorder in Korean women in Japan : Based on an interview with a Korean welfare worker’『応用社会学研究』第 63 号、立教大学社会学部、2021 年 3 月
- ・シンポジウム「外国にルーツを持つ若者の大学進学に対する支援」（2020 年 12 月 13 日開催）報告書（2021 年 4 月初旬発刊予定）
- ・学会発表「在日コリアン女性における複合差別と精神障害・自殺問題について」第 27 回多文化間精神医学会学術総会、2020 年 11 月
- ・学会発表「在日外国人における自殺問題の現状と課題—在日コリアンを中心として」第 40 回日本社会精神医学会、2021 年 3 月

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究において「社会的マイノリティ」とは、人種・民族、ジェンダー、性自認、性的指向、出身地、障がいの有無などにおいて社会的に少数者の立場にあり、また社会的に差別や蔑視などをうける立場にある人びとを指している。一般的に社会的マイノリティは、そうではない人たちよりもストレスを受けやすく、それに起因して精神障害を発症し、ひいては自殺に至ってしまう確率が高いことが知られている。日本における在日外国人・エスニック集団である在日コリアンも例外ではない。本研究では実証的調査をとおして、彼/彼女らがうけているストレス、精神障害、自殺問題の実像を明らかにし、そのメンタルヘルス・セーフティネット・システムの構築をめざして基礎研究をおこなった。

研究方法として、在日コリアンに関する文献をレビューし、アイデンティティをめぐる葛藤や差別体験とメンタルヘルスとの関連について整理をした。また在日コリアン集住地区においてライフヒストリーを中心としたメンタルヘルスに焦点を合わせた聞き取り調査をおこなった。特に今回は、在日コリアンの中でもよりマイノリティの位置におかれてきた女性に焦点をあて、在日コリアン女性がうける複合差別の現状と影響について明らかにした。

また今回は、2020 年 12 月に開催されたシンポジウム「外国にルーツを持つ若者の大学進学に対する支援」を共催した。在日外国人の子ども若者の学力と学歴の低位性ということが社会問題となっている。そのことが社会階層の低さを生み、それが世代を越えて継承される再生産構造が問題となっている。こうした状況が起因して、在日外国人がアルコール依存症に陥ったり、その他の精神障害に罹患する傾向の高さも指摘されている。在日外国人および外国ルーツの子どもたちの就学支援をおこなうことは、彼/彼女たちの健全な精神心理的発育のためには必須である。シンポジウムでは各界の教育関係者から現状・課題・展望について提起がなされ、たいへん意義深い機会となった。

2. 研究経過および成果の概要

今年度はとくに在日コリアン女性の複合差別と影響について実証的研究をおこなった。その研究成果をもとに英語論文 Compound Discrimination and Mental Disorder in Korean women in Japan : Based on an interview with a Korean welfare worker' を作成して、立教大学社会学部から発刊されている『応用社会学研究』第 63 号（査読付き 2021 年 4 月発刊予定）に公表した。また同様の内容を、第 27 回多文化間精神医学会学術総会（2020 年 11 月）にて「在日コリアン女性における複合差別と精神障害・自殺問題について」の題目で発表するとともに、第 40 回日本社会精神医学会（2021 年 3 月）にて「在日外国人における自殺問題の現状と課題—在日コリアンを中心として」を発表した。また、先の説明にあるようにシンポジウム「外国にルーツを持つ若者の大学進学に対する支援」（2020 年 12 月 13 日開催）を共催し、その報告書を発刊予定である（2021 年 4 月初旬発刊予定）。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究における課題は、この研究成果からいかに実践的な取り組みにそれを結びつけるかということである。そこで今年度の研究から明らかとなり、今後求められる実践についてまとめる。

① 「在日」のためのメンタルヘルス・ピアサポート

「ピアサポート」は「同じような立場の人によるサポート」である。一般的に、抱える問題のマイノリティ性が高いほど、当事者は「普段はなかなか口にできない」悩みに苦しんでいるわけであり、その点においてピアサポートは課題解決の大きな力となり得ると考えられている。これは「在日」だけではないであろうが、女性には女性の、男性には男性の、そしてセクシュアルマイノリティにはセクシュアルマイノリティの、またその他、さまざまな立場にある人々にはその人たち独自の苦悩があり、それぞれの生きていく戦略が必要だとおもわれる。「在日」であり、かつそれぞれの立場の人たちが独自に集い語りあうピアサポート活動が必要である。

② 「在日」のための「いのちの電話」

日本社会には国、自治体、民間団体などがおこなう「いのちの電話」がある。しかしそうした窓口でも、「在日」には「在日」ゆえの悩みがあり、日本社会にあるさまざまな相談窓口がかならずしもそのニーズを満たしていない場合も多い。「在日」を対象とした「いのちの電話」（あるいは E メールなど）が必要である。

③ 「在日」自死遺族の会

先に示したように、日本の韓国・朝鮮籍者（また朝鮮半島にルーツを持つ「在日」）の自殺死亡率は高い。ということは自死遺族や、自死で友人知人を失くされた方も多いということである。日本社会には自死遺族会があるように、「在日」のための自死遺族会、あるいは友人知人を失くされた方たちのグリーフケアをおこなう場が必要である。

④ 「在日フレンドリーな精神科医・支援職」をふやすための啓発・研修活動

マイノリティの医療やカウンセリングにおける問題のひとつに「臨床的・バイアス」(Clinical Bias)がある。クライアントが所属するマイノリティ集団に対して医師やカウンセラー、あるいはさまざまな支援職の人々が抱くステレオタイプ的な見方により生じる臨床的判断や態度の歪みのことである。

日本社会には「在日」に対する蔑視感や差別意識が根強く存在する。それは医療者やカウンセラー、支援職の人々も例外とはいえない。支援を必要とする「在日」が訪れた機関が、自身の存在に対して否定的な見方をもつ人々であつたとしたらどうであろうか。そのとき医療やカウンセリングは「救済」ではなく「暴力」の機能をはたすことになってしまうであろう。「在日」の状況やメンタルヘルスの問題に理解を持った「在日」フレンドリーな医師やカウンセラー、支援職の人々の掘り起こしが急務である。

⑤ さまざまな取り組みを実践する人材の育成

①から④までの取り組みをファシリテートしたりコーディネートする人材がいないことには、ピアサポートも「いのちの電話」も遺族会も啓発・研修活動も実現できない。日本社会にすでにある育成プログラムや資格認定制度を活用して、それを「在日」に応用したり、「在日」を対象とした独自の手法をつくりだしていく、そうした取り組みが必要である。

以上の点が実践的課題としてあげられる。今後は、こうした実践的課題を実現すべくさらなる研究を進めていきたいと考えている。

Summary

Zainichi Koreans is the term for Koreans living in Japan. "Zainichi" is represented by the characters “在日” in a kanji. The character “在” means “existence,” while “日” means “of Japan” (Nippon=Japan). The combination is “Koreans living in Japan.” There was a time when Koreans occupied the majority of the foreigners who lived in Japan. “Zainichi foreigner” was synonymous with “Zainichi Koreans”. In Japan, “Zainichi” includes a unique nuance, therefore over the years it has acquired a special meaning referring to the descendants of Koreans who were brought over to Japan as a result of Japanese colonial rule of the Korean Peninsula. Among this group, some have been in Japan for close to 70 years. Up until the early 1980s, the population of Zainichi accounted for 85 % of all non-Japanese residents in the country. It can be said their existence was absolute. However, after the mid-1980s, many ‘new comer’ foreigners came to Japan to live and, in recent years, the ratio of Zainichi Koreans has declined to only one-third of all non-Japanese residents. In addition, the second-, third- and fourth-generation Zainichi Koreans that were born in Japan have become the majority of Zainichi Koreans in present day Japan. First generation Zainichi, who were born in Korea and came to Japan, only comprise 10 % of the total Zainichi population, their social position and identity in Japanese society is quite different from those of born in Japan.

According to Selye, stress is a condition characterized by a unique syndrome consisting of various changes induced in biological tissue in a non-specific manner (Selye, H. 1956-1988). “Non-specific” is defined as what can “occur in any case.” When a state of tension develops within an individual due to an internal stimulation which can be a physical or mental burden, event, or condition, or due to an external stimulation which can cause stress, such stimulations are referred to as stressors. Stressors can be physio-chemical, physical, psychological, environmental, or social. Selye defined environmental and social stressors as “social/cultural stressors.” For example, he indicated that “cross-cultural stress” is felt by persons who are easily considered as unfavorable

intruders by the receiving residents, such as immigrants and foreigner workers. These new visitors can easily suffer from a lack of friendship or social contact because they are expected to follow not only the customs and food (of the land) but also the general sense of life which is vastly different than their own. However, it is wrong to view “stress=bad influence.” While “bad stress” can adversely affect a person when in excess, “good stress” is said to help a person to grow.

Generally, when an individual is exposed to an external environmental factor (stressor), he changes his vital environment to adapt to it. This is referred to as the stress response. Stress response is called a “two-edged sword.” It is a biological defense function in case of an emergency, while at the same time it can cause various ailments when prolonged.

Stress can be acute stress or chronic stress. “Acute” occurs when an event or in a critical situation suddenly occurs. “Chronic” is sustained and continuous stress. Stress experienced by Zainichi Koreans as discussed here is chronic stress which is felt daily as a Zainichi Korean.

Zainichi Korean women live with discrimination in Japanese society because they Zainichi Korean, but also receive various forms of discrimination because they are women. With the problem of “compound discrimination” in the background, Zainichi Korean women have a difficult time living. In this study, we empirically clarified the current situation and impact of compound discrimination in Korean women living in Japan through interviews and other means.

クラウドソーシングと公募型パネルを用いたウェブサーベイデータの質の調査

The Qualities of Survey Data Collected via Crowdsourcing and Online Panel

研究代表者 伊藤 大将(国際学部グローバル・イノベーション学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①ウェブ調査 Web survey

②クラウドソーシング Crowdsourcing

③量的調査 Quantitative Research

④データの質 Data Quality

2020 年度交付額／ 152,000 円

研究発表／学会および口頭発表

伊藤大将, 2021, 「クラウドソーシングを用いたデータ回収と回収したデータの質の検討」『第 70 回数理社会学会』, 3 月 8 日

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

プライバシーに対する意識の高まりや、発信者番号通知サービスといった技術の発達、男女ともに労働に従事し家にいないといった社会的背景のため、個別面接や留置回収を用いた社会調査の回収率は低下してきている。無作為抽出を用いたとしても、回収率が低ければ、そのデータに代表性があるのか疑わしく、従来の方法を用いた社会調査は危機的状況にある。従来型の調査法にデータ回収の方法として、注目され、特に心理学の分野で使われ始めているのが、クラウドソーシング（CS）である。CS とは、ウェブを通して依頼者が作業を依頼し、依頼者が設定した報酬と引き換えに、その作業をできる人が仕事を行う場のことである。文字起こし、翻訳等がよく依頼される作業だが、マーケット調査も頻繁に行われている。データの代表性に重きを置く社会学の分野では、慎重な立場が取られてきたが、本研究では、CS で回収したデータの社会学的な調査での利用可能性を検討した。

日本政府が行っている世論調査である「社会意識に関する世論調査」と「外交に関する世論調査」、政府から正式に統計が出ている運転免許証やパスポートの発行数を精査し、同じ質問・形式を用いてオンラインアンケートを作成した。加えて、きちんと読んでアンケートに回答しているかを確認するため、「この質問は、設問を読んで回答しているかチェックするものです。読んでいたらどちらかという親しみを感じない、を選択してください」という質問を含めた。アンケートをクラウドソーシングのサイトに掲載し、500 件のアンケートを回収した。回収したアンケートを調べると、自営業の人が多かった。回収日が平日だったことが理由として考えられたため、日曜日にもう一度

アンケートを回収した。その後、クラウドソーシングを運営する会社が異なる場合に、回答者に異なる特徴があるかを調べるため、異なる運営会社で同様のアンケートを掲載し、データを回収した。回収したデータを統計ソフト SPSS で読み取り、アンケートで尋ねた質問に対する回答の分布を計算し、世論調査の結果と比較した。

2. 研究経過および成果の概要

2020 年度に、アンケートの作成、そのアンケートのオンライン化を行い、クラウドソーシングを用いてアンケートを 3 度回収した。1 回目のアンケートは 2020 年 12 月に 500 件を回収した。質問には、性別や年齢、居住地域、学歴、同居人数、個人の収入といった属性の他、生活満足度、階層帰属意識、家計、性別役割態度、米国・中国・韓国・東南アジアの国々に対する親しみ等が含まれる。2 回目のアンケートは 2021 年 1 月に 500 件回収した。1 回目のアンケートで聞いた質問に加え、同居している人の続柄、世帯収入、コロナの世帯収入への影響を尋ねた。3 回目のアンケートは 2 月に 400 件を回収した。1 回目と 2 回目のアンケートで尋ねた質問に加え、コロナ禍での行動や危機意識に関する質問を多く尋ねた。

3 回目のアンケートはデータクリーニングの最中であり、分析するまでに至っていないが、1 回目と 2 回目のアンケートを分析し、2021 年 3 月開催の数理社会学会にて発表した。まず回答者が質問を読んで回答しているかをチェックする質問に対して、間違った答えを選択した人の割合は、1 回目のアンケートが 2.4%、2 回目が 1.6%と、比較的少なかった。また 2 回目のアンケートでは、個人の収入と世帯収入を尋ねており、世帯収入が個人の収入よりも低いことはあり得ない。世帯収入から個人収入を引いてマイナスになった回答者が 3.5%いた。

属性の比較によると、政府の世論調査と比較して、クラウドソーシングを用いて回収したデータの方が女性が多く、年齢は若かった。特に、クラウドソーシングでは 60 代以上の人からアンケートを回収することができなかった（1 回目も 2 回目も 60 代以上は約 4%）。職業に関しては、自営業者が約 20%と政府統計の 8%と比較してかなり多く、雇用者が 1 回目（平日）のアンケートでは約 15%、2 回目（休日）のアンケートでは 7%、政府統計よりも低かった。自営業を営んでいる人が、オンラインでアンケートに回答している、平日会社で仕事をしている人が休日にクラウドソーシングを使って働いているといった可能性が考えられる。家計に関しては、「非常に苦勞している・やや苦勞している」と回答した人が全体の約 50%を占めており、生活に苦勞している人がクラウドソーシングで仕事をしている様子が見えた。外国への親しみに関しては、中国に親しみを感じない（「親しみを感じない」「どちらかというと親しみを感じない」と回答した人が 9 割弱で政府統計の 8 割弱よりも 10%ほど多く、韓国についても、政府統計では男性約 73%、女性約 55%が親しみを感じないと答えたのに対し、クラウドソーシングでは約 85%の男性、約 70%の女性がそう回答しており、親しみを感じない人の割合が多かった。この傾向は、回答を年齢別に見ても、すべての年代で見られた。

回答者は質問を読み、きちんと回答している。各登録者を評価する制度があるため、無責任な作業をする人は比較的少ないと考えられる。若い人、自営業者、家計が苦しいと答えた人が多く、平日と休日で回答者の特徴に大きな差はなかった。意識変数に関しては、中国や韓国に親しみを感じないと答えた人が多く、性別や年齢で分けても傾向は変わらなかった。

3. 今後の研究における課題または問題点

代表性を重要視する社会学的な調査で使用するには、さらなる検討が必要である。社会学的な調査では、変数の分布ではなく、変数間の関連を調査することが多い（例えば、高齢者の方が若年者よりも中国や韓国に親しみを感じないと回答する＝年齢と外国への親しみをいう2変数の関連を調査している）。クラウドソーシングを用いて回収したデータで2変数間の関連を調べた場合、確率抽出を用いて回収したデータと同様の結果が得られるのか、検討する必要がある。

予算の制約もあり、ウェブ調査会社にデータ回収を依頼することができなかった。ウェブ調査は社会学の領域で認められつつあるが、そのウェブ調査と比較してクラウドソーシングを用いて回収したデータにはどの程度偏りがあるかを調べる必要があるだろう。

Summary

Due to the mindfulness about privacy, the technological development like caller IDs, and the household arrangements that both wives and husbands work, it is more challenging to collect survey data in a traditional way, such as face-to-face interviews and/or self-administered surveys. If the response rate is low, it is questionable whether the data are generalizable to the target population even if they are collected using random or probability sampling. As alternatives to traditional survey collection methods, online panel surveys and surveys collected through crowdsourcing started to be used in marketing and psychological research. However, in the field of sociology where generalizability is an important aspect of the data, researchers have been hesitant to use online panel surveys and/or data collected through crowdsourcing. In this research, I checked how similar or different the data collected via crowdsourcing are compared to Census data or data collected using probability sampling.

I developed the survey questions referring to public opinion research conducted by the Japanese government and statistical data such as the number of driver's licenses or passports issued, which the actual numbers are available. To check whether respondents read the questions carefully, I also included a question that asked to mark a certain response. I collected the data three times in the academic year of 2020 with 500 surveys collected in the first one, another 500 in the second, and 400 in the third. The first survey was collected on Wednesday, a weekday, the second on Sunday, a weekend, and the third through a different crowdsourcing company. I intended to compare the first two to see whether respondents' characteristics were different between weekdays and weekends and the first two with the third to see whether respondents were different between two different companies.

The third data have not been analyzed yet, but the analyses of the first two data sets were conducted. The percentages of the people who selected the wrong choice in trick questions were 2.4% and 1.6% in the first and the second data, respectively. In terms of distributions of demographic variables, crowdsourcing respondents overrepresented women, younger people, and those who said they have a difficult time making ends meet every month. In attitudinal variables, crowdsourcing respondents were less likely to express closeness to China and South Korea compared to the respondents in public opinion research. These tendencies did not disappear even after the data were broken down by sex and age.

The distributions of a variable tend not to be the focus of sociological research; sociologists are more interested in examining the relationships between two or more variables. Further investigation is necessary to check whether the results obtained from crowdsourcing data are similar to the ones obtained from representative data when the relationships of two or more variables are investigated.

ユンカー欧州委員会における EU エネルギー同盟の政治過程

The Political Process of the EU Energy Union under the Juncker Administration

研究代表者 市川 顕(国際学部グローバル・イノベーション学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①EU

②エネルギー同盟

③気候変動

④コロナ

⑤グリーンディール

2020 年度交付額／1,190,000 円

研究発表／学会および口頭発表

【研究発表】

市川顕(2021)「ポーランド：新型コロナ対策から見えるポーランド政治の特徴」、植田隆子(2021)編著『新型コロナ危機と欧州-EU・加盟 10 カ国と英国の対応-』文眞堂 pp.228-248。

市川顕(2021)「EU エネルギー同盟の政治過程における気候変動規範の強靱性と脆弱性」、市川顕・高林喜久生(2021)編著『EU の規範とパワー』中央経済社 pp.87-106。

市川顕(2020)「EU におけるガス供給源多様化をめぐる欧州諸国の動向—2015 年 7-12 月を中心に—」『政策情報学会誌』第 14 巻第 1 号 pp.43-51。

【学会発表】

市川顕(2020.11.7)「ヌマベーションの可能性と限界」政治社会学会第 11 回研究大会、於：オンライン。

市川顕(2020.10.24)「イリベラル・デモクラシーをめぐるポーランド=EU 関係」日本国際政治学会 2020 年度研究大会、於：オンライン。

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本年はコロナ禍の状況だったため、計画していたインタビュー調査は行うことができなかったが、オンラインでの専門家との対話や文献調査を通じて、ユンカー政権における EU エネルギー同盟および EU 気候変動政策、さらにはコロナ禍の当該政策に与えた影響について研究を行った。

2. 研究経過および成果の概要

上記のとおり学会誌および書籍に論文をコンスタントに発表することができた。

また、当該研究の成果の普及という意味においては、学会討論者・座長として以下の通り貢献することができた。

2021.3.13 【討論者】 国際公共経済学会第9回春季大会・若手報告 於：オンライン

以下の発表に対する討論者を務めた。安田 直樹（関西学院大学大学院経営戦略研究科 博士課程後期課程）「社会的責任の実現施策として機能する公共調達の影響範囲～EU における Socially Responsible Public Procurement の取り組みに関する考察～」

2021.3.6 【座長】 政治社会学会第1回研究セミナー 於：オンライン 主催：政治社会学会 共催：東洋大学グローバル・イノベーション学研究センター

以下の発表を含む研究セミナーの座長を務めた。「日本の COVID-19 対策：問題点と課題」（専修大学・原田博夫）（指定討論者：東洋大学・益田安良）

2021.2.4 【座長】 「遠隔」の挑戦—2020 年度オンライン授業の課題と可能性— 於：オンライン 主催：九州大学アジア・オセアニア研究教育機構文化変動クラスター セッションⅡ

以下の発表を含むセッションⅡの座長を務めた。岩田久美加（共立女子大学）「オンライン授業における視覚と聴覚」、田中直（立命館大学・龍谷大学）「Zoom と YouTube による遠隔授業—少人数語学クラスと大講義科目における実践—」、加藤由香子（名古屋芸術大学・東京福祉大学）・鈴木茂樹（東京福祉大学）「オンライン雑談会による教員間のピア・サポート活動：その限界と可能性について」、黄偉修（東京大学）「遠隔授業が中国に関連する授業に与えた影響」、中沢知史（南山大学）「コロナ禍のラテンアメリカとラテンアメリカ地域研究—オンライン授業実践を振り返りながら—」、久保智之（九州大学）「フィールドと教室を結ぶ言語学」

2020.12.19 【討論者】 日本計画行政学会関西支部 2020 年度研究大会 於：Zoom 研究報告 3

以下の発表に対する討論者を務めた。

藤原直樹（追手門学院大学）梅村 仁（大阪経済大学）井上智之（愛知工業大学）「地方都市における海外との交流促進による社会経済のイノベーションに関する研究」

2020.11.28 【討論者】 日本計画行政学会第 43 回研究大会 於：Zoom ワークショップ E-WS1

以下の発表を含むワークショップ「ポストコロナ時代のまちづくりプラットフォーム—脱中央集権化、ガバナンス、地方創生—」の討論者を務めた。

枋尾圭亮（船井総合研究所）「枚方市“巡リズム”に見る持続する公民連携事例」

若狭弘（経済ジャーナリスト）「大阪府大阪市“ミナミのまちづくりネットワーク”における民間主導のまちづくり事例」藤原直樹（追手門学院大学）「地方都市における産業クラスターの国際連携に向けたプラットフォーム構築」

2020.11.15 【討論者】 グローバル・ガバナンス学会第 13 回研究大会 於：Zoom 部会 4 以下の発表を含む部会 4 「「多元的民主主義」と国際秩序」の討論者を務めた。

長谷川雄之（防衛研究所）「変動期ロシアの政治改革と戦略環境認識」志田淳二郎（東京福祉大学）「中東欧における「多元的民主主義」と既存の国際秩序への影響」大澤傑（駿河台大学）「ラテン・アメリカにおける民主主義の後退と国際秩序の相互作用」

2020.11.8 【座長】 政治社会学会第 11 回研究大会 於：Zoom 特別企画テーマセッション 2

以下の発表者を含む特別企画テーマセッション 2 「コロナ禍とその政治・社会的対応について考える」の座長を務めた。

後藤圭二（吹田市長）、中林啓修（国士舘大学）、益田安良（東洋大学）

2020.11.7 【座長】 政治社会学会第 11 回研究大会 於：Zoom 共通論題 1

以下の発表者を含むパネルディスカッション「地方創生とイノベーション」の座長を務めた。

荒井裕三（館林市役所地球環境課長）、市川颯（東洋大学）、朽尾圭亮（船井総合研究所）

3. 今後の研究における課題または問題点

2019 年 12 月に欧州委員会は欧州グリーンディールを発表し、またコロナ禍からの復興においても、当該グリーンディールに基礎を置く「グリーン・リカバリー」を提唱している。2050 年カーボンニュートラルに向けた EU の動きは、コロナ禍においても加速しており、今後は社会政策・経済政策・環境政策の三側面を含む欧州グリーンディールに焦点を当てて、EU の今後の方向性を解明したい。

Summary

Energy security is an urgent issue in the European Union these days. Especially from the Ukraine crisis in 2014, Polish Prime Minister Donald Tusk (after 2015 he became the president of the European Union) strongly insisted that European countries should have much more solidarity regarding energy supply and its security.

On the other hand, the European Union has a greenhouse gas reduction target called the Climate Change Energy Package, which has ambitious targets, against the backdrop of CO₂ emission, for instance, 20% reduction by 2020, 40% reduction by 2030 and accomplish carbon neutral society by 2050.

In this context, the European Union have to try to harmonize the two policy areas, which means between energy policies and climate change policies. This was so complicated process, because these two policies sometimes conflict each other, and such a harmonization have been very challenging political actions in the European Union.

The European Union's Energy Union began discussions at the end of March 2014 to converge this. Since the European Union's Energy Union is an ongoing event, policy studies have been started to conduct, but few investigations have followed the political process. That's why this research work is very valuable not only in Japan but also worldwide, especially in the European Union member countries. Moreover, despite the European Union's Energy Union being a priority in the Juncker European Commission administration from 2015, research trends in Japan are biased toward technical analysis, not political process.

This investigation, funded by Enryo Inoue Anniversary Fund in Toyo University observes the "political process of the EU Energy Union in the Juncker European Commission, asked "How did the EU try to harmonize energy policies and climate change policies, which were originally the authority of member states?"

It was examined as a new case of "separation of powers between member states and the EU".

As I pointed out in one of my contributions this year, in Akira ICHIKAWA(2021) "Resilience and Weakness of the European Union's Climate Change Norms in the Political Process of the EU Energy Union", the European Union's climate change policies and norms have survived in the EU energy policies. This is the most important conclusion in my research work in academic year 2021.

炭素繊維複合材料による耐震補強を適応した

既存木造建築物における長期耐久性の解明

Elucidation of long-term durability of existing wooden buildings to which seismic reinforcement of carbon fiber composite materials has been applied

研究代表者 高岩 裕也(理工学部建築学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①既存木造建築物 Wooden building

②常時微動測定 Micro tremor measurement

③固有振動特性 Natural vibration characteristics

④水平剛性評価 Horizontal rigidity evaluation

⑤数値解析シミュレーション Numerical analysis simulation

2020 年度交付額／ 2,000,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・ Koji Kubo, Akina Furuie, Nobuji Sakurai, Yuya Takaiwa : ESTIMATION OF IN-PLANE STIFFNESS OF HORIZONTAL STRUCTURE OF WOODEN BUILDING BASED ON MICROTREMOR MEASUREMENT, World Conference on Timber Engineering 2020 2021 年 8 月 (掲載決定)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究の目的は、炭素繊維複合材料ロッドによる耐震補強を適応した既存木造建築物の構造モニタリングを実施して、長期耐久性を明らかにすることである。構造モニタリングは、定期的な常時微動計測により建物全体の固有振動特性の変動を確認するとともに、補強部材である炭素繊維複合材料ロッドを竣工後、段階的に取り出して引張試験等を行うことで研究知見を構築する。得られた研究知見は場所的一回性を帯びているが、実験室で構築された定量的研究知見と組み合わせることで、長期耐久性評価の更なる信頼性向上に寄与する研究知見となる。本研究の意義は、全国各地に現存する既存木造建築物の有する歴史的・文化的価値の保守に貢献する点にある。

対象とする既存木造建築物は、大阪府に現存する木造建築物(屋外に設置される展示物)である。対象建築物は、2019 年 10 月に炭素繊維複合材料ロッドを耐震補強部材とした耐震補強設計が完了し、2021 年から工事着工予定となっている。

そのため本研究期間は、下記の研究ⅠおよびⅡを実施した。研究Ⅰは、本研究のモニタリングシステム(無線加速度計測システム)を有線加速度計測の結果と比較することで、研究計画の妥当性を検証する方法である。東洋大学大型構造物実験棟内に建設されている架構試験体の図 1 に示す柱

頭柱 1 点 Y 方向に加速度計を取り付けて計測し、その結果を比較することで確認を行った。研究Ⅱは、耐震補強前の対象建築物の建物調査・常時微動計測による結果の分析を実施することで、本研究のモニタリングシステムで対象建築物の固有振動モードを適切に評価できることを確認した。

2. 研究経過および成果の概要

本研究期間に実施した研究ⅠおよびⅡについてそれぞれ研究経過を以下に示す。

研究Ⅰ

東洋大学大型構造物実験棟内に建設されている架構試験体の図 1 に示す柱頭柱 1 点 Y 方向に加速度計を取り付けて計測し、その結果を比較することで確認を行った。また、部分的に増築して重量を作用させない部分を構築し、接続することで、理想的な試験体とは異なる様々な剛性のフレームが取付く既存木造建築物の振動性状を再現し、そのような試験体においても計測が可能であることを確認した。



写真 1 試験体アイソメ



写真 2 試験体側面

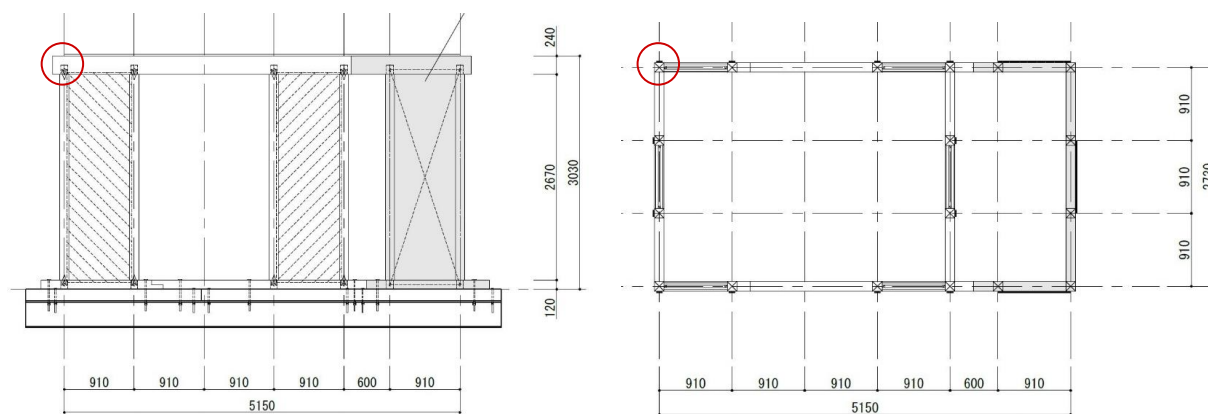


図 1 試験体立面および平面図

東洋大学大型構造物実験棟内に建設されている架構試験体の図 1 に示す柱頭柱 1 点 Y 方向に加速度計を取り付けて計測した結果を図 2 に示す。有線加速度計において DC 成分を処理するために、1Hz 以下のフィルタリングを行った。両システムの計測結果を比較すると、8.75Hz 付近に同様に卓越（1 次固有振動モード）が確認できることから、計測システムの違いによる影響は無いことを確認した。

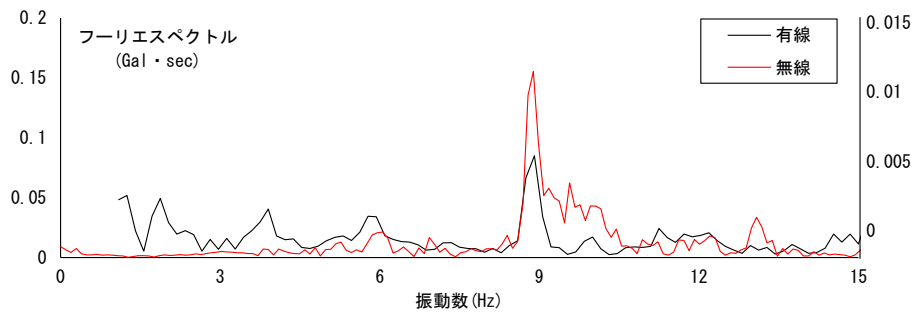


図 2 フーリエスペクトル（錘なし）

つぎに、部分的に増築して重量を作用させない部分を構築し、接続することで、理想的な試験体とは異なる様々な剛性のフレームが取付く既存木造建築物の振動性状を再現し、そのような試験体においても固有振動モードを適切に評価できるかを検証した。評価した固有振動モードを図 3 に示す。Y 方向の一次固有振動モードの振動数は、5.37Hz となり、図 2 に示す卓越固有振動数と比較して、低い振動数となっている。新たにフレームが取付いた影響よりも、2t の錘が作用したことによる固有振動数の低下が顕著であることを表している。また、12Hz 付近の固有振動モードを確認すると、増設部分が既存部分と異なる挙動を示していることがわかる。このように、理想的な試験体とは異なる様々な剛性のフレームが取付く既存木造建築物の振動性状を適切に評価できることを検証した。

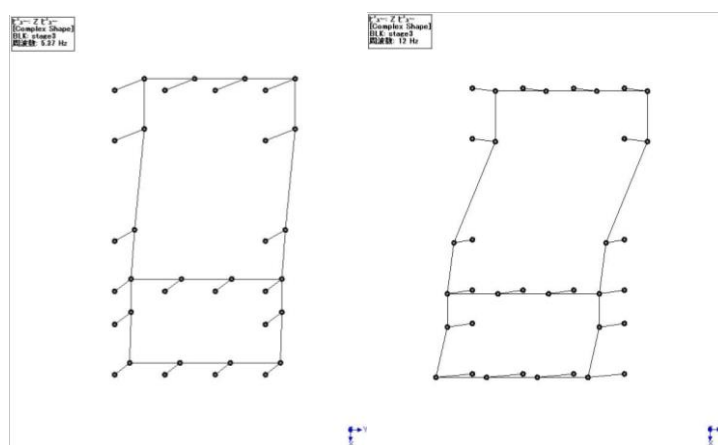


図 3 固有振動モード（増設・錘作用時）

研究 II

対象建物の固有振動数、振動モード形状を評価するために、常時微動測定を行った。測定位置を図 4 に示す。測定は、3 軸加速度計測器（RS-ONE）を柱頭および地盤レベルに設置し、サンプリング周波数 100Hz で 180 秒のデータを採取した。測定結果より、7.4-7.5Hz 付近および 7.7-7.8Hz 付近に X 成分の固有振動モード、7.1-7.3Hz 付近に Y 方向の固有振動モードを有していることを確認した。図 5 から図 7 に分析結果をそれぞれ示す。7.4-7.5Hz の X 成分は、Y 方向の固有振動数においても近傍で卓越が確認されることから、建物全体がねじれることによって生ずる固有振動モードであることが推察される。7.7-7.8Hz X 成分は、主に六通り付近が X 方向に振られる固有振動モードであり、六通り（妻面）と他の通りの壁量の際によって生じているものであることが推察され

る。これら固有振動モードの要因として、当該建物が L 型の平面計画となっていることが起因していることが挙げられる。各部屋の挙動は、7.1-7.9Hz の幅に水平方向に対する並進成分が散見されるものの、各フレームが独立して挙動するような固有振動モードは確認できない。これは、水平構面の剛性と鉛直構面の剛性のバランスが良いものであることが要因として考えられる。以上のことから、常時微動測定によって固有振動特性を評価できることを確認した。

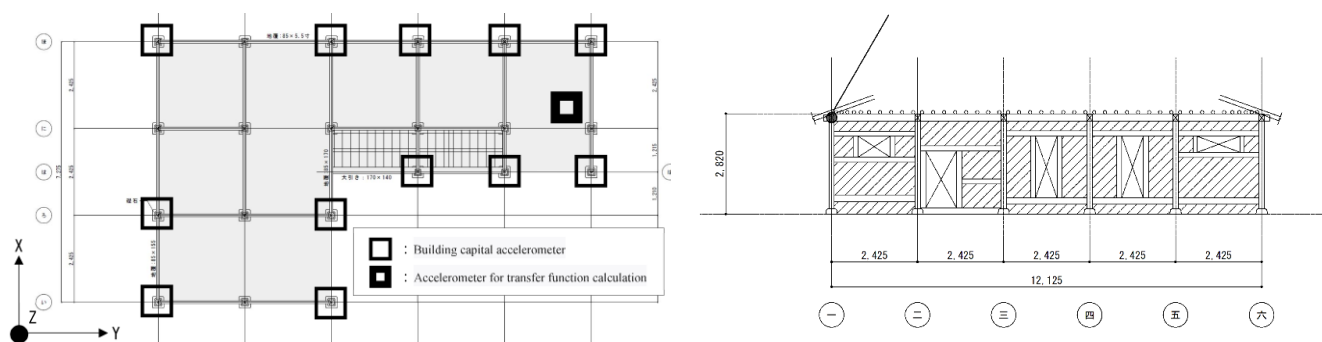


図 4 測定位置

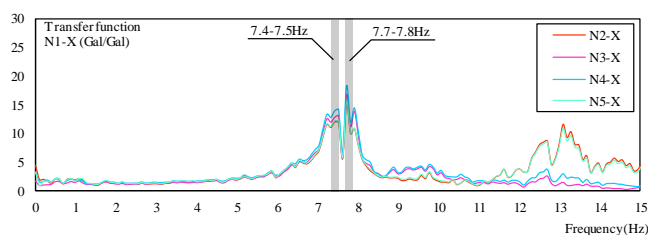


図5 X方向伝達関数

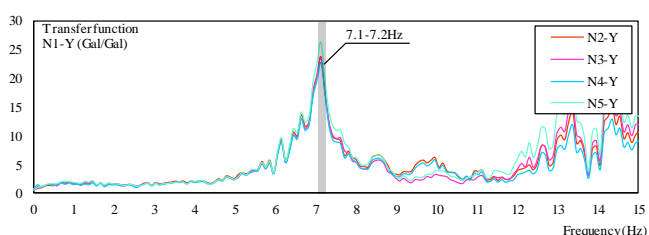


図6 Y方向伝達関数

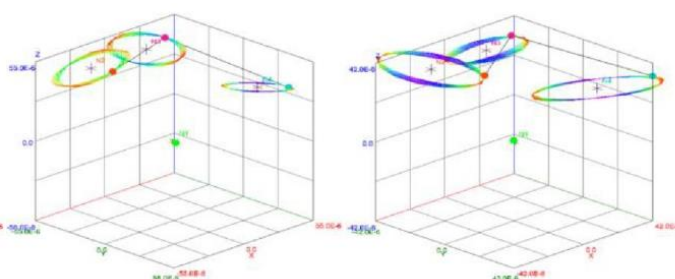


図 7 固有振動モード

3. 今後の研究における課題または問題点

研究Ⅰにより、本計測システムによる振動特性評価の妥当性を確認し、研究Ⅱにより、研究対象となる既存木造建築物の振動特性を正確に把握することができることを確認した。今後は、耐震補強工事を実施した後に、常時微動測定を行い、固有振動特性を評価する予定である。

Summary

The purpose of this study is to clarify the long-term durability by conducting structural monitoring of existing wooden buildings to which seismic reinforcement with carbon

fiber composite rods is applied. The target existing wooden buildings are the existing wooden buildings (exhibits installed outdoors) in Osaka. For the target building, the seismic retrofit design using carbon fiber composite material rod as a seismic reinforcement member was completed in October 2019, and construction is scheduled to start in 2021. In this study, the following studies I and II were carried out. Study I was a method of verifying the validity of the research plan by comparing the monitoring system of this study with other existing systems (existing equipment of Toyo University). By installing a weight on the frame test body constructed in the large-scale structure experiment building of Toyo University, the vibration state of the existing wooden building was reproduced and the measurement was performed. The measurement results were filtered below 1 Hz to process the DC component. Comparing the measurement results of both systems, the same predominance (primary natural vibration mode) is confirmed around 8.75 Hz. From this, it was confirmed that there was no effect due to the difference in the measurement system. Study II was a method of conducting a building survey of the target building before seismic retrofitting and analyzing the results by constant microtremor measurement. For the measurement, 180 seconds of data was collected at a sampling frequency of 100 Hz. From the measurement results, it was confirmed that there is a natural vibration mode of the X component near 7.4-7.5Hz and 7.7-7.8Hz, and a natural vibration mode in the Y direction near 7.1-7.3Hz. Since the X component of 7.4-7.5Hz is confirmed to be predominant in the vicinity even at the natural frequency in the Y direction, it is inferred that it is the natural vibration mode caused by twisting the entire building. The reason for these natural vibration modes is that the building has an L-shaped plan. As a result of the research, it was confirmed that the monitoring system of this research can appropriately evaluate the natural vibration mode of the target building. The above research results proved the validity of the research plan. In the future, we plan to measure the fine movements and evaluate the natural vibration characteristics after performing seismic retrofitting work.

急勾配な水路式魚道における魚類の遡上率向上を目指した

粗度要素や配置に関する研究

Study on roughness arrangement for improvement of flow and swimming behavior of fish in stream-type fishway with steep slope

研究代表者 青木 宗之(理工学部都市環境デザイン学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①水路式魚道 Stream-type fishway

②急勾配 Steep slope

③粗度 Roughness

④遡上率 Run-up ratio

⑤遊泳行動 Swimming behavior of fish

2020 年度交付額／ 1,140,000 円

研究発表／学会および口頭発表

【研究発表】

Taisei SATO, Tomoaki FUNAKOSHI and Muneyuki AOKI : THE SWIMMING BEHAVIOR OF TRIBORODON HAKONENSIS IN STREAM-TYPE FISHWAY WITH THE SLOPE OF 1/10, Proceedings of the 22nd IAHR-APD Congress 2020, Vol.22, 3-6-2, pp.1-7, 2020. 【Corresponding Author】

【学会および口頭発表】

佐藤大誠, 末吉祥太, 船越智瑛, 青木宗之 : 急勾配な水路式魚道に設置した粗度群配置の違いとウグイの遡上行動について, 土木学会全国大会第 75 回年次学術講演会, II-03, 2020.9, オンライン.

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

河川や農業用排水路などには, 多くの落差が生じている. 数 10cm の落差でさえ, 魚類は遡上できないことがある. そのために, 縦断的な連続性を確保すべく, 魚道が設置される. その魚道は, プールタイプ, ストリームタイプ, オペレーションタイプとして大きく 3 分類されるが, 本研究ではストリームタイプの水路式魚道に着目している. 水路式魚道の縦断的な推奨勾配は 1/20 ではある一方で, 現地では施工箇所が十分に確保できず, 縦断勾配を 1/20 よりも急にせざるを得ない状況もある. 事実, 1/10 程度の縦断勾配である水路式魚道が設置されていたことを確認している. 縦断勾配が急であると, 魚道内の水深が確保できず流速が魚類の遊泳能力を上回ってしまい, 魚類の遡上を困難にする可能性が高い. そこで本研究では, 魚類の遡上が困難である急勾配の水路式魚道において, 魚類が遡上できる粗度配置の提案を目的とし, 実魚を用いた挙動実験および水理実験を行った.

実験には、幅 60 cm の水路に縦断勾配 1/10、魚道延長 500 cm の水路式魚道を設置した。粗度要素には、高さ 15 cm、直径 4.8 cm の円柱を用いた。また、魚類の休息場が形成されることを期待して粗度要素を 5 本用いて「く」の字にまとめ、凸部を有する粗度群とした。なお、粗度と粗度の間は通水するようにした。実験は、粗度群の凸部を上流に向けたケースおよび下流に向けたケースし、粗度群を平行および交互に配置した。実魚を用いた挙動実験では、体長 $BL=6.6\sim10.5$ cm（平均体長 $\overline{BL}=8.5$ cm）のウグイを用いた。魚道下流で魚を水温や流況に慣らせた後に、魚の遊泳行動を 30 分間撮影した。実験終了後、各ケースにおけるウグイの魚道内における存在位置を 0.1 s 毎を解析した。また、魚種や大きさの違いを標準化するため、体長倍速度を用いて整理した。ここで、体長倍速度とは、例えば、魚類が長時間遊泳可能な持続速度は、その体長 BL の 2~4 倍の長さを毎秒当たりした速さといわれており、2~4 BL/s と表す。ちなみに、魚類が 1~5 s 程度で瞬発的に遊泳する突進速度は、10 BL/s である。水理実験では、流速および水深の計測を行った。流速の計測は、2 次元電磁流速計を使用した。x 方向（流下方向）の流速 u 、y 方向（横断方向）の流速 v を計測し、x 方向および y 方向の時間平均流速 \bar{u} 、 \bar{v} を単純平均して算出した。水深の計測には、ポイントゲージを使用した。

2. 研究経過および成果の概要

ウグイの遡上率は、粗度群の凸部を上流に向けたケースに比べて下流に向けたケースのほうが 3~5 倍高かった。これは、先行研究と同様の傾向であった。また、先行研究では粗度群の設置間隔が 25 cm および 50 cm であるのに対し、本研究ではその感覚を 75 cm とした。一方で、ウグイの遡上率は、本研究と先行研究とで同様の結果が得られた。また、遡上に成功したウグイの遡上距離および遡上時間に着目した。本研究での実験結果は、先行研究に比べて遡上距離が約 0.45 倍、遡上時間が約 0.4 倍の長さであり、それぞれが短縮された。そこで、魚道内でのウグイの遊泳行動および流れに着目した。ウグイは、粗度群の直上流に留まりながら遡上することが主であった。粗度群直上流における流速は、2~6 \overline{BL}/s であり、比較的ウグイが留まりやすい流れ場が形成されていたことが分かる。これは、粗度群の塞き上げ効果によって水深が確保され、流速が低減されたためである。粗度群の凸部を上流に向けたケースよりも、下流に向けたケースのほうがより塞き上げされ、前者よりも流速が低減され、より多様な流れ場が形成されたため、遡上率にも影響したものと考えられる。なお、先行研究に比べて本研究においてウグイが留まった箇所は下流側に移動した。これは、粗度群の設置間隔による粗度群の塞き上げ効果が得られた箇所の違いによるものである。

以上より、本研究ではより塞き上げ効果の高い粗度群の凸部を下流に向け、その設置間隔を 25 cm から 75 cm に広げても、ウグイの遡上率は低下しなかったことが分かったため、これらの知見を現地で適用していきたいと考えている。

3. 今後の研究における課題または問題点

現地に適用する際には、維持管理も含めて粗度形状を考慮する必要があるといえる。そのため、本研究では円柱を粗度要素として用いたが、角柱などが適用しやすいと考えられる。角柱は、流れを受け止めやすい一方で、水流と粗度要素との間で剥離現象が生じやすいため、可能な限りその現象を抑える工夫が必要である。また、粗度要素の設置間隔は、塞き上げ効果に影響を及ぼすため、現地で適用する際には、魚道に流下させる流量に応じた設置間隔を適用する必要がある。

Summary

There are three sections of fishways in Japan. Fishway sections are classified into pool type, stream type and operation type. This study focused on the stream-type fishway. The stream-type fishway can create various flows and is excellent in terms of landscape. Generally, the recommended longitudinal slope of the Japanese stream-type fishway is 1/20. However, there may be cases where there is not enough fishway length in the field. In that case, the longitudinal slope of the stream-type fishway becomes steep. At this time, water depth is low, and the flow velocity is rapid, making it difficult for fish to run up. The model fishway width B was 60 cm, horizontal length L was 500 cm, height H was 50 cm and longitudinal slope $ix = 1/10$. The element of flow resistance used the column with a diameter of 4.8 cm and a height of 15.0 cm. In this study, the column group were used as the roughness group. The real fish used in the experiments were Ugui; *Triborodon hakonensis*. The average body length \overline{BL} was 8.5 cm.

As the results, the run-up ratio of the fish was similar to that of previous study. In addition, the run-up rate was high in cases where the convex part of the roughness group was directed downstream. This is because the raising effect of the roughness group is high, so that the water depth is secured and the flow velocity is reduced. Moreover, when interval of the roughness group was large, the run-up distance and time of the fish became shortened. Because, the number of times that fish stayed decreased in the downstream of roughness group.

When applying to the river site, it is necessary to consider the roughness shape including maintenance. Therefore, it is possible that a simple prism is more suitable as a roughness element than the cylinder used in this study. The simple prism is easy to catch the flow, however peeling of flow is likely to occur between the flow and the roughness element. It is necessary to devise ways to suppress the peeling of flow as much as possible. In addition, the installation interval of the roughness element affects the raising effect. When applying in the river site, it is advisable to set the installation interval suitable for the water quantity into the fishway.

バイオプローブを利用した細胞核内動的構造秩序の基本原理解探索

Study on the dynamic order in the living cell nucleus

研究代表者 藤井 修治(食環境科学部食環境科学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／① バイオプローブ Biological probe

② 細胞核 Cell nucleus

③ 画像解析 Image analysis

④ ゲル Gel

⑤ 剪断変形 Shear deformation

2020 年度交付額／ 2,000,000 円

研究発表／学会および口頭発表

第 175 回 東海高分子研究会講演会 2020 年 10 月 31 日

「タンパク質自己会合体を用いた細胞核内ダイナミクス計測」

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

細胞核内部の染色体配置には、ある時空間的規則性が存在すると考えられるが、その詳細は明らかではない。特に、常に細胞に作用する外力のために細胞核も大きな変形を受けているが、変形下において規則性を維持するメカニズムは未解明である。

本研究では、外力により変形した核内部の染色体の運動情報を抽出する実験手法を確立することを目的とした。本研究目的を達成するために、細胞に様々な変形を与えながら顕微鏡観察ができるように、顕微鏡上にオリジナルの変形治具を設置することを考えた。

顕微鏡観察では、細胞の動画を撮影することは比較的容易であるが、問題はいかにして動画から構成物の運動情報を抽出するかである。運動情報の抽出には粒子追跡法や粒子画像流速測定法などの複数の手法が知られている。これらの解析は画像のノイズに敏感であるため、高精度な運動情報を得るには、これらの手法を適用する前に、興味のある物体を分割しておかなければならない。そこで、機械学習を応用した分割手法を構築することとした。

2. 研究経過および成果の概要

細胞に外力を与え、その変形を解析するために、

1. 変形量を見積もるための画像解析手法の確立、

2. 細胞を変形させるための治具、

が必要である。本年は、CMOS カメラ、対物レンズ等を購入し、上記課題の確立を進めた。

細胞の立体的な形状を考慮すると、その変形量を解析するためには、観察の焦点面が厚みを持つステレオ観察が適当である。そこで、ステレオ顕微鏡を用い、スポンジをモデルに、変形解析を実施した。機械学習に加え、測定中の振動除去など、複数の画像処理技術を組み合わせることにより、

外力による極微量の変形量(1 μ m 程度)でも追跡できる処理手法を開発した。これは、観察視野 2mm に対し、1/2000 の精度である。細胞の顕微鏡観察ではさらに高倍率・高開口度の対物レンズを用いるため、同手法の適用により、非常に高い精度で運動を抽出できることになる。また、今回用いた光学系では厚み 100 μ m 程度までの深さ方向の構造を明瞭に観察することができた。

細胞に一定剪断変形を加えつつ構造観察を行うため、特注品の変形治具を設計・作成した。具体的に作成した変形治具は、1. 回転剪断変形治具、2. 単純剪断治具、3. 剪断摩擦治具、4. 伸長圧縮治具の4種類である。通常、変形試料の観察では、試料のごく一部のみが観察可能である。単一細胞の観察実験としてはごく一部の観察で問題はない。しかし、細胞集団の応答を観察する場合には、より広い視野での高精度観察が必要となるため、試料全体の観察が可能となるように、工夫をした。まだ細胞を播種したゲルを固定することに難点があるが、これらの治具類で変形させた試料の動画に対し、上記画像解析手法を適用することにより、さまざまな変形下にある物体の微小変形を抽出できるようになった。今後は、この変形治具類に改良を加え、操作性を改善していく。

3. 今後の研究における課題または問題点

上記の治具類は全て我々の研究室で用意したオリジナルであるため、特定の顕微鏡に特化した設計になっている。オリジナルという特徴はあるが、これは汎用性に乏しいという欠点でもある。これら治具類の設計・製作により得た知見を基に、汎用性の高い装置設計をすることにより、蛍光顕微鏡や、共焦点顕微鏡観察にも使用できるように改良を重ねる必要がある。この改良により、観察プラットフォームが増えるため、より多様な解析が可能になる。

ただし、現状では、機械学習を応用した画像の分割化は、動画ごと実施しなければならない。これでは異なる実験条件で行われた実験の結果に、画像解析の影響が及ぶ可能性があるため、機械学習が運動情報を切り捨ててしまうなども悪影響を及ぼす場合もあり得る。現状では学習内容の普遍化に成功していないため、さらに工夫が必要である。

機械学習による分割化と同様に重要なのが、画像の並進移動処理である。観察時間が長時間化すると、顕微鏡の振動が観察内容に影響を及ぼすことがある。振動の影響を除去するために、顕微鏡を防振台に設置しているが、それでも微細な振動を完全に取り除くことはできないため、画像解析による処理が必要である。現在は、観察視野の並進・回転処理を複数回実施することにより、見かけ上の振動を取り除いている。短時間観察と同程度の精度で運動情報を抽出するために、新たな処理手法の検討も必要である。そのための処理手法の一つとして、運動抽出後の結果に並進や回転の影響がないことを判別することを考えている。観察視野内の複数の点の移動挙動に同方向の並進・回転が含まれていないか検討することにより、振動の影響をできるだけ細かく評価することができる。さらに、この解析を応用することにより、試料内部の歪みを評価できるようになるため、微視的変形の評価という新しい解析が可能になる。

これらの解析手法も確立し、よりロバストな画像処理方法を構築することが新たな課題である。

Summary

In this study, we aim to obtain the information of the dynamics inside the cell nucleus under deformation. We developed image analysis methods in order to extract sub-micron motion of objects under deformation. Specifically, we established a segmentation method of the image in terms of a machine learning. We also designed several shear deformation cells, which

enable us to observe the samples under different kinds of deformations. Notably, four kinds of deformation cells we developed will provide useful data on the cell dynamics under deformation as very powerful tools. According to a combination of these developments, we are able to perform the microscopy analysis of the cells under deformations now. However, we need further improvement of these analysis methods and deformation tools by following reasons.

First, we still need to improve a method for de-drift of the image. We are able to remove the drift of the image during the observation and estimate micro-scopic displacement of the object in sub-micron scale. However, we found that drifting of the image can be still serious issue for the long-time observation. During long-time measurement, we could see vibration of the image which remains even after the de-drift treatment. If the vibration of the image is in the same order as the diffusion of the particles, it is quite difficult to remove the vibration because we cannot distinguish the vibration and diffusion in the order of μm . We therefore need to develop another de-drifting method.

Second, we established a method for segmentation of the images. By the segmentation, we can distinguish different kinds of objects in the microscope images, which allow us to measure the dynamics with high accuracy. In the present method, however, we have to iterate the machine learning process for every image with different conditions. In other words, we cannot proceed the machine learning process for all of the images all at once. Because of that, we have a possibility to have an artifact in the comparison of data.

In the next plan, we will work on these tasks. Additionally, we will further improve the image analysis method to extract the meso-scale distortion by applying the de-drift method used in this study. These improvements will give rise to progress on the trans-scale image analysis for the bio-imaging science.

炭素窒素安定同位体比に基づく現代日本人の食性解析

Diet analysis of contemporary Japanese based on carbon and nitrogen stable isotope ratios

研究代表者 吉永 淳(生命科学部応用生物科学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①炭素窒素安定同位体比

②マーケットバスケット

③陰膳

④頭髮

⑤オフセット値

2020 年度交付額／1,250,000 円

研究発表／学会および口頭発表

“Carbon and stable isotope ratios of diet of the Japanese and diet-hair offset value”
を Isotopes in Environment and Health Study 誌に投稿中。

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

発掘人骨に残存するコラーゲン等の炭素窒素安定同位体比分析は、先史時代の食生活を復元する (Diet reconstruction) 方法として 1980 年代から多用されるようになった。一方、人々の食生活を知ることは食文化や栄養学、人類学などの分野でも必要であるが、現生の人々を対象とした場合でもこれは必ずしも簡単なことではない。頭髮などの生体試料の炭素窒素安定同位体分析は、こうした現生の人々の食生活解析法として有望視されるようになってきた。

本研究はこうした研究の基礎となる情報を提供することを目的として計画された。日本人の食物総体の炭素窒素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$) の代表的な値を調べるとともに、頭髮の同位体比から食物－頭髮オフセット値を求めることとした。オフセット値は、今後頭髮の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 測定から人々の摂取食物を推定する食性解析 (Diet Analysis) において必須の情報となるが、これまで信頼性のある値が報告されていなかった。オフセット値を推定するにあたり必要となる食物総体の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ を求めるために、本研究では 2 つの異なるアプローチをとった。マーケットバスケット (MB) 法と陰膳法である。これらを総称してトータルダイエットスタディといい、対象集団の摂取する栄養素や汚染物質の代表値の推定方法として適した方法とされているため、本研究では食物総体の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ を求める方法として適用した。

2. 研究経過および成果の概要

2020 年 8 月～11 月に群馬県・東京都のスーパーマーケット 2 か所で別々に購入した計 389 食品を、厚生労働省の分類に従って 15 食品群に分け、各食品について前処理 (洗浄、皮むき等)・調理 (焼く、ゆでる等) 後、2018 年の国民健康栄養調査結果に示された各食品の国民平均一日摂食重量に従って各食品を混合した (MB 法) 混合サンプルと、2011 年、2015 年に同様に収集・調製した

MB 試料を $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 測定対象とした。これらの試料は収集単位ごとにフードプロセッサーで均一化後に凍結乾燥・脱脂した。陰膳は 2017-2018 年に、主に関東地域で収集したもので、凍結乾燥品を冷蔵保管してあったものを使用した。凍結乾燥した食品群毎の混合試料および陰膳試料は、元素分析計／同位体比測定質量分析装置による $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 測定を外注した。頭髮試料は群馬県の美容室、東京の理容室において 2019 年に収集したものである。それぞれ約 100 人分 (1.5 kg)、約 140 人分 (2.1 kg) の頭髮混合物試料を、洗浄・細切・均一化・脱脂後、同様に同位体比を測定した。MB については食品群毎の同位体比を、各食品群の一日総たんぱく摂取量への寄与率 (国民健康栄養調査悔過から算出) で重みづけしたものを合計して、食物総体 (diet) の同位体比を算出した。

2011 年、2015 年、2020 年に収集・調製した 3 セットの MB 試料 (各 13~15 の食品群毎の混合試料) の同位体比の測定値と、各年の各食品群のたんぱく摂取寄与率から算出した、各年の食物総体の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ は、それぞれ $-21.1 \sim -22.0 \text{ ‰}$ 、 $4.4 \sim 5.0 \text{ ‰}$ であった。陰膳 35 試料の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ はそれぞれ -24.0 ± 1.4 、 $3.8 \pm 1.2 \text{ ‰}$ であり、MB に基づく値とやや異なっていた。2019 年に収集した頭髮の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ は、男女差が小さく、男女の平均で -19.3 、 8.5 ‰ であり、これと 2020 年の MB 試料から算出した食物総体の同位体比から推定される食物－頭髮オフセット値は $\delta^{13}\text{C} = +2.0 \text{ ‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N} = 4.1 \text{ ‰}$ であった。また 2011 年の MB 試料から算出した食物総体の同位体比と、2007~2009 年に収集した日本人 1300 人余りの頭髮同位体比平均値の文献値 (Kusaka et al.,) から推定したオフセット値はそれぞれ $+1.7$ 、 4.4 ‰ と、2020 年の推定値とほぼ一致した。これらの 2 セットのデータの平均値から、食物－頭髮同位体比は $\delta^{13}\text{C} = +1.9 \text{ ‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N} = 4.3 \text{ ‰}$ と推定した。

3. 今後の研究における課題または問題点

MB 法で推定した食物総体の同位体比と、陰膳の平均値に多少の差がある。どちらも対象集団の摂取食物からの汚染物質・栄養素摂取量推定に適した方法であるのにこうした差がみられるのは、どちらかが日本人の食物総体の同位体比をうまく反映していないことになる。本研究で求めたオフセット値は、推定に使用した MB 法に基づく食物総体の同位体比が代表性のあるものとの前提であるので、食物総体の同位体比に代表性があることは確認しておく必要がある。今回陰膳と MB で差が見られた一つには、陰膳がまだ $n=35$ のデータであり、代表性の点で不十分な段階であることがあるのかもしれない。この陰膳は別研究で収集した 150 人分の一部であるので、今後も同位体比の分析を進め、MB 法での推定値との比較を進めていきたいと考えている。

Summary

Carbon and nitrogen stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) were measured for food and hair samples of the Japanese. Three hundred eighty-nine foodstuffs were collected in 2020 in Tokyo and Gunma, Japan. The foodstuffs were classified into 15 food categories, prepared as usually consumed, and mixed to make 15 composite samples representing the food category (market basket method). Similarly prepared market basket samples in 2011 and 2015 were also used as samples in this study. Hair samples were two composites of hair collected in 2019 in a barber shop and a beauty salon in Tokyo and Gunma, Japan, respectively. The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of food composites and hair samples were measured by elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry. Some of the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of food composite (or food category) varied from

composite to composite and according to year of collection. The $\delta^{13}\text{C}$ values of whole diet, protein intake-weighted sum of isotope ratios of all of the composites, were -21.1, -22.0 and -21.5, for 2011, 2015, and 2020 samples, respectively. The $\delta^{15}\text{N}$ values were 5.0, 4.4, and 4.4, respectively. Diet-hair offset values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were estimated by the differences in hair and estimated whole diet δ values: Offset estimates were 1.9 and 4.3 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively. These offset values will be important for the dietary analysis and nutritional research with hair isotope ratios.

In addition to market basket method, duplicate diet samples from 35 households, collected during 2017-2018, were also measured for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ for the alternate estimation of whole diet isotope ratios of the Japanese. Mean and standard deviation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the duplicate diet were -24.0 ± 1.4 and 3.8 ± 1.2 ‰, respectively. The whole diet $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ estimated from market basket and duplicate diet had small but significant differences. This may be partly due to small sample size of the duplicate diet (n=35) analyzed so far and further measurement was warranted to have representative picture of whole diet $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of the Japanese.

トラザメの胚期に特有の塩類細胞から

謎多き軟骨魚類のイオン調節機構を解明する

To clarify the mysterious osmoregulatory mechanism of elasmobranch fish
with reference to ionocytes in cloudy catshark embryo

研究代表者 井ノ口 繭(生命科学部生命科学科)

研究期間／2020年6月25日～2021年3月15日

キーワード／①塩類細胞 Ionocyte

②濾胞構造 Follicular structure

③トラザメ Cloudy catshark

④胚 Embryo

⑤鰓 Gill

2020年度交付額／800,000円

研究発表／学会および口頭発表

染谷友美子 他(共著)「トラザメ胚の鰓で観察された濾胞状塩類細胞の発達過程の観察とイオン輸送体機能の検証」日本動物学会第91回大会、オンライン開催、2020年9月

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

生き物にとって体内環境をある一定の範囲内に保つ恒常性の維持は、生命を維持する上で必要不可欠である。川や海などの水圏環境は淡水と海水、軟水と硬水などイオン組成が多様に変化するため、そこに生息する魚類は独自の浸透圧調節機構を発達させてきた。現生魚類の大部分を占める硬骨魚では、鰓(えら)に存在する塩類細胞がイオン調節に最も重要な役割を果たすことが知られている。塩類細胞にはイオンを取り込む淡水型とイオンを排出する海水型が存在し、環境水と接する頂端膜および体内側の側底膜に様々なイオン輸送体が局在することでイオンを能動的に輸送している。一方、魚類を構成するもうひとつの大きなグループでサメやエイを含む軟骨魚類については、塩類に加え高濃度の尿素を体内に維持することにより、体液浸透圧の調節を行っていることが知られている。成魚を用いた先行研究により、軟骨魚の鰓にもイオン輸送の駆動力となるタンパク質 Na^+/K^+ -ATPase や V-ATPase を強く発現する塩類細胞が多数存在することが示されてきた。しかし、イオンの排出が必要な海中にもかかわらず塩類細胞はイオン取込型に類似したイオン輸送体の局在を示すなど、塩類細胞の浸透圧調節における役割は明らかになっていない。本研究の先行研究により、トラザメ胚が二次鰓弁を発達し始める時期に、鰓で塩類細胞の集団構造も発達する様子が観察された。この集団構造は成魚でも見られるものの、胚期に特に発達する。そこで、本研究ではトラザメ胚の鰓に存在する塩類細胞集団に着目することで、まだ謎が多く残る軟骨魚類の塩類細胞の機能を明らかにするこ

とを目的とした。これまで軟骨魚類の浸透圧調節の研究は成魚を中心に行われてきたが、胚に着目することで成魚では明らかにできなかった新規機能を解明することが期待される。本研究では、まず塩類細胞集団の機能を明らかにするため、成魚の塩類細胞で発現が確認されているイオン輸送体 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$, V-ATPase , $\text{Na}^+/\text{H}^+\text{-exchanger 3}$ の抗体を用いて蛍光免疫組織化学染色をおこなった。次に、トラザメ胚の鰓をパラフィンに包埋し、連続切片を作製した。これを $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ または $\text{Na}^+/\text{H}^+\text{-exchanger 3}$ に対する抗体を用いて免疫組織化学染色し、この染色後の連続切片を用いて立体構造解析を行うことで、塩類細胞集団の立体構造および鰓での分布を明らかにした。

2. 研究経過および成果の概要

トラザメ胚の鰓を用いて二重免疫組織化学染色を行った。まず、塩類細胞においてイオン輸送の駆動力となることが知られている $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ と V-ATPase を同時に検出したところ、これらのイオン輸送体は別々の細胞に局在することが明らかになった。また、塩類細胞の集団構造には $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ は存在するが、 V-ATPase は発現していないことが示された。次に、 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ と $\text{Na}^+/\text{H}^+\text{-exchanger 3}$ を検出したところ、塩類細胞集団は側底膜に $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ が頂端膜に $\text{Na}^+/\text{H}^+\text{-exchanger 3}$ が局在している様子が観察された。ここから、トラザメ胚の塩類細胞は成魚と同様に、 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ と V-ATPase をそれぞれ発現する type A および type B の二種類の塩類細胞が存在し、塩類細胞集団は type A に機能が近いことが示唆された。また、この塩類細胞集団が Na^+ と H^+ の輸送を行い、イオン調節及び酸・塩基調節に関わっていることが示唆された。次に、 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ または $\text{Na}^+/\text{H}^+\text{-exchanger 3}$ を免疫組織化学染色により検出した連続切片の立体構造解析により、塩類細胞集団の構造を調べた。その結果、塩類細胞集団は複数の塊が並んで存在し豆のサヤの様な構造をしていることが示された。また、この構造は頭部側の鰓隔膜にのみ存在し、鰓弁上および尾部側には存在しないことが明らかになった。以上の結果から、孵化前のトラザメの鰓で発達する塩類細胞は、環境水に効率良く接する頭部側の鰓隔膜に集中して位置し、酸・塩基調節を行っていることが示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

今年度の研究成果により、トラザメの胚期に鰓で発達する細胞集団は塩類細胞から構成され、酸・塩基調節およびイオン調節を担っていることが示唆された。また、その細胞集団の立体構造および器官内の分布を明らかにした。今後は、 pH を変化させた環境水にトラザメを馴致させるなどの飼育実験を行い、この細胞集団の機能をより詳細に明らかにする必要がある。

Summary

Osmoregulation is essential for maintaining internal homeostasis to ensure the normal operation of cell functions and activities. In teleost fishes, as in most vertebrates, plasma osmolality is maintained within narrow physiological ranges, equivalent to about one-third of seawater osmolality. It is well known that branchial ionocytes are important osmoregulatory sites for maintaining ionic balance in the body fluid. On the other hand, marine elasmobranch fish, such as sharks and rays, maintain high concentration of urea in addition to Na^+ and Cl^-

such that osmolarity remains slightly hyper-osmotic to seawater. Ionocytes also have been found in elasmobranch gill epithelia, but their ionoregulatory function is still poorly understood. Two types of ionocytes, Na⁺/K⁺-ATPase-rich cell (type-A ionocyte) and V-ATPase-rich cell (type-B ionocyte), have been found in the gills of adult elasmobranch fish, and these cells are considered to function primarily in acid-base regulation. In preliminary experiment, we found an aggregate structure of Na⁺/K⁺-ATPase-rich cell in the gills of catshark embryo. The aggregate of Na⁺/K⁺-ATPase-rich cell have been found in the gills of adult Japanese banded hound shark (Takabe et al., 2012, *Cell Tissue Res*, 384, 141-153). However, the structure is more developed in the embryo shark gill and the size is much larger than those of adult gills. In the present study, we aimed to elucidate the ionocyte function in elasmobranch fish. First, we examined the distribution of Na⁺/K⁺-ATPase, V-ATPase, Na⁺/H⁺-exchanger 3, which is known to be localized in ionocytes of adult elasmobranch, by the fluorescent immunocytochemical staining. Na⁺/H⁺-exchanger 3 is detected in the apical membrane of ionocyte aggregates in addition to Na⁺/K⁺-ATPase in the basolateral membrane. This finding indicates that the aggregates of ionocytes are involved in Na⁺ and H⁺ transport. Next, we investigated the 3D structure of Na⁺/K⁺-ATPase-rich cell aggregates by three-dimensional reconstruction method from serial sections. The results showed that aggregates of ionocytes look like bean-pod structure and their distribution was concentrated on the anterior side of gill septum. Our findings indicate that the ionocyte aggregates were distributed in the anterior side of gill septum and might contribute to the ion regulation and acid-base regulation.

「利害」が生じる日中異文化接触場面におけるイン/ポライトネス研究

Im/politeness seen in the benefit-oriented conversations between Chinese and Japanese

研究代表者 谷智子（情報連携学部情報連携学科）

研究期間／2020年6月25日～2021年3月15日

キーワード／①イン/ポライトネス

Im/politeness

②異文化接触場面

Intercultural contact situation

③利害

Interests

④ビジネスコミュニケーション

Business communication

2020年度交付額／ 910,000円

研究発表／学会および口頭発表

- 1 「行為促進型表現における語用論的認証ストラテジー」, 『比較文化研究』141, 日本比較文化学会（論文）
- 2 行為促進表現におけるポライトネス表現の日仏比較, （於：日本フランス語学会, オンライン開催）（口頭発表）

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究は、中国語母語話者と日本語母語話者の「接触場面」に関して、実際の会話データの分析を通して、ポライトネスの観点からその実態を明らかにすることを目的とする。また、これまで包括的に明らかにされてこなかったポライトネスのあり方を詳察することで、ポライトネス理論に新たな一考察を与えることも目的とする。

研究の方法としては以下の通りである。本研究ではポライトネス理論について、文献調査を進めながら、実際の会話データに基づく実証研究を進めている。まず、理論については、従来、最も影響力のあるとされてきた **Brown and Levinson(1987)**の理論を批判的に捉え、新たな理論的な枠組みを見出していきたいと考えている。これまでの先行研究において、上記の理論は一発話レベルや短いやりとりのみを考察の対象としているため、コミュニケーションを包括的に捉えられないという批判がある。また、円滑なコミュニケーションを遂行することが前提になっている理論でもあるため、それ以外の目的を持ったコミュニケーションを捉えきれないとも言われている。また、欧米の言語を主な考察対象としており、日本語や中国語をはじめとするアジア言語を捉えきれないことも批判の対象となっている。本研究では、上記の批判を参照した上で、生の会話データをもとに、これまで、あまり注目されてこなかった利害が生じる会話に注目することで、より包括的にコミュニケーションを捉えていきたい。また、日本語や中国語の背景にある文化や社会なども含めて考察を進めることで新たなポライトネスの側面を見出したいと思っている。本研究では、実際のデータをもとにそこから理論を形作っていく”discursive approach”の手法を取る。そのために、まず、文献調査により最近のこの種のアプローチの動向を調査している。

また本研究では生の会話データが重要になってくる。使用データについては、実際の会話データを収録（録音・録画）し、それをもとに議論を進めている。また、人々がコミュニケーションにおいてポライトネスをどのように意識しているかという意識調査も行っている。意識調査については、インタビューおよび紙面でのアンケートを進めている。

2. 研究経過および成果の概要

これまで、主に、日本語と中国語による日常会話やビジネス会話のデータを収録してきている。しかし、会話参加者の属性などに偏りがあるため、より多くの種類の会話データを集める必要がある。今年度に関して、当初は様々な場面での会話データを収集し実証研究を進める予定であったが、新型コロナウイルスの影響もあり、会話場면을収集することは難しかったため、主に日中接触場面を経験した者の意識調査をオンラインで行った。特に日本及び中国でビジネス会話を経験した者を対象とし、接触場面におけるポライトネス意識についてインタビューをした。そこで、様々なアジア言語及びビジネス会話に特有のポライトネスストラテジーを会話参加者が意図的に行使していることが明らかになった。また、日中コミュニケーションにおいて、異なるフェイス概念（面子概念）があることも明らかになった。「面子」という概念は日中共に存在するが、その捉え方やその概念がコミュニケーションに与える影響はそれぞれの文化で異なることがわかった。特にこの「面子」概念については、近い将来に学会で発表する予定である。

また、理論面については、ポライトネスに関して主に日本語に焦点を当て、ヨーロッパ言語との比較によって日本語における語用論的ストラテジーおよびポライトネスの新たな側面を示した。（上記研究発表1，2）

3. 今後の研究における課題または問題点

今後も上記の実証研究と理論研究を進めていきたい。今後の課題としては、実際の日中接触場面のあり方を包括的に明らかにすべく、実際の会話データを増やすことが必要である。これまでの会話データは性別や職種などに偏りがあったため、より幅広い属性の者に対して調査を行いたいと思っている。今回は新型コロナウイルスの影響で収集が不可能であったため、今後、多様なデータの収集を進めていく。

ポライトネスに関してはこれまで文末の文体など限られた現象にのみ焦点化して、ミクロなレベルの考察が行われてきていたが、単語レベルから文レベル、そして談話レベルへと視野を広げてよりマクロなレベルでポライトネスを捉え、ポライトネスのあり方を包括的に示していくことを試みたい。

また、アジア言語の実態を明らかにするためには、他の文化圏の言語と比較し、考察する必要がある。現在はフランス語との比較を行っているが、今後は他の言語との比較も進めていきたいと考えている。

最後に、将来的には、本研究で得た見地をもとに、教育やビジネスの場で活かせるようなコミュニケーションのモデルを示していくなど、何らかの形で社会生活において応用する方法を模索していきたい。

Summary

This research aims to figure out how Chinese and Japanese show “Politeness” in their conversations, focusing on the politeness strategies and face managements. In previous study on politeness, many researchers refer to the politeness theory of Brown and Levinson (1987). However, recently, there are critical opinions on the theory that points out that they are only analyze one utterance or short series of utterances. Moreover, other researcher points out that other languages besides American and European language, such as Japanese or Chinese cannot be explained by the theory. It means we should have other theoretical frameworks. Therefore, this study aims to figure out new aspects of politeness by focusing on the conversation between Chinese and Japanese.

Furthermore, most of the previous study on politeness focus on how people try to conduct conversations “smoothly”, but when we pay attention our daily conversations, there are many cases that smooth conversations are not aimed at. If we would like to understand our daily, actual conversations comprehensively, we also have to focus on such a conversation in which people ignore maintaining “face” and focus on other goals besides smooth communication. This study will focus on benefit-oriented interactions such as business communication in which the main interests of people are their “actual profit” and “efficiency” of communications. By focusing on this kind of conversations, it is sure that we can find the new aspects of politeness.

In other words, this research aims at following two points:①to figure out the Politeness shown in the benefit-oriented conversations, ②to construct the new theoretical framework of politeness.

As a methodology, this research takes the “discursive approach” which is firstly analyze the actual conversational data and then construct the theoretical framework from the certain data. Therefore, actual conversational data is really important in this study. Until now, several conversational data and follow-up interview data already have been collected.

For now, business communication data have been collected and analyzed, but in order to comprehensively understand our conversations, more data should be collected. For this year, I was planning to collect the new conversational data, but I could not (because of the current situation on Corona virus). Instead of collecting conversational data, I conducted the follow up interviews to the participants of the previous conversational data. After collecting the data, I figured out the difference of the understanding of “face” between Chinese and Japanese. Both Chinese and Japanese culture have the notion of “Face(面子(“mianzi” in Chinese and “mentsu” in Japanese))”, but it figured out that they understand that differently. In the previous study of politeness , many researchers have focus on the notion of “face” but it is new to figure out the notion of face and face managements from the actual data. In the near future, I am planning to publish a paper focusing on this matter.

関数解析的手法のネットワーク解析への応用

Application of functional analysis to network analysis

研究代表者 本多 泰理(情報連携学部情報連携学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①関数解析	Functional analysis
②ニューラルネットワーク	Neural network
③機械学習	Machine learning
④偏微分方程式	Partial differential equation
⑤無限次元力学系	Infinite-dimensional dynamical system

2020 年度交付額／ 700,000 円

研究発表／学会および口頭発表

【査読付論文】

- Hirotada Honda, "On a partial differential equation based Neural Network", IEICE Comex, vol.10 (2021), No.3, pp.137--143.
- Hirotada Honda, "On Continuous Limit of Neural Network", Proc. of NOLTA 2020.
- Hirotada Honda, "A novel framework for reservoir computing with inertial manifolds", to appear in Proc. ICAIIC 2021.

【口頭発表(予定含む)】

- Hirotada Honda, "Continuous limit of neural network", 電子情報通信学会 ソサエティ大会(2020 年 9 月 18 日, オンライン).
- Hirotada Honda, "Approximating multi-layer neural network by an optimal control of PDE", 応用数理学会 2020 年 年会(2020 年 9 月 8 日, オンライン) .
- Hirotada Honda, "On Continuous Limit of Neural Network", NOLTA 2020(2020 年 11 月 17 日, オンライン) .
- Hirotada Honda, "Continuous limit of neural network-based multiclass classification", 日本数学会 2021 年年会(2021 年 3 月 19 日, オンライン).
- Hirotada Honda, "A novel framework for reservoir computing with inertial manifolds", ICAIIC 2021(2021 年 4 月発表予定, オンライン).

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究では、関数解析的観点からニューラルネットワークによる機械学習法について検討を進めたが、大きく以下の 2 つの項目について検討を進めた。以下、それぞれ①②として記載する。

- ① 時系列予測のための機械学習法である **reservoir computing** について、無限次元力学系の理論を応用し、より効率よく、かつ理論的に望ましい性質が満たされる手法を提案した。その性質とは、i)時間経過とともに所定の速度で過去の情報を忘却するはたらきを示す”echo state

property”，ならびに，ii) 異なる入力信号を識別するはたらきである”separation property”である．以下，当該対象に対する検討内容について詳述する．第一に本検討では，力学系の理論を最大限活用すべく，reservoir の時間挙動を，まずは inertial manifold を有する連続時間の力学系として設定した．さらに当該力学系はある種の消散性を満たすことから，非線形半群の理論を援用可能であり，所与の入力信号と初期条件に対応する解が一意に存在すること，ならびに同一の入力信号に対しては，初期条件が異なる 2 つの解が所定の速度で漸近することを示し，echo state property が満たされることを理論的に示した．また，当該力学系が，緩和された形ではあるが，所定の条件下において separation property を有することを証明した．ここでは主に Fourier 変換によるスペクトル領域上での解の評価を用いた．

第二に，前記 reservoir が従う力学系を inertial manifold 上に射影して得られる常微分方程式系(inertial form)を計算し，また当該常微分方程式系に含まれる inertial manifold の表現を，その近似(approximated inertial manifold)表現を用いて取り込んだ．これにより，前記 inertial form が閉じた形の常微分方程式系として表現され，より簡易な形で reservoir computing を再定義することに成功した．

第三に，前記常微分方程式系の未知変数を新たに reservoir のノードと見なす発想を取り入れ，前記常微分方程式系を時間に関して離散化した差分方程式系を導出し，コンピュータ上での実装を可能とした．なお，当該差分方程式系も，元の inertial form が満たす性質を継承していることを理論的に示した．

- ② 多層ニューラルネットワークによる教師有り学習のプロセスを，連続的な偏微分方程式として近似し，解析的に扱う手法を提案した．当該手法は，2018 年に国際会議 NeurIPS にて発表された NeuralODE の発想を拡張したものであるが，NeuralODE が表現できなかったネットワークのトポロジーを表現可能な手法である．

本研究については，第一に，グラフの連続極限の概念として近年活発に研究されている”graphon”の理論を用いて，ニューラルネットワークの連続極限を考えた．これにより，当該 graphon 上での非線形偏微分方程式の最適制御問題としてニューラルネットワークの動作を近似的に表現した．

第二に，ネットワークの各ノードの状態に相当する，前記非線形偏微分方程式の解の時間大域的存在と一意性の証明を行った．また，当該偏微分方程式の最適制御問題に関数空間上での変分法的手法を適用し，その最適解の存在を示した．

第三に，前記最適制御問題における損失関数のフレッシュ微分の解析的な表現を導出し，局所最適解を得るためのネットワークの重み係数に相当する関数の更新アルゴリズムを gradient projection method を用い理論的に導出するとともに，最適解が満たす必要条件としての変分不等式を示した．また，前記フレッシュ微分が所定の関数空間(L2 空間)に属するための十分条件の抽出，ならびに L2 空間に属することの証明を行った．

第四に，非線形関数解析の知見，特に単調作用素の理論を適用することにより，所定の条件下において，前記変分不等式が一意に解を持つこと，また前記アルゴリズムの収束レートの評価が可能であること，およびその各種パラメータへの依存状況について明らかにした．

2. 研究経過および成果の概要

① 成果(査読付きは採択のみ)：査読付き国際会議 1, 口頭発表予定 1(左記国際会議, 4 月).

本助成金を活用し, 提案手法のうち入力信号がスカラー値の場合について, python 上での実装を業務委託により行った(7 月-10 月). また, それにより得られた知見と結果を論文に纏め投稿した(6 月投稿, 11,12 月に査読コメント対応時に業務委託の結果を活用. 現在査読中). また多変数入力への拡張も行い, 査読付き国際会議への投稿(12 月)・採択(3 月)を果たした.

② 成果(査読付きは採択のみ)：

査読付き学術論文誌 1, 査読付き国際会議 1, 口頭発表 4 (左記国際会議含む).

前記多層ニューラルネットワークの偏微分方程式による近似手法を回帰, 二値分類, 多値分類の各種タスクに適用し, それぞれ論文に纏め, 口頭発表(9 月 2 回および 3 月), 査読付き学術論文誌への投稿 (8 月)・採択(12 月), 査読付き国際会議への投稿 (6 月)・採択 (8 月) を果たし発表(11 月). また, 数学的な詳細をまとめた論文 (3 月投稿, 現在査読中), スパースな有向グラフの連続極限を議論する手法について, graphon 理論を活用して提案し, 関数解析的解析にニューラルネットワークを考察する手法を提案した (3 月投稿, 現在査読中).

①②とも既存検討でロシア語の文献について本助成を活用して英文への翻訳を行い, 網羅的な情報収集を行った. また論文作成時に本助成金を活用して業者の支援を受け, 完成度を高めた. 結果, 現在査読中のものを除きすべて採録に至っており, 本助成を有効に活用できたと考えている. 同時に, 本研究の意義も認められていると考える.

3. 今後の研究における課題または問題点

- ① 今後, 提案手法のうち, 多変数入力への拡張手法をコンピュータ上に実装し, 具体的に実現すること, また各種のデータに対して数値実験を行うことが課題である. また, 現状の数値実験は一期先予測に留まっているが, 自律的に長期先の予測を実現すること, またそれが有効に動作するための理論的条件の抽出が必要である.
- ② 多層ニューラルネットワークの偏微分方程式による近似手法についても, コンピュータ上への実装と数値実験, また既存の多層ニューラルネットワークとの性能面での比較, 近似精度の検証を要する. また, universal approximation property に関する議論, および所望の性質を発揮するのに要するネットワークのスケールの導出方法について理論的考察を行う予定である.

Summary

In this study, we discussed the machine learning theory based on functional analysis. We summarize the two perspectives of our study as i) and ii) below.

i) We proposed an application of the theory of the infinite-dimensional dynamical system to reservoir computing, which enables us to attain two desirable properties: a) “echo state property” and b) “separation property”. The echo state property signifies that the reservoir loses the past information with the elapse of time, whereas the separation property indicates the ability of the reservoir to distinguish two different input signals.

We proposed the formulation of a reservoir as a dynamical system that is guaranteed to possess an inertial manifold; subsequently, we demonstrated that such a reservoir possesses both the echo state property and the separation property in some relaxed sense under certain conditions.

Using the inertial manifold theory, we projected the original system on the inertial manifold and obtained a system of finite-dimensional ordinary differential equations (ODEs hereafter). This system, which we regarded as a new formulation of the reservoir, possesses the desired two prescribed properties.

Moreover, we found a time discretization of ODEs for this system that is suitable for numerical computations. We have summarized these insights in some papers. One paper has been accepted for publication as a proceeding of an international conference, which will be held in April. We will work on the implementation and numerical computations of our method in a future study and also extend our method to longer-range predictions.

ii) We proposed an approach that approximates a neural network as an optimal control of a partial differential equation (PDE hereafter). Although the idea is based on the celebrated proposal, i.e., “neural ODE” raised in NeurIPS 2018, it carries forward the information of the network topology, which the neural ODE lacks. Using the emerging theory of “graphon,” which is a continuous limit of graphs, we devised the continuous limit of neural networks.

Thereafter, we formulated the optimization control of PDEs that approximates the functionality of the original neural network. Based on the theory of functional analysis and PDEs, we demonstrated the well-posedness of the PDE, unique existence of the optimal control, explicit representation of the Fréchet derivative of the loss function as well as the functional class to which it belongs, and upper bound of the convergence ratio of the proposed algorithm.

We have summarized these insights in some papers. In summary, one paper has been accepted and published in a journal and another one is awaiting publication in a proceeding of an international conference. We have also discussed our results in four academic conferences.

We will work on the implementation and numerical computation of our method and the comparison of the result with that of the existing neural networks in the future. We will also tackle the study on the universal approximation property and the theoretical planning of neural networks.

創造性を高めるオフィス実現に向けた環境自動制御の研究

Automatic control of the office environment to enhance human creativity

研究代表者 神場 知成(情報連携学部情報連携学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①創造性向上 Creativity enhancement

②オフィス環境 Office environment

③オンライン会議システム Online conference system

④サウンド制御 Sound control

⑤会話促進 Conversation promotion

2020 年度交付額／ 773,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- 神場知成：オンラインビデオ会議の状況に応じた背景音の自動生成と共有，INTERACTION 2021（第 25 回一般社団法人情報処理学会シンポジウム）2P-06（口頭発表 2021 年 3 月 11 日）

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究は、発想時には主として物理的なオフィス空間での仕事や、その場で行われる対面の会議の快適性向上を想定し、オンライン空間は副次的に位置づけていたが、2020 年 2 月頃からの急速なコロナ禍の拡大とその長期化を受け、オンラインビデオ会議の場を主対象として進めることとした。これは働き方のニューノーマルとして、人と人とのコミュニケーションにおけるオンラインビデオ会議の長期的な重要性が大きく高まったためである。しかし、働きやすさに関する本質的な考え方は変わっておらず、次のようなものである。

- これからの社会では、一定時間内に決まった仕事をできるだけ効率的に行うことではなく、働く人の精神的な快適さを向上することが必要であり、それが結果的に、新たな発想やイノベーションにつながる。
- 働きやすさの向上という点では、人と人とのコミュニケーションの快適性向上が重要である。
- そのために、環境（たとえば光、音）の状況をセンサー等でとらえて認識し、それに基づいてその場にいる人が特に意識しないままに環境を自動制御する手法をとる。つまり「その場の状況に応じて、より快適な環境になるように動的に制御する」という方法である。

研究を進める第一段階として、急速に普及したオンラインビデオ会議システム（Zoom、Google Meet 等）で行われるミーティングや会議を対象に、会議室内のサウンド（音量や周波数）の変化を常に測定し、それに基づいてオンライン会議室内に流れるサウンドを制御するシステムを開発した。なお、ここで「サウンド」と呼んでいるのは、人間の声だけでなく周辺環境の雑音など、オンライン会議内に流れる音をすべて含むものを指している。

2. 研究経過および成果の概要

研究経過は次の通りである。

- ① 2020 年 6 月 25 日～2020 年 7 月末：
オフィスの働きやすさや会話の活性化に関連する文献調査および、実現手段の検討。
- ② 2020 年 8 月初～2020 年 9 月末：
汎用的に利用可能な実装方法の調査および実装。オンライン会議システムから会議音を取得する方法と、データ分析結果にもとづきリアルタイムにサウンド送出をするための効率的な実装。特に、汎用的なオンライン会議システム（Zoom, Google Meet 等）で動作することの確認。
- ③ 2020 年 10 月初～2021 年 1 月末：
上記実装システムの評価と改善。実際のオンライン会議で利用することにより、機能面の追加・修正。具体的には、サウンド送出におけるパラメータ（フェードイン・アウトのための時間長など）制御方法の柔軟化など。
- ④ 2021 年 2 月末～2021 年 3 月 15 日：
まとめと今後の課題の検討

成果の概要を以下に説明する。

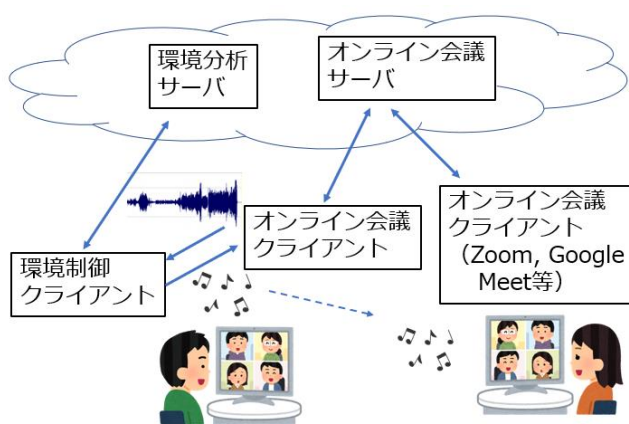


図 1. システムの概要

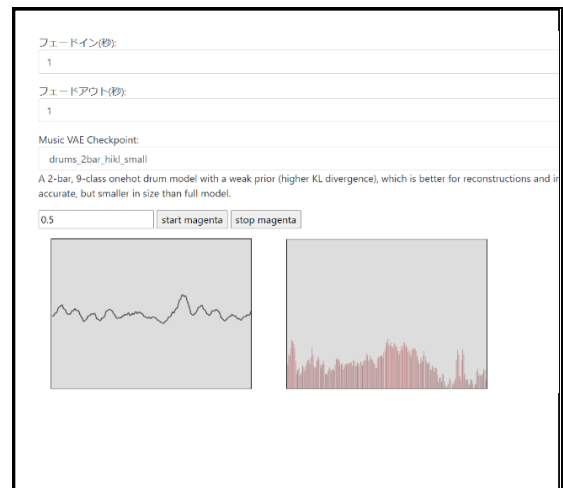


図 2. 環境制御クライアント画面

図 1 がシステム構成の概要で、図 2 は環境制御クライアントの画面例である。図 1 の右側の 3 つの構成要素は一般のオンライン会議システム（Zoom, Google Meet 等）であり、左側の環境制御クライアントと環境分析サーバが、新たに開発したものである。環境制御クライアントは、仮想的な 1 ユーザとして会議システムに参加し、会議音を取得しながらその状況に応じて、会議システムに対して環境音や BGM を自動的に送出するボットプログラムとして動作する。会議の運営上、仮想的な 1 ユーザとして参加することが望ましくない場合は、特定のユーザが自分のクライアント端末で動作させ、システムが送出するサウンドは、そのユーザ自身が送出する音（発言の声など）にミックスしても良い。

環境分析サーバは Web サーバアプリとしてアプリケーションフレームワーク Flask で実装しており、そのサーバにアクセスしたブラウザが環境制御クライアントとなる。環境制御クライアントは、WebAudioAPI を用いてオンライン会議クライアント上のサウンドを取得するとともに、状況

に応じて適切なサウンドを送出する．たとえば、「会議内で誰の発言もないときに、自動的に BGM を送る」等の動作が可能である．会議内から取得したサウンドの分析と送るサウンドの生成は、環境制御クライアント上の **JavaScript** プログラムと、環境分析サーバ上の **Python** プログラムで分担をする．それぞれのプログラムがどのような処理を担当するかは目的に応じて容易に選択可能なので、今後、本システムは、さまざまなアルゴリズムを実験するための、プラットフォームとして利用可能である．

なお、現時点で実装した背景音生成のアルゴリズムは、「沈黙の時間（一定のボリューム以下の時間）が一定秒数（たとえば 30 秒）続いたときに自動的に BGM を挿入する」といった単純なものである．BGM については、あらかじめ蓄積した 10 個程度のサウンド（波の音、鳥の声などの環境音、一般的なオフィスの雑音、クラシック楽曲など）、または、人工知能を用いた自動作曲ライブラリとして公開されている **Magenta** (<https://magenta.tensorflow.org/>) の API 呼び出しである．自動作曲ライブラリを用いているのは、今後、サンプル音や楽曲を繰り返し流すだけではなく、状況に応じて常に変化するサウンドを自動生成して送ることも予定しているためである．

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究期間において実現したのは「よりスムーズにコミュニケーションが可能なオンライン会議環境を実現するためのプラットフォーム」であり、今後はこのプラットフォーム上で、実際にさまざまな手法を試し、最適な会議環境を実現する方法を見極めることが課題となる．さらに、物理的な会議室など、リアル空間における適用可能性も検討予定である．

課題の一つとして、プライバシーを考慮した適切なシステムの実現方法の検討がある．これは、会議内のサウンドから、どのような情報を抽出したうえでサーバに送信しサーバ上で分析するか、というアーキテクチャの設計となる．また、さらにシステムを拡張するうえでは、本研究内で扱っているサウンドだけでなく、会議システム内の視覚的な表現の検討も必要になると考えている．

Summary

Use of online video conferences is rapidly increasing. There are various usage styles such as official meetings and private chat sessions. Some meetings have a rule among the members to turn on the video, and some meetings have opposite rules. The audio is turned on by everyone in some meetings, and in other meetings, it is turned on only while the speaker is speaking. Sound and silence in online conference rooms which are very different from the physical room affect the user impressions, and some people say, "I feel nervous when I have to talk" and "I can't stand the silence when a conversation stops". The effects of background sound (noise, background music, etc.) in face-to-face conference rooms have been studied so far, but in this study, we focused on the background sound of online conferences. Our system is a platform that can automatically insert appropriate background sounds in real time by monitoring the volume change and the sound frequency analysis in the commonly used online conference systems. It is implemented using JavaScript that uses WebAudio API and the server-side function to analyze the sound data. The algorithm to decide the timing to start and end the background sound is changeable flexibly, and we are planning to investigate appropriate sound control to make online conferences more comfortable.

非居住地域へのグリーンインフラ導入による都市域縮退の実現可能性

Feasibility Study on Urban Shrinkage by Introducing Green Infrastructure to Non-Residential Area

研究代表者 加知 範康（情報連携学部 情報連携学科）

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／① グリーンインフラ Green Infrastructure

② 都市域縮退 Urban Shrinkage

③ 生活の質 Quality of Life (QoL)

④ 人口減少 Depopulation

⑤ 非居住地域 Non-Residential Area

2020 年度交付額／2,000,000 円

研究発表／学会および口頭発表

・第 44 回日本計画行政学会・全国大会 2021 年 9 月予定

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

都市域縮退策の実施によって発生する非居住地域へのグリーンインフラ導入の費用対効果の検討を目指して、(1) グリーンインフラに関する文献調査、(2) 地理情報システム (Geographical Information System : GIS) データベースの構築、(3) 生活の質 (Quality Of Life : QOL) に関するアンケート調査と基本集計、を実施した。

2. 研究経過および成果の概要

(1) 文献調査

昨年度に引き続き、グリーンインフラに関する文献調査を行った。本研究が着眼している都市縮退とグリーンインフラの導入に関連する先行研究として、科研の挑戦的萌芽研究として 2016 年から 2018 年度に実施された「縮退都市におけるグリーンインフラ適用策の戦略的展開に関する研究」では、縮退都市におけるグリーンインフラ適用策の戦略的展開のためのフレームワークを、米国の縮退都市を対象として、文献調査、ヒアリング調査、現地調査などを通じて、明らかにしている。具体的には、米国の縮退都市として、フィアデルフィア市とデトロイト市を対象に、グリーンインフラに関係する計画、計画の実践をサポートするための仕組み、組織体制などを、都市スケール（トップダウン）と敷地スケール（ボトムアップ）の視点から調査・検討している。また、都市縮退に伴う空き地や空き家とグリーンインフラの整備・マネジメント施策の相互補完関係を分析している。この研究は、本研究が目指しているグリーンインフラ導入による効果の定量分析をする上で必要となるグリーンインフラの施策シナリオを検討・分類・整理する上で役立つものと考えられる。

(2) GIS データベースの構築

都市域縮退やグリーンインフラ導入に費用対効果のシミュレーションを実施するために必要となる人口、住宅、土地利用、災害ハザードマップ、都市施設、インフラ等の GIS データベースとシミュレーションの実施に必要な環境をデスクトップ PC 上に整備した。表 1 に国土数値情報（国土交通省）から入手可能な GIS データのうち、本研究に関連すると考えられるものを示す。これより全般的に種々のデータが入手できるが、10 年前が最新であるデータがあるようにデータの年度には幅があり、分析を行う上では、この点にも注意して行う必要がある。グリーンインフラの導入効果を考えたときに重要となる要素のひとつである災害・防災関連のデータは 2018、2019 年で比較的に新しいものが準備されている。

表 1 国土数値情報から入手可能な GIS データ

分類	データ
国土	<u>水域</u> ：海岸保全施設 (pt, ln, 2012)、湖沼及び貯水池 (pl, 2005)、流域 (100m grid, 2009)、ダム (pt, 2005, 2014)、河川 (pt, ln, 2006-2009) <u>地形</u> ：標高・傾斜度 (250m grid, 2009) <u>土地利用</u> ：土地利用詳細 (100m grid, 1976, 1987, 1991, 1997, 2006, 2009, 2014, 2016)、都市地域土地利細分 (100m grid, 2009, 2014, 2016)、土地利用詳細 (三大都市圏) (50m grid, 2016) <u>地価</u> ：地価公示 (pt, 1983-2021)、都道府県地価調査 (pt, 1983-2020)
政策 区域	<u>行政区域</u> ：行政区域 (pl, 1920, 1950, 1955, 1960, 1965, 1970, 1975, 1980, 1985, 1995, 2000, 2006-2020)、DID (pl, 1960, 1965, 1970, 1975, 1980, 1985, 1990, 1995, 2000, 2005, 2010, 2015)、小学校区 (pl, 2010, 2016)、中学校区 (pl, 2013, 2016)、医療圏 (pl, 2013) <u>災害・防災</u> ：避難施設 (pt, 2012)、土砂災害危険箇所 (pt, l, pl, 2010)、土砂災害警戒区域 (l, pl, 2013, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019)、洪水浸水想定区域 (pl, 2019)、津波浸水想定 (pl, 2016-2018)
地域	<u>施設</u> ：国・都道府県の機関 (pt, 2013)、市町村役場等及び公的集会施設 (pt, 2010)、市町村役場 (pt, 2014)、公共施設 (pt, 1990, 2006)、警察署 (pt, pl, 2012)、消防署 (pt, pl, 2012)、郵便局 (pt, 2013)、医療機関 (pt, 2010, 2014)、福祉施設 (pt, 2011, 2015)、文化施設 (pt, 2013)、学校 (pt, 2013)、都市公園 (pt, 2011)、燃料給油所 (pt, 2016)、地場産業関連施設 (pt, 2012)、道の駅 (pt, 2018)
交通	<u>交通</u> ：高速道路時系列 (pt, l, 2011-2019)、緊急輸送道路 (l, 2013, 2015)、バス停留所 (pt, 2010)、バスルート (l, 2011)、鉄道 (l, 2019)、鉄道時系列 (pt, l, 2012-2019) <u>パーソントリップ・交通変動量</u> ：発生・集中量及び OD 量 (l, pl, 東京都市圏：2008, 中京都市圏：2001, 2011、近畿圏：2000, 2010)、貨物旅客地域流動量 (l, pl, 2001-2016)
その他	500 メッシュ別将来推計人口 (500m grid, 2020, 2025, 2030, 2035, 2040, 2045, 2050)

注：() の記号は pt : point、ln : line、pl : polygon を示し、数字はデータの年

(3) 居住者の移転及び QOL に関するアンケート調査と基礎集計

居住者の移転及び QOL に対する選好を分析するためのアンケート調査を実施した。研究代表者がこれまでに実施してきたコンジョイント分析に対応した選択実験型のアンケートをベースとし、

移転や QOL の点から居住者の選好に関わる施設の数と距離との関係、グリーンインフラ導入の効果进行分析できるようにアンケートを設計した。対象地域は、九州地方 7 県（福岡県、佐賀県、長崎県、熊本県、大分県、宮崎県、鹿児島県）である。表 2 にサンプルサイズ・割付（セグメンテーション）を、表 3 に調査項目の概要を示す。

表 2 アンケート調査のサンプルサイズ・割付（性別 2 × 年代 7=14 セグメント、800 s）

	10 代	20 代	30 代	40 代	50 代	60 代	70 代以上	合計
男性	50	60	60	60	60	60	50	400
女性	50	60	60	60	60	60	50	400
合計	100	120	120	120	120	120	100	800

表 3 アンケート調査の項目概要

項目	説明
設問数	15 問
主な質問	1) 被験者の現在の生活環境 2) 生活環境の異なる 2 つの地域から住みたいと思う地域を選ぶ選択質問 ※生活環境の項目：居住地の交通利便性、居住地の快適性、居住地の安全性
個人属性	年齢 1 歳刻み、県、既婚・未婚、子供の有無、学生分類、世帯年収、個人年収、郵便番号

アンケート結果の一例として、図 1 に自宅から最寄り施設まで所要時間と移動手段の割合を示す。これらより、通勤・通学を除き最寄り施設への所要時間が 30 分以内の割合が約 9 割になっており、移動手段は 45.7%~61.5%でクルマ（自分で運転）の割合が最も高くなっている。その他の生活環境についても同様に現状を整理している。このような形式で現状の生活環境に質問するとともに、生活環境の異なる 2 つの地域から住みたいと思う地域を選ぶ質問を行っている。居住を選択する質問は、コンジョイント分析を適用して生活環境の各要素が居住地の選択に与える影響を分析するためのデータとして使用するとともに、月々に家賃を基準として生活環境の各要素の価値を貨幣単位で評価することができる。

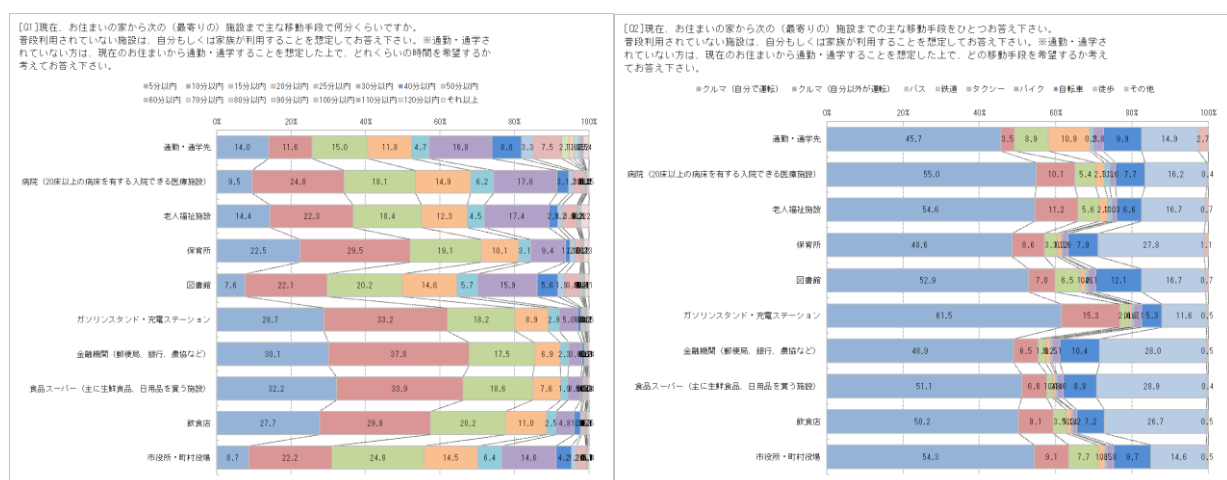


図 1 自宅から最寄り施設まで所要時間と移動手段の割合

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究では、具体的な効果の定量分析に必要となるデータ収集や居住者の生活環境に対する価値観を把握するためのアンケート調査などを実施した。今後は、基本的な集計まで実施できなかった居住者の生活環境に対する価値観の把握を、いくつかモデルを当てはめて検討するとともに、これらを実際の都市に適用してグリーンインフラの導入が居住者の生活環境に与える効果を、個人属性による違いを考慮して分析していくことが課題である。

Summary

We are here concerned with the feasibility of green infrastructure practices in a non-residential area, where residents will relocate to other regions by implementing an urban shrinkage policy. The Japanese national government has provided several kinds of cost-benefit analysis manuals for infrastructure development projects related to urban and transportation planning. However, it has not offered a cost-benefit analysis manual focusing on green infrastructure. Therefore, this study's final goal is to develop a methodology to evaluate the impact of green infrastructure-related policy on the residential quality of life. We conducted the literature survey, examine data availability and GIS-based database, and performed the questionnaire survey on residential quality of life.

As the result of the literature survey, the academic research entitled "Strategic Green Infrastructure Implementation in Shrinking Cities" supported by JSPS KAKENHI Grant analyzed the strategic implementation of green infrastructure in shrinking cities (Philadelphia and Detroit in the US). Site scale green infrastructure implementation methods and city-scale green infrastructure policies and planning are analyzed. This research will help examine green infrastructure-related policy scenarios to be quantitatively evaluated in terms of social, economic, and environmental aspects.

The simulation for cost-benefit analysis of urban shrinkage and green infrastructure needs the GIS database and simulation platform. We examined some websites providing public open data to collect GIS and statistical data. National Land Numerical Information is valuable publicly available data, including municipal boundary, natural hazard map, land use, land price, urban facilities, road, railroad station, population projection, etc. These are very useful to evaluate urban shrinkage and green infrastructure. For example, the natural hazard map was updated in 2018 or 2019, and the land price has been updated every year. However, some of them have not been updated for about ten years.

We conducted the questionnaire survey on residential quality of life to estimate individual weights for the residential environments. We collected eight hundred respondents, of which residential region is Kyushu region, and examined the residential environments' current situation such as travel time to nearest urban facilities, green space, natural hazard, etc.

So far, we collected GIS and statistical data to evaluate urban shrinkage and green infrastructure and conducted the questionnaire survey on residential quality of life and its simple tubulation. A further direction of this research will be to work quantitative evaluation using collected data and estimated individual weights for residential environments.

第二言語使用を抑制・促進する社会生態学的基盤の解明：

関係流動性に着目して

The Socio-ecological Factor Inhibiting or Facilitating Second Language
Use:
From the Perspective of Relational Mobility

研究代表者 伊藤 健彦（情報連携学部情報連携学科）

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①第二言語	second language
②コミュニケーション	communication
③関係流動性	relational mobility
④社会生態学	social ecology
⑤日本人	Japanese people

2020 年度交付額／613,000 円

研究発表／学会および口頭発表

伊藤健彦 (2021). 関係流動性が日本人の英語 Willingness to Communicate に与える影響 社会心理学研究, 37(1).

Ito, T. (2020). The influence of networks of general trust on willingness to communicate in English for Japanese people. *Scientific Reports*, 10(1).

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究は、関係流動性が日本人の英語使用に与える影響を検討するものである。関係流動性とは、社会生態的要因であり、特定の個人が周囲の対人関係や集団を選択できる自由度を示す。関係流動性が高い環境にいる個人は、英語コミュニケーションの積極性が高く、流動性が低い環境にいる個人は、英語コミュニケーションの積極性が低いという仮説のもと研究を行った。申請者が従来行ってきた研究では、関係流動性が質問紙で測定されていた。しかし、自己報告による流動性の測定では、準拠集団効果によって、同じ環境にいる人々でも回答がばらつきやすい。よって、社会における人々の流入と流出の程度の客観的な大きさを表す居住地流動性 (Oishi, Rothman, Snyder, Su, Zehm, Hertel, Gonzales, & Sherman, 2007) に着目し、地域のレベルで関係流動性を測定した。

具体的には、日本の中で流動性が高い県（東京など）と低い県（秋田など）(岩谷・村本, 2017) の日本人を対象として、オンライン社会調査を行った。流動性が高い県の人々1000人と低い県の人々1000人（20代から60代の男女）が対象となった。調査項目は、関係流動性に関する項目と、英語コミュニケーションの積極性に関する項目、そして積極性に最も影響すると言われている英語コミ

コミュニケーションの自信 (Elahi Shirvan, Khajavy, MacIntyre, & Taherian, 2019) に関する項目であった。なお、統制要因として、調査参加者の個人年収と世帯年収を測定した。

2. 研究経過および成果の概要

調査の結果、まず、関係流動性の高い県と低い県に住む人々において、関係流動性尺度の得点に差が見られ、関係流動性の高い県の方が低い県よりも得点が高かった。このことから、本研究で選んだ県の違いは、社会環境である関係流動性の違いを生むことが確かめられた。

また、関係流動性の高い県と低い県に住む人々において、英語コミュニケーションの積極性に差が見られた。具体的には、関係流動性の高い地域に住む人々は、低い地域に住む人々よりも英語コミュニケーションの積極性が高いという結果となった。この結果から、地域のレベルで測定した関係流動性が日本人の英語コミュニケーションの積極性に影響していることが分かった。

次に、積極性に最も影響すると言われている英語コミュニケーションの自信が、流動性が積極性に与える影響を媒介するかどうかを検討した。その結果、関係流動性が上がれば上がるほど、英語コミュニケーションの自信が上がり、そして英語コミュニケーションの積極性が上がるという媒介効果が見られた。このことから、各地域における人々の英語コミュニケーションの積極性を規定する心理的要因として自信が機能していることが示された。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究では、社会生態学的要因である関係流動性が日本人の英語コミュニケーションの自信を通して、積極性に影響することが示された。しかし、関係流動性が高まるとなぜ英語コミュニケーションの自信が高まるのかは明らかに出来ていない。関係流動性が高くなると、周囲の他者が流動的なため、特定の他者の前で失敗しても代替他者と関係を築くことが容易となる。よって、他者からの評価に不安を感じる評価懸念が低下することが考えられる。評価懸念が低下するにつれて、他者に対するコミュニケーションの自信が上昇する可能性がある。今後は、評価懸念の観点を取り入れ、関係流動性がなぜ英語コミュニケーションの自信を高めるのかを検討する必要があるだろう。

従来の英語コミュニケーション研究は学習動機や自信など心理的要因に着目したものが多く見られたが、本研究は関係流動性という社会環境の要因を取り入れた点で新規性があると言える。関係流動性は、日本では低く、アメリカでは高いという調査結果がある。以前から、日本人の英語コミュニケーションの積極性は低いと指摘されていることを踏まえると (Yashima, Nishide, & Shimizu, 2004)、積極性の向上には関係流動性が関わっていることが示唆される。ただ、社会生態学的要因と心理的要因がどのように影響し合って日本人の英語コミュニケーションの積極性に影響を与えるのかはいまだ明らかとなっていない。今後は、特定の社会環境において積極性にプラスの効果がある心理的要因、もしくはマイナスの効果がある心理的要因を検討していくことで、日本人の英語コミュニケーションの積極性への介入に示唆を与えていく必要がある。

Summary

This study aims to examine the effect of relational mobility on English communication in the Japanese population. Relational mobility is defined as the degree of freedom to choose interpersonal relationships in a specific environment. It was predicted that people in a society with high relational mobility have more positive attitudes toward English communication. In

contrast, people with low relational mobility hold more negative attitudes. Previous studies have measured relational mobility with questionnaires; however, an issue with self-reporting is that individuals can perceive the same social environment differently. Therefore, this study measured area level relational mobility. An online social survey was conducted targeting Japanese people living in prefectures with high and low relational mobility.

The survey revealed a difference in attitudes towards English communication between areas of high and low relational mobility. Specifically, people located in prefectures with high relational mobility held more positive attitudes than those in prefectures with low mobility. This suggests that area level relational mobility may influence attitudes towards English communication. Furthermore, the effect of area difference was mediated by confidence in English communication, which is considered the strongest predictor of attitudes. This suggests that confidence functions as a psychological factor in each social environment.

This study did not determine why relational mobility increased confidence in English communication. If relational mobility increases, then interpersonal relationships will be flexible. If people fail in communication, then it is easy to create new relationships with alternative others. In short, evaluation concern from others decreases as relational mobility increases, and the decreased concern increases confidence in their English communication. Therefore, future studies should examine the mediating role of evaluation concern. Furthermore, it is said that relational mobility in America is higher than in Japan. It is also demonstrated that positive attitudes toward second language communication is low for Japanese people. From these perspectives, relational mobility is an important factor to increase attitudes. However, it has not been determined how these socio-ecological and psychological factors interact and influence English communication in Japanese people. Future studies must examine what psychological factors have positive or negative effects on attitudes towards English communication in specific social environments in order to find an intervention.

個人投資家の証券投資に関する行動・意思決定の総合的研究

A comprehensive study of the behavior and decision-making of individual investors regarding securities investment

研究代表者 大野 裕之(経済学部国際経済学科)

研究分担者 林田 実(北九州市立大学経済学部)

研究期間／2020年6月25日～2021年3月15日

キーワード／①証券投資

②有価証券保有総額

③確定拠出年金

④機械学習

⑤Causal Tree

2020年度交付額／821,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・東洋大学経済学部『経済論集』第47巻（2021年度中に発刊）への掲載（予定）
- ・日本応用経済学会 2021年度秋季大会（北星学園大学）での口頭発表（予定）

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

日本証券業協会『個人投資家の証券投資に関する意識調査』2016年版の個票データで、有価証券保有総額、確定拠出年金の加入有無を目的変数、性別を処置変数、世帯所得、個人所得、年齢を説明変数とし、機械学習の Causal Tree の手法を適用した。

2. 研究経過および成果の概要

家計の証券投資が進んでいないのは何故か。それを探るべく、これまで様々な政策・制度変更に関心を当てた実証分析が行われてきている。その中でも、アンケート調査の個票データを用いた研究では、個人属性などを説明変数にとり、政策効果を表す目的変数への影響を、「質的変数に関する推定法」で追うことが多い。しかしながら、これらの手法は属性ごとの政策効果はターゲットにしておらず、仮にターゲットにしたとしても、技術的な限界がある。ところが昨今、汎用性を増している機械学習の手法を使えば、このような分析も可能になる。そのような機械学習の中でも最近、Athey and Imbens (2016) らによる Causal Tree という斬新な分析手法が、さまざまな研究で急速に使用されるようになってきている。そこで本研究は、この Causal Tree を用いて個人の貯蓄投資行動を分析することとした。

具体的には、有価証券保有額と確定拠出年金への加入・非加入を目的変数に据える。本稿の目的が、証券投資が進まない理由を探ることであることから、有価証券保有額を目的変数に据えることには何の異論もなかろう。ここで確定拠出年金の加入の有無を目的変数に据えるのは、以下の理由による。確定拠出年金は有価証券と同じく、老後の貯えとして用いられる金融資産

で、制度も比較的新しく、公的年金の将来不安が増す中、おおきな注目を集めているからである。

本研究で用いる『個人投資家の証券投資に関する意識調査』は 2006 年より、日本証券業協会が毎年 6～7 月に実施し、9～11 月に結果を公表しているアンケート調査である。対象者は証券投資を行っている全国の、満 20 歳から 89 歳までの投資家である。毎年の調査対象者数は 2015 年調査までは 2100～2300 人で、回答率は約 50%、回答者数はおおよそ 1,000 人、2016 年調査では調査対象者数 5000 人、回答者数は 2024 人である。ここまでは郵送調査であったが、2017 年以降はインターネット調査に切り替えて、5,000 程度の回答者数を確保している。質問項目は、年齢、性別などのフェース項目の他、株式、株式投信、債券など証券投資に関する多岐にわたる項目がある。ただし、毎年、質問項目が多少変わっていることには注意を要する。本研究では、2016 年のデータを用いる。先述したように、有価証券保有額を目的変数とした Causal Tree と確定拠出年金への加入・非加入を目的変数とした Causal Tree とを作成した。また、説明変数としては、世帯所得、個人所得、年齢をとり、処置変数としては性別を採用した。機械学習の特性としては、多くの説明変数が存在する状況が有利であるが、従来の研究成果を踏まえ、かつ、Causal Tree の挙動を解析するということも本研究の目的であることからそのようにした。

有価証券保有額の分析では、全 8 つのリーフ中、全体の 81%を占める 6 つのリーフで、女性の有価証券保有額は男性より少ないことが確認された。一方、世帯収入が 500 万円未満の、比較的所得の低い世帯で、個人収入が 300 万円未満、年齢が 45 歳未満の比較的若い女性と、世帯収入が 1,000 万円未満でかつ個人収入が 500 万円以上の女性では、女性の有価証券保有額が男性よりも多くなった。低所得世帯で有業の女性、世帯年収は中庸でありながら、個人年収は高い部類の女性は、男性よりも証券投資に励んでいることが示された。

確定拠出年金の分析でも、全 8 つのリーフ中、全体の 91%を占める 6 つのリーフで、男性の方が女性より加入率が高いことが確認された。制度の複雑さや、確定拠出型年金のひとつである企業型は、企業に勤務していなければ加入ができないことが、この男女差の背景と考えられる。逆に女性の方が、加入率が高いリーフは、どちらも年齢が 65 歳以上で、世帯年収が 300 万円未満と低いか、逆に 1,500 万円以上と高額収入世帯かの両極端である。収入の低い層では、夫の遺族年金も低いため、老後の生活保障としては不十分であり、女性は積極的に自分の老後を考えてため、一方、所得の高い層では、男性は公的年金受給額も多く、また貯蓄も相当額あるため、男性が確定拠出年金への加入の誘因を持っていなかったため、男性が低いということではないかと考えることが可能である。

3. 今後の研究における課題または問題点

処置変数は性別以外にも様々なものが考えられる。目的変数についても、『調査』には株式、公社債、投資信託それぞれの保有額を問う問いもあるが、今回はその合計額を用いた。説明変数についても、今回用いたもの以外に多くの候補が考えられる。そうした中、今回の研究は処置変数、目的変数、説明変数のいずれにおいても限定的に取り上げたのは、紙幅の都合もさることながら、Causal Tree という、未だ多くの人になじみのない手法を紹介することを貢献の一つに据えたためである。故に、今後の研究においては、まず、さまざまな目的変数、処置変数、説明変数の組み合わせで分析を拡張して行くことが考えられる。併せて、Causal Tree を

発展させた Causal Forest というのも昨今、盛んに研究され、また諸問題に活用されつつある。今後は、本論文が追及するテーマに関しても、この Causal Forest の活用が期待されるところである。

Summary

We applied the Causal Tree method of machine learning to individual data from the 2016 edition of the Japan Securities Dealers Association's "Survey of Individual Investors' Views on Securities Investment." To do so, we use total securities holdings and defined contribution (DC) pension plan membership as objective variables, gender as the treatment variable, and household income, personal income, and age as explanatory variables.

In the analysis of securities holdings, it was confirmed that women hold fewer securities than men in six of the eight "leaves," accounting for 81% of the total. On the other hand, women in relatively low-income households with household incomes of less than ¥5 million, personal incomes of less than ¥3 million, and relatively young women under the age of 45, and women with household incomes of less than ¥10 million and personal incomes of more than ¥5 million, held more securities than men. Employed women in low-income households, and women in the moderate household income but high personal income category, were shown to be more likely than men to invest in securities.

The analysis of DC pension plans also confirmed that men are more likely than women to participate in six of the eight "leaves," which account for 91% of the total. The complexity of the system and the fact that, for a corporate-type defined contribution pension plan, you must work for a company to be eligible to join, may account for this difference. On the other hand, the "leaves" in which women are more likely to participate are those in which both men and women are aged 65 or older and have household incomes of either less than ¥3 million or more than ¥15 million. In the lower-income group, the husband's survivor pension is also low, so public pension is insufficient, and thus the women actively consider their own retirement, while in the higher-income group, the men receive a larger public pension and have substantial savings, so they had no incentive to join a DC pension plan. It is also possible that this is because men did not have an incentive to join a DC pension plan.

ビジネスモデルの漸進的逸脱プロセスの追跡

Tracing business models' continuous deviational change process

研究代表者 山口 裕之(経営学部経営学科)

研究分担者 阿部 智和(北海道大学経済学研究院)

大原 亨(経営学部経営学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①ビジネス・モデル business model

②逸脱的变化 deviational change

③組織変化 organizational change

④経時的事例分析 longitudinal case studies

⑤コンビニエンス・ストア convenience store

2020 年度交付額／800,000 円

研究発表／学会および口頭発表

未発表（国内査読誌に論文を投稿済み、現在審査中）

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究の目的は、ビジネスモデルの逸脱的变化が継続的・漸進的に生じるプロセスを記述することで、そのメカニズムを明らかにすることにある。

事業環境が急速かつ劇的に変化するなか、企業はそのビジネスモデルを大きく変化させる必要にしばしば迫られる。こうしたビジネスモデル変革の実務的な重要性を背景に、2010 年前後から、ビジネスモデルの変化プロセスに注目した研究が展開されている（e.g. Chesbrough, 2010; Chesbrough & Rosenbloom, 2002; Zott et al., 2011）。しかしながら、その変化プロセスに関する理解は未だ限定的である。先行研究では、ビジネスモデルの慣性が議論の前提に置かれており、ビジネスモデルの逸脱的变化は一時的ないし断続的なプロセスを通じて生じると想定されてきた（Chesbrough, 2010; McGrath, 2010; Rindova & Kotha, 2001）。しかしながら、この想定に反し、ビジネスモデルの逸脱的变化が漸進的ないし継続的に生じる事例も散発的ながら報告されている（Demil & Lecocq, 2010; Foss & Stieglitz, 2015）。こうしたビジネスモデルの逸脱的变化が漸進的に生じるプロセスについては十分に明らかになっていない。

この既存研究の間隙を埋めるべく、株式会社セコマ（以下、セコマ）を対象とした経時的事例分析を行った。セコマは、コンビニエンス・ストア（CVS）事業に関して独自性の高いビジネスモデルを有する企業として近年注目されている。われわれは、セコマを対象とした予備調査を既に行っており、当該企業において生じたビジネスモデルの逸脱的变化が、既存研究では説明できない、決定的事例（critical case; Yin, 2014）であることを明らかにしている（阿部・山口・大原, 2019a; 2019b; 2020）。この決定的事例、すなわちビジネスモデルの逸脱的变化が継続的に生じた事例を対象とした経時的分析を通じて、ビジネスモデルの変化メカニズムに関する理解の拡張を試みた。

事例分析では、セコマの CVS 事業のスタート時点である 1971 年から 2018 年 3 月までを対象とし、同社の公開情報と、新聞（『日本経済新聞』・『日経 MJ（日経流通新聞）』・『北海道新聞』・『日本食糧新聞』）および雑誌（『日経ビジネス』・『週刊東洋経済』・『コンビニ』・『激流』）記事を網羅的に収集した。これらのデータに基づき、セコマのビジネスモデルの変化プロセスの記述をおこない、そのプロセスに関連しうる理論を広く参照しつつ分析を進めた。

2. 研究経過および成果の概要

当初、セコマのビジネスモデルの変化プロセスに加え、それと並行して展開された組織プロセスを併せて記述・分析を進める計画であった。この計画の下、社内資料およびインタビュー・データを中心とした調査を予定していたものの、新型コロナ渦の下では、現地訪問を必要とする上記の調査の実施は難しく、研究アプローチの変更に迫られた。われわれは、組織内プロセスの調査・分析を延期し、ビジネスモデルの変化プロセスの記述・分析の精緻化に専念した。

具体的には、まず、セコマのビジネスモデルの記述に用いる枠組について理論的検討を行った。ビジネスモデルという概念は、未だ萌芽的段階にあり、統一的な定義や共通理解が存在せず、分析対象・単位に応じて多様な記述枠組が提案されつつある（Morris et al., 2005）。このことに起因して、その概念的貢献の不明確さ（e.g., Porter, 2001）や記述の恣意性（Demil & Lecocq, 2010）が批判されている。これらの問題に対処すべく、ビジネスモデルの静的記述を巡る議論のレビューを行った。この検討を通じて、価値の創造と獲得に向けた活動システムのアーキテクチャを記述することによって戦略論に対する理論的貢献がビジネスモデルに期待されることが明らかとなり、提案価値・活動・経営資源という 3 種類の構成要素とそれらの依存関係からなるシステムとしてビジネスモデルを記述する枠組を構築した。加えて、記述の恣意性を回避すべく CVS のビジネスモデルを対象とした主要な既存研究（矢作, 1993, 1994; 小川, 2000; 川辺, 2004; 田村, 2014）をレビューし、それらのビジネスモデルの記述を参照した。

つぎに、構築した記述枠組を通じて、複数時点におけるセコマのビジネスモデルの記述を試みた。この記述を通じて、①1990 年代中頃を境にセコマのビジネスモデルが競合他社と同様のモデルから漸進的に逸脱したことと、②その変化が既存のビジネスモデルに対して整合性の低いものであったことを明らかにした。

さらに、こうして記述された漸進的な逸脱的变化について過程追跡を行った。この分析からは、ビジネスモデルの逸脱的变化を阻害要因として既存研究において扱われてきた 2 つの要因、すなわち、ビジネスモデル自体が認知枠組として機能することと、構成要素間の相互依存関係を強化する組織ダイナミクスによって、局所的な逸脱が誘発・波及・増幅されるダイナミクスが明らかとなった。

上記の研究成果に関しては、査読誌への投稿論文としてまとめ、3 月に投稿済みである。

3. 今後の研究における課題または問題点

ビジネスモデルに慣性をもたらすと考えられてきた要因によって、ビジネスモデルの漸進的な逸脱的变化が駆動されるメカニズムが明らかになったものの、自体が認知枠組として機能することと、構成要素間の相互依存関係が組織的に保持・強化されることによって、逸脱的变化を抑制/促進するダイナミクスが働く境界条件について、本稿は、調査設計上、予備的考察を加えたのみである。この境界条件の解明に向けて、当初予定していた組織プロセスの記述・分析が求められる。

Summary

This research aims to shed light on a continuous change process of business models, leading to a divergent change in business models. Prior studies on business model changes have assumed business models' inertia and have focused on episodic and divergent change. Although some studies have reported cases where deviant models have arisen through continuous change, we still have not acquired the whole picture of the process. To enhance our understanding, we conducted a longitudinal case study.

We selected Secoma, a firm running a convenience store chain, as the subject of our survey because we can treat this case as a critical case. Secoma has been changing its business model from the dominant model continuously and radically. We can expect to get new insight into the business models' change process by tracing this critical case.

We conducted this study in three stages. Firstly, we chose a framework to describe Secoma's business model. There are no unified descriptive frameworks on business models because business model studies have their roots in multiple research areas and are still immature. It has been criticized that business model studies lacks cumulativeness because each research develop and use its own framework. To avoid this problem, we search for a framework suitable for our research purpose by reviewing existing studies describing business models and chose the descriptive framework of Demil & Lecocq (2010).

Secondly, we comprehensively collected archival data on Secoma and described Secoma's business models at multiple time point. This description makes clear that Secoma's business model has deviated from the dominant model radically and continuously. Although Secoma had developed the dominant business model, it gradually changed its business model since the middle 1990s. It can also be characterized that this change was radical because Secoma's current business model has two unique components that are inconsistent with its previous business model.

Thirdly we trace the change process. This analysis reveals dynamics that induce, spread and amplify divergent local changes over time. Moreover, these dynamics were driven by two organizational forces that have been assumed as sources of inertia; organizations use their business model as a cognitive frame and attempt to keep internal consistency between components of the business model.

These findings suggest that business model experimentation, which prior studies have presented as a prescription for business model innovation, may have side-effect: eliminating drivers of continuous change, which could lead to a divergent change. We have already put the above results together in a manuscript and submitted it.

珠海デルタ地域における会社法の展開について

The development of Company law at Pearl River Delta Region

研究代表者 井上 貴也(法学部企業法学科)

研究分担者 後藤 武秀(法学部法律学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／① グローバル化

② 民事法制度

③ 会社法制度

④ 粵港澳大湾区

⑤ 裁判例分析

2020 年度交付額／ 939,000 円

研究発表／学会および口頭発表

【著書】

① 後藤武秀・井上貴也 編著『中国・台湾・香港法の諸問題』東洋大学アジア文化研究所、2021 年 2 月 8 日 ISBN978-4-904279-22-9

② 井上貴也・梁詩ナンシー 編『粵港澳大湾区法制の基礎的研究(2)―関税および文献目録―』東洋大学アジア文化研究所、2021 年 2 月 8 日 ISBN978-4-904279-21-2

【論文】

① 井上貴也「香港会社法における取締役に関する裁判例について」前掲『中国・台湾・香港法の諸問題』2021 年 2 月 8 日、所収

② 後藤武秀「臨時台湾旧慣調査会における「台湾合股令」の起草―第 1 次草案と法案審査会における議論―」前掲『中国・台湾・香港法の諸問題』2021 年 2 月 8 日、所収

【口頭報告】

後藤武秀「台湾における小規模商業組織としての合股について」地域文化学会第 237 回月例研究会、2020 年 9 月 26 日

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究は、珠江三角地帯の歴史的文化的背景が法制度にどのように影響しているかを探求することを目的とする。珠江三角地帯は、今日の東アジア経済の牽引役を果たしている香港、マカオ、中国華南地域を指す。この地域はかつて香山地域と呼ばれ、文化的一体性を有していた地域である。

しかし、1500 年代以降、マカオはポルトガルに租借され、1800 年代中期以降、香港がイギリス領となったことにより、この地域には三層の法構造が生まれた。すなわち、ポルトガル領とされる以前から存在した家族法などの固有の慣習法が存在し、その上に、マカオではドイツ法を基礎とするポルトガル法、香港ではイギリス法が導入された。たとえば、会社法制に関してもマカオでは 1901 年、1932 年に会社法が制定された香港では長らくイギリスの会社法が準用されてきた。その後の大規模改正は 1984 年に行われた。この改正は、基本的にイギリス 1948 年会社法の主要な改革を、その後の 1967 年イギリス会社法の改革を取り入れた。その後、1985 年、2006 年英国会社法の改正を受けて、2013 年に香港会社法が制定され、2014 年 4 月に施行された。この制度は大規模会社を対象とした法制度である。そのためこの地域に多い小規模会社については、香山地域の慣習法であり、中国の伝統的な共同出資による企業形態である合股組織が今なお機能している部分もある。このようにそれぞれの特殊性を有する法制度を持つ地域であったが、2013 年に中国が一带一路経済政策を発表し、この地域が海のシルクロードの起点として位置づけられることになった。この地域は経済的一体化が模索され、法制度のグローバル化の波が押し寄せている。

本研究では、このような政治・経済状況の中で、ポルトガル式、イギリス式および中国の法制度がどのように一体化しつつあるかについて考究を行った。対象の法分野としては会社法制度を念頭に置き、小規模な経営形態からグローバル化した大規模な経営形態の法規整について調査および研究を行った。また、2014 年香港会社法改正についても英国法の会社法改正や香港会社法の従来の裁判例を素材として、考察を加えている。

2. 研究経過および成果の概要

研究の範囲を文献および主要判例研究に焦点をあてて考察を行った。2014 年香港会社法の改正点については最新の文献を入手し、課題の究明にあたることができた。

先にも述べたとおり、香港は英国法の体系にあり、イギリスの裁判例により法体系が構成されている。しかし 1905 年以降、香港の裁判例の記録・保存が法制度化された。このことにより香港の裁判例も独自の法体系を形成してきた。香港ではイギリスによる強い影響にありつつも「香港コモンロー」ともいえるべき独自の法体系が形成されるに至っている。このような状況のもとで最近の裁判例を参照することにより香港会社法制度の特色の一端を解明することができた。一例として、取締役が他社へ転職をしたり、部下を引き連れて転職したりした場合の事案について考察を行った。わが国では忠実義務に問われる事案である（会社法 355 条）。この忠実義務は一般的義務であり、わが国ではその具体化、精密化が課題である。英米法系では、忠実義務（Fiduciary Duty）の一類型として、会社機会の奪取（corporate opportunity）の理論が、実質的に競業を禁止してきた。香港会社法の裁判例においても会社と利益衝突を生むような行動をしない義務を取締役が負っていることを明確に述べている。2014 年香港会社法でも明文化された内容である。その他にも、支配株主の抑圧的態度を扱った裁判例についても、いわゆる TOB 等のわが国の法解釈にも大いに参考になるものである。

2006 年英国法の内容を受け、その他の英法系諸国でも会社法改正が行われている。今後は、裁判例の比較分析に拘泥することなく、その中での 2014 年香港会社法の体系的な位置づけについて理解を深めてゆく。

3. 今後の研究における課題または問題点

香港会社法については一定程度の研究を進めることができたが、ポルトガル法の影響を受けているマカオ会社法についても文献研究を通して理解を深めてゆきたい。今回の研究対象地域では、中国の伝統的な共同出資による企業形態である合股組織が今なお機能している部分もある。香港会社法には、英国法系諸国特有の「私会社 (private companies)」という会社がある。小規模な会社形態に適している形態であるが、会社統治の実態という観点から合股組織がどのように機能しているかについて後藤教授の研究成果の分析も用いながら解明することを課題としたい。経済のグローバル化、法規範のグローバル化とアジア地域の会社経営の実態と法との乖離について引き続き考察を行って行く。

Summary

This research aims to explore the influence of the historical and cultural background of Pearl River Delta (Zhejiang River Delta) to its legal system. Pearl River Delta region refers to the area near the delta of Pearl river, it includes Macao, Hong Kong, Guangzhou, Dongguan, Shenzhen, where serving as a leading role among the economy of East Asia today. This region is culturally united and once was called the fragrant hills region. However, after 1500s, Macao was lent to Portugal and in the mid-1800s Hong Kong was occupied by Britain. This turned the legal structure of Pearl River Delta into 3 layers. In other words, there were customary laws such as family law which had already exist before the rule of Portuguese, later Portuguese law which was based on Germany law was introduced to Macao and British law was introduced to Hong Kong. For example, in term of the Companies Act, the British Companies Act had long been applied at Hong Kong. In 1984, a large-scale amendment was made and the content was basically incorporated the amendment of British Companies Act in 1948 and 1967. Under the amendment of British Companies Act in 2006, Hong Kong established a new Companies Ordinance in 2013 and executed in 2014. This new Companies Ordinance was targeted at large scale companies. Therefore, many small companies continue to follow the customary laws of the fragrant hills region which allows some part of the traditional Chinese partnership which is based on jointly funded continue to function even nowadays. Despite the fact that the region contains particular different legal systems, it is positioned as the starting point of the “Silk Road of the Sea” when China announced the “Belt and Road Initiative” economic policy in 2013. This region is bombarded by the wave of globalization on legal system and seeking economic integration with South China

This research had discussed how Portuguese, British and Chinese legal systems are being blended together under the foregoing political and economic situations. The target among the field of law was to examine and study the development of company law on management structure from small scale to globalized large scale. Besides this research also took the amendment of Hong Kong Companies Ordinance in 2014, the amendment of British Companies Acts and the legal precedents heretofore related to Hong Kong Companies Ordinance as research materials for examine.

開発途上国における廃棄物発電の導入可能性評価指標の

開発に関する実証的研究

研究代表者 北脇 秀敏 (東洋大学 国際学部)

研究分担者 眞子 岳 (東洋大学 国際共生社会研究センター)

松藤 康司(東洋大学 国際共生社会研究センター)

村上 淑子(東洋大学 国際共生社会研究センター)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①廃棄物発電

②サーマルリサイクル

③Waste to Energy

④途上国への導入

⑤バングラデシュ

2020 年度交付額／1,200,000 円

研究発表／学会および口頭発表

①MONDAL Md Shoriful Alam, KITAWAKI Hidetoshi, Assessing heating value of MSW of Dhaka city to support WtE technology, The 31st Annual Conference of JSMCWM 2020 年 9 月 16 日

② CHERKI Mohamed Hamza, KITAWAKI Hidetoshi, Estimation of compost potential demand through agriculture land allocations and crop calendars, Case study of Rabat area in Morocco, The 31st Annual Conference of JSMCWM 2020 年 9 月 16 日

③中国北京市における生活ごみの分別に対する市民意識の調査、周可、荒巻俊也、北脇秀敏、第 31 回廃棄物資源循環学会研究発表会 2020 年 9 月 17 日

④Nitrogen flow characteristics of solid waste in China, Yongqiang Zhao, Qingsheng Zhou, Kitawaki Hidetoshi, Lili Luo, Ecotoxicology and Environmental Safety 208 111596 - 111596 2021 年 1 月

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究は、どのような条件が整えば開発途上国において廃棄物発電が経済的に妥当な条件で環境改善に貢献できるかを明らかにすることを目的とする。研究では、都市スケールでの廃棄物の発生量とごみ質の変化と処理方式の変化が温室効果ガス発生量と廃棄物発電量に与える影響を検討し、売電や補助金、公民連携等が経済的妥当性にどう影響するかを明らかにするモデルを構築する。研究ではマレーシア、ミャンマー、バングラデシュ等のアジア諸国において重要業績評価指標のデー

タを収集し、予想される投入財源(Cost)と環境改善程度(Benefit)との関係を定量化するケーススタディを行う。研究は大学と日本側実務者、ミャンマー在住の研究者(眞子)および技術者との緊密な協力の下に行い、研究成果を現地にフィードバックすることにより廃棄物発電を用いた環境改善における評価指標の社会実装を目指して研究をスタートさせた。

2. 研究経過および成果の概要

今年度は新型コロナウイルス感染症のため、海外での調査は行えなかったことにより TV 会議等により情報収集と研究打合せを行った。具体的には、バングラデシュ在住の Mondal 氏(大学院博士後期課程、廃棄物コンサルタント)が現地での廃棄物の発熱量データの収集を行い、毎週の TV 会議によりデータの加工や統計的处理等の打合せを行った。その成果は廃棄物資源循環学会の研究発表会(2020 年 9 月 16 日)において発表している。なおマレーシアは自ら現地調査を行うことによりデータ収集を行うことを予定していたが、こちらはコロナ禍のため進捗していない。またミャンマーは共同研究者でミャンマー在住の眞子氏がデータ収集を担当することとしていたが、やはりコロナ禍のため帰国を余儀なくされたため進捗していない。ただ関連する研究として同じ廃棄物処理分野において、モロッコのコンポスト需要、中国の生活ごみに関する意識調査と廃棄物中の窒素収支等の研究を進め、論文発表を行っている。

次に「研究発表/学会および口頭発表」欄に示した研究成果(発表論文)の概要を示す。

①"Assessing heating value of MSW of Dhaka city to support WtE technology"においては、ダッカ市における廃棄物の長期間におけるごみ質を筆者らのグループがモニタリングしてきた結果をとりまとめ、可燃性成分の低位発熱量が経済発展とともにどのように変化するかを明らかにした。これによりダッカ市において WtE(廃棄物発電)が将来どのような時期に物理的に可能になるかを推測する根拠が明らかになった。本研究の最終ゴールは低位発熱量が将来どのように増大し、どの程度の発電量が得られるかを表現する式の構築であるため、本論文はその基礎資料としての意味を持つ。

②"Estimation of compost potential demand through agriculture land allocations and crop calendars, Case study of Rabat area in Morocco"においては、コンポストの潜在需要を表現するモデルを作成した。WtE を検討する際には、可燃ごみの燃焼時に発生する熱量からごみが含有する水分の蒸発熱を減じた低位発熱量が重要な意味を持つが、コンポストの原料となる仲介は水分が多いため低位発熱量を減じる大きな要因となる。そのためコンポストプラントを併設すると WtE が技術的に妥当なものとなることが多い。こうしたコンポストプラントが成功するためには製品であるコンポストの需要がじゅうようであるため本研究では、需要のモデル化とともにモロッコのラバト地域を対象にコンポストの潜在需要に関するケーススタディを行った。

③「中国北京市における生活ごみの分別に対する市民意識の調査」においては、生活ごみの分別に対して市民がどのように協力してくれるかのアンケート調査と意識構造の分析を行っている。WtE を成功させるためには可燃ごみと不燃ごみの分別やコンポスト化可能なごみの分別などが欠かせないため、住民の協力が必須である。住民のごみの分別意識は、心理学的な分析を行わなければならないため複雑なデータ処理が必要であるが、本論文では共分散構造分析の手法を用いて住民の環境問題認知、同調圧力等を調査することにより目的意図や行動意図に影響を与える要因を明らかにした。

④”Nitrogen flow characteristics of solid waste in China” においては、廃棄物の成分のうち窒素に焦点を当てて分析を行った。WtE を成功させるためには仲介のコンポスト化が重要であることはすでに述べたが、肥料として使用されるコンポスト中の窒素を地下水汚染の原因物質という観点から見た場合、その収支をマクロに把握しておくことは重要である。本論文では中国を例に廃棄物中の窒素が処理により土壌や地下水、大気中へと移行する現象を定量的に解明している。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究は、海外における調査が大きな情報源となっているため、海外渡航ができなかった 2020 年は苦戦を強いられた。しかしコロナ禍の状況が改善し、途上国との往来が可能になればマレーシア及びミャンマーのデータ収集を行えるようになり、研究が進展することが予想できる。また本研究を発展させる研究として「開発途上国における廃棄物発電の導入可能性評価モデルの開発に関する実証的研究」を基盤研究（B）に応募中である。この科研費に採択されれば、マレーシア及びミャンマー（現地の政治情勢による）における本研究をさらに発展させることが可能となる。

Summary

This study aims to develop indicators which describe feasibility of power generation from incineration plants in developing countries. With such indicators, economical feasibility of WtE (waste to energy) can be calculated. For instance, incinerators with power generation, which is considered as too expensive in in developing countries, can be an economically feasible alternative when certain conditions are met. Hypothesis is that the change in solid waste quality and economical development makes this alternative economically feasible in the future. Large cities in Bangladesh, Malaysia and Myanmar were chosen as case study cities. As the first step, basic data on solid waste quality were scheduled to be collected. However, in FY 2020, study could be carried out only in Bangladesh, where resource person was available, whereas it was difficult to collect data in Myanmar and Malaysia because of COVID-19 pandemic. In Bangladesh, data on the chronological change of solid waste quality was collected and analyzed. The results were compiled into a paper “Assessing heating value of MSW of Dhaka city to support WtE technology” and read at the 31st Annual Conference of Japan Society of Material Cycle and Waste Management on September 16th, 2020. In Malaysia, originally field study was scheduled, however, due to the pandemic, field survey was cancelled. In Myanmar, according to the same reason and coup, resource person had to evacuate to Japan, which prevented the progress of the study. In addition to WtE topic, similar research topics on solid waste management were implemented in FY 2020 because of the reduction of research work on WtE. For example, compost demand analysis in Morocco, people’s behavior towards solid waste in China, and nitrogen mass balance of solid waste in China are other main topics. The results of these research topics were compiled into papers, which were listed above in this document.

The research team has submitted a new proposal to JSPS on WtE research topic, which would be successfully implemented if the pandemic is over in 2021. The research proposal

includes the development of economical model which includes indicators to describe economic feasibility of WtE in developing countries. The model can calculate feasibility of incineration plants considering capital cost, operation and maintenance costs, sales of generated power etc. The feasibility changes with time course because solid waste quality changes year by year. Considering chronological change of lower heating value of combustible waste, the model can forecast future feasibility of WtE in large cities of developing countries. The study team is planning to develop the model and carry out case studies in Asian large cities.

観光サービスにおける労働生産性の向上に関する研究

Research on Improvement of Labor Productivity in Tourism Services

研究代表者 吉岡 勉 (東洋大学国際観光学部国際観光学科)

研究分担者 青木 章道 (専修大学経営学部経営学科)

田坂 公 (福岡大学商学部経営学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／① 付加価値

Value added

② 収益管理 (レベニュー・マネジメント)

Revenue management

③ 原価企画 (ターゲット・コストイング)

Target costing

④ ホテル

Hotel

⑤ ホスピタリティ・マネジメント

Hospitality management

2020 年度交付額／1,000,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・ Resolving Labor Productivity Challenges of the Japanese Lodging Industry: Revenue Management Perspective, 7th International Conference on Hospitality and Tourism Management 2020 (ICOHT 2020), 25th Aug. 2020.
- ・ A Study on Performance Measurement of Restaurants Revenue Management from the Perspectives of Revenue, Profit, and Labor Productivity, Journal of Tourism Studies (20), Mar. 2021.
- ・ Resolving Labour Productivity Challenges of the Japanese Lodging Industry: A Revenue Management Perspective, Journal of Tourism Studies (20), Mar. 2021.

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究には数カ年の期間を要するとの計画であり、文献収集および文献サーベイ、現状把握のためのインタビュー調査、アンケート調査とその結果の分析、分析結果に基づきさらにインタビュー調査を実施する。それら研究の成果をとりまとめ、研究報告書等の作成に至る予定である。

今年度については、労働生産性研究に関する国内および海外の文献を収集し、改めてこの領域の研究についてサーベイを行った。前述のとおり当該領域については国内における近年の研究がわずかなことから、過去にさかのぼり先行研究が明らかにしてきたことを整理しつつ、本研究の道筋を確立した。また、若干ではあるがインタビュー調査を実施した。

2. 研究経過および成果の概要

わが国における観光サービス業の労働生産性が低いことは、よく指摘されていることである。世界的に見るならば、『労働生産性の国際比較 2016 年版』(日本生産性本部)によれば、OECD 加盟 35 カ国のうち主要先進 7 カ国において、1 人あたり GDP は 6 位、労働生産性は最下位 (7 位)、時

間当たり労働生産性も同様に最下位（7位）となっている。

国内に目を転じると、財務総合政策研究所『財政金融統計月報第774号』「5. 業種別財務営業比率表」によれば、非製造業の従業員一人あたり付加価値が製造業より低く、さらに非製造業のうちサービス業が、そしてそのうち宿泊、飲食サービス業はさらに低いという現状にあることがわかる。

最近の先行研究をサーベイすると、この領域、すなわち観光サービスの労働生産性に関する研究は、官公庁主導による取り組み、および、実務家による各種文献を見出すことができるが、研究者による研究があまり進められていないことがわかる。

従来、研究者（特に会計領域の研究者）による先行研究では、労働生産性は[$\text{Output} \div \text{Input}$]、[付加価値 \div 就業者数] または [付加価値 \div 就業者の総労働時間] としてとらえられてきた。むろんこれが誤りというわけではない。しかし、製造業をベースに構築されてきたといえるこれら理論が、はたして観光サービスにもそのまま適用されるのであろうか。とくに付加価値の算出においては、（製造業ではなく）サービスに特化した（いわば）付加価値といえるであろう **output**（つまり顧客に提供されるベネフィット・効用）が存在すると考えられることから、新たな方法による付加価値算出が必要なのではなかろうか。そして、それに基づく労働生産性の測定を要するのではないか。そして、観光サービスにおける労働生産性が意味するものは何か。これらの点を明らかにする必要を、レビューにより認識した。

今年度、これらのレビューを行い、さらにこのレビューに基づき、ホテル企業2社へのインタビュー調査を実施した。その詳細については今後の学会における研究報告および論文誌への投稿により明らかにする予定であるが、概略的に記すとすれば、付加価値の捉え方として観光サービスに特化したものを要するという点で、研究者と実務家との間で意見の一致を見たといえる。さらに本研究では、収益管理（レベニュー・マネジメント）、原価企画（ターゲット・コストイング）がその重要な位置を占めるものと考えている。これらの点についてもインタビュー調査において、インタビュイーである実務家から同意見との反応を得ている。つまり、本研究の道筋が、実務に適合するものであることが、今年度の研究により理解できた。

なお、今年度の本研究においては、前述のとおり、国際カンファレンスにおける研究報告、および研究代表者の所属する学部の紀要において、その成果を公表している。

3. 今後の研究における課題または問題点

特殊な外部環境の制約により今年度実施できなかった研究活動について、今後実施していきたい。たとえばインタビュー調査は2社のみとなったが、さらに多くの企業へのインタビュー調査を今後実施する予定である。また、オンラインにて共同研究者との研究会を開催してきたが、今後も引き続き、オンラインあるいは対面での研究会を開催していく予定である。

本研究における課題は、数値的データの収集と実証研究の難しさにあると認識している。会計情報を用いた分析が不可欠となる研究であり、それら情報を開示していただける企業が希少であることから、実証に難儀することが想定される。しかし現時点で既に協力を表明していただいている企業もあることから、また、公開情報からの類推やシミュレーションによる分析が可能であろうと考えていることから、引き続きこの研究を進めていく予定である。

末筆となるが、本研究助成に感謝の意を記して示す。

Summary

This research is planned to take several years, and will include literature collection and literature survey, interview survey to understand the current situation, questionnaire survey and analysis of the results, and further interview survey based on the analysis results. The results of these studies will be summarized and a research report will be prepared.

This year, we collected domestic and international literature on labor productivity research and conducted another survey of research in this area. As mentioned above, there is only a small amount of recent research in this area in Japan, so we have established a path for this research by going back in time and sorting out what previous research has revealed. In addition, we conducted a few interviews.

In the past, previous research by researchers (especially those in the accounting field) has considered labor productivity as [Output / Input], [Value Added / Number of Workers], or [Value Added / Total Work Hours of Workers]. Of course, this is not necessarily wrong. However, can these theories, which have been developed based on the manufacturing industry, be applied to tourism services as they are? In particular, in the calculation of value added, it is considered that there are outputs (i.e., benefits and utility provided to customers) that can be considered as value added specifically for services (as opposed to manufacturing), and therefore a new method of value added calculation is necessary. Therefore, it is necessary to calculate the value added using a new method, and to measure labor productivity based on this method. And what is the meaning of labor productivity in tourism services? The need to clarify these points was recognized in the review.

This year, we conducted a review of these studies and also conducted interviews with two hotel companies based on this review. The details of this study will be presented in a report at a future conference and in a paper to be submitted to a journal, but in summary, it can be said that the researchers and practitioners agreed that value-added needs to be understood in a way that is specific to tourism services. In addition, this study considers revenue management and target costing to be important. In the interview survey, the interviewees, who were practitioners, expressed the same opinion on these points. In other words, this year's research has helped us understand that the path of this study is compatible with practice.

In addition, as mentioned above, the results of this year's research have been published in a research report at an international conference and in the bulletin of the faculty to which the principal investigator belongs.

We would like to express our gratitude for this research grant.

特殊菌を利用した 1,4-ジオキサン処理における微量元素種と最低濃度条件の解明

Effect of trace elements on the 1,4-dioxane removal performance using effective microorganisms

研究代表者 井坂和一(理工学部 応用化学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①1,4-ジオキサン 1,4-dioxane

②生分解 biodegradation

③排水処理 wastewater treatment

④微量元素 trace elements

⑤主要元素 main elements

2020 年度交付額／1,200,000 円

研究発表／学会および口頭発表

【学会発表】 3 件

①分解菌を用いた 1,4-ジオキサン廃水処理方法の実用性評価, 第 23 回日本水環境学会シンポジウム (2020.9)

②*Pseudonocardia* sp. TY11 株による 1,4-ジオキサン分解活性の評価, 第 55 回日本水環境学会年会 (2021.3)

③1,4-ジオキサン生物処理システムにおける分解菌の固定化方法の検討, 第 23 回化学工学会学生発表会(2021.3)

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

1,4-ジオキサンは発ガン性の疑われる化学物質であり, 溶剤や溶媒など幅広い製品に混入している。一方, 1,4-ジオキサンは生分解され難く, 化学的にも安定な化学物質である。様々な排水中に含まれることから, 水環境中に放出される前に, 排水処理工程で適切な処理が必要である。

排水処理では, 安価な生物処理技術が求められるが, 1,4-ジオキサンは通常の生物処理では分解が困難である。近年, 1,4-ジオキサンを分解する微生物の存在が報告されており, これらを利用した新しい排水処理システムの開発が求められている。

本研究では, 1,4-ジオキサンを分解する分解菌の探索を行い, 排水処理システムの開発を行うと共に, 安定運転のため必要とされる微量元素濃度の影響について検討を行った。

化学工場の土壌からジオキサン分解菌の探索を行い, 単離したジオキサン分解菌の生化学的特徴について評価を行った。また, 1,4-ジオキサン分解菌を排水処理工程に利用することを想定し, 分解菌が反応槽内から流出することを防止するため, ポリビニールアルコール (PVA 製) およびポリウレタン製のスポンジ状担体等を用い, 付着固定化について検討を行った。さらに, この付着性試験の結果を基に, 有用な担体を 2 種類選定し, 1,4-ジオキサンのみを有機源とする合成排水を調整し, 模擬排水を用いた連続処理試験を実施した。なお, 排水処理試験中に不安定となる重大な事象が発見されたことから, この阻害要因の解明と対策について合わせて検討を行うこととした。

2. 研究経過および成果の概要

1,4-ジオキサン分解菌の培養液を用い、PVA 製スポンジ担体 2 種 (P1・P2)、ウレタン製スポンジ担体 4 種 (U1・U2・U3・U4)、PVA 製ゲル担体 (PG)、ポリプロピレン (PP) 製発泡担体 (PP) の計 8 種について菌体の付着性評価を行った。培養液中に各種担体を充填し、O.D.600 値の変化を確認した。その結果、P1, P2, U1 の 3 種の担体について、O.D.600 値の減少が確認され、担体への付着傾向が確認された。一方、U4, PP, PG は O.D.600 値の減少がみられず、付着傾向は見られなかった。これらの結果から、1,4-ジオキサン分解菌の固定化には PVA 製スポンジ担体が良く、ウレタン担体の一部でも付着傾向がみられた。次の連続試験では、同サイズであり、素材が異なる P1 と U1 を用いて比較実験を行った。

PVA 製スポンジ担体 (P1) を用いて連続試験を行った。1,4-ジオキサン濃度 20mg/L の排水を処理した結果、処理水中の 1,4-ジオキサンの濃度は徐々に低下し、8 日目には 1.8 mg L^{-1} まで低下した。このように特殊菌の固定化担体により 1,4-ジオキサン処理の可能性が示された。

しかし、8 日目から 1,4-ジオキサン処理性能が低下する傾向が見られた。この時、硝化反応に伴う亜硝酸 (NO_2^-) 濃度が上昇していたことから、この NO_2^- により阻害影響を受けたものと推察した。なお、ウレタン製スポンジ担体 (U1) を用いた処理系においても、1,4-ジオキサンの処理性能が確認されたが、同様に硝化反応に伴う亜硝酸 (NO_2^-) 濃度の上昇に伴い、1,4-ジオキサン処理性能が低下する傾向が見られた。

この要因を明確にするため、回分試験系において、亜硝酸濃度と 1,4-ジオキサン分解活性について評価を行った。その結果、亜硝酸濃度の増加に伴い、1,4-ジオキサン分解速度は低下し、 NO_2^- が 10 mg-N L^{-1} の条件で活性は半減した。通常の排水処理系では、共存する亜硝酸酸化細菌により NO_2^- は速やかに硝酸 (NO_3^-) に酸化される。そのため、実用上は大きな課題では無いと考えられるが、急激な窒素負荷の上昇などにより亜硝酸濃度の上昇の可能性があることから、注意が必要であり、重要な操作要因の 1 つを解明することができた。

3. 今後の研究における課題または問題点

本試験により、安価な PVA 製スポンジ担体を用いることで、特殊菌を付着固定化することができ、1,4-ジオキサンを生物学的に処理できる可能性を確認することができた。一方で、硝化反応に伴う亜硝酸イオン (NO_2^-) による活性阻害を確認され、硝化反応の制御が重要であることが示された。今後、1,4-ジオキサン濃度を基準とした検討を行うと共に、共存するアンモニア濃度を考慮した条件検討が必要である。そのため、様々な実排水中の 1,4-ジオキサン濃度とアンモニア、リン濃度など主要元素濃度の調査する必要性が示唆された。そして、連続試験系においてこれらの課題について取り組み、安定した試験系の確立を目指す。その後、原水中の Fe, Cu, Zn, Ni, Mo, Co, B, Mn 等の微量元素濃度を調整することで、必要とされる微量元素種と最低濃度条件を明らかにする予定である。

Summary

1,4-Dioxane is a toxic chemical substrate and major pollutant of water environments. International Agency for Research on Cancer (IARC) classified it as a group 2B carcinogen, possibly carcinogenic to humans. Environmental pollution by 1,4-dioxane is a remarkable situation and has been detected in many water environments. In the United States, almost 30 million people receive

drinking water with 1,4-dioxane levels above the health-based reference concentration of 0.35 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Uses of 1,4-dioxane include lacquers, paints and pesticides as a stabilizer or solvent. As a further source, 1,4-dioxane is produced in manufacturing processes of detergents or cosmetics as an unwanted byproduct. The effluent from such kinds of factory includes 1,4-dioxane and is discharged to surface water via wastewater treatment plants (WWTPs). Thus, treatment of 1,4-dioxane from industrial effluents in WWTPs is very important to reduce the risk of surface water.

Biological treatment process is cost effective way to remove 1,4-dioxane from wastewater. However, 1,4-dioxane is persistent against biodegradation in general. Although 1,4-dioxane cannot be degraded by activated sludge, some kinds of microorganisms have high degradability of 1,4-dioxane. Recently, it has been reported that some species of bacterial culture such as *Afiplia* sp. D1 *Mycobacterium* sp., *Pseudonocardia* sp., *Xanthobacter* sp. and *Rhodococcus* sp. can degrade 1,4-dioxane. Therefore, development of biological wastewater treatment systems using these bacterial is attracting attention as a practical use to remove 1,4-dioxane effectively.

In order to develop biological wastewater treatment system, immobilization method is most important factor, especially utilizing specific bacterial pure cultures.

In the present study, immobilization method for 1,4-dioxane-degrading bacteria was investigated. Eight types of porous sponge carrier made of Polyvinyl alcohol (PVA) and Polyurethane (PU) was used for immobilization batch tests. Consequently, it was cleared that PVA porous sponge carrier is better affinity for 1,4-dioxane-degrading bacteria. Also, 1,4-dioxane removal performance using this carrier was observed in the continuous feeding tests. However, 1,4-dioxane removal activity was gradually decreased with increase of effluent nitrite concentration. 1,4-Dioxane removal activity was seemed to be inhibited by nitrite produced by nitrifying bacteria. From batch experiments, it was cleared that 1,4-dioxane removal activity was inhibited by nitrite. It was suggested that control of nitrification is one of the important factors to obtain stable 1,4-dioxane removal performance.

iPS 細胞に基づくマイクロ腫瘍モデルの構築とナノ薬剤評価への応用

Development of a microfluidic tumor model based on iPS cells and its application to nanomedicine evaluation

研究代表者 吉田 泰彦(理工学部応用化学科)

研究分担者 佐々木 直樹(立教大学理学部化学科)

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／①マイクロ流体デバイス Microfluidic device

②腫瘍 Tumor

③ナノ薬剤 Nanomedicine

④iPS 細胞 iPS cells

⑤血管内皮細胞 Endothelial cells

2020 年度交付額／798,000 円

研究発表／学会および口頭発表

2021 年 10 月に原著論文投稿予定

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

マイクロ腫瘍モデルは、微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイスに腫瘍組織の細胞を組み込んで、腫瘍の再現を目指すものである。このようなモデルは、一般にナノ薬剤と総称される、腫瘍選択的な薬物送達が可能ナノ粒子薬剤の評価系として着目されている。本研究ではこのマイクロ腫瘍モデルに組み込む細胞として、人工多能性幹(iPS)細胞から分化誘導した細胞を用い、遺伝的に同一な細胞のみでモデルを構築するための基礎検討に取り組んだ。

2. 研究経過および成果の概要

本研究で用いる iPS 細胞として 1231A3 株を選定した。これは、一般的な iPS 細胞の培養法では、まずフィーダー細胞とよばれる細胞を培養し、その上に iPS 細胞を培養するが、本株は培養にフィーダー細胞を必要とせず、培養が容易であるためである。iMatrix-511 で表面処理した培養フラスコを用い、StemFit AK02N 培地を用いて標準プロトコールで培養を開始した。DEF-CS 500 Culture System を用いた馴化培養ののち、MiraCell iPS Cell to Endothelial Cell Differentiation Kit を用いて血管内皮細胞へ分化誘導した。分化誘導後の血管内皮細胞を顕微鏡観察したところ、フラスコに接着し、増殖していることを確認できた。細胞の形状は、代表的な正常血管内皮細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の形状に近かったが、HUVEC より細長く見える細胞も存在していた。このことから、1231A3 は完全には血管内皮細胞に分化しておらず、未分化のものが含まれている可能性がある。

マイクロ流体デバイスは以下の手順で作製した。まず、アクリル薄板をレーザー加工機を用いて流路の形に切断し、別のアクリル板と貼り合わせ、マイクロ流路の鋳型とした。これをシリコーン

ゴム的一种であるポリジメチルシロキサン (PDMS) でかたどりし、流路パターンを有する PDMS 基板を作製した。流路パターンを有さない PDMS 基板を同様の手順で作製し、これら 2 種の基板をプラズマ処理して貼り合わせた。セルカルチャーインサートから孔径 1 μm の多孔膜を切り出し、カミソリを用いて基板に切り込みを入れ、そこに多孔膜を挟み込んだ。基板の側面にカバーガラスを貼り、溶液導入・排出用のチューブを取り付け、マイクロ流体デバイスを完成させた。

マイクロ流体デバイス内での血管内皮細胞の培養は以下の手順で行った。UV 滅菌したマイクロ流体デバイスの流路にフィブロネクチンの溶液を導入し、 CO_2 インキュベーター内で 30 分インキュベートした。培地で流路内を洗浄したのち、血管内皮細胞の懸濁液を流路内に導入した。多孔膜に細胞が接着するように、デバイスを立てた状態で CO_2 インキュベーター内で 1 時間インキュベートした。培地を導入して未接着の細胞を除去したのち、2 日間静置培養した。生細胞および死細胞をそれぞれ蛍光染色して生死アッセイを行ったところ、同一条件で培養しても細胞の生存率がデバイスによって異なることが分かった。腫瘍細胞による血管内皮細胞への刺激を模擬するために、腫瘍壊死因子 ($\text{TNF-}\alpha$) を用いて血管内皮細胞を刺激し、同様に生死アッセイを行ったところ、刺激なしの場合と同様の結果が得られた。

血管内皮細胞層の物質透過性を評価するために以下の実験を行った。血管内皮細胞を培養したデバイスの流路に、平均分子量 10000 の蛍光標識デキストラン水溶液を一定流量で送液し、蛍光顕微鏡下で経時観察した。蛍光標識デキストランの内皮細胞層及び多孔膜透過に伴う蛍光強度の上昇を基に、定法に従い透過係数を算出し、評価に用いた。透過係数の値は対照実験 (細胞なし) と比べ小さくなり、血管内皮細胞を培養することで物質透過が抑制されていることを確認できた。 $\text{TNF-}\alpha$ による刺激前後で透過係数を算出して比較したところ、刺激後に有意な増加がみられた。ただし、 $\text{TNF-}\alpha$ の代わりにウシ血清アルブミン (BSA) を用いた対照実験でも、透過係数は刺激後に有意に増加したため、刺激に依らない物質透過性上昇を完全に抑制できていない可能性が考えられる。別の対照実験として、iPS 細胞由来の血管内皮細胞の代わりに HUVEC を用いたところ、 $\text{TNF-}\alpha$ による刺激後に透過係数の有意な増加がみられ、BSA を用いた実験ではみられなかった。よって本研究では、血管内皮細胞層が本来有するバリア機能や化学刺激に対する応答性を、HUVEC ほどには再現できていないことが考えられる。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究では iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導を細胞形態のみで判断したが、血管内皮細胞に特異的な細胞表面マーカーの発現をフローサイトメトリーで確認するなど、複数の判断基準を基に分化誘導の成否を評価し、分化誘導条件の検討と最適化、或いは実験に用いる iPS 細胞株の選定を進める必要がある。また、本研究では血管内皮細胞に特化して研究を進めたが、腫瘍細胞や免疫細胞など、腫瘍組織を構成する各種の細胞を iPS 細胞から分化誘導してデバイスに組み込むことで、実際の腫瘍により近いマイクロ腫瘍モデルを構築することができると期待される。

Summary

Microfluidic tumor models aim to reproduce tumors by incorporating tumor tissue cells into microfluidic devices. Such a model is attracting attention as an evaluation system for nanomedicines. In this study, we used induced pluripotent stem (iPS) cells as the source of the cells to be incorporated into the microtumor model.

The 1231A3 cell line was selected as the iPS cell for this study. Microscopic observation of the vascular endothelial cells after induced differentiation of the 1231A3 cells showed that the differentiated cells were adherent and proliferating. The shape of the cells was close to that of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), which are typical normal vascular endothelial cells, but there were also cells that looked more elongated than HUVECs.

The microfluidic device was fabricated by the following procedure. First, a thin acrylic sheet was cut into the shape of a channel using a laser cutter, and then laminated with another acrylic sheet to form a mold for the microfluidic channel. The mold was then covered with polydimethylsiloxane (PDMS) to create a PDMS substrate possessing a channel pattern. A PDMS substrate without a channel pattern was fabricated by the same procedure, and these two substrates were laminated by plasma treatment. A porous membrane was cut out from a cell culture insert and integrated into the microfluidic channel.

The vascular endothelial cells derived from the 1231A3 cells were cultured in the microfluidic device. The viability assay was performed by fluorescence staining of viable and dead cells, respectively, and it was found that cell viability differed between devices even when cultured under the same conditions. To simulate the stimulation of vascular endothelial cells by tumor cells, we stimulated vascular endothelial cells with tumor necrosis factor (TNF- α) and performed the viability assay in the same way, and the results were similar to those without stimulation.

A fluorescently labeled dextran solution was introduced into the microchannel. Permeability coefficients (P) of the dextran were calculated according to the standard method and compared before and after stimulation with TNF- α . An increase in P was observed after stimulation. However, P also increased in the control experiment using bovine serum albumin (BSA) instead of TNF- α . In another control experiment in which HUVECs were used, there was an increase in P after stimulation with TNF- α , and was not after stimulation with BSA. Therefore, further studies would be required to reproduce the inherent barrier function of the vascular endothelial cell layer by using iPS cell-derived endothelial cells.

「科学の有用性」を実感し、探究型の学びの実現を目指す
学習モデルに関する研究
A Study of Learning Models for Realizing Inquiry-Based Learning and
Realizing the Usefulness of Science

研究代表者 後藤 顕一(食環境科学部 食環境科学科)

研究分担者 松尾 知明

高橋 三男

伊藤 克治

野内 頼一

川崎 弘作

研究期間／2020 年 6 月 25 日～2021 年 3 月 15 日

キーワード／① STEAM 教育 STEAM education

② 持続可能な開発のための教育 Sustainable development: SD

③ 相互評価 Mutual evaluation

④ 国際協働研究 International collaborative research

⑤ 科学的思考力・表現力 Ability to think and express scientifically

2020 年度交付額／ 2, 000, 000 円

研究発表／学会および口頭発表」

査読付論文：(1) 飯田寛志, 山内慎也, 後藤顕一, (2020)『理科実験における相互評価表を用いる授業実践に関する一考察』理科教育学研究, vol.60, No3

日本理科教育学会 第 70 回全国大会(岡山大会)場所, 岡山大学, 期間 2020 年 8 月 22 日(土)、23 日(日),「課題研究」にて発表: 題目「相互評価を活用した理科学習における研究の方向性資質・能力の育成の視点から」

①相互評価を活用した理科学習における研究の方向性 後藤顕一

②相互評価表を用いた中学校理科授業の実践に関する一考察 飯田寛志 山内慎也 熊田憲朗

③自宅学習期間における化学実験授業での実践と分析 北川輝洋

④高校化学授業における相互評価活動の自由記述の分析 上村礼子

⑤ルーブリックと相互評価表を用いたSSH「探究科学」の評価Ⅱ 生田依子 真井克子

⑥双方向型遠隔授業における 実験レポートの 相互評価活動 伊藤克治

日本科学教育学会 『新学習指導要領「理科において育成を目指す資質・能力の整理」等の導出と背景』後藤顕一, 寺田光宏

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究では、初等中等教育、大学の教員養成における理科及び総合的な学習の時間、総合的な探究の時間、新教科「理数」を対象として研究を行うこととした。また、これまでの研究体制や枠組みを維持、継承し、さらなる発展的な研究を行うこととした。

焦点化させたのは、STEM 教育研究である。2 点から研究の方法と方向性を示す。

1 点目は、SDGs を視点に置いた SD (Sustainable development) 教材研究での指導法の確立とその検証といった成果を活かし、実践的知見を得ること、さらには、NGSS における「プラクティス」に対応するように開発したツールや指導法（学習法）をまとめたプロセスとして経験をすることが、どのような資質・能力の育成どのように寄与するかを明らかにし、STEM 教育のプロトタイプを構築、提案することである。

2 点目は、構築した STEM 教育プロトタイプを国内外において、実践、検証、改善を重ね、国際協働研究による国際化を推進していくことである。

これらは、国内外の学校、教員研修等で実践、検証、改善を重ね、実効性のある STEM 教育プロトタイプの実現と普及を目指すこととした。

2. 研究経過および成果の概要

1) STEM 教育でのプラクティスに対応している「指導法」はすでに SD 教材で確立されており、STEM 学習において SD 教材での「指導法」を活用すれば、学びを通じて自然な形で資質・能力の獲得が可能となる。「指導法」については、やがて学習者が使える「学習法」に変化していくことを目指した。

2) 科学探究や工学デザインのプロセスの本体を担う原理（モデル）と実験計画、定量測定と結果の解析を即時に見える化できる EDT (Experiments Design Template) は、STEM 教育におけるプロセス実践を容易にし、学習者の科学的思考力、データ分析・解釈力、表現力の獲得において、顕著な成果が期待できることを明らかにした。

3) アジア近隣諸国の教育研究・実践者との、SD を視点にした国際協働研究は、これまで 10 年以上の蓄積があり、共通の課題とそれを越えていく共通の指導法を見いだしてきた。長年の蓄積を基にした STEM 教育での協働研究は例が無く、国際協働研究のプロトタイプとなる。

全体枠組みについて、本研究グループが定期的に主催している研究会で協議を重ね、資質・能力の育成に適した教材の開発や改善を進め、実効性のある STEM 教育プロトタイプを提案する。実証的研究、評価研究を行い、研究成果は、学会での発表、学会誌への掲載を目指す。

研究目的を具体化するの方向性、(1)日常生活や社会の文脈を基盤とする学習内容を重視する方向、(2)科学的能力と科学的態度の形成を志向した学習過程の検証・改善を重視する方向について検討し、三つの視点として整理した。

具体的には本研究課題について 15 名程度の研究グループを立ち上げて、月 2 回程度、定期的に研究会を開催して研究を推進し続けている。特に、本年度は、コロナ禍において、遠隔での会議方法を確立し、国内外の研究分担者、連携研究者は、一体となった協議、研究活動が可能となった。

一方、本研究グループは、SD 研究、授業分析研究、相互評価表に関する実践研究にも取り組んできた。これまで、学習者のこれから求められる資質・能力の向上に関する研究、科学的な判断力や表現力の解明、評価研究にも数多く取り組み、成果を日本理科教育学会、日本科学教育学会等で報告してきた。

さらに、1 年間の研究成果報告書を刊行し、国立国会図書館、東洋大学図書館をはじめ関係機関に配布して成果を公開した。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究グループは、SD 教材の理念と具体的な取組の整理を行い、問いに答える探究活動に対し、問題を解決する工学デザインのプロセスの関係の整理も行い（後藤，2019），研究課題の核心をなす学術的「問い」，および、これから取り組むべき研究課題と具体的な方略を明らかにした（後藤ら，2020）。すなわち，学習者の資質・能力の獲得に向けては，問題を解決する工学デザインのプロセスの導入，SD に向けては，これまで我が国の教育ではあまり意識されていない科学・工学的プラクティスのステップ，さらなる実証的な研究の推進が欠かせないことが明らかになった。そのためにも，STEM 教育のプロトタイプの構築が求められ，その推進に向けて以下の 2 点が今後の課題として挙げられる。

- 1) 学習者が「問題」から「課題」を特定するのにどのような学習方略が有効か。
- 2) 実験デザインテンプレート（EDT）は、プラクティスの達成支援を通して STEM 学習にどのように役立つか。また，EDT を誰でも作成できるようになる定型（基本の型）はどのようなものか これら「核心をなす学術的な問い」に向けて，すでに具体的な取組を考えている。

Summary

The purpose of this study is to propose an effective learning model that will help students realize the usefulness of science and develop scientific ability and attitude, and to obtain basic data for future educational research. Specifically, the research was promoted from three perspectives.

(1) The "teaching methods" that correspond to the practices in STEM education have already been established in the SD materials, and by using the "teaching methods" in the SD materials in STEM learning, it will be possible to acquire qualities and abilities in a natural way through learning. We aimed to transform the "teaching methods" into "learning methods" that learners can use.

(2) The EDT (Experiments Design Template), which enables the immediate visualization of the principles (models), experimental designs, quantitative measurements, and analysis of results that are the main body of the process of scientific inquiry and engineering design, facilitates the implementation of the process in STEM education, and is expected to achieve remarkable results in the acquisition of learners' scientific thinking, data analysis and interpretation, and expression skills.

(3) International collaborative research with educational researchers and practitioners in neighboring Asian countries from the perspective of SD has been accumulated for more than 10 years, and we have found common issues and common teaching methods to overcome them. There are no examples of collaborative research in STEM education based on the accumulation of many years of experience, and this will be a prototype for international collaborative research.

The overall framework will be discussed at the research meetings that our research group regularly holds, and we will propose an effective prototype for STEM education by developing and improving teaching materials that are appropriate for the development of qualities and abilities. We will conduct empirical research and evaluation research, and aim to present our research results at academic conferences and publish them in academic journals.

In order to realize our research objectives, we examined (1) the direction of emphasizing learning content based on the context of daily life and society, and (2) the direction of emphasizing the

verification and improvement of learning processes that are oriented toward the formation of scientific abilities and scientific attitudes.

Specifically, we established a research group of about 15 members for this research topic, and have continued to promote the research by holding regular research meetings about twice a month. In particular, in this fiscal year, we established a remote meeting method for the Corona Periscope, which enabled domestic and overseas research subcontributors and collaborating researchers to hold discussions and research activities in unison.

On the other hand, our research group has also been engaged in SD research, class analysis research, and practical research on mutual evaluation charts. We have also been involved in research on the improvement of the qualities and abilities required of learners in the future, clarification of scientific judgment and expressive power, and evaluation research, and have reported the results at the Japan Society for Science Education and the Japan Society for Science Education.

In addition, we published a one-year research report and distributed it to the National Diet Library, Toyo University Library, and other related institutions to publicize the results.

中国人民大学（中国）・金剛大学校（韓国）と結んだ交流協定に基づく国際シンポジウム
「東アジア仏教における生活規範—戒律・大乘戒・清規・非僧非俗」の共同開催

Co-hosting of the International Symposium, "Regulations of Life in East Asian Buddhism : Vinaya, Mahāyāna-precepts, Rules of purity (qinggui), and 'Hisōhizoku'(neither monk nor layman)" based on the academic exchange agreement which has been concluded with Renmin University of China and Geumgang University of Korea

研究代表者 伊吹 敦（文学部東洋思想文化学科）

研究分担者 渡辺 章悟（文学部東洋思想文化学科）

山口しのぶ（文学部東洋思想文化学科）

岩井 昌悟（文学部東洋思想文化学科）

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①仏教思想	Buddhist thought
②戒律	Vinaya
③大乘戒	Mahāyāna-precepts
④清規	Rules of purity (qinggui)
⑤非僧非俗	Hisō hizoku (neither monk nor layman)

2020 年度交付額／ 2,000,000 円

研究発表／学会および口頭発表

伊吹敦

- ・「荷澤神會の著作『壇語』の成立時期について」（2020 年 7 月 4 日、日本印度学仏教学会第 71 回学術大会、創価大学、オンライン開催）
- ・『師資血脈傳』に見る『傳法寶紀』の影響と神會の獨自性」（2020 年 11 月 7 日、国際禅研究プロジェクト主催 2020 年度第 1 回研究会「初期禅宗史研討会Ⅱ」、東洋大学、オンライン開催）
- ・『六祖壇經』の成立に関する新見解—敦煌本『壇經』に見る三階教の影響とその意味」（2020 年 12 月 12 日、国際禅研究プロジェクト主催 2020 年度第 2 回研究会（陳金華先生講演会併催）、東洋大学、オンライン開催）

渡辺章悟

- ・「コロナウイルス蔓延の中で仏教心理学が担う役割について」をテーマとした学会鼎談への参加及び司会担当（2020 年 9 月 16 日、仏教心理学会第 12 回学術大会、東洋大学、オンライン開催）
- ・「般若の智慧と大乘の転法輪」（2021 年 2 月 16 日、中村元東方研究所新春研究発表会、中村元東方研究所、オンライン開催）

研究発表／出版物

伊吹敦

- ・「七世紀後半における中國北地の思想動向—『金剛三昧經』に見る初期禪宗と三階教の接合とその意味」(『国際禅研究』5、2020年8月、pp. 311-361)
- ・「李華撰『故左溪大師碑』に見る知識人の佛教認識」(花野充道博士古稀記念論文集『仏教思想の展開』山喜房佛書林、2020年10月、pp. 479-503)
- ・「鈴木大拙はどうして初期禅宗史研究を始めたか」(『国際禅研究』6、2020年11月、pp. 131-195)
- ・「荷澤神會の著作『壇語』の成立時期について」(『印度学仏教学研究』69-1、2020年12月、pp. 304-297)
- ・「『師資血脈傳』に見る『傳法實紀』の影響と神會の獨自性」(『東洋思想文化』8、2021年3月予定)
- ・「佛教は哲學なりや宗教なりや(中國篇・下) —近代中國における淨土教・禪宗の評価と佛教の脱宗教化」(『東洋学研究』58、2021年3月予定)

渡辺章悟

- ・「第二の転法輪」(『駒澤大學佛教學部論集』51、2020年12月26日、pp. 1-13)

山口しのぶ

- ・「バリ・ヒンドゥー教のサンスクリット儀軌 *Wedaparikrama* —儀軌の概要および部分訳」(『東洋思想文化』8、2021年3月予定、pp. 87-107 ((1)-(21)))
- ・「カトマンドゥ盆地における文殊の信仰と図像」(立川武蔵・森 雅秀編『アジア仏教美術論集 南アジアⅡ』中央公論美術出版、2021年3月予定、pp. 509-536)

その他(翻訳、事典項目執筆等)

伊吹敦

- ・「『歴代法宝記』に見るプラマーナや瑜伽行派の専門用語の修辭法的使用」(ウェンディ・アダメック著、単訳、『国際禅研究』5、2020年8月、pp. 275-309)
- ・「初期禅宗の交雑—北宗禅と牛頭禅の交渉を中心に」(韓伝強著、単訳、『国際禅研究』6、2020年11月、pp. 21-37)

渡辺章悟

- ・「曹洞宗で唱えられるダラニ經典：第三回 大悲心陀羅尼が説かれる背景から」(『仏教企画通信』60、2020年6月、pp. 3-4)
- ・「曹洞宗で唱えられるダラニ經典：第四回 大悲心陀羅尼の真言」(『仏教企画通信』61、2020年9月、pp. 3-4)
- ・「曹洞宗で唱えられるダラニ經典：第五回 大悲心陀羅尼」(『仏教企画通信』62、2021年1月、pp. 3-5)
- ・「大乘仏教の興起」「大乘仏教の展開」(日本佛教学会編『仏教事典』丸善出版、2021年1月、pp. 78-79; pp. 80-81)

岩井昌悟

- ・「三国因縁釈迦一代伝記について（前編）」（『CANDANA』282、中央学術研究所、2020年7月、pp. 2-5）
- ・「三国因縁釈迦一代伝記について（後編）」（『CANDANA』284、中央学術研究所、2021年1月、pp. 2-5）
- ・「安居」「乞食（鉢）」（日本佛教学会編『仏教事典』丸善出版、2021年1月、pp. 364-367）

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究プロジェクトの中心となる国際シンポジウム「日・中・韓 国際仏教学術大会」は、東洋大学と中国の人民大学、韓国の金剛大学校との交流協定に基づき、毎回異なるテーマを掲げて、この三箇国の研究者を中心に発表と討論を行っており、今回のテーマは「東アジアにおける生活規範—戒律・大乘戒・清規・非僧非俗」であった。例年、この国際シンポジウムにおいては、開催前に三箇国の発表者を決定し、論文を書いてもらい、中国と韓国の研究者の論文については、事前にこちらで日本語に翻訳して開催国に送り（中国と韓国でも同様の作業を行う）、シンポジウム開催当日には、三箇国の発表者の原稿とそれに対するコメントを三箇国語で提示する論集を配布して討論を行ってきた。そして事後には、その内容を網羅した論集を三箇国で自国語によって公表していた。

本年度も、当初は人民大学・金剛大学校からそれぞれ発表者3名を含む5名程度が来日して発表等を行うこととなっており、東洋大学の専任教員の中から、仏教を専攻し、特にこのテーマに強い関心を持つ研究者を選抜して研究分担者とするとともに、東洋学研究所の客員研究員を中心に、この分野で活躍している人を選び、研究協力者をお願いしていた。しかし、新型コロナウイルスの影響を鑑み、特別措置として論文およびコメント、コメントへの回答はすべて書面上で行い、論集として刊行する形に変更した。

2. 研究経過および成果の概要

令和二年度で9回目を迎える国際シンポジウム「日・中・韓 国際仏教学術大会」は、2020年6月20日（土）・6月21日（日）の両日に東洋大学を会場として「東アジアにおける生活規範—戒律・大乘戒・清規・非僧非俗」を統一テーマとして開催される予定であった。本来の計画に従えば、このシンポジウムは東洋大学東洋学研究所と中国人民大学の仏教与宗教学理論研究所、および韓国の金剛大学校の仏教文化研究所との共催であり、各大学を中心に多数の研究者に参加してもらい、最新の研究成果の発表と活発な議論を通して国際交流を促進することを目指していた。しかし、新型コロナウイルスの世界的流行により、三箇国ともに海外渡航等が当面困難となってしまったこと、また国際シンポジウムをオンライン上で開催するには時間的に十分な準備ができなかったことから、各研究所と相談の上、やむを得ず書面上での開催とした。

韓国からは、本プロジェクトの共同研究者である李承南氏が「『法華経』の安樂行としての戒行の研究」、高承学氏が「菩薩戒に関する華嚴の立場—法蔵の『梵網経菩薩戒本疏』を中心に—」、裴慶娥氏が「法性の観点から見た比丘尼戒律—比丘尼戒律の男女差別的条項についての様々な解釈を中心に—」と題する研究発表を行った。韓国語論文の翻訳にあたっては、本研究プロジェクトの研

究協力者である佐藤厚氏と水谷香奈氏に協力してもらった。

中国からは、夏徳美氏が「新羅の勝莊と『梵網經述記』」、温金玉氏が「明末・清初期における弘賛法師の戒律思想」、張雪松氏が「開悟公案における禅宗祖師の妻帯問題—禅門清規中の晩参制度は如何にして生まれたのか—」との題で研究発表を行った。いずれもこれまであまり研究されてこなかった分野や人物に焦点をあてた興味深い内容であり、コメンテーターからも積極的な質疑が寄せられていた。

日本からは、戸次顕彰氏が「『四分律』から『四分律行事鈔』へ—『行事鈔』の仏典引用に関する諸問題—」、板敷真純氏が「真宗における妻の役割とその変遷—真宗史料に見る「坊守」の活動を中心に—」、金子奈央氏が「宗教的共同体における役職交代—禅宗清規にみるその理念と意義—」、山部能宜氏が「日本中古天台の行法と禅宗の行法との比較考察」との題で研究発表を行った。いずれも本プロジェクトの研究協力者であり、山部氏以外は新進気鋭の若手研究者でもあることから、研究発表を通して今後の三箇国の仏教学研究発展の契機としてもらえたように思う。

今年度はおおよそ 9 月頃までかけて、各種原稿の日本語への翻訳、整理、編集等の業務を行ってきた。そして、2021 年 2 月にシンポジウムの内容を網羅した報告書、『東アジア仏教学術論集』第 9 号の刊行と配布を行った。残念ながら対面での開催ができず、フロアからの質問等を受けることはできなかったが、掲載された論文の質は決して例年と比較して劣ったものではなく、むしろ書面上であっても極めて有意義な議論がなされたと認められる内容となっている。他の協定校との協議に基づいて、刊行後一年を経た『東アジア仏教学術論集』第 8 号のインターネットへのアップも申請する予定である。

なお、研究分担者である渡辺章悟氏、山口しのぶ氏、岩井昌悟氏については、各自の戒律に関する知見を生かし、国際シンポジウムの司会進行などを依頼する予定であったが、上記の都合により直接協力いただく機会を設けることはできなかった。しかし、各分担者がこの 1 年間を通して発表した研究成果はいずれも実り多いものであり、それが今後の各種研究活動や第 10 回「日・中・韓 国際仏教学術大会」に何らかのかたちで反映されることを期待している。

以上を要するに、本研究プロジェクトの最も大きな研究成果として、「第 9 回 日・中・韓 国際仏教学術大会」の書面開催および『東アジア仏教学術論集』第 9 号の刊行、またそれ以外の成果として、各研究代表者・分担者の口頭発表と論文等を挙げることができる。

3. 今後の研究における課題または問題点

新型コロナウイルスの影響は今後もしばらく続くとみられ、各研究機関においては学会等をオンライン上で開催することがもはや一般的になっている。しかし、本研究プロジェクトで予定していた国際シンポジウムは、例年、6 月開催ということで、オンライン開催の準備が間に合わず、書面上での開催となったため、フロアからの質疑等を受けることができなかった点が課題として挙げられる。

本研究は、当初、十年間、国際シンポジウムを共催することを目標として始まったため、次回が最後となる。この記念すべき大会を成功させるために、本年度の教訓を生かして万全の態勢で臨む所存である。

Summary

The 9th international symposium "Japan-China-Korea International Buddhist Academic Conference" was scheduled to be held on June 20th (Sat) and 21st (Sun), 2020 at Toyo University. under the unified theme of Regulations of Life in East Asian Buddhism : Vinaya, Mahāyāna-precepts, Rules of purity (qinggui), and 'Hisō hizoku'(neither monk nor layman)". According to the original plan, as the co-host of the Institute of Oriental Studies (Toyo University, Japan), the Institute of Buddhist and Religious Studies (Renmin University, China), and the Institute of Buddhism and Culture (Geumgang University, Korea), this symposium was going to be aimed at promoting international exchange through the presentation of the latest research and lively discussions by having many researchers, mainly from each university. However, due to the global epidemic of the COVID-19, it became difficult for all in these three countries to travel abroad for the time being, and there was not enough time to prepare for holding an international symposium online. As a result of consultation at the three institutes, it had to be held in the form of a written conference.

Three researchers each from China and Korea, and four researchers from Japan wrote the treatises, and commentators from three countries commented on each treatise. In this research project, all the foreign language manuscripts including the comments and its responses have been translated into Japanese. Then, in February 2021, the 9th issue of "*Proceedings of the International Conference on East Asian Buddhism*", that covers all the contents of the symposium, has been published and distributed. Unfortunately, this year's symposium could not be held face-to-face, and we were not able to provide the opportunity to answer direct questions from participants. However, the quality of the treatises published in the proceedings is not low, on the contrary, it seems that there are more excellent treatises than usual.

Initially, this international symposium was started with the aim of being co-hosted by the three institutes of the three countries for ten years based on an exchange agreement, and the next year, the tenth, will be the last. We are determined to take all possible measures to make this memorable event a success.

高齢者の住まい及び高齢者の生活資金融資に関する日韓比較

Japan-Korea Comparison on Housing for the Elderly and Financing for the Elderly

研究代表者 太矢 一彦 (法学部企業学科)

研究分担者 根岸 謙 (法学部法律学科)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①韓国

②高齢者の住まい

③リバースモーゲージ

2020 年度交付額／ 1,913,000 円

研究発表／学会および口頭発表

『日本空間』29 号 (2021 年 6 月発行予定) 掲載予定

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

申請時の研究方法としては、高齢者の住まいに関する問題・リバースモーゲージについて、日韓相互に研究代表者・研究協力者が渡航し、行政、事業者団体、研究機関(大学・研究所・シンクタンク等)、高齢者施設から情報提供を受け、統計等な分析、文献調査、ヒアリング調査という調査方法を用いながら、法的な問題意識(契約法理)を中心に研究を進める予定であり、その準備(アポイントメント等)は全て整っていた。しかし、新型コロナウイルスの影響により、日本・韓国ともに渡航することができなくなったことから、状況をみながら 9 月末まで、日本側と韓国側でスケジュールの調整を繰り返してきた。そして、9 月末時点で、本年度の渡航は不可能と判断し、共同研究者一同で今後の研究方法について再協議した。その結果、今年度は、今後の共同研究を発展させるための基礎を固める準備期間と位置づけ、日本と韓国における高齢者政策の現状、日本と韓国間の政治的関係性、法制度(特に契約という観点から私法分野)に関して広く文献調査を中心とした研究を行うことで合意した。具体的には、まず相互に必要な文献(書籍・論文・報告書等)を調査・収集し、それをネット・郵便等で互いに提供し合うこととした。そして、提供された文献等を中心に、国内で入手したものも併せて、資料の整理、検討を行うこととした。

2. 研究の経過および成果の概要

先に述べた理由から、実質的に共同研究を開始することができたのは 10 月からであり、まず、リモートでやり取りするためにネット環境を整え、リモート会議を通し、研究のテーマ(高齢者の住まい・リバースモーゲージ)についての互いの国の現状を説明し、互いに必要となる書籍・論文・その他の資料等をそれぞれ選定し、e-mail 等で送付できるものは送付し、書籍等郵送が必要なものは、ある程度まとまった段階で順次韓国へ郵送した。韓国側からは、およそ 100 点以上の資料(書籍・論文等)の提供を受け、韓国側にも 150 点以上の資料を提供した。現在、それらのものについて、翻訳ソフト等も利用して内容を確認しながら、資料の整理に努めている。また、法律に関して

は、韓国が英米法の影響を強く受けていること、また日本においても国際的な場面で英米法に準拠することが多いことから、互いの共通認識を得るため、英米法に関する書籍等も収集し、それらについても併せて内容の理解に努めている。

また、今回の共同研究では日韓での比較的検討が主目的であり、文献資料だけでは限界があるため、韓国側と協議し、まずは、それぞれの国の現況について、まとめたものを作成し、さらに互いの問題意識を深め合ったうえで、渡航が可能になるのを待つことで合意した。そのことから、まず、研究代表者が、高齢者のための住宅に関する日本政府の最近の政策、高齢者の住まいに関する法規制等の変遷などをまとめ、さらに法律上重要な争点となっている、入居一時金、終身借家権制度などについて問題整理を行った論文を作成し、現在、韓国側の共同研究者が韓国語への翻訳をおこなっているところである。当該論文については、海外協定校(国民大学校)の紀要である『日本空間』29号(2021年6月発行予定)に掲載する予定となっている。また、日本での共同研究者は、日本の高齢者の意思決定支援の現状に関する論文の執筆を進めており、それについては、『日本空間』30号(2021年12月発行予定)に掲載する予定となっている。韓国側の共同研究者については、来年度(6月)、本学に短期招聘教員として招致することが決まっており、その際に研究報告及び本学の紀要等への投稿を行う予定である。

3. 今後の研究における課題または問題点

現在のところ、来年度には、日韓で互いに渡航できることを期待しており、その際には、当初の予定通り、行政、事業者団体、研究機関(大学・研究所・シンクタンク等)、高齢者施設から情報提供を受け、ヒアリング調査を行うことで、日韓の違いを明確に意識しながら研究を進めることができると考えている。しかし、現状では、来年度も渡航が厳しい状況も予想される。そのため、本年度、リモートでのやり取りのための機材をある程度揃えることができたので、それを有効活用してリモートでの意思疎通がこれまで以上にできるようにする必要があると思われる。

今回の研究では、韓国側の共同研究者は、海外協定校の国民大学校の日本研究所の所員であり、また全員日本での博士号を取得していることから、日本語が堪能で、そのための韓国へヒアリング等の調査に行く際に、通訳等も務めていただく予定としていた。それができないということになると、比較研究が深まらないことを懸念する。しかし、その場合にも、海外協定校との共同研究の助成は、両校の繋がりを強化する意味もあることから、本年度の共同研究に基づいて研究テーマをさらに拡大し、共同研究を継続していくことで、両校の協力関係がより密接なものとなるように心がけている。

Summary

At the time of application, the research method was to conduct research on housing issues and reverse mortgages for the elderly by having the principal investigator and research collaborator travel to Japan and Korea, receive information from the government, business organizations, research institutions (universities, research institutes, think tanks, etc.), and senior citizen facilities, and conduct statistical analysis, literature research, and interviews. The research was planned to focus on legal issues (contract law) while using research methods such as statistical analysis, literature review, and interviews. However, due to the effects of the new coronavirus, we were unable to travel to both Japan and South Korea, and as a result, all of the co-researchers re-considered the future research methods. As a result, it was agreed

that this year would be a preparatory period to lay the foundation for the development of future joint research, and that we would conduct a wide range of research centered on a literature survey from the perspectives of the current status of elderly policy in Japan and Korea, the political relationship between Japan and Korea, and the legal system (especially contracts). Specifically, it was decided that we would first research and collect mutually necessary documents (books, articles, reports, etc.) and provide them to each other via the Internet and mail. Then, we will organize and examine the materials, focusing on the provided documents, as well as those obtained in Japan. In addition, since the main purpose of this joint research is to conduct comparative studies between Japan and Korea, and there are limits to what can be done with literature alone, we discussed with the Korean side and agreed to first prepare a summary of the current situation in each country, deepen our mutual awareness of the issues, and then wait for travel to become possible. First, the principal investigator summarized the recent policies of the Japanese government regarding housing for the elderly and the changes in laws and regulations regarding housing for the elderly, and then wrote a paper on the issues of lump-sum payments and lifetime tenancy systems, which are important legal issues. The paper is currently being translated into Korean by a Korean co-researcher. The paper is scheduled to be published in Korean in the Bulletin of the Overseas Cooperating University (scheduled for publication in June 2021). The Japanese co-researcher is also writing a paper on the current status of decision-making support for the elderly in Japan, which will be published in the Bulletin of the Overseas Cooperating University (scheduled for publication in December 2021). In addition, it has been decided that the Korean co-researcher will be invited to our university as a short-term faculty member next year (June), and at that time, he will report on the situation in Korea and contribute to our university's bulletin. On the basis of the above, we will continue to study the situation of the new coronavirus, and hope to deepen our joint research not only on the research theme of this study but also on related issues.

中国浙江省出身の若者にみるトランスナショナリズムに関する

教育人類学的研究

An Educational Anthropological Approach to Transnationalism among Young People from Zhejiang Province, China.

研究代表者 山本 須美子(社会学部社会文化システム学科)印

研究分担者 徐 輝(温州大学准教授)

鄭楽静(寧波大學・講師)

杜天煦・余婷(温州大学・修士課程)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①トランスナショナリズム Transnationalism

②浙江省 Zhejiang Province

③青田県 Qingtian County

④僑郷 Qiaoxiang

⑤華僑 Overseas Chinese

2020 年度交付額／2,000,000 円

研究発表／学会および口頭発表

[論文]

- ・山本須美子・徐輝・鄭楽静 (2020) 「ビジネスチャンスを生む僑郷への帰国—中国浙江省青田県の事例から」『白山人類学』24 号 (3 月中旬 発行予定、査読有) .
- ・鄭楽静 (2020) 「民国時期における浙江省の海外移民変遷史」『東洋史訪』27: 83-99.
- ・徐輝「青田県方山郷華僑華人留守児童現状に関する調査」『八桂僑刊』4: 82-93.

[発表]

- ・オンライン・フォーラム：2021 年 1 月 25 日 (月) (主催：アジア文化研究所)
テーマ：『ビジネスチャンスを生む「僑郷」への帰国—中国浙江省青田県の事例から—』
- ・オンライン講演会：2020 年 8 月 26 日「21 世紀アジアのグローバル・ネットワーク構築と静岡県
県の新たな役割」(主催：静岡県立大学グローバル地域センター)
鄭楽静「温州と静岡—在日温州人のライフストーリーを中心に」
- ・第一回国際移民論壇：2020 年 10 月 24 日 (於) 中国人民警察大學
徐輝「ヨーロッパ温州人の歴史と現状：フランスを中心に」

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究の目的は、ヨーロッパに移民を送り出す歴史があり、20 世紀後半からは特にイタリアやスペインへの移住が顕著な中国浙江省 (特に青田と温州) 出身者を対象として、その子どもが浙江省とヨーロッパの間でどのように移動し教育を受け、アイデンティティを形成しているのかを、出

身地と移住先の双方での文化人類学的調査に基づき多角的視点から明らかにすることであった。研究立案時の方法は、青田と温州、及びスペインとイタリアにおいて、学校教育や中国語教育等の教育環境を把握した上で、本人や親、祖父母、親族、教師にインタビューをする予定であった。しかし、コロナ禍で計画立案時のようなフィールドワークができなくなった。

それゆえ、研究分担者である浙江省在住の徐輝と鄭樂静が、浙江省青田県という古くから華僑を送り出している「僑郷」で、ヨーロッパから帰国した青田県出身者 12 名にライフヒストリーを構築するインタビュー調査を実施した。

調査は、2020 年 7 月と 8 月に青田県において、浙江省在住の徐と鄭が、12 名のヨーロッパからの帰還者にライフヒストリーを構築するインタビューを中国語で実施した。中心的なインタビュー項目は、海外移住や帰還の理由、子どもの教育への考え方や家族の移住経験、新型コロナウイルスの影響である。インタビュー対象者 12 名は 10 名が青田県生まれで、1 名はスペイン生まれ、男性 6 名と女性 6 名である。年齢層は 20 代から 50 代まで広い。90 年代に海外移住したのは 6 名、2000 年以降移住したのは 5 名で、1 名は海外生まれである。移住先はスペインが 7 名で一番多く、イタリア 2 名、フランス、セルビア、タンザニアが各 1 名である。海外移住時の年齢は、16 歳～36 歳で、20 代が一番多く、海外在住期間は 7 年～26 年である。インタビュー対象者は、全員中国籍である。

2. 研究経過および成果の概要

まず、浙江省青田県の移民送り出しの歴史と現状を文献調査によって把握した。そして、浙江省在住の徐と鄭は、予備調査として、2020 年 7 月 29 日に青田県帰国華僑聯合会で関係者から青田県の帰国の現状に関して聞き取り調査を行った。海外からの帰国者の多くが青田県僑郷輸入商品城でビジネスに携わっているという情報を得て、青田県帰国華僑聯合会関係者の紹介で、雪だるま式サンプリング法を取り、商品城に関わる 12 名のヨーロッパからの帰国者に中国語でライフヒストリーを構築するインタビュー調査を実施した。中心的なインタビュー項目は、海外移住や帰国の理由、子どもの教育への考え方や家族の移住経験、新型コロナウイルスの影響である。インタビューにおいては、調査目的と調査結果を学術雑誌に匿名で掲載することをあらかじめ説明し、8 名から録音の承諾を得た。4 名からは録音の承諾を得ることができなかったのでメモを取ったが、結果発表には同意を得ることができた。

この調査結果を山本・徐・鄭 3 名の共著論文（査読付き）として掲載した。また、オンライン/フォーラムを開催し、結果を発表した。

オンライン・フォーラムのプログラムは下記のようなものであった。

日時： 2021 年 1 月 25 日（月）14 時～16 時（Webex Meetings 使用）

テーマ：『ビジネスチャンスを生む「僑郷」への帰国—中国浙江省青田県の事例から—』

タイトル・発表者：

「海外移住の歴史と現状—青田僑郷輸入商品城の開業」 徐輝氏（温州大学准教授）

「帰国者のライフヒストリー分析—インタビュー調査から」 鄭樂静氏（寧波大學講師）

コメンテーター：

田嶋淳子氏（法政大学教授）

3. 今後の研究における課題または問題点

2020 年度は、コロナ禍ゆえに、当初予定していた海外調査はできなかった。しかし、特に僑郷である浙江省青田県へのヨーロッパからの近年の帰国者について調査でき、論文 3 本とフォーラムなどで発表でき、学術的にも大変貴重は成果を上げることができた。

なお、経費の執行に関しては、中国人研究者に本学の方針を伝えるのが困難であり、結果的に思うように経費を執行していただけなかったのは残念であった。国際共同研究の課題である。

Summary

The present study focused on Chinese migrants from Zhejiang Province (in particular, those from Qingtian and Wenzhou), a historical source of Chinese overseas migration, and the place of origin of a significant number of Chinese migrants to Italy and Spain in the late 20th century. It sought to examine the education and identity formation of the children of these migrants, moving between Zhejiang and Europe, based on multifaceted ethnographic surveys conducted in both their place of origin and destination countries. However, due to the coronavirus pandemic, overseas studies could not be undertaken as originally planned.

Accordingly, Xu (徐) and Zheng (鄭) who reside in Zhejiang Province conducted an interview with twelve returnees from Europe. The interviews constructing the life history were conducted in Qingtian County between July and August 2020. Since the study was conducted during the current COVID-19 pandemic, it also elucidated the impact of the global pandemic on the transnationalism of returnees.

In conclusion, the study's findings indicated that the perception of returning to the homeland among overseas Chinese has changed because of the investment promotion strategies implemented by the Qingtian County government, such as policies that favour returnees as well as the setting-up of the commodity city. Overseas Chinese currently consider that they can find new business opportunities by returning to their homeland. Moreover, the interviewees have increased their trust in their national government during the COVID-19 pandemic in 2020 as the government effectively implemented infection control measures for the virus, and believed that their decision to return to their homeland was a correct one. The interviewees are living in the transnational social space that connects overseas countries and Qingtian County while facing economic and social changes such as the COVID-19 pandemic. It can be said that the interviewees have enhanced their connection to Qingtian County from both business and psychological perspectives.

Furthermore, findings indicated that transnationalism has been transformed by Chinese returnees through mobility experiences over three generations in a transnational social space between Qingtian and Europe. The older generations of returnees in their 60s and 70s came back to Qingtian in order to retire; those in their 40s and 50s have enhanced their connection to Qingtian from both business and psychological perspectives as they see opportunities both in

Europe and Qingtian. Further, the younger generations who were educated both in China and Europe, while migrating between the two regions, have independently selected their place of residence.

Research findings were presented in papers and at a forum, and resulted in a highly valuable academic contribution.

脳の性差や性転換に及ぼす性ステロイドの影響

The effect of sex steroids on the sexual differences and sex reversal of the brain

研究代表者 金子 律子(生命科学部生命科学科)

研究分担者 小柴 和子(生命科学部応用生物科学科)

共同研究者 黄 鵬鵬・曾 庸哲(台湾中央研究院・
個体細胞生物学研究所)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／① 性ステロイドホルモン

② 性転換

③ 性差

④ 脊椎動物

⑤ GnRH3 ニューロン

2020 年度交付額／ 1,983,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- (1) 自閉症モデルマウス (CRMP4 欠損マウス) から見た自閉傾向と感覚異常および性差、金子 (大谷) 律子、第 84 回日本心理学会大会企画シンポジウム「自閉症スペクトラム障害と感覚異常：動物実験による神経科学・行動科学の知見から、乳幼児、児童を対象とした行動科学・認知科学の知見までを振り返る」(企画者・話題討論者)、第 84 回日本心理学会 (2020 年 9 月 8 日～11 月 2 日) Web
- (2) 野生型と自閉症モデルマウス(Crmp4 欠損マウス)雌雄間で見られた超音波発声パターンの違い. 塩野鈴佳、古屋夏海、土屋貴大、大谷-金子律子 日本動物学会第 91 回大会 (2020 年 9 月 4～5 日ポスター発表) Web
- (3) Collapsin Response Mediator Protein4 (CRMP4) が PC12 細胞の樹状突起形成に及ぼす影響. 比嘉彩香、吉津葵、塩野鈴佳、大谷-金子律子. 日本動物学会第 91 回大会 (2020 年 9 月 4～5 日 オンライン開催、ポスター発表)
- (4) 11-KT 投与により新生する成熟雌ティラピア GnRH3 ニューロンはどこから来るか? 沖田圭介、金子豊二、村上志津子、大谷-金子律子. 日本動物学会第 91 回大会 (2020 年 9 月 4～5 日 ポスター発表) Web
- (5) 11-Ketotestosterone (11-KT) によるティラピア脳内の Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 関連遺伝子の発現量の変化 井上咲良、塩野 鈴佳、曾 庸哲、黄 鵬鵬、大谷-金子律子 東洋大学工技研 2020 年研究発表会 2020 年 2 月 24 日 Web
- (6) ティラピア雌脳の雄性化を引き起こすホルモンのバイオアッセイ系. 金子凌、緑川大雅、曾 庸哲、黄 鵬鵬、大谷-金子 律子 東洋大学工技研 2020 年研究発表会 2020

年 2 月 24 日 Web

(7) 成熟雌ティラピアにおける 11-KT 投与による神経新生と細胞増殖、及び JAK-STAT 経路の関連。緑川大雅、安次富萌、曾 庸哲、黄 鵬鵬、大谷-金子律子

東洋大学工技研 2020 年研究発表会 2020 年 2 月 24 日 Web

(8) 「Sall1/4 are essential for heart development though regulation of Isl1 and Myocd expression」Wataru Katano, Shunta Mori, Yuki Tajika, Jun K Takeuchi, **Kazuko Koshiba-Takeuchi** 第 43 回分子生物学学会, オンライン, 2020 年 12 月 (ポスター発表)

(9) 「魚類間における hand 遺伝子の比較解析」大牧創, 古川大雅, 守山裕大, 黒川大輔, 小柴和子 日本動物学会 第 71 回大会, 2020 年 9 月 Web

(10) 「The number of hand genes is not correlated with the ventricular septation」大牧創, 古川大雅, 守山裕大, 黒川大輔, 小柴和子 第 43 回 日本分子生物学会, 2020 年 12 月 Web

研究経過および成果の概要

当初は、台湾での研究代表者・研究分担者・共同研究者およびそれぞれに所属する院生達との共同研究会を計画していた。しかし、コロナ感染拡大により研究会の主催は延期そして中止せざるを得なかった。黄 鵬鵬先生には、研究科で実施した国際化プログラムにもご協力頂き、学生達を中心にオンラインで実験についての討論会に参加して頂いた。またその他、オンラインやメールを介して実験の打合せをさせて頂き、IGF-1 mRNA の脳での *in situ* hybridization 法 (金子研究室で小柴研究室の協力も得てかなり長い間試行錯誤を続けていたもの) を成功させて頂いた。IGF-1 の発現は肝臓では多いため、肝臓で *in situ* hybridization 法を用いて IGF-1 mRNA を検出することは容易なのだが、脳では発現が少ないことと肝臓とはアイソフォームが違う点があり、脳での検出に苦労していた。台湾でマンパワーを掛けて成功させて頂いたのは、とても有り難い事である。また GnRH3 mRNA を *in situ* hybridization 法で検出するプローブ作製と条件決めを業務依頼した。今回、研究会を台湾で開催することはかなわなかったが、小柴研究室との共同研究 (CRMP4 の性差形成への関与に関する研究)、台湾中央研究院・個体細胞生物学研究所との共同実験は実施することが出来た。以下、研究成果の概要を纏める。

1. 研究方法

「脳の性差や性転換に対する性ステロイドの影響」について、大きく 2 種類の研究を行った。

1 つ目は、自閉症モデルマウス (*Crmp4* 欠損マウス) について行った実験である。これらの実験は、自閉症患者の発症に性差が存在するメカニズムを明らかにすることを目的として行っている。*Crmp4* 遺伝子は、自閉症患者さんに点変異を我々が報告した遺伝子であり (ヒト *CRMP4* 遺伝子での点変異)、また *Crmp4* 遺伝子から読み取られる CRMP4 タンパク質は、脳に存在する性的二型核 (雄と雌とで働きや大きさが異なる神経核) で性差形成時期に発現が異なるタンパク質として我々が見つけたものである。研究方法としては、自閉症モデル動物を用いて細胞レベル～行動レベルまで性差について様々な解析を行うと共に、性ステロイドホルモンが自閉症の性差出現に関係するかについて、胎仔期マウスおよび幼若マウスに性ステロイドホルモンを投与もしくは摂取させた場合の影響について調べた。

2 つ目は、魚の脳の性転換に及ぼす性ステロイドホルモンの影響を調べた研究である。こち

らの実験は、性ステロイドホルモンによって生殖行動が雌型から雄型になるティラピアを用い、行動の性転換つまり行動を指令している「脳の性転換」メカニズムを明らかにしようとの目的で行っている。方法としては、脳を用いた解析や脳のスライス培養を用いて、特定のニューロンに対する雄性ホルモンの作用や作用メカニズムを調べている。特定のニューロンとしては、雄の生殖行動を調節しているとされる GnRH3 ニューロンに焦点を当てている。様々な手法を用いているが、本概要では、脳スライス培養実験と、台湾のグループが進めてくれた *in situ* hybridization 法についてのみ簡単に記載する。【脳スライス培養実験】成熟雌ティラピアから麻酔下で脳を摘出し、脳ブロックを作製後、ビブラトームを用いて終神経節を含む厚さ 200 μm の脳スライス標本作製。脳スライスを左右に分けて一方を実験群、もう一方を対照群とする。実験群には 10 nM 11-KT や各種阻害剤を添加。対照群はそれらの溶媒を添加。培養期間を経た後、脳スライス中の GnRH3 ニューロンを免疫染色法により染め出し、GnRH3 ニューロンの発達を解析。あるいは、脳スライスから RNA を抽出し、cDNA への転写後、*Igf-1*, *Igfbp2b*, *Igfbp4* 等のプライマーを用いて RT-qPCR を行い遺伝子発現を解析。【*in situ* hybridization 法】成熟雄ティラピアを麻酔下で脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液 (PFA) に浸漬。その後 20%ショ糖 (in 0.1 M PBS) 溶液に浸漬後、厚さ 16 μm 連続凍結切片を作成。凍結切片を PBST で洗浄し、Proteinase K 処理後、4%PFA で固定。*Igf-1* アンチセンス、センスプローブで 1 晩ハイブリダイゼーション。洗浄後、ブロック処理し、DIG 抗体により検出。

2. 研究経過および成果の概要

自閉症モデルマウス (*Crmp4* 欠損マウス) について行った実験: *Crmp4* 欠損マウスの雄での異常が顕著であった。つまり、*Crmp4* 欠損マウスの雄での社会性低下や感覚異常が、雌雄の野生型マウスや *Crmp4* 欠損雌マウスよりも顕著であった。また母マウスとのコミュニケーションを、仔マウスが発する超音波発声の回数や鳴き方のパターンにより解析したところ、生後 7 日齢で既に雄の *Crmp4* 欠損マウスのコミュニケーション低下および発声パターンの変化が見られた。また性ステロイドの影響については、胎仔期の注射 (母マウスへの注射) はストレスが高いためか、生まれた野生型仔マウスにも超音波発声の異常が出てしまった。そのため、現在、投与方法を注射から好物 (クッキー) にステロイドホルモンを混ぜて食べさせる方法に変更して再実験を行っている。

ティラピアの脳の性転換について: 魚類雄性ホルモン (11-KT) によって GnRH3 ニューロンが発達する際、11-KT により脳内で Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) の合成が高まり、IGF-1 が GnRH3 ニューロンの発達を促している証拠が、今回得られた。今回得られた証拠は、①脳スライス培養法により、IGF-1 受容体を阻害すると、11-KT の作用が消失すること。②11-KT 投与により IGF-1 の産生が高まる事。③IGF-1 を 11-KT の代わりに直接脳スライスに添加しても、11-KT と同様の効果が得られる事。④*in situ* hybridization 法により IGF-1 mRNA を発現している細胞を脳内で検出できた事。⑤GnRH3 ニューロンの細胞体に、IGF-1 受容体が存在することを免疫組織化学法により示せた事。以上の結果から、魚類 (ティラピア) の雌の脳が 11-KT によって性転換を起こす際 (雄の生殖行動を調節する GnRH3 ニューロンが発達する際)、脳内で IGF-1 が合成され、それが GnRH3 ニューロンの受容体に結合し、GnRH3 ニューロンの発達を促す、という一連の分子メカニズムモデルを得ることができた。

3. 今後の研究における課題または問題点

今年度は、コロナ感染拡大のため、前期に殆ど実験が出来なかった。また台湾のグループと研究会を台湾で開催する予定だったが、それも中止となった。オンラインやメールでコミュニケーションは取れていたが、実験内容は縮小せざるを得ない部分があり、大変残念だった。

GnRH3 ニューロン結果が得られたものについては、来年度中に国際誌への公表を行いたいと考えている。

Summary

We performed two groups of experiments to approach the effect of steroids on sex differences and sex reversal in the brain. The aim of the first group was to examine “prenatal sex steroid hypothesis on autism spectrum disorder (ASD)” which suggests excessive prenatal exposure to testosterone could contribute the development of ASD. By using ASD-model mice (*Crmp4*-KO mice), we examined total numbers and categories of ultrasonic vocalizations (UVs) emitted by wild-type and *Crmp4*-KO pups to communicate with their mothers. Our results showed that the total number of calls was significantly smaller in male *Crmp4*-KO mice than in male WT mice when mother and pups were isolated. In addition, the pattern of UVs were also quite different in male *Crmp4*-KO pups from those in male and female WT and female *Crmp4*-KO pups. These results indicated that ASD-like communication impairment in male *Crmp4*-KO mice can be observed even at postnatal day 7. The investigation of the steroid effects on ASD model mice is still under examination.

The aim of the second group was to elucidate the signaling pathway relating to the androgen (11-KT)-induced sex reversal of the female tilapia brain. The treatment with 11-KT increased the number of GnRH3 neurons in mature female tilapia and induced male-specific reproductive behavior. The addition of 11-KT into the medium also increased GnRH3 neurons. Pharmacological studies applying IGF-1 receptor (IGF-1R) inhibitor on cultured brain slices suppressed the effect of 11-KT, suggesting that IGF-1 receptor (IGF-1R) is involved in the androgen-induced increase of GnRH3 neurons. The addition of IGF-1 into the medium increased GnRH3 neurons. The increase of IGF-1 mRNA shortly after 11-KT treatment in brain slices and the co-localization of IGF-1R immunoreactivities in GnRH3 neurons supported the involvement of IGF-1 and IGF-1R in the signaling pathway. Finally, *in situ* hybridization study showed the expression of IGF-1 mRNA in the tilapia brain. Taken together, these studies indicated, when mature females are treated with androgen, GnRH3 neurons, key neurons for male reproductive behavior, are positively regulated through IGF-1/IGF-1R pathway.

スリランカにおけるイネ収量および亜鉛吸収効率向上のための遺伝構造解析

Genetic Analysis of Sri Lankan Rice to Improve Grain Yield and Zn Biofortification

研究代表者 廣津 直樹 (生命科学部生命科学科)

研究分担者 長坂 征治 (生命科学部生命科学科)

共同研究者 Dr. Saman Seneweera,
(National Institute of Fundamental Studies,
Sri Lanka)

Dr. Siril Wijesundara,
(National Institute of Fundamental Studies,
Sri Lanka)

Dr. Ishara Perera
(National Institute of Fundamental Studies,
Sri Lanka)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①イネ Rice
②遺伝資源 Bioresource
③亜鉛 Zinc
④スリランカ Sri Lanka
⑤次世代シーケンス Next Generation Sequencing

2020 年度交付額／1,800,000 円

研究発表／学会および口頭発表
なし

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究では、スリランカ国立基礎研究所で選定された 192 系統を双方の研究機関で共通して取り扱うため、まず 192 系統のイネ種子を法的手順に則って輸入することを計画した。192 系統の種子は滅菌消毒後発芽させた後に DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる GRAS-Di 技術により 0.5 Gb 約 50,000 箇所の一塩基多型情報を取得する。遺伝子多型情報からゲノムワイド関連解析に用いるための 192 系統の遺伝子型情報を抽出する。同時に、現地スリランカで同系統のイネをセットで栽培し、収量および玄米の亜鉛吸収効率に関する形質の調査を行う。これらにより、スリランカ独自の遺伝資源から収量性および亜鉛吸収効率が優れた遺伝資源の選抜とこれらを制御する遺伝的要因を特定することを目的とした。しかしながら、新型コロナウイルス感染拡大による渡航制限により研究計画の大幅な変更を余儀なくされた。

2. 研究経過および成果の概要

新型コロナウイルス感染拡大により、スリランカ国立基礎研究所で選定されたイネ系統の栽培や輸入手続きに必要な SMTA 締結が予定通り進まなかった。そのため急遽、国内ジーンバンクで利用可能なスリランカ遺伝資源から 96 系統をスリランカ国立基礎研究所と共同で選定し、遺伝資源構造の評価を行なった。96 系統のイネを発芽させて DNA を抽出し、DNA 品質の確認を行なった。次世代シーケンサー HiSeq4000 を用いて 2x100 bp モードで、1 系統あたり約 5M リード、約 500 Mbp のシーケンスを行なった（外部業者に委託）。これにより、計 56 Gbp（データ量約 38 G バイト）に相当する断片配列のデータを得た。信頼性が 99%以上であると推定される塩基数の割合は全体で 89.4%であり、幅広い遺伝資源から信頼性の高い配列情報を得ることに成功した。その後、データ解析を行なった。Trimmomatic (ver. 0.39)を用いてアダプター配列や信頼性の低いリードを除去するクリーニングを行い、各系統で約 500 Mbp、96 系統で計約 56 Gbp の配列情報を得た。次に bowtie (ver. 2.4.1) を用いてクリーニングにより得られたリードをイネのリファレンスゲノム配列にマッピングし、samtools (ver. 1.10) および bcftools (ver. 1.10.2) を用いてマッピング結果からリファレンスゲノムと異なる塩基配列を抽出した。さらに GRAS-Di (ver. 1.0.5) を用いてジェのタイピング解析を行なった。まず、5'末端の 10 bp を除去した後、優性マーカーを検出し、リファレンスゲノム上で候補位置を特定した。その結果、リファレンスゲノムにマッピングされたマーカー 57,827 のうち、使用可能なマーカーを 50,523 箇所特定することに成功した。これらの使用可能なマーカーは、スリランカイネの遺伝構造を特徴付ける遺伝情報であり、今後の遺伝構造解析を進める上で基盤となるものと期待される。

また、今年度は新型コロナウイルス感染拡大による計画変更の次善措置として、現地スリランカで DNA の抽出を行い、種子の輸入を回避する措置をとった。まずは、現地スリランカで DNA の抽出技術を付与するために、オンラインで技術指導を行い DNA 抽出の技術供与を行なった。これも今後の共同研究を進めるために有用な技術基盤となると考えられる。

3. 今後の研究における課題または問題点

今年度は新型コロナウイルス感染拡大により当初の研究計画の変更を余儀なくされたが、それでもスリランカ国立基礎研究所との共同研究を進めるための一定の基盤を構築することができた。一方で、当初計画していた、また本研究課題の主目的である現地スリランカでの収量および亜鉛吸収効率などの形質調査を行うことができなかった。現地における調査は、調査項目の事前の検討が必要であり、本研究課題を遂行するためには必要不可欠である。また、今年度の研究で得られた遺伝子型情報をゲノムワイド関連解析に結びつけるためには、PC 機材やソフトウェアのやり取りを含めて対面での会議を行う必要がある。本来、協定期間との連携強化のための課題であり、今後も継続して人的交流を行うことができるか、が本研究課題の課題として挙げられる。

また、一般的なゲノムワイド関連解析では 300-400 系統を解析に用いることから、本課題で計画した 192 系統、さらに今年度実施できた 96 系統の遺伝解析では不十分である。今年度は、次世代シーケンサーを用いたゲノムシーケンスとそこから使用可能なマーカーの抽出実験は滞りなく行うことを確認することができた。この 96 系統の表現型データが取れ次第、モデルケースとしてゲノムワイド関連解析を進めていく必要がある。さらに、スリランカの幅広い遺伝資源をさらに 200-300 系

続を今後追加していく必要がある。スリランカ遺伝資源の大規模な遺伝構造解析は行われたことはない。引き続き同国における本学の優位性を保ちつつ共同研究を進め、成果の発表を行なっていく必要がある。

Summary

The world's population is expected to increase by 2.3 billion between 2009 and 2050, requiring significant increases in global food production to fulfil future food demand. Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the world's most important crops, providing nutrition for approximately one-half of the global population and is the most important crop in Asia. Micronutrients are essential elements for the effective functioning of human metabolic activities and good health. Currently, micronutrient malnutrition or hidden hunger is a global health issue caused by inadequate intake of essential vitamins and minerals from the diet. Zinc (Zn) is an essential micronutrient required for proper growth and development, immune system function, reproductive health and neurobehavioral development in the human body. Zn deficiency causes impaired growth, increased susceptibility to infections and increased mortality and affects around one-third of the world's population. Populations in developing countries like as Sri Lanka are at a high risk of Zn deficiency due to high intake of plant-based diets.

This study aims to improve grain yield and biofortification success rate of Zn in Sri Lankan rice. In this project, we planned to analyze the genetic structure of Sri Lankan rice by Next generation sequencing technology and to perform the Genome Wide Association study related traits evaluated in Sri Lank. However, due to COVID-19 emergency, we could not visit rice field at Sri Lanka, and therefore, we could not complete planned study. In this year, we changed the plant and analyzed the genetic structure of 96 selected Sri Lankan rice which available in Japanese gene bank. We successfully sequenced 500 Mbp in 96 Sri Lankan rice and found that the bases with high (>99%) quality were 89.4%. The data was processed using trimmomatic (ver. 0.39), bowtie (ver. 2.4.1), samtools (ver. 1.10) and bcftools (ver. 1.10.2) and all 96 Sri Lankan rice were genotyped using GRAS-Di (ver. 1.0.5). We finally found 50,523 markers and these markers will be able to use for further analysis as Genome Wide Association Study GWAS). To complete GWAS relating grain yield and quality in Sri Lankan rice germplasm, the number of populations should be increased more.

In this project, we also transfer the techniques for DNA isolation from rice leaves into Sri Lanka, and this will help to increase the number of populations to be used for this study in the future. We aim to identify the genes regulate the grain yield and the efficiency of Zn biofortification. These traits will be affected by environments, it is inevitable to obtain the trait data at the actual rice field in Sri Lanka. To complete this study and strength up the collaborative relationship between two countries, we need to continue the communications including human exchanges.

ヒトメラノーマ予防法開発のためのモデルとしてのイヌメラノーマの可能性

A possibility of canine melanoma as a model for establishment of preventive approach against human melanoma

研究代表者 矢野 友啓(食環境科学部食環境科学科)

共同研究者 Maria Lucia Zaidan Dagli(サンパウロ大学)

Francisco Javier Hernandez Blazquez(サンパウロ大学)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①イヌメラノーマ canine melanoma

②ヒトメラノーマモデル model for human melanoma

③がん幹細胞 cancer stem cell

④がん予防 cancer prevention

⑤ファイトケミカル phytochemicals

2020 年度交付額／ 1,990,000 円

研究発表／学会および口頭発表

福岡那菜、西澤梨子、遠藤大輝、矢野友啓、食品機能性素材を用いたイヌメラノーマ新規治療法構築に向けた検討、第 67 回日本栄養改善学会学術総会、2020.9.2-9.4 誌上開催

福岡那奈、矢野友啓、機能性食品素材 Bowman-Birk protease Inhibitor のイヌ口腔内メラノーマ療法への可能性、第 18 回日本機能性食品医療学会、2020.12.19 オンライン開催

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

研究背景: イヌの死因の約 3 割は悪性腫瘍である。その中でもイヌメラノーマ(イヌ悪性黒色腫)は、口腔内に発症する悪性腫瘍において最も発症率が高い。侵襲性、転移率、浸潤性等が高いことから悪性度が高いイヌ悪性黒色腫は、初期段階では、ほとんど症状が無いため発見が遅れることが多い。また、抗がん剤耐性が強く副作用のリスクも高いことから、がんの三大療法(外科治療、放射線治療、化学療法)では、完治に至る有効な治療法は無い。実際に、イヌ悪性黒色腫細胞における事前検討でも抗がん剤耐性が確認されている。従って、抗がん剤の代替成分として安全且つ有効な予防候補成分を利用した新規予防法の構築が必要となる。また、イヌ悪性黒色腫は近年増加傾向にあるヒト悪性黒色腫との遺伝子発現パターン等の類似性から、ヒト悪性黒色腫の良いモデルになるとされている。ヒト悪性黒色腫は希少がんであり、なかなか症例数がそろわず、大規模な抗がん剤の介入試験ができない状態にある。しかし、イヌ悪性黒色腫の症例数は多く、イヌ悪性黒色腫での介入研究はヒト悪性黒色腫の介入試験の代わりになり、イヌ悪性黒色腫の介入研究で有効性と安全性が確認された新規抗悪性黒色腫成分は、大規模なヒト介入試験を行わずに臨床応用が可能であるとされ、イヌ悪性黒色腫で有効性が確認された新規成分は、そのままヒト悪性黒色腫の臨床治療に使える可能性がある。

近年、がんの発生はがん幹細胞と言われる少数の腫瘍組織が起源となり階層的に分化細胞を作り出し、腫瘍全体を構成するという「がん幹細胞仮説」が提唱されている。がん幹細胞は、通常がん細胞にはない自己複製能や多分化能、化学療法剤・放射線などへの耐性、腫瘍形成能といった特徴を

保有する。そのため、腫瘍形成の起源となるがん幹細胞を標的とすることが、再発・転移のリスクの少ないがんの治療に有効であると考えられる。そこで本研究では、以前研究からヒト悪性黒色腫との類似性が確認されているイヌ悪性黒色腫細胞株と代表的なヒト悪性黒色腫細胞株から幹細胞を濃縮し、その幹細胞を用いて、2つの作用点が違うファイトケミカルを組み合わせ、がん幹細胞を分化誘導後、殺細胞効果が認められる成分で分化させたがん幹細胞をたたき方法で、新たな悪性黒色腫幹細胞を標的とした悪性黒色腫治療法の可能性を検証した。

細胞株とがん幹細胞分離：ヒト悪性黒色腫細胞株（A375）とイヌ悪性黒色腫細胞株（TLM-1）を用いた。2週間の3次元培養により、がん幹様細胞含有集団（Spheroid：Sph）を分離した。比較対象は通常悪性黒色腫細胞（Adherent：Adh）とした。細胞生存率はいずれも MTT assay により評価した。

Sph のがん幹細胞性の検討：がん幹細胞マーカーの発現と薬剤耐性能により、Sph のがん幹細胞性を検討した。がん幹細胞マーカーは、CD133、OCT 4、SOX 2 を使用し、Sph におけるこれらのマーカー遺伝子の発現量を qRT-real time PCR 法で解析した。薬剤耐性能は、Sph に対して抗がん剤 Docetaxel による処理を行い、24 及び 48 時間後に、細胞生存率を評価した。

機能性食成分による細胞死誘導への影響：分化誘導作用がある成分として、リスベラトロール(RES)を、殺細胞効果がある成分として α -トコフェロールコハク酸エステル (α -TOS) を各々選択し、まず、Adh 及び Sph に対して RES を 0-50 μ M 濃度範囲で処理を行い、24 及び 48 時間後に、細胞生存率を評価した。次に、Sph を RES 処理群 (25 μ M：この濃度が生存活性に影響しない最大濃度) と RES 未処理群 (0 μ M) に分け 24 時間処理し、さらに α -TOS を 0-40 μ M の濃度範囲で処理を 24 時間行って細胞生存率を評価した。

2. 研究経過および成果の概要

悪性黒色腫細胞株からの幹細胞性を有する細胞集団の濃縮：ヒト悪性黒色腫細胞株からは従来当研究室で行っている他のがん種からがん幹細胞を分離する 3 次元培養法で、がん幹細胞性を有する可能性が高い明確な Sph が得られたが、イヌ悪性黒色腫細胞株からはいくつかの三次元培養法を使って、幹細胞性を持つ細胞集団の分離を試みたが、明確な Sph は得られず、以後の検討はヒト悪性黒色腫細胞株から得られた Sph を用いた。

Sph のがん幹細胞性の検討：Sph におけるがん幹細胞マーカー遺伝子の発現量は、Adh と比較して全てにおいて高い値を示した。また、抗がん剤 Docetaxel による処理を行うことで、Adh では濃度依存的に細胞生存率が低下したが、Sph では有意な低下は認められず抗がん剤への抵抗性を示した。これらのことから、3 次元培養によって得られた Sph はがん幹細胞性を有し、Sph は悪性黒色腫幹様細胞であることが示唆された。

機能性食成分による細胞死誘導への影響：Adh では、最大処理濃度 50 μ M RES で処理 24 時間後に細胞生存率が有意に低下したが、Sph では同条件で 48 時間後に細胞生存率が有意に低下した。一方、Sph に対して、25 μ M RES と α -TOS (処理濃度：0-40 μ M) を併用することにより、全ての処理濃度で、未処理群と比較して細胞生存率は有意に低下した。本研究により、Sph に対して、機能性食成分 RES の単独使用では高い効果が得られなかったが、 α -TOS と併用することで相乗的に細胞死を誘導することが示された。すなわち、RES 処理が Sph に対して分化を誘導し、分化した細胞に α -TOS がアポトーシスを引き起こしたことで、細胞生存率が効率的に低下したと考えられる。以上のことより、RES と α -TOS との併用は新規悪性黒色腫治療に有効であることが示唆された。

3. 今後の研究における課題または問題点

今後の課題は、イヌ悪性黒色腫細胞株からの有効な幹細胞株の濃縮法を構築し、今回得られた RES と α -TOS との併用がイヌ悪性黒色腫幹細胞においても有効で、イヌ悪性黒色腫を使用した臨床試験がヒト悪性黒色腫の臨床介入試験の代替法として有効であることを確認することである。

Summary

Background and aim: Canine melanoma is a representative malignant tumor in frequently observed dog and is considered as an adequate model for human melanoma. Since human melanoma is a representative rare malignant tumor in human, it is difficult to perform clinical investigation against human melanoma, using a lot of human melanoma patients. As an alternative clinical investigation, it is reasonable to utilize canine melanoma, because the melanoma is frequently observed in dogs. In this study, we investigated if we tried to establish a new treatment approach against melanoma based on the eradication of melanoma stem cells, using human and canine melanoma cells.

Methods: We used two commercially available human melanoma (A375) and canine melanoma (TLM-1) cells. To establish an adequate method concentrating stem-like cells from parent melanoma cells, we created spheroid-formed cell population (Sph) from the parental cells, using several conditioned 3D culture systems. To evaluate the stemness of Sph, after each mRNA was prepared from each spheroid, mRNA levels of several cancer stem-like cell markers were determined through RT-Real time PCR. Also, we checked chemoresistance of Sph, using cell viability after an anti-cancer drug (Docetaxel) treatment. Finally, to estimate the combination effect of RES and α -TOS on viability of Sph, we evaluated cell viability in Sph by the combination.

Results: we succeeded in concentration of melanoma stem cells from parental human melanoma cells but not parental canine melanoma cells, using 3D culture system from the high level of each cancer stem-like cell marker. In addition, we confirmed that the concentrated human melanoma stem cell population showed severe chemoresistance against Docetaxel. These results clearly demonstrated that our established 3D culture was an effective method to concentrate melanoma stem cells from parental melanoma cells. Finally, we confirmed that the combination of RES and α -TOS could effectively induce cell death in melanoma stem cell population.

Conclusion: The differentiation of melanoma stem cell population by RES may lead to abrogation of chemoresistance in this cell population, and subsequent treatment of a cytotoxic anti-cancer agent, α -TOS may enhance the treatment effect against the stem cell population. Thus, the combination of differentiation-inducing agent and cytotoxic agent can be effective to absolutely eradicate melanoma cell population.

東南アジアにおける帰還移民の社会経済的再統合

—日本就労経験者を中心に—

Socio-Economic Re-integration of Migrant Labor in Southeast Asia: Focusing on Technical Intern Trainees in Japan

研究代表者 長津一史 (社会学部社会文化システム学科)

研究分担者 箕曲在弘 (社会学部社会文化システム学科)

左地亮子 (社会学部社会文化システム学科)

寺内大左 (社会学部社会文化システム学科)

渡邊 暁子 (文教大学国際学部)

合地幸子 (東洋大学アジア文化研究所)

鈴木佑記 (国土舘大学政経学部)

研究期間／2020年4月10日～2021年2月15日

キーワード／①帰還移民 Return Migrants

②東南アジア Southeast Asia

③技能実習生 Technical Intern Trainees

④社会経済的再統合 Socio-Economic Re-integration

⑤気仙沼 Kesenuma

2020年度交付額／1,800,000円

研究発表／学会および口頭発表

【著書】

Nagatsu Kazufumi, 2021. Maritime Diaspora and Creolization: A Genealogy of the Sama-Bajau in Insular Southeast Asia. In, *Sea nomads of South-East Asia Past and Present*, edited by Bellina, Bérénice and Roger Blench, Singapore: National University of Singapore. (in press)

長津一史 (編) 2020. 「東南アジアにおける帰還移民の社会経済的再統合—日本就労経験者を中心に」『アジア文化研究所研究年報』第55号.

長津一史 (編) 2021. 『インドネシアにおける移民労働の社会経済的意味——漁船員・水産加工労働者から考える』東洋大学アジア文化研究所 ACRI シリーズ.

間瀬朋子・長津一史 2021. 「アジアとオーストラリアを繋ぐ人びと—海域世界の視座から」鎌田真弓編『大学のオーストラリアガイド』昭和堂. (近刊)

長津一史 2021. 「タマリンドが語るもうひとつのオーストラリア史」『大学のオーストラリアガイド』鎌田真弓編『大学のオーストラリアガイド』昭和堂. (近刊)

箕曲在弘 2020. 「新大久保をフィールドとした「社会調査および実習」の軌跡—多文化共生に向けた生活史調査の授業運営方法—」『東洋大学社会学部紀要』58(2):71-85.

合地幸子 2021. 「インドネシア人移民の就労地における共生—東日本地区と台湾宜蘭県の比較」長津一史 (編) 2021. 『インドネシアにおける移民労働の社会経済的意味——漁船員・水産加工労働者から考える』東洋大学アジア文化研究所 ACRI シリーズ, 29-33 ページ.

【口頭発表】

Nagatsu, Kazufumi 2020. Online Webinar “Anthropology in the Time of Pandemic: What Can We Do and Learn from This Crisis.” August 7, 2020. Hosted by Dept. of Anthropology, Faculty of Cultural Sciences, Gadjah Mada University, Jogjakarta, Indonesia.

高橋典史・長津一史・箕曲在弘 2020. 「地球市民教育は何を目指すのかーグローバル化と多様性」2020年度社会学部社会文化システム学科オンライン連続シンポジウム『<地球市民>への誘いー多様性に学び、共生を創造する』(第2回) 2020年11月04日、東洋大学、オンライン開催.

箕曲在弘 2020. 「新大久保の多文化共生に関する『社会調査および実習』の展開ー多文化共生に向けた生活史調査の授業運営方法」第15回アジア文化研究所年次集会、オンライン開催.

左地亮子 2020. 「ジプシー巡礼祭に立ち現れる『市民の共同体』ー〈政治〉を民族誌的に問うための試論」日本文化人類学会 第54回研究大会 2020年5月30日、オンライン開催.

寺内大左 2020. 「自己変容型フィールド調査の試みー時間と専門知識の制約の中で学生の自己変容をいかに導くか」日本文化人類学会 第54回研究大会 2020年5月30日、オンライン開催.

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究プロジェクトは、日本で技能実習生等として就労した経験を有する東南アジアの移民労働者を主な対象として、日本での就労内容や生活形態、帰還後の社会経済的再統合、キャリアの再編を出身国別に比較考察し、これらのパターンの異同を明らかにすることを目的とした。具体的な対象は、インドネシア・フィリピン・ミャンマー出身の移民労働者である。

東南アジアの多くの国において帰還移民は、地域社会の変容・発展の重要なアクターになっている。この点を意識しつつ本研究では、東南アジアにおける帰還移民の社会経済的再統合とその意味を比較検討することを計画していた。方法論的には、ライフヒストリー調査と質問票調査の双方を用いる予定であった。

研究代表者は、2014年以来、宮城県気仙沼で水産加工業・漁業・建築業に従事するインドネシア人を対象に、来日の経緯、日本での就労形態、帰国後の再就職とそのネットワーク等に関する予備調査をおこなってきた。同様の予備調査は、インドネシアに帰国した元技能実習生を対象としても実施した。他に、マレーシアのアパレル製造工場で働くインドネシア人労働者を対象とする同様の予備調査もおこなった。

これら予備的調査の成果を検討する中で、代表者は、現代東南アジアの社会経済変容の動態を微視的なレベルで理解するためには、1) 移民労働者の就労以前から帰還後までの一連のプロセスを視野に入れたうえで、出身地におけるかれらの社会経済面での再統合のあり方を探る必要があること、2) 出身地の違いがそうした再統合のあり方にどう影響しているのかを比較検討する必要があることを確認した。

本研究は、日本で技能実習生等として就労した移民労働者の就労形態、帰還後の再統合とキャリア再編について、インドネシア・フィリピン・ミャンマーの出身国別に分けて比較考察し、これらのパターンの異同を明らかにすることを目的とした。具体的には、上記3カ国の移民労働者は、①どのような経路・機関を通じて当該国での職を探し、②どのような仕事と日常生活を経験し、③帰国後、いかに海外就労経験を活かして、出身地での社会経済生活を再編しているのかの三点を、ライフヒストリーと質問票調査により分析・考察しようとした

東南アジアの移民労働に関する従来の研究では、政治経済力学からみた労働力移動のプル・プッシュ要因の分析に重点をおくことが多かった。そうしたアプローチでは、移民労働者は国家間関係のなかの受動的な存在とみなされがちであった。これに対し本研究は、移民労働者を現在のグローバル状況下における主要な行為主体（エージェント）と位置づけ、かれらが海外就労を通じてどのように社会経済的な変容をとげ、帰国後、地域の社会経済にどのような影響を与えているのか（あるいはいないのか）に着目する。また、日本や東アジアの移民労働者に関する研究は、これまで主に再生産／家事労働者を中心的に取りあげることが多かった。これに対し本研究は、現在日本で働く技能実習生の多くが従事しており、かつキャリアの連続・非連続が可視的な農業・水産漁業とケア労働に焦点をあてることを企図した。

2. 研究経過および成果の概要

以上のように計画していたが、本年度は、新型コロナウイルス感染拡大状況のため、研究代表者・分担者ともに本格的な調査をおこなうことが困難であった。ただ、限定的ではあったものの、代表者は後述のような予備現地調査を実施することができた。また、現地では日本の遠洋漁業の海外進出と外国人雇用の歴史的背景を理解するための貴重な一次資料（「みなと新聞」等）を入手し、資料調査をおこなうこともできた。

成果として代表者は、過去の研究成果ともあわせて、アジア文化研究所発行の ACRI Research Paper Series:20 を刊行したほか、複数の論考と、1本の口頭発表をおこなった。他に分担者も関連する研究成果を公表した。

主な現地調査は下記のとおりである（国内のみ）。

① 8月2日～3日

宮城県気仙沼市気仙沼まち・ひと・しごと交流プラザにおいて商工会議所青年部鈴木敦雄氏に聞き取り調査を実施。港まつりインドネシアパレード写真展について説明をうける。同写真展は、新型コロナで中止になった港まつりインドネシアパレードの代替として商工会議所によって組織された。また、インドネシア人等の外国人漁船員を手配する市内旅行代理店では、新型コロナ禍における外国人雇用形態の変化について話を伺った。

② 9月26日～27日

宮城県気仙沼市の水産加工工場・漁業会社において、技能実習生の就労に関する聞き取りおよび観察調査をおこなった。水産加工工場で働く技能実習生3名と面会。新型コロナ禍での就労環境の変化について話を伺った。3名は実習生としてすでに5年間働いており、5月には帰国を予定していた。しかし、新型コロナ禍のため帰国延長を余儀なくされた。幸い、雇用側が雇用延長手続きをし、彼女たちを特定技能生に移行させたため、来年（2021年）までの実習就労が可能になった。

③ 10月29日～11月3日

宮城県気仙沼市においてインドネシア人技能実習生が働く水産加工会社を訪問。同者の新型コロナ対応、技能実習生の経歴等について話を伺った。また気仙沼港において、インドネシア人漁船員（マルシップ船員と呼ばれる）の就労状況等に関する聞き取り調査をおこなった。

④ 11月13日～17日

宮城県気仙沼市の気仙沼港においてインドネシア人漁船員による漁獲水揚げを見学。かれらが働くのは、近海マグロ・メカジキ延縄漁船で、気仙沼市唐桑を拠点としている。後に、見学中にコンタクトできた漁船員のアパートを訪問し、過去20年ほどにおよぶ日本漁船での就労歴について話を伺った。

3. 今後の研究における課題または問題点

本研究は、代表者が事情により 2 年目以降の申請をすることができず、更新がなされなかった。コロナ禍で本格的な調査が実行できなかったことは悔やまれるが、2022 年度以降の更新を念頭に、下記、本研究にかかる今後のテーマを簡潔に記しておく。

- ①新型コロナ禍に生じた技能実習生やマルシップ船員（海外で日本船に乗船する外国人船員、主にインドネシア人）の就労形態・被雇用形態の変化
- ②技能実習生の送付・受入の制度に関する国家間比較
- ③農業・水産・漁業分野の技能実習生の帰国後の再社会統合と国家間比較
- ④マルシップ船員雇用の歴史的展開と国家間比較

Summary

In most of the Southeast Asian countries, return migrants have played important roles in their countries of origin by bringing back home their knowledge and experience since the 1980s. Part of them now constitute important actors who lead the innovative transformation and development of local communities. Meanwhile, there are a number of migrant workers from Southeast Asia in Japan. In 2019, there were 1.66 million foreign workers in Japan as of 2019. Technical intern trainees, or Gino-Jissusei approximately comprise 23 percent of the foreign workers. They come mainly from China, Vietnam, the Philippines, Indonesia and Myanmar.

With this in mind, this research project aims at comparing and examining the works and everyday lives in Japan, socioeconomic re-integration after return, and career restructuring in the country of origin of ex-migrant workers in Southeast Asia. It pays special attention to the people who have worked as technical intern trainees in Japan. The Technical Intern Training Program was established as a formal program in 1993. According to the Ministry of Justice, there are now approximately 410,000 technical intern trainees. The specific subjects of this study are ex-migrant workers who once worked as technical intern trainees in Indonesia, the Philippines, and Myanmar.

The three research questions of this study are as follows (1) through what channels and institutions do migrant workers in the above three countries seek employment in their own country, (2) how do they find their work/ technical intern trainees and daily life, and (3) how do they utilize their overseas work experience to reorganize their socioeconomic careers in their home country after returning home? This study planned to conduct fieldwork on these three questions through life history interviews and questionnaire surveys in Indonesia, the Philippines, and Myanmar.

Due to the spread of the new coronavirus since the beginning of 2019, it became impossible for both the project leader and project members to conduct an ordinary fieldwork this fiscal year. However, the project leader could barely conduct preliminary fieldwork for four times among the technical intern trainees in Miyagi, Japan. He also collected the valuable historical data such as Minato Shimbun published in 1970-80s and explore the historical background of the overseas expansion of Japanese pelagic fisheries and the employment of foreign fishermen working in the Japanese fishing boats.

Based on the above-mentioned research, the project leader edited and published an ACRI booklet at the Asian Culture Research Institute (ACRI), wrote several book chapters and made oral presentation in Indonesia (webinar). The project members also published related research results, too.

大腸がん幹細胞を標的とした新たな大腸がん予防法の構築

○Establishment of a new preventive approach against colorectal cancer based on targeting colorectal cancer stem cells

研究代表者 宮越 雄一(食環境科学部健康栄養学科)

研究分担者 矢野 友啓(食環境科学部食環境科学科)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①大腸がん

②がん幹細胞

③がん予防

④エピジェネティクス

⑤食品機能性素材

2020 年度交付額／ 1,782,000 円

研究発表／学会および口頭発表

Takahama Y, Endoh T, Yano T, Impact of sodium butyrate on the epigenetic regulation in colon cancer stem-like cells, 79th Annual meeting of the Japanese Cancer Association, 2020.10.3, on line.

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

ヒト大腸がん細胞株(HT-29)を用いた。1 週間の 3 次元培養により、直径 77 μm 以上のがん幹様細胞含有(Spheroid : Sph)集団を分離し、がん幹細胞性を評価した (がん幹細胞マーカーの発現レベルと抗がん剤耐性)。比較対象は通常大腸がん細胞(Adherent:Adh)を用いた。また、最初に 3 次元で 1 週間培養したものを Sph+ とし、それ以降の 3 次元での連続継代は Sph++, Sph+++として、がん幹細胞性の維持状態を検討した。がん幹細胞表面マーカーとして、CD44, Lgr5, EpCAM を選択し、qRT-real timePCR 法で評価した。生細胞数は MTT 法で測定し、*In vitro*での 3 次元培養での足場非依存性増殖能を腫瘍形成能評価に用いた。さらに、臨床で大腸がんの治療に使用されている 5 フルオロウラシル(5-FU)を用いて、0, 1, 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で処理し、細胞生存活性を WST-8 法で評価した。

確立した 3 次元培養法により、ヒト結腸がん細胞株 (HT29) から大腸がん幹様細胞を分離し、幹様細胞に対して酪酸 (0,0.5,1,2mM) を 24h,48h で処理した。その後、Lgr5 (大腸がん幹細胞マーカー)、DKK1 (Wnt アンタゴニスト) 及び HDAC2 (ヒストン脱アセチル化酵素) の mRNA 発現レベルを qRT-リアルタイム PCR 法、細胞生存率を MTT 法によって測定した。分化レベルは ALP 活性を用いて評価した。また、大腸がん幹様細胞にゲニステイン (0.10,50,100,200 μM) を 24h,48h で処理し、細胞生存活性を WST8 法を用いて評価した。

2. 研究経過および成果の概要

大腸がん幹細胞の特異的マーカーである **Lgr5** の mRNA 発現量を指標に、**Sph** に幹細胞を載淑されているか検討したところ、**Adh** と比較して、**Sph+** で有意に増加した。また、**Sph** を二次元培養に戻し、継代することによるがん幹細胞性を評価したところ、**MTT** 法による生細胞割合及び、各表面マーカーの mRNA 発現量は、**Sph+++ > Sph++ > Sph+** と、連続継代により増加傾向を示すと同時に、*in vitro* 足場非依存性増殖能で評価したところ、少なくとも 3 継代目までは腫瘍形成能に変化は認められなかった。また、**5-FU** に対する薬剤耐性能を評価したところ、**Sph** は **Adh** と比較して、薬剤に対する高い生存率が有意に示された。

以上の結果から、大腸がん **Sph** は薬剤耐性能、自己複製能・多分化能を有する集団であると示唆され、大腸がん幹細胞はある程度 2 次元における簡易培養の可能性が示唆された。

次に、大腸がん幹細胞を標的とした大腸がん予防法の可能性を評価するために、エピジェネティクス修飾作用がある酪酸を用いて検討した。その結果、酪酸処理したがん幹細胞では、濃度依存的に **Lgr5** の mRNA 発現レベルが低下し、特に 48h, 2mM で有意な差がみられた。さらに、2mM における **HDAC2** の mRNA 発現レベルの減少、**Dkk1** の mRNA 発現レベルの上昇がみられた。また、48h の酪酸処理による濃度依存的な細胞生存率の減少、**ALP** 活性の上昇が明らかになった。以上、**HDAC** 阻害剤として知られている酪酸は、がん幹細胞に対して濃度依存的ながん幹細胞性の低下をもたらした。さらに、細胞生存率の減少と分化誘導が伴うことが示唆された。これは分化と細胞死が同時に進行していることが考えられる。また、酪酸はがん幹細胞に対して、エピジェネティクス制御を介し、**HDAC2** と **Dkk1** の mRNA 発現レベルを相互に作用させることが示唆された。以上のことから、本研究における大腸がん幹細胞の細胞生存活性の低下にはエピジェネティクスな制御が関わっている可能性が推測された。したがって、エピジェネティクス制御により、大腸がん幹細胞の分化誘導と細胞死誘導が可能であることが示された。このことは、エピジェネティクス制御を介した、大腸がん幹細胞を標的とした大腸がん予防法構築が可能であることを示している。

3. 今後の研究における課題または問題点

今回の研究結果から、エピジェネティクス制御により大腸がん幹細胞の分化誘導とそれに関連した細胞死を誘導できることが確認された。したがって、エピジェネティクス制御活性を持つ食品機能性成分を用いた大腸がん幹細胞を標的とした新たな大腸がん予防法の構築は可能と判断できる。今後は、実用可能な安全性が確保された食品機能性成分のスクリーニングとその実用化が望まれる。

Summary

Aim: Cancer stem cells(CSCs)have the abilities to self-renew and maintain their stemness traits and to differentiate into various non-stem cancer cells. Progression of colorectal cancer(CRC)is the accumulation of a variety of genetic and epigenetic changes. The histone deacetylase inhibitor, Sodium Butyrate(SB) induces differentiation of CRC. However, there is insufficient evidence for the effects on colorectal CSCs. Thus, the aim of this study was to investigate the potential of antitumor effects via the control of epigenetics in colorectal CSCs by SB. In order to complete this aim, this study was carried out as follows: 1) the

development of the simple method to concentrate colorectal CSCs from colorectal cancer cells, 2) to investigate a possibility on suppression of colorectal CSCs via modification of epigenetic regulation by several active phytochemicals.

Method: A human CRC cell line, HT-29 was used. mRNA expression of epigenetic marker was evaluated by qRT real-time PCR. Additionally, I obtained spheroids by 3D cell culture to concentrate CSCs. In order to check stemness of colorectal CSCs separated from human colorectal cancer cells. Cell viability was determined by MTT or WST8 method. Also, in vitro tumorigenesis was evaluated by soft agar assay.

Result: 1) Using a 3D culture system, we succeeded in the formation of spheroid colony, and the sphere colony showed the elevation of stemness markers and in vitro tumorigenesis capability. Also, the sphere showed chemoresistance against 5-FU, a clinically used anti-cancer drug. These results suggested that we establish a method to concentrate colorectal CSCs. 2) We investigated if SB, a typical epigenetic regulator, could induce differentiation and subsequent cell death of colorectal CSCs. SB inhibited viability of the spheroids. And, the low doses decreased several stemness and epigenetic markers in the spheroids. Alternatively, DKK1(a Wnt antagonist) mRNA level has been increased, indicating that SB is promising as an epigenetic regulator to induced the differentiation and subsequent cell death of colorectal CSCs.

Discussion: SB in low dose has suggested to induce normalization of the balance both cell cycle and cell differentiation via inhibition of epigenetic markers in the spheroids, indicating that the eradication of colorectal CSCs could be completed via the epigenetic regulation. Overall, it is promising that a new preventive approach against colorectal cancer is established via the epigenetic regulation in colorectal CSCs.

東洋大学に所蔵される中国語諸史資料のデータベース構築と活用開発

Construction and development of the database about the Collection of
various Chinese source materials preserved at TOYO University

研究代表者 千葉正史（アジア文化研究所研究員、文学部史学科
教授）

研究分担者 【アジア文化研究所研究員】

三沢伸生（社会学部・社会文化システム学
科・教授）

【アジア文化研究所客員研究員】

大室智人（東洋大学文学部・非常勤講師）

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①中国語 Chinese

②史資料 Source

③文書 Document

④データベース Database

⑤アーカイブ Archive

2020 年度交付額／ 1,800,000 円

研究発表／学会および口頭発表

【単行本】

- ・千葉正史（主編）・工藤寿晴・大室智人（編）『歴史資料と中国華北地域：遊牧・農耕の交錯とその影響』東洋大学アジア文化研究所, 2021 年, 74 頁.
- ・野間信幸（監）・三沢伸生（編）『日本万国博覧会までの軌跡：EXPO'70 開催 50 周年の回顧』東洋大学アジア文化研究所, 2020 年.
- ・Junichiro ANDO, Chisako OMOSO, Nobuo MISAWA (eds.), *The Illustrated History of the Modern Japanese Images about the Islamic World through the Expeditions*, Asian Cultures Research Institute, TOYO University, 2021.
- ・田中逸平（著）・三沢伸生（序）『曾遊畫觀』東洋大学アジア文化研究所, 2021 年.
- ・Nobuo MISAWA (ed.), *Tokyo Muslim School Album (1927-1937)*, Asian Cultures Research Institute, TOYO University, 2021.

【論文】

- ・千葉正史「欽定行政綱目の解題と訳註(一)」『東洋大学文学部紀要』第 73 集史学科篇第 45 号, 2020 年, 99-152 頁.
- ・Nobuo MISAWA, “Abdürreşid İbrahim'in Japonya'daki izleri üzerine”, *Japon Seyyahı Abdüttrşit İbrahim'in İzinde* (Ali Merthan DÜNDAR ed.), Ankara: Doğu Kütüphanesi, 2020, pp.29-34. 【トルコ語】

- ・Nobuo MISAWA, “Yeni kaynaklar ile Abdürreşit İbrahim'in Japonya'daki hayatı”, *Japon Seyyahı Abdürreşit İbrahim'in İzinde* (Ali Merthan DÜNDAR ed.), Ankara : Doğu Kütüphanesi, 2020, pp.35-43. 【トルコ語】
- ・三沢伸生「明治維新以降の日本とイスラーム世界の関係」『歴史と地理』732号, 2020年, 3-21頁
- ・大室智人「明朝洪武帝期における琉球馬獲得とその背景」
- ・小林栄輝「日本における漢籍分類の現状と課題—東洋大学所蔵漢籍データベース化作業の進捗状況から—」アジア文化研究所研究年報「第55号」131-143頁※小林栄輝は研究協力者

【口頭発表】

- ・三沢伸生「日本における西アジア・イスラーム世界の表象化・具象化：博覧会・展覧会を通して」オンライン国際シンポジウム：日本の博覧会におけるアジア表象の推移（東洋大学アジア文化研究所）, 2020年12月12日.

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

研究プロジェクト全実施期間を通して、現在、アジア文化研究所内において研究所所蔵の史資料データベース化のために組織されている「汎用性データベース開発・構築研究会」（同研究会の中心は研究代表者・研究分担者および国内外の共同研究者（共同研究者は過去の共同研究の成果にもとづき本研究所の客員研究員を中心とし、一部は新規の研究者を含む）を、継承して、図書館との連絡・協議を図りつつ、すでにデータベース化されている本研究所の中国語史資料のデータベースと、本プロジェクトによって新規に進める本学図書館所蔵の中国語史資料のデータベース化事業を連動して、その有効的活用システムを構築する。

上記研究会において2016-18年度、中国語・ハングル・ミャンマー語・トルコ語といったアジア諸言語史資料のデータベース化が進められてきたが、前述のように本学図書館所蔵のアジア諸言語史資料のうち、特に質・量的に特徴があり、広く学界において活用が期待される中国語史資料に特化して、より規模の大きいデータベース構築とその活用方法を図っていく。具体的な役割分担としては、研究代表者である千葉が近現代期の史資料、研究分担者である大室が中世・前近代期の史資料について研究会の中で主導してデータベースの具体的作業にあたる。その際には、本研究所に所属する、中国を専門とする研究員（後藤武秀・元所長、斎藤里美、有澤晶子、野間信幸・所長、郝仁平、続三義、王亜新、王雪萍、劉永鵬ら）、客員研究員（飯塚勝重、石川重雄、植野弘子、高橋継男・元所長、横川伸・元所長、竹内洋介ら）、院生研究員（小林栄輝、程楽ら）および海外とりわけ本研究所と長きにわたる学術提携関係にある中国の華中科技大学の客員研究員（王秋華、王淨華ら）らを研究協力者として上記研究会（対面／非対面オンライン方式）で作業を進める。

さらに日本とイスラーム世界の関係史研究を専門とする三沢は、本研究所において多く所蔵される、特筆すべきコレクションとなっている回族・回教・伊斯蘭などイスラーム関係中国語史資料について、修得している中東地域の言語と専門知識を活かして、研究員の三沢伸生、客員研究員の安藤潤一郎を研究協力者として分析にあたる（ちなみに東洋大学でイスラームを研究対象の専門とする専任教員は子島と三沢の両名のみである）。学祖・井上円了もイスラームに興味を抱いていたこともあり、珍しく本学にはこの種のコレクションが存在し、従前まで中国研究において顧みられて

こなかった同コレクションの整理・分析・データベース化は本プロジェクトの今一つの特徴になるものと期待される。

上記の研究会・下位の作業部会における具体的な研究計画・方法としては、第一に国立情報学研究所（NII）によって整理公開されている CiNii および本学図書館の OPAC に依拠しながら、本研究所で今まで構築されたデータベースのシステムに基づき、本学図書館に所蔵される中国語史資料をデータベース化していき、本研究所のホームページ上での情報提供の準備を進める。また分析・整理途上に貴重な文献と認定されたものについては、保存のためのスキャナを用いたデジタル化を行い、著作権を考慮したうえでの将来的なデジタル・アーカイブの準備を進める。本プロジェクトの主眼はデータベース構築・活用であり、現在注目されるデジタル・アーカイブの構築については、解決すべき問題がまだ残されているのであくまで将来的な公開準備にとどめる。

2. 研究経過および成果の概要

初年度 2019 年度末には、実施した公開シンポジウムをもとに冊子『中国史研究と史料利用の現況：漢籍・石刻・檔案』を研究所の研究叢書として公刊・配布し、学生バイトを雇用してのデータベース準備も予定通り進み、順調な進捗にあり、成果公開を実現できたものの、年度末よりコロナ禍の世界的拡大が始まった。

周知の通り、中間年度の 2020 年度に入ってから、想定外の世界規模のコロナ禍により、世界の学術研究プロジェクトと同じく、本プロジェクトも深刻な打撃を被わり、計画の進捗は著しく停滞・遅れざるを得なくなった。予定していた海外出張・中国人研究協力者の招聘は全て不可能になり、代案のオンラインによる協力も先方の多忙・混乱によりままならなかった（本研究所と良好な学術協力体制にある華中科技大学がコロナ発生源と目される武漢に位置する）。また漢籍のデータベースには漢籍現物との照合が不可欠であるが、コロナ禍による東洋大学図書館の長期閉鎖とりわけ多くの古い漢籍が保管される板倉保存書庫の閉鎖によって半年以上作業を中断せざるを得なくなった。加えて学生バイトの雇用制限により、在宅テレワーク勤務も導入したもののデータベースの入力作業が大いに遅れてしまった。秋学期に再開できたものの、第三波の影響を受けて、再び困難に陥って現在に至る。

このように本プロジェクトの主眼であるデータベース構築作業は停滞せざるを得なかったものの、漢籍および漢籍の整理・データベース構築にかんして、研究分担者・国内外の研究協力者を交えての日常的なオンライン研究会をとおして理解を深めることが出来た。その集大成として、オンライン方式による公開シンポジウム「歴史資料と中国華北地域：農耕・遊牧の交錯とその影響」の開催である。日本人研究者だけでなく、中国人研究者の発表を交えて実施したオンライン・シンポジウムは、本プロジェクトにとっても有益であったばかりでなく、アジア文化研究所が将来的にオンライン方式で国際シンポジウム・ワークショップ開催する経験値を積むものとしてコロナ禍を奇貨とした成果としてあげることができる。また初年度に続き、本シンポジウムもアジア文化研究所の研究叢書たる ACRI Research Paper Series の 1 冊として上梓した。初年度同様に海外への発送が出来ずにいるが、研究所のホームページに PDF 版としてあげており、国内外への成果公開に努めている。

また初年度の分担者である子島進研究員（国際学部国際地域学科・教授）を引き継いだ三沢伸生研究員（社会学部社会文化システム学科・教授）が中心に進めている中国語諸史資料に含まれる回教・回族・伊斯蘭（イスラーム）関係につき、アジア文化研究所において約 100 点あまりの書籍（多

くが、新疆・雲南関係のもの）が、研究協力者の安藤潤一郎・客員研究員（専門：近代の中国イスラーム）とが整理を進めているが、前述のようにコロナ禍の影響により、計画していたデータベース構築作業が終了しておらず、次年度に継続して進めていく。

3. 今後の研究における課題または問題点

初年度の成果報告により指摘を受けた、中国研究者を招聘し、こちらも中国・台湾に短期出張して調査・研究することが不可能になったほか、上記のように図書館の長期閉鎖の影響を受けて、データベース構築作業は著しい遅延状況にあり、今後の大きな課題である。

2021 年度当初もコロナ禍の状況は変わらないものと予想され、データベース構築のための代替方策を講じる必要がある。図書館と協議して板倉保存書庫につき、研究分担者・研究協力者の短期出張などを実施して、漢籍現物照合を進めてデータベース構築を進めていきたい。

また海外の出張・招聘に関しては、外務省ならび東洋大学の方針を順守しながら、即応できるように相手側との連絡を密に取りながら計画していく。

Summary

[1. Method]

Our research project is organized with the aim for the development and construction of the special database of the various Chinese source materials collections belonged to TOYO University, which have been collected by the Library of TOYO University and Asian Cultures Research Institute (=ACRI), TOYO University. Nowadays, it has become common practice for the various research institutions at home and abroad to release the publications and source materials as the database and digital archive to promote the development of the academic researches.

Specifically, we are trying to construct the above mentioned the special database of the various Chinese source materials (books, magazines, newspapers, documents, photographs and so on). Furthermore we would like to pay attention on the minority in the China, such as the Chinese Muslims and Tatars in China.

[2. Development Process of the Project & Abstract of the Research Results]

In the second year (2020-2021), due to the world-wide pandemic COVID-19, we could not carry on our project for the most part, as planned. Because TOYO University was obliged to close all libraries (HAKUSAN Campus, but also ITAKURA Storage) and restrict to employ the assistants at university. It was not permitted to promote our database plan, but to hold the online meetings among the members. In this very bad circumstance, we carried out the following (but limited) developments. (1) We continued to make the data-base of the Chinese source material collections at TOYO University under the limited circumstance of the COVID-19. Two postgraduate students (one Japanese and one Chinese) worked at ACRI. (2) We promoted the WebEx online international symposium about our project at Hakusan Campus on October 10, 2020. (3) We published the book about above mentioned symposium and

will distribute for the important universities, libraries and researchers both within and outside Japan (unfortunately it will take more time to send to China because of the new-type Coronavirus disasters). (4) In addition, among our Chinese source materials, we found some important materials about Chinese Muslims especially Uyghurs in China.

[3.Future Tasks for the Research Project]

In the third year (2021-2022), we must do our best to recover from the delay of the second year (2020-2021) under the influence of COVID-19. We are ready to promote our plan with the close online contacts with the domestic and foreign collaborators. We hope to promote our plan in the next year.

初期大乘の成立と展開—テキスト・ことば・思想—（和題）

The Formation and Development of Early Mahayana Buddhism

—Texts, Vocabulary and Thoughts—（英題）

研究代表者 渡辺 章悟（文学部東洋思想文化学科）

研究分担者 山口しのぶ（文学部東洋思想文化学科）

研究分担者 岩井 昌悟（文学部東洋思想文化学科）

研究分担者 石川 美恵（東洋学研究所）

研究分担者 現銀谷史明（東洋学研究所）

研究期間／2020年4月10日～2021年2月15日

キーワード／①『八千頌般若経』

②初期大乘仏教

③梵-藏、藏-梵対照語彙

④データベース

⑤テキスト・ことば・思想

2020年度交付額／680,000円

研究発表／学会および口頭発表

渡辺章悟（研究代表者）

<研究論文>

①「般若経の縁起説とその展開—龍樹『中論偈』の八不偈をめぐって」『東洋思想文化』第7号、東洋大学文学部、2020年3月、pp.1-30(Left)

②「第二の転法輪」『駒澤大学佛教学部論集』51号、2020年12月26日、pp.1-13(Left).

③ “A Question Concerning the Title of the Prajñāpāramitā-hṛdaya[-sūtra]: Is the Prajñāpāramitā-hṛdaya[-sūtra] a Sūtra that Advocates Emptiness or a Dhāraṇī (Mantra)?” , Investigating Principles: International Aspects of Buddhist Culture, Essays in Honour of Professor Charles Willemen, ed. by ‘Lalji Shrivak’, Supriya Rai, the Buddha-Dharma Centre of Hong Kong, 2019, pp.383-396. (published in 2020)

<口頭発表>

①「般若の智慧と大乘の転法輪」（公財）中村元東方研究所・新春研究発表会におけるリモートでの講演、2021年2月16日（火）

<褒章>

○「第30回中村元東方学術賞受賞」（公財）中村元東方研究所・在日インド大使館共催、2020年9月1日

山口しのぶ（研究分担者）

<研究論文>

①「バリ・ヒンドゥー教のサンスクリット儀軌 *Wedaparikrama* —儀軌の概要および部分訳」『東洋思想文化』第8号、2021年3月、pp.87-107 ((1)-(21)) (印刷中)

②「カトマンドゥ盆地における文殊の信仰と図像」『アジア仏教美術論集 南アジアⅡ』（立川武蔵・森雅秀編）中央公論美術出版、2021年3月、pp.509-536（印刷中）

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

初期大乘仏教成立の解明の基礎として『八千頌般若経』の梵-蔵、蔵-梵対照語彙索引データベースを構築する。データベースの構築にあたっては研究協力者（今年度は6名）により、Excelシートに対照梵蔵語彙及び各語彙のテキスト上での所在を入力していく。

2. 研究経過および成果の概要

今年度も、昨年度から継続して『八千頌般若経』の梵・蔵対照索引作成のための語彙抽出作業を行った。抽出作業は、『八千頌般若経』の各章を研究協力者に割り当て、今年度は六名の研究協力者が作業を行った。その結果、5963語が収集され、昨年度分との合計は9403語となった。

3. 今後の研究における課題または問題点

来年度（最終年度）は収集された語彙を点検・確認し、抽出作業が完了した章について梵・蔵対照語彙索引として報告書にまとめる予定である。報告書作成にあたり、①語彙データ入力作業の完了から②入力データ検証、③報告書版下作成までの工程を速やかに実現できるスケジュールを次年度のはじめに組んでおく。

Summary:

1. Outline

In recent years, a new manuscript of *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra* (Perfection of Wisdom in 8,000 Lines), the oldest of the *Prajñāpāramitā Sūtras* representing early Mahayana Buddhism, has been excavated from Bāmiyān Site, Afghanistan. Our research project aims at research of these manuscripts of *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra* by the comparison of various Sanskrit texts and Tibetan, Chinese, English translations of them. And we are aiming to build the database configuration of concordance in various texts and translations of *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra* by classifying the words in these texts and translations. Furthermore, we intend to comprehend the characteristics of *Prajñāpāramitā Sūtras* from the aspects of the texts, vocabulary and thoughts on that database.

2. Staff

Our research members and their role are as follows:

WATANABE Shogo: research leader, comparative studies of the manuscript of Schøyen Collection and other manuscripts in *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra*

YAMAGUCHI Shinobu: research on rituals of female deity Prajñā-Bodhisattva and early Mahayana Buddhism.

IWAI Shogo: Subscription study on and vocabulary collecting of the Sanskrit text of *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra*.

ISHIKAWA Mie: Subscription study on and vocabulary collecting of the Tibetan text of *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra*, and development of the database operating program.

3. Research Activities in 2020

3-1. Database constructing work

In this second year, we have entered and collected the vocabulary of *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra* in Excel, continuing from the previous year. This data entry work aims to build the database of *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra* through creating a text of Sanskrit-Tibetan/Tibetan-Sanskrit contrast vocabulary collection of *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra*. Since this database is created in Excel, it will be a database that can be compared not only with Sanskrit and Tibetan but also with other languages in the future.

Therefore, it can be expected to provide the basis for future research on *Aṣṭasāhasrikā Prajñāpāramitā Sūtra*.

The task of collecting data for the database construction was performed by the following six research collaborators: That is, SHOJI Fumio (associate professor, Rissho University), MIYAZAKI Tensho (associate professor, Tsurumi University), SUZUKI Kenta (professor, Hokkaido Musashi Women's Junior College), SATO Naomi (researcher, Center for Information on Religion), HIRABAYASHI Jiro (researcher, Institute for Comprehensive Studies of Buddhism, Taisho University) and IKUMA Hiromitsu (researcher, Institute for Comprehensive Studies of Buddhism, Taisho University).

This year, 5,963 words have been entered into the Excel sheet. Last year, about 3440 words were entered, so the total vocabulary currently collected is 9,403 words.

3-2. Research achievements

<Research treatises>

1. WATANABE Shogo, "The Second Turning of Wheels of Dharma", *Journal of Buddhist Studies*, no.51, Faculty of Buddhism Komazawa University, 2020, pp.(1)-(13)
2. WATANABE Shogo, "A Question Concerning the Title of the Prajñāpāramitā-hṛdaya[-sūtra]: Is the Prajñāpāramitā-hṛdaya[-sūtra] a Sūtra that Advocates Emptiness or a Dhāraṇī (Mantra)?", *Investigating Principles: International Aspects of Buddhist Culture*, Essays in Honour of Professor Charles Willemsen, ed. by 'Lalji Shrivak', Supriya Rai, the Buddha-Dharma Centre of Hong Kong, 2019, pp.383-396. (published in 2020)
3. Yamaguchi, Shinobu, "The Outline and a Partial Japanese Translation of a Balinese Sanskrit Ritual Text *Wedaparikrama*", *Eastern Philosophy and Culture*, no.74, Series of Eastern philosophy and Culture, 8, Bulletin of the Faculty of Letters, Toyo University, 2021, pp.87-107

<Research presentations>

1. WATANABE Shogo, "Wisdom (Prajñā) and Turnings of Wheels of Dharma in Mahayana Buddhism". Remote Lecture at the Nakamura Hajime Eastern Institute: New Year Research Presentation, February 16, 2021.

珠江デルタ地帯における民事法統一化傾向の研究

A study on the unification of civil and commercial law in the Guangdong-Hong Kong-Macau Bay Area

研究代表者 後藤武秀(法学部法律学科)
研究分担者 井上貴也(法学部企業法学科)
芦野訓和(法学部法律学科)
大坂恵里(法学部法律学科)
朱大明(アジア文化研究所客員研究員)
深川裕佳(アジア文化研究所客員研究員)

研究期間／2020年4月10日～2021年2月15日

キーワード／① 粵港澳大湾区 Greater Bay Area of South China

② 香港会社法 Honkong company law

③ 珠江デルタ地帯 Guangdong-Hong Kong-Macau Bay Area

④ 民事法 civil law

⑤ 中国会社法 Chinese company law

2021年度交付額／1,576,000円

研究発表／学会および口頭発表

【著書】

① 後藤武秀・井上貴也 編著『中国・台湾・香港法の諸問題』東洋大学アジア文化研究所、2021年2月8日 ISBN978-4-904279-22-9

② 井上貴也・梁詩ナンシー 編『粵港澳大湾区法制の基礎的研究(2)—関税および文献目録—』東洋大学アジア文化研究所、2021年2月8日 ISBN978-4-904279-21-2

【論文】

後藤武秀「臨時台湾旧慣調査会における「台湾合股令」の起草—第1次草案と法案審査会における議論—」前掲『中国・台湾・香港法の諸問題』2021年2月8日、所収

井上貴也「香港会社法における取締役に関する裁判例について」前掲『中国・台湾・香港法の諸問題』2021年2月8日、所収

芦野訓和「ドイツにおける新型コロナ大流行下での消費者・事業者の保護」NBL1170号、2020年5月

芦野訓和「ドイツ法からみたデジタル・コンテンツおよびデジタル・サービス」Law & Technology 89号、2020年10月

朱大明「中国における信託投資商品の損失補填について」武蔵野法学 13号、2020年4月

朱大明「中国証券法における適合性原則と投資者保護」武蔵野法学 15号、2020年9月

朱大明「日本における多重代表訴訟制度—妥協と平衡との下の立法」証券法苑 29号、2020年11月

朱大明「中国会社法成立の源流考—日本法との関係を中心に—」財経法学 2021 年 1 号、2021 年 1 月

研究補助者として参加した梁凌詩ナンシーは、以下の論文を発表した。

梁凌詩ナンシー「中華人民共和国における関税法と関税率」前掲『粤港澳大湾区法制的基礎的研究(2)—関税および文献目録—』2021 年 2 月 8 日

【文献目録】

井上貴也・梁詩ナンシー 共編「香港会社法文献目録」前掲『粤港澳大湾区法制的基礎的研究(2)—関税および文献目録—』2021 年 2 月 8 日

【口頭報告】

後藤武秀「台湾における小規模商業組織としての合股について」地域文化学会第 237 回月例研究会、2020 年 9 月 26 日

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究の目的は、粤港澳大湾区と称されるようになった香港、マカオを含む中国華南地方において、一帯一路政策の展開が著しく進展しており、それに伴って民事法の統一化が進んでいることを検証し、それがどのような法体系を基礎としているかを解明することにある。とりわけ、この地域は香港法がイギリス法、マカオ法がヨーロッパ大陸法、そして広東省が中国法という 3 つの大きな法体系を背景に有していることから、法の統一化は一面においてこれら世界を代表する法体系の統合という性格を有している。それは、比較法学的に見ても稀有の現象が現れつつあるということができる。本研究では、民事法の統一化が進みつつあることをまず検証し、次いでそれがどのような法体系を基礎として進展しようとしているかを検討することを方法とした。そのために、法の統一化を促進する要素としての経済発展の動向、とりわけ一帯一路政策による粤港澳大湾区、すなわち広東省、香港、マカオの経済的連携の動向を解明し、これに伴う人口移動の動向を解明することを基礎作業とした。また、中国における地方政府の独自性及び経済特区の多様性の結果、この地域の税制が不統一であることを確認するための基礎作業として中国、香港の税制についても調査を進める必要がある。

2. 研究経過および成果の概要

4 月以降、月に 1 回の定例研究会を開催し、問題点の共有を図った。特に、5 月の研究会では中国全人代常委会民法室という中国の国家機関を迎え、環境法の立法調査に大坂研究員を中心として貢献した。本研究の直接対象とした地域だけでなく、中国という国家レベルで不法行為法の立法化が図られており、世界に共通する問題について法体系の枠組みを超えた解決が図られようとしていることを相互に認識した。6 月以降の研究会では、香港法、マカオ法の基礎となってきた現地の慣習に関する理解を共有していった。夏季休暇にヨーロッパ諸国においてこの分野の研究がどのように進展しているかの調査を行い、また、香港、マカオの慣習法調査も行った。

2019 年度は、これらの作業と並行して、研究補助者梁凌詩ナンシーを中心として本研究に関連する文献目録の作成、基礎的データの収集を進めた。これを集大成して、後藤武秀・梁凌詩ナンシ

一編著『粵港澳大湾区法制的基礎的研究(1)—基礎的資料—』(A Fundamental Studies on Legislation of the Guangdong - Hong Kong - Macao Greater Bay Area—Primary Data Collection—)東洋大学アジア文化研究所、2020年2月1日、ISBN978-4-904279-15-1を刊行した。また、朱大明は中国政府の委託を受け、朱大明『21世紀シルクロード沿線国家の投資環境と会社法制』清華大学出版、2019年11月を刊行した。こうした研究初年度における先行作業を受け、2020年度は、井上貴也・梁詩ナンシー 編『粵港澳大湾区法制的基礎的研究(2)—関税および文献目録—』東洋大学アジア文化研究所、2021年2月8日 ISBN978-4-904279-21-2を刊行し、本研究の基礎資料の整備を終えた。また、これらの資料集、文献目録を活用した論文集として、後藤武秀・井上貴也 編著『中国・台湾・香港法の諸問題』東洋大学アジア文化研究所、2021年2月8日 ISBN978-4-904279-22-9を刊行した。

3. 今後の研究における課題または問題点

2年間にわたる共同研究は、参加研究員の個別論文の他、資料集2冊、論文集1冊を上梓することによって終了することとなる。当初予定していた中国における研究報告会の開催が新型コロナウイルスの蔓延により実現不可能となったのが残念であるが、将来、機会を得ることができれば、現地研究者、実務家の参加を得て発表してみたいと念願している。

Summary

本研究は、一帯一路政策の中国南部における展開の過程で生じてきた民事法の統一化傾向を解明することを目的としている。とりわけ、中国南部地域は、粵港澳大湾区と称されるようになったことからわかるように、経済的一体性を強めており、それに伴って人の移動も活発化してきている。このような近年急速に進んできた現象は、これらの地域における物資の移動などの経済的一体性を強化することになり、必然的にそれを支える取引関係法の統一化を要求する。ところが、この地域の法についてみると、香港、マカオがかつて植民地経験を有していることから、香港ではイギリス法、マカオではヨーロッパ大陸法の影響が今日も色濃く残っており、また、深センなど広東省の諸地域では社会主義法を基礎とする中国法が実施されている。このように、法体系の異なる法が基礎となってこの地域の法が形成されているが、他面において、この地域はかつて同一の文化が形成されていた地域であることから、家族生活などの面においては慣習法が強く機能している。このような特色を持つ地域において経済発展の要請から民事法の統一化という現象が生じてきている。

本研究では、まず、これらの地域の経済と人の移動に関する基礎的データを収集し、その上に立って民事法の統一がどのように進展しているか、異なる法体系がどのように調整されているかを解明する。とりわけ、投資関係法、税制関係法において統一化が進みつつある状況を明らかにしていく。

The aim of this research is to evaluate the trend of standardizing civil law generated by the developmental process of 'Belt and Road Initiation' policy in South China. In particular, the case of the 'Guangdong-Hong Kong-Macao Greater Bay Area' in South China has indicated that population movement is accelerated while economic cohesion is being strengthened. Since this type of situation appears frequently, in order to strengthen economic cohesion such as goods transportation of the area, a demand on standardizing the law which supports the business connection will generate necessarily. However, looking at the law system of this area, since

Hong Kong was colonized by Britain and Macao was colonized by Portugal, the influence from British Law to Hong Kong's law and European Continental Law to Macao's law remains strong. And for Shenzhen and other cities in Guangdong prefecture, they are following Chinese Law which is based on socialism. Hence, the establishments of law systems in this area are based of different law and order. Yet, the function of customary law remains strong because this area shares the same local culture in different aspects such as family life. Therefore, a demand on standardizing Civil Law evolves under this specialty of this area. This research will first, collect the basic data on population movement and region's economy; then, evaluate how the different law systems are being adjusted and the development processes of standardizing civil law. All in all, this research will figure out the situation of standardizing processes in law related to tax system and investment.

被災地における子どもと子育て家庭の居場所づくりに関する

継続的な取り組み支援研究—当事者参加型支援モデルを手掛かりにして

Study on the continuous initiatives to create safe and comfortable places for children and their families in the disaster-affected areas - Based on the support model through the involvement of the affected people

研究代表者 森田 明美（社会学部社会福祉学科）

研究分担者 内田 塔子（ライフデザイン学部生活支援学科）

安 ウンギョン（ライフデザイン学部生活支援学科）

林 大介（人間科学総合研究所）

上田 美香（人間科学総合研究所）

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①被災地 Disaster Area

②子ども Child

③子育て支援 Child-Rearing

④居場所 Safe and Comfortable Places

⑤参加 Support their Self-Sufficiency

2020 年度交付額／1,800,000 円

研究発表／学会および口頭発表

- ・安ウンギョン「日本の教育機会の保障をめぐる動向と課題—不登校、多文化を中心に」『(韓国・嶺南大学)2021 地域教育イノベーション研究フォーラム—多文化教育と教育研究』2021 年 2 月 18 日 研究発表

論文等著作物

- ・森田明美「災害からの復興における子どもの権利—東日本大震災山田町ゾンタハウスの活動から」連合総合生活開発研究所『DIO2021.3』2021 年 3 月 pp.12-17
- ・森田明美「次の 10 年も子どもたちに寄り添う支援を」『灯台』2021 年 3 月、pp.26-29
- ・安ウンギョン「韓国の「代案教育」オルタナティブスクールの条件整備の動き」『子どもの権利条約ニュースレター』141 号、2020 年 9 月
- ・安ウンギョン「学校における子どもの意見表明及び参加保障の課題—生徒会を中心に—」『工学院大学教職課程学芸員課程年報』第 23 号 2021 年 3 月(予定)
- ・安ウンギョン「韓国の教育政策研究動向 2020—時代の転換期の教育政策とその研究動向—」『日本教育政策学会年報』第 28 号 2021 年 7 月(予定)

- ・林大介「若者の視点をこれからの自治体に活かすー若者のエンパワメントと社会参画」『月刊自治研 2020 年 4 月号』自治研中央推進委員会、2020 年 4 月、pp.16-23

<広報、成果発表など>

- ・上田美香・森田明美・唐田順子「千葉県八千代市子ども政策八千代市の子ども施策（主に子育て支援）における現状の到達点等の確認（検証）」2020 年 9 月 15 日、八千代市役所
- ・森田明美「NHK 東日本大震災音声アーカイブス宮城・岩手 あのときの子どもたちが思うこと」NHK ラジオ第 1 放送、2020 年 10 月 3 日
- ・森田明美「読むらじる。NHK 東日本大震災音声アーカイブス宮城・岩手 あのときの子どもたちが思うこと 前編、後編」2020 年 10 月 3 日
- ・森田明美「東京こども未来会議第 3 回「居場所」」での指名報告者、東京都 2021 年 2 月 12 日 YouTube 発信
- ・森田明美「復興を生きる若者たちからの提言～これからの 10 年を考える」でのコメント、宮城県議会、2021 年 3 月 1 日 YouTube 発信
- ・森田明美「被災地の子どもを支えて 10 年」NHK ラジオ第 1 放送：ラジオ深夜便 2021 年 3 月 8 日

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

- (1) 被災体験をもつ 10 代の若者の協力を得て、震災からの復興過程で求められる子どもたちの居場所について継続的な調査研究を岩手県、宮城県、福島県で実施
- (2) 東日本大震災の被災地で育った子どもや若者、子育て中の親たちへの継続的な支援方法を探る。
- (3) 10 代親支援を含めた子ども・子育て支援研究については、その成果を自治体子育て支援評価に活用する方法を探った。

<倫理的配慮>

学内の倫理委員会の審査を受け承認を得ている。

2. 研究経過および成果の概要

東日本大震災から 10 年、道路や建物の復旧が進められる中で、過疎、少子化、子育て家庭の貧困、ひとり親家庭、虐待やDV、不登校の増加など被災地の子どもや子育て家庭の困難が伝えられるようになってきた。こうした問題への対策として相談や支援の総合的な支援が可能となる居場所づくりは急務となっているが、この地域では、発災までに当事者参加型の居場所づくりはほとんど取り組まれることがなかったため、そのシステム構築のための専門的な支援が求められている。

そこで、被災地でのひとり親母子の居場所づくり、子育て支援、岩手県山田町ゾンタハウス、福島しんぐるまざーずふぉーらむに協力して、子育て家庭の居場所づくりを進めた。2020 年 2 月からは、コロナ禍にあってほぼフィールドに出られない状態であったため、研究の多くはオンラインで行い、オンラインを現地で作り出すための協力なども同時に行った。これは距離的な問題を今後実践的に解決する方法としても活用できると考え、現地とのオンラインでの交流を積極的におこなった。

(1) 被災地での若者参加の推進への反映と調査

①山田町ゾンタハウスを、2020 年 8 月でいったん閉じることになり、閉鎖のための助言を行った。また終了後の若者たちの居場所として現地スタッフの自宅の提供がおこなわれることになり、東洋大学の学生やゾンタハウスで育った子ども若者たちとオンラインでつなぎ、東洋大学の卒業生の会の時（2020 年 10 月 25 日ホームカミングディ）、社会学部での 10 年目の振り返りの会（2021 年 2 月 20 日）の時にその企画を支援し、また当日の実施にも参加した。

②震災からの若者支援活動について

1) 被災地の子ども若者を継続的に支援する仕組みが必要であるということから、被災地の高校生と被災地出身の大学生と被災地支援をしている大学生に継続的に議論に参加してもらい、被災地の若者の居場所づくりへの意見をもとに、被災地での子ども若者支援の継続的な支援の仕組みづくりを行った。災害遺児孤児を対象にして支援活動を進めてきた仙台レインボーハウスに、被災地の子ども若者支援機関としての場の提供を得て、心理、医療、福祉の専門家と市民活動団体が集まり作られた一般社団法人「東日本大震災子ども・若者支援センター」の活動をてがかりにして継続的にかかわることができた。

2) 2016 年度に始めた若者たちの活動は継続的に開催され第 1 に南三陸町の被災地ツアーが大学生たちの協力のもと、オンラインで初めて実現できた（2021 年 2 月 20 日夜実施）。

3) 東京で働く山田町ゾンタハウス出身の若者たちと東洋大学森田明美ゼミ生と交流が 11 月 3 日、学生たちが里親子と交流する場に若者たちも参加し、一緒にボランティア活動する形で実現ができた。

4) 被災地出身の大学生や社会人になった若者たちが、震災からの復興支援を宮城県議会での検証の会に参加し、発表することを実現し、政策への提言にかかわることができた。

5) 福島の母子家庭への学習支援をオンラインで行う方法を検討し、森田ゼミ生などの協力を得て、長期休暇と 1、2 月の土曜日オンライン学習会を実施した。

6) オンラインでほぼ毎月被災の復興支援に関する研究と実践にかかわる人が集まる東日本大震災子ども若者支援ネットワークの運営委員会に参加し、情報共有や意見交換にかかわった。

(2) 10 代で出産した母親の子どもと子育て活動支援と実態調査

今年度についてはオンラインでの支援と、この活動を手掛かりにして行政へのコメントを求められた八千代市での検討会に協力した。八千代市での検討会は市長、副市長のヒアリングと意見交換、こども部長以下の職員との議論をおこない、評価と課題について提言することができた。また飯能市でのオンラインの職員研修会を 3 月 24 日にできることになった。

3. 今後の研究における課題または問題点

こうした問題に対応するために、被災地域で 10 代を過ごした経験をもつ若者たちの参加によって、被災地である仙台市において、仙台レインボーハウスの協力のもと、子ども若者 20 年応援プロジェクトの立ち上げにかかわり、3 年を経るなかで、地域での承認を得られるようになってきた。今年度は残念ながらオンラインでの会議を中心に活動を進める事になったが、3 月 1 日には宮城県議会での意見交換会に行政、市民、支援者

が集まり、私たちの研究の成果が若者たちからの価値ある支援として発言されて、特に復興からの支援について、居場所の重要性とそこにいる大人が子ども・若者たちに対して指示・指導ではなく、一人ひとりの希望の実現のためにアドボケートしてくれることが重要であることを共有できたことは重要な成果と思う。またこのことを行政としても尊重して具体化を進めたいというコメントを得ることができた。

今後はこれらを事業に具体化するための支援を行っていきたいと思う。今回の意見交換会には、子育て中の親も意見交換にかかわることができ、子育て中の親にとっても居場所が重要であることを共有できた。

11年目に入る被災地域の若者たちの暮らしの実態に寄り添いながら、若者が大人になって新しい家族の形成や仕事を始めていく時期に被災地に求められる居場所の形や、支援者に求められる専門性や、運営の方法などを子ども参加によって探っていく実践に関与していく必要があると考えている。

Summary

A decade having passed since the Great East Japan Earthquake, an increasing number of reports have indicated the emergence of difficulties faced by children and child-rearing families in the affected areas, including depopulation, a decrease in the number of children, poverty among child-rearing families, the situation of single-parent households, child abuse and domestic violence as well as an increase in the number of children who do not attend school, while progress has been observed in the reconstruction of roads and buildings. It is urgent to create safe and comfortable places in order to address these problems, making it possible to provide comprehensive support, including counselling and other forms of support services; however, it has not been possible to develop such mechanisms, because few efforts had been made to create such places with the involvement of the concerned population before the disaster.

Although field activities in the affected areas were almost impossible in the present fiscal year because of the COVID-19 pandemic, we could organize online seminars as well as meetings in several municipalities to confirm what has been achieved in the past decade. In particular, the discussion at the Miyagi Prefectural Assembly between the administration and the affected young people and support organizations for them was an important outcome, in that the results of our studies were openly acknowledged as an invaluable form of support from young people and that, particularly, agreement was reached concerning the importance of safe and comfortable places in support activities for recovery and of the adults in such places acting as advocates for children and young people to realize their aspirations rather than providing direction and guidance to them.

The young people in the affected areas go into the eleventh year after the disaster. We believe it necessary, while standing close to their actual status of living, to remain involved in the practice of exploring, through the involvement of children, how safe and comfortable places in the affected areas should be in their transition to adulthood, when they will start to form new families and to work; what kind of expertise the supporters should have; and how these places should be managed.

首都圏在住アジア系の若者にみる

トランスナショナリズムに関する比較研究

Transnationalism among Asian Young People in the Tokyo Metropolitan Area: A Comparative Study

研究代表者 山本 須美子(社会学部社会文化システム学科)

研究分担者 三沢 伸生(社会学部社会文化システム学科)

長津 一史(社会学部社会文化システム学科)

箕曲 在弘(社会学部社会文化システム学科)

宮下 良子(アジア文化研究所客員研究員)

研究期間／2020 年 4 月 10 日～2021 年 2 月 15 日

キーワード／①トランスナショナリズム Transnationalism

②アジア系 Asian

③若者 Young people

④首都圏 Tokyo Metropolitan Area

⑤比較 Comparison

2020 年度交付額／1,800,000 円

研究発表／学会および口頭発表

[本プロジェクト主催・オンライン・フォーラム]

2021 年 1 月 25 日 (月)

テーマ：『ビジネスチャンスを生む「僑郷」への帰国——中国浙江省青田県の事例から』

[著作]

- ・長津一史編著(2021)『インドネシアにおける移民労働の社会経済的意味——漁船員・水産加工労働者から考える』東京：東洋大学 ACRI Research Paper Series 20.
- ・田中逸平（著）・三沢伸生（序）『曾遊畫觀』東洋大学アジア文化研究所, 2021 年.
- ・Nobuo MISAWA (ed.), (2021) Tokyo Muslim School Album (1927-1937), Asian Cultures Research Institute, TOYO University.
- ・野間信幸（監）・三沢伸生（編）(2020)『日本万国博覧会までの軌跡：EXPO'70 開催 50 周年の回顧』東洋大学アジア文化研究所, 2020 年.

[論文]

- ・山本須美子・徐輝・鄭楽静（2020）「ビジネスチャンスを生む僑郷への帰国——中国浙江省青田県の事例から」『白山人類学』24 号（3 月下旬 発行予定、査読有）
- ・箕曲在弘（2020）「新大久保をフィールドとした「社会調査および実習」の軌跡——多文化共生に向けた生活史調査の授業運営方法——」『東洋大学社会学部紀要』58(2):71-85.
- ・Nobuo MISAWA(2020), “Abdürreşid İbrahim'in Japonya'daki izleri üzerine”, Japon Seyyahı Abdüttrşit İbrahim'in İzinde Ali Merthan DÜNDAR ed.), Ankara : Doğu Kütüphanesi, pp.29-34.

- ・ Nobuo MISAWA (2020) , “Yeni kaynaklar ile Abdürreşit İbrahim'in Japonya'daki hayatı” , Japon Seyyahı Abdürreşit İbrahim'in İzinde Ali Merthan DÜNDAR ed.), Ankara : Doğu Kütüphanesi, pp.35-43.
 - ・ 三沢伸生 (2020) 「明治維新以降の日本とイスラーム世界の関係」『歴史と地理』 732: 3-21.
 - ・ 長津一史 (2021) 「東南アジアにおける帰還移民の社会経済的再統合—日本就労経験者を中心に」『アジア文化研究所研究年報』 55 (印刷中)
- [口頭発表]
- ・ オンライン国際シンポジウム, 2020 年 12 月 12 日 (主催: 東洋大学アジア文化研究所)
テーマ『日本の博覧会におけるアジア表象の推移』
三沢伸生「日本における西アジア・イスラーム世界の表象化・具象化: 博覧会・展覧会を通して」:
(東洋大学アジア文化研究所)
 - ・ 第 15 回東洋大学アジア文化研究所年次集会での口頭発表 (オンライン開催・動画配信)
(主催: 東洋大学アジア文化研究所)
山本須美子「東京都在住ジャイア教徒にみる日本社会への適応—世代間の差異に着目して—」
箕曲在弘 「新大久保の多文化共生に関する「社会調査および実習」の展開—多文化共生に向けた生活史調査の授業運営方法—」
 - ・ Nagatsu, Kazufumi 2020. Sea Peoples' Creolism and Its Political Settings in Southeast Asian Maritime World Anthropology in the Time of Pandemic. Presented at International Webinar “Teori dan Praksis Masa Pandemi: Tantangan Kurikulum S3 Antropologi (Theory and Practice in the Time of Pandemic: Challenges of Doctor Course of Anthropology.), 7 August, 2020 at Graduate School of Culture, Gadjara Mada University, Jogjakarta, Indonesia.
 - ・ オンライン地理学コロキウム, 2021 年 1 月 8 日 (主催: 大阪市立大学)
宮下良子 2021 「エスニシティの脱構築—コリアンの民族誌的考察を中心として」

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

本研究の目的は、首都圏在住のアジア系の若者（中国、韓国、インド、インドネシア、ラオス、トルコ）を対象に、彼ら/彼女らが形成する出身国あるいは他国とのトランスナショナルな関係の実態とその背後にある諸要因を、現地調査に基づいた多角的視点から明らかにし、日本社会への適応のあり方との関係性を検討することである。アジア系の若者の中でも人数も先行研究も少ないインド、インドネシア、ラオス、トルコ出身の若者も研究対象に含めることにより、在日外国人の日本社会への適応のあり方について、トランスナショナリズムという視点からこれまでになかった研究成果を期待できる。

主たる課題は以下の3点である。

- (1) アジア系の若者へのライフヒストリーを構築するインタビューを通して、渡日前の教育経験や職業、渡日理由や在留資格等を明らかにした後、出身国への渡航頻度や期間、出身国や他国に在住する家族や親族、友人との連絡方法、出身国への送金や出身国からの仕送りの実態等を把握する。
- (2) 出身国での家族や親族の職業や経済状況、日本や他国への移住者の割合とその変化を明らかにし、首都圏在住若者やその家族の日本移住がどのように捉えられ、将来的に何が望まれているかを検討する。

(3)以上を踏まえて、彼ら/彼女らの形成するトランスナショナルな関係の実態とその背後にある諸要因を析出し、出身国別に比較し、日本社会への適応のあり方との関係性を明らかにする。

2. 研究経過および成果の概要

日本での外国人受け入れ政策の歴史的変遷や現状を把握した後に、古くから華僑を送り出している「僑郷（華僑の故郷を意味する）」である中国浙江省青田県における近年の変容に今年度は焦点を当てた。浙江省在住の中国人研究者との交流を通して、近年ヨーロッパから帰国する華僑が多いことを把握することができた。この結果については、2021年1月25日（月）にオンライン・フォーラムを開催して、浙江省在住の徐輝と鄭楽静が発表をした。フォーラムはオンラインでの開催であったことにより、全国から多くの研究者が参加して盛会であった。移民送り出し側の変化が、首都圏在住の中国系（特に浙江省出身）の若者のどのような影響を与えているかを明らかにすることが来年度の課題となった。

オンライン・フォーラムのプログラムは下記のようなものであった。

日時： 2021年1月25日（月）14時～16時（Webex Meetings 使用）

テーマ：『ビジネスチャンスを生む「僑郷」への帰国—中国浙江省青田県の事例から—』

タイトル・発表者：

「海外移住の歴史と現状—青田僑郷輸入商品城の開業」 徐輝氏（温州大学准教授）

「帰国者のライフヒストリー分析—インタビュー調査から」 鄭楽静氏（寧波大学講師）

コメンテーター：田嶋淳子氏（法政大学教授）

また、箕曲は、新大久保の外国人集住地区においてこれまで聞き取ったネパール、ベトナム、韓国、中国、インドネシア、タイ出身者の生活史を、授業運営方法という視点から論文1本としてまとめ、第15回アジア文化研究所年次集会（オンライン開催）で口頭発表をした。同大会では、山本も東京都在住ジャイナ教徒の日本社会への適応について、世代間の差異に着目して口頭発表をした。三沢は、東京のトルコ系学校や日本における西アジア・イスラーム世界の表象に関して、著書や論文として発表、さらに国際シンポで口頭発表した。長津は、在日インドネシア技能実習生に焦点を当てて、帰国後の経験について論文としてまとめ、口頭発表もおこなった。宮下はコリアン系若者について、口頭発表を行った。

3. 今後の研究における課題または問題点

2020年度は、コロナ禍ゆえに、当初予定していたアジア系の若者へのインタビュー調査は進まなかった。しかし、特に中国人研究者とのオンライン交流を通して、移民送り出し側の状況が把握できたことによって、来年度は送り出し側の変化が中国系の若者に与える影響を明らかにできるので成果は大きかったといえる。今年度の成果によって来年度の東京都でのインタビュー調査がより充実したものとなることを期待できる。

また、新大久保や台東区御徒町における調査結果も発表することができた。各メンバーは、調査は実施できなかったが、これまでの調査の蓄積を多くの論文やオンライン学会で発表することができ、充実した一年となった。

Summary

The aim of the present research was to reveal the substance and contextual factors behind the transnational relationships formed by young Asian (Chinese, South Korean, Indian, Indonesian, Laotian and Turkish) residents living in the capital district, and to examine these in relation to how they have adapted to Japanese society.

Historical fluctuations and the current policies surrounding the intake of foreigners in Japan were reviewed before focusing on recent transformations taking place in Qingtian County in China's Zhejiang Province, a historical source of Chinese migrants. Exchanges with Chinese researchers in Zhejiang revealed that many Chinese migrants have returned to the province from Europe in recent years. Two Chinese researchers based in Zhejiang presented this information at an online forum held on 25 January 2021. The forum itself was a great success, as its online format allowed many researchers from across the country to participate. An area of enquiry for the coming year will include how changes occurring in immigrants' place of origin have impacted young Chinese (particularly those from Zhejiang Province) currently living in the capital district.

Mino presented a paper at the 15th Annual Meeting of the Asian Cultures Research Institute (Online), compiling the life histories of Nepalese, Vietnamese, South Korean, Chinese, Indonesian, and Thai respondents living in collective dwellings in Shin Okubo, Tokyo. At the same meeting, Yamamoto gave a presentation focused on generational differences in how adherents of Jainism residing in Tokyo have adapted to Japanese society.

新規球状ナノ炭素材料「マリモカーボン」の合成と用途探索

-エネルギー・環境・生体分野への応用を目指して-

The controllable growth of a novel spherical Marimo-like carbon
-For the application of energy, environment, and biocompatible devices-

研究代表者 蒲生西谷 美香(理工学部応用化学科)

研究分担者 相沢 宏明(理工学部応用化学科)

井坂 和一(理工学部応用化学科)

物部秀二(理工学部機械工学科)

(吉野隆(理工学部機械工学科))

吉本智巳(理工学部電気電子情報工学科)

村野昭人(理工学部都市環境デザイン学科)

稲本将史(SAITEC)

伴雅人(日本工業大学)

中川清晴(関西大学)

江口美佳(茨城大学)

研究期間／2020年4月10日～2021年2月15日

キーワード／①繊維状ナノ炭素 Carbon nanofilament

②触媒 Catalyst

③化学気相合成 Chemical Vapor Deposition (CVD)

④燃料電池 Polymer Electrolyte Fuel Cell (PEFC)

⑤水素センサー Hydrogen gas sensor

2020年度交付額／ 1,800,000 円

研究発表／学会および口頭発表

・土屋 良太, 白石 美佳, 勝亦 徹, 中川 清晴, 安藤 寿浩, 蒲生西谷 美香

“酸化ダイヤモンド担持 Co-Cu 触媒を用いたマリモカーボンの合成”

(一社) 表面技術協会第 142 回講演大会 (2020 年 9 月 10 日～11 日)、講演番号: B01-01

・斉藤郁、白石美佳、土屋良太、城石英伸、中川清晴、安藤寿浩、蒲生西谷美香

“液相酸化によるマリモカーボンの表面修飾”

(一社) 表面技術協会第 142 回講演大会 (2020 年 9 月 10 日～11 日)、講演番号: B01-02

・斉藤郁、白石美佳、土屋良太、岸雄大、黒田菜摘、城石英伸、中川清晴、安藤寿浩、
蒲生西谷美香

“液相酸化によるマリモカーボン繊維状ナノ炭素の表面修飾と評価”

(一社) 表面技術協会第 143 回講演大会 (2021 年 3 月 3 日～4 日)、講演番号: P-36

・富永晃多、相沢宏明、青木耕輔、土屋良太、物部秀二、安藤寿浩、蒲生西谷美香

“Pd 担持カーボンペーパーの調製と水素ガスセンサへの応用”

(一社) 表面技術協会第 143 回講演大会 (2021 年 3 月 3 日～4 日)、講演番号:P-43

・林出帆、城石英伸、白石美佳、蒲生西谷美香

“噴霧凍結乾燥法によって調製した酸化グラフェンによる酸素還元反応”

(公社) 電気化学会第 88 回大会 (2021 年 3 月 22 日～24 日)、講演番号: 3T-22

・今野龍刀、城石英伸、白石美佳、蒲生西谷美香、原田祐弥、吉田司

“貴金属担持 $\text{TiO}_{2-x}\text{N}_x$ ナノ粒子触媒を用いた低温常圧下における電気化学的窒素還元 (3)”

(公社) 電気化学会第 88 回大会 (2021 年 3 月 22 日～24 日)、講演番号: 3T-24

総説・解説

・長谷川康太、荒川凌志、江口美佳、蒲生西谷美香、安藤寿浩

“マリモカーボン；リチウムイオン電池材料としての電気化学的特性”

月刊 EMC, No. 388, 39-48 (2020. 8).

研究経過および成果の概要

1. 研究方法

2020 年度は以下の項目について検討を行った。

①昨年度に引き続き、マリモカーボンのミクロおよびマクロ構造を制御可能な触媒として、Co-Cu 触媒を用いた合成に取り組んだ。Co と Cu は、周期表上で Ni の両側に位置する元素である。この二元系触媒によって、Ni と同様の触媒活性が得られるのか、否かという興味に加えて、Ni への Cu 添加によるマリモカーボン微細構造への影響が大きいことから、Cu を含む二元系触媒として Co-Cu 触媒に関してもマリモカーボン合成への影響を調べた。Co への Cu 添加量は、モル比で 0～3% として調製した。1% 前後に、マリモカーボン生成量に影響が大きいことを把握しているため、この領域で生成量の Cu 添加量および反応温度依存性を調べた。一方、Ni-Cu 触媒を用いてメタンとの接触反応により合成したマリモカーボンは、グラフェンが積層してなるコイン積層構造を持っていることから、マリモカーボンを構成する繊維状ナノ炭素表面のグラフェンエッジ数は、Ni 触媒を用いた場合のカップ積層構造よりも多い。この微細構造の違いが、Pt を担持した場合の担持状態に及ぼす影響を調べ、さらに電気化学的酸素還元能測定を試みた。

②マリモカーボンのセンサ材料および PEFC 電極材料への応用を念頭に、Pt 微粒子を制御性良く担持する方法を引き続き検討した。金属イオン還元法は、金属イオンを含む溶液中にマリモカーボンを投入し、液相で還元反応を行って金属微粒子をマリモカーボン表面に担持する方法である。この方法においては、マリモカーボンを分散させつつ還元反応を行うが、その際の超音波照射がマリモカーボンの形態および Pt 担持状態に与える影響について走査型および透過型電子顕微鏡を用いて調べた。さらに、液相からの Pt 担持マリモカーボンの回収は、遠心分離による沈降と上澄み液排出、純水を加えて再度遠心分離・沈降・上澄み液排出を繰り返して洗浄するプロセスを経るため、上澄み液に混ざって廃棄される触媒が出る。触媒回収量が超音波照射によって受ける影響についても調べた。

③マリモカーボンのグラフェンエッジをルイス塩基的に化学修飾することを引き続き検討した。酸は、硝酸、過酸化水素を用い、酸の濃度、および処理温度（室温から 80℃ 程度）が酸化状態に及ぼす影響を調べた。溶液酸化は、マイルドな酸化方法として採用している。空気中の加熱処理では、マリモカーボンの酸化状態をコントロールすることは困難で燃焼してしまう。表面化学吸着種の存在については、酸

素含有官能基の存在は X 線光電子分光法により確認済のため、その吸着構造と量について中和反応を用いて調べ、酸化処理条件との関係を明らかにした。

④液相酸化処理を施したマリモカーボン表面の酸素含有官能基量の種類と量を中和反応による逆滴定法を用いて調べる条件を検討した。③で酸素含有官能基を持つマリモカーボンを調製し、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムと中和反応させ、その際に消費された塩基の量を逆滴定法により求めることで、それぞれの塩基と反応する酸素含有官能基の種類と量を分別定量して算出した。

⑤マリモカーボンそのものの導電性を評価する試みとして、粉末圧縮法による電気伝導性測定条件を検討してきたが、試料に荷重をかける際、重りを載せる方法ではなく、連続的に可変な荷重印加方法をとる必要があることがわかってきた。今年度は、荷重を連続的に可変な仕組みを持つ装置を検討、導入した。この装置を用いる前提として、測定上、不可避に印加される初期荷重（約 200 グラム）によって、粉体試料の充填状態の再現性に関する情報を得ることを試みた。充填状態は、粉体粒子間の接触状態を左右するため、試料全体の抵抗値に関わる値である。酸化処理をしたマリモカーボンと、*as-grown* のマリモカーボンを用いて、初期荷重印加後の試料抵抗の経時変化を調べた。

⑥昨年度は、日工大・伴先生の下、マリモカーボンを用いて細胞培養足場を試作し、マリモカーボンと足場材料との複合化条件が細胞（マウス）培養に及ぼす影響（増殖・毒性など）を調べる予備実験を行った。PDMS へのマリモカーボンの埋め込み条件は明確になっていないが、この実験と並行して、今後の方向性として、マリモカーボンの抗菌・抗ウイルス作用の検討を調査することになった。コロナ禍により実験が進められない間も、マリモカーボンの新たな用途探索、および予備実験を進めることができる。マリモカーボンに加えて、カーボンペーパーに CNFs を合成して複合化した材料（CNFs/CFP）についても、検討に加えることとした。

⑦マリモカーボン合成量のスケールアップ（従来用いてきた実験機の合成量の約 10 倍）をはかり、さらにマリモカーボン粒径の微細化を目指した回転機構付気相合成装置については、その各機能を導入しながら組み立てを行ってきて、装置として完成した。今年度は、装置を実際に稼働するにあたり、必要となる安全部品の組み立てと取り付け、および反応温度のさらに精密な制御のための機構を導入した。

⑧ 面内および厚み方向に均一な CNFs/CFP の合成条件確立を目指して、合成に必要なニッケル触媒の担持法を検討した。

2. 研究経過および成果の概要

2020 年度は、コロナ禍により、研究活動が実質約半年、足踏みする結果となった。共同研究先でも同様に研究が滞ってしまった。以下に経過と成果の概要を記す。

マリモカーボンの微細構造制御に関する検討は、酸化ダイヤモンド担持 Co-Cu 二元系触媒を用いた合成に取り組んだ。その結果、Cu をわずかに添加することで、Co のみの場合と比べて約 4 倍のマリモカーボン生成量が得られることを見出した。この現象は、ダイヤモンド担体の酸化温度の違いが大きく影響していることを確認した。さらにこのとき、TEM 観察から触媒微粒子の担持状態が異なる様子が観察された。この詳細は不明であるが、ダイヤモンド担体の酸化処理温度が表面の物理化学的状态に影響を及ぼしたと考えている。Co への Cu 添加量が 1%とごくわずかな量で生成量が多くなることから、この 1%を制御するための触媒調製法を工夫し、合成実験の再現性を確認

することができた。今後、改良した触媒調製法によって、Cu 添加量を 1%以下のレベルで制御した触媒を調製して合成に用い、合成温度および時間によって生成量および形態、微細構造がどのように異なるのかを調べる。このことにより、接触反応における Co への Cu の添加効果について理解を深められると考えている。得られたマリモカーボンを構成する繊維状ナノ炭素は、直線状というよりは、らせん状構造に近い。透過型電子顕微鏡で微細構造を調べ、グラフェン構造の大きさ、完全性および積層状態について明らかにすることにより、その微細構造を活かした用途についても検討していきたいと考えている。

Ni-Cu 触媒を用いて合成したマリモカーボンを構成する繊維状ナノ炭素は、平板状のグラフェンが積層したコイン積層構造を持っている。このグラフェンエッジを固体高分子型燃料電池の Pt 触媒の担持サイトとして活用すれば、Pt 触媒微粒子を高分散かつ高密度で担持できると考え、金属イオン還元法により Pt を担持した。昨年度は、予想通り、3 ナノメートル程度の微粒子が高密度かつ高分散な状態で担持できることを確認した。この担持状態は、Ni 触媒を用いて合成したマリモカーボンの場合よりも高密度で全体的にむらの少ない状態であった。一方で、この担持法において、超音波照射を行うことが、マリモカーボンの構造にダメージを与えることも分かった。昨年度は、超音波照射回数を 1 回まで減らすことで、ダメージを軽減することができ、さらに、マリモカーボンに Pt を担持した触媒の仕込み量に対する回収率を、約 88%まで向上させることができた。このようにして調製したマリモカーボン担持 Pt 触媒を用いて、酸素還元能を調べた。グラッシーカーボン製の測定電極表面に、この触媒とイオノマーを複合化したスラリーを調製し、滴下して乾燥した後、測定に供した。マリモカーボンとイオノマーとの複合化条件を検討し、グラッシーカーボン電極に滴下と乾燥を繰り返して塗布することで、試料の性質が測定結果にあらわれる最適条件を明らかにすることができた。これにより、グラフェン積層構造に特徴があるマリモカーボンを用いた Pt 触媒の PEFC 用電極触媒としての基礎データが得られつつある。実験条件を明らかにすることができたので、マリモカーボンのグラフェン積層構造が異なる場合に Pt 担持したものがどのような電気化学的性質を示すのか、引き続き基礎データを取得することに加え、実際に燃料電池セルを作成し、発電試験に着手している。今後は、Pt に加えて、水素酸化触媒として Pd 微粒子を担持できるような条件を検討していく。

液相酸化処理を施したマリモカーボン表面の酸素含有官能基量の種類と量を中和反応による逆滴定法を用いて調べる条件を検討した。水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムと中和反応させ、その際に消費された塩基の量を逆滴定法により求めることで、それぞれの塩基と反応する酸素含有官能基の種類と量を分別定量して算出した。昨年度の検討によって、酸化マリモカーボンと反応する塩基の濃度に目途が立ったこと、反応に供するマリモカーボンの最低量が明確になったことから、今回の取り組みによって塩基との反応および中和滴定の実験条件をほぼ固めることができた。硝酸酸化については、酸化温度によって官能基の構造に違いがあった。グラファイト粉を酸化し、酸化グラフェンを得る過去の研究では、過マンガン酸カリウムを用いる酸化方法がとられている。マリモカーボンは、カップ積層構造をとることから、グラフェンエッジ間の距離がグラファイトよりも広い。このことも、硝酸酸化が可能なことに影響しているかもしれない。今後は、グラフェン積層構造の異なる CNFs から成るマリモカーボンについて、酸化条件と酸化状態の関係を調べ、酸素含有基の構造の違いを明らかにする。このことにより、窒素吸着状態の生成や、ルイス塩基的表面の特徴的性質等、エッジ構造を活かした用途探索を進めていく。

マリモカーボンそのものの導電性を評価する試みとして、粉末圧縮法による電気伝導性測定条件を検討してきたが、試料に荷重をかける際、重りを載せる方法ではなく、連続的に可変な荷重印加方法をとる必要があることがわかってきた。今年度は、荷重を連続的に可変な仕組みを持つ装置を検討、導入した。この装置を用いる前提として、測定上、不可避に印加される初期荷重（約 200 グラム）によって、粉体試料の充填状態の再現性に関する情報を得ることを試みた。充填状態は、粉体粒子間の接触状態を左右するため、試料全体の抵抗値に関わる値である。酸化処理をしたマリモカーボンと、**as-grown** のマリモカーボンを用いて、初期荷重印加後の試料抵抗の経時変化を調べた。その結果、初期荷重印加時の抵抗値が、試料の充填状態を知る指標となる可能性が確認できた。さらに今回の実験から、酸化処理によって、粉体抵抗が上昇する現象が確認された。電気陰性な表面同士の静電的反発によるものの可能性もあるが、詳細は不明である。今後、得られた知見を基に、粉体試料の電気抵抗値が意味するものを理解しながら基礎物性を測定していく。

昨年度は、マリモカーボンの生体適合性に関する予備実験では、日工大の伴先生にマリモカーボンを提供し、マウスの細胞を用いた培養実験を行った。実験結果は、細胞への毒性が無いであろう事は概ね確認できたが、ばらつきの大きな実験となってしまう、確実な結論を得るには至らなかった。今後はマリモカーボンを PDMS に埋め込む条件を検討し、再現性の向上を目指すことに加えて、抗菌作用や抗ウイルス作用に注目した取り組みを進めることを念頭に、調査を進めている。

マリモカーボンの合成量スケールアップおよび粒径制御の可能性を検討するため、反応管を従来の約 8 倍とした合成装置の導入および検収が昨年度に完了した。今年度は、9 月以降から、安全な実験を行うため装置周辺の環境整備を進めた。さらに、現状の仕組みからさらに反応温度の精密制御を可能とする機構を組み込み、動作確認を行った。あとは、ガラスウールによる反応領域の断熱作業を残すのみとなった。試運転は済ませている。本装置により、合成中のマリモカーボン原料に揺動を加えながら合成が行えるので、その粒径に及ぼす効果についても今後検討していく。

マリモカーボンの合成手法である接触反応を用いて、メタンとの反応により面内および厚み方向に均一な CNFs/CFP の合成を試みてきた。CFP に Ni 触媒を含浸担持する方法を改善し、面内および厚み方向に均一な CNFs/CFP の合成が可能となった。

3. 今後の研究における課題または問題点

実験を行う環境としては、いままで利用していた走査型電子顕微鏡（製造後 27 年）がついに観察不能となってしまったが、同時期に、私大研教育機器として大学から申請していただいた、新しい走査型電子顕微鏡の導入が決定し、安堵したところである。3 月 12 日には、付属 X 線分析部まで含めた全体の取り扱い説明まで完了予定である。今後の教育研究への活用が期待される装置である。一方で、コロナ禍による三密回避のための学生入構制限によって、実験の進捗は遅れがちである。安全と健康はなにもものにも代えられないものであり、制約はあるものの、今後も安全第一で研究を進めていく。

Summary

A novel spherical carbon, we named as the “Marimo-like carbon”, consists carbon nanofilaments which are grown from a catalyst particles supported on the diamond powder surfaces. We have investigated a catalytic growth of the Marimo-like carbon to realize a

structure-controllable growth process for the respective applications such as a support material for the catalyst particles of PEFC, an electrolyte material for the Li-ion battery, a water-treatment agent, a cell scaffold material, a hydrogen-sensor, and so on. In this fiscal year, we studied the following topics in our theme;

1) The effect of Cu addition to the Co catalyst on the fine structure of the CNFs consisted of the Marimo-like carbon.

→We found that a small amount of Cu addition, 1 % molar ratio to the Co catalyst gave four times Marimo-like carbon growth in the case of using different temperature of oxidized diamond powder as a support material. We have also investigated to reveal the effect of the diamond-support oxidation temperature on the amount of grown CNFs.

2) We have established the condition for making the glassy-carbon electrode covered with the Marimo-like carbon-ionomer composite slurry for the reproducible electrochemical measurement. We just have started to fabricate a cell with using the Marimo-like carbon grown with Ni-Cu catalysts to measure the power generation of the PEFC.

3) A new system for the electrical conductivity measurement of the powdered carbon materials had been installed. We found that the electrical conductivity of our material was affected by the density putted in the sample area. We also found that the oxidized Marimo-like carbon showed a higher electrical resistivity compared to that of as-grown one.

4) The semi-large scale chemical vapor deposition system equipped with a rotated reactor was almost settled up, and a safety equipments were also prepared to start a normal running.

5) We have tried to prepare a new method for supporting the Ni catalysts on the CFP surfaces, and established to grow a uniform CNFs/CFP both in the plane and the thickness.

2020年度 井上円了記念研究助成 執行一覧

※原則として採択者の所属・身分・指導教員は応募時

【個人研究】

【院生】

					(単位:円)		(単位:円)	
	身分	研究代表者			指導教員名	研究課題名	採択額	執行額
		氏名	学部/研究科/センター	学科/専攻				
1	院生	小林栄輝	文学研究科	史学	西村陽子	唐後半期の武官と政治	630,000	629,391
2	院生	程案	文学研究科	史学	千葉正史	清末における京張鉄道とモンゴル地域の近代化政策	560,000	558,816
3	院生	蘇雨青	社会学研究科	社会心理学	桐生正幸	犯罪発生地点に対するリスク評価変化のアプローチ -環境要因がリスク評価に及ぼす影響-	700,000	696,640
4	院生	滝口雄大	社会学研究科	社会心理学	桐生正幸	他者に対する疑わしさの知覚に関する検討 -欺瞞についての信念と欺瞞を知覚させる手がかりに着目して-	630,000	626,127
5	院生	倉矢匠	社会学研究科	社会心理学	安藤清志	ジェンダースtereotypeを反映した職業におけるジェンダー不均衡の原因帰属と役割変容	630,000	630,000
6	院生	沓澤岳	社会学研究科	社会心理学	尾崎由佳	目標表象活性化の反復がセルフコントロールの向上に与える影響の検討	630,000	626,589
7	院生	大前 周平	理工学研究科	応用化学	井坂 和一	アナモックス反応における必須微量元素及び適正濃度条件の解明	690,000	690,000
8	院生	小豆畑 隼	理工学研究科	応用化学	安藤 直子	カビ毒トリコセンのMS/MSライブラリーの作成 〜カビ毒汚染小麦から食の安全を守る〜	630,000	629,948
9	院生	小宮山 寿紗	理工学研究科	応用化学	峯岸 宏明	紫外線抵抗性好塩性古細菌の紫外線耐性評価および糖性質解析	630,000	630,000
10	院生	明間 大輝	理工学研究科	都市環境デザイン	青木 宗之	治水構造物の河川環境機能評価 一魚類の生息状況を例に一	560,000	542,190
11	院生	水藤 飛来	ライフデザイン学研究科	健康スポーツ学	大迫 正文	トレッドミル走運動による発育期ラット膝蓋靱帯付着部の構造変化に対するアイシングの影響	700,000	700,000
12	院生	関口 菜樹	生命科学研究科	生命科学	清水 文一	植物二次代謝選択的阻害剤の開発を目的とした基質の有機合成とケルチン骨格形成における鍵酵素の構造活性相関	637,000	636,999
13	院生	福岡 彩加	生命科学研究科	生命科学	廣津 直樹	イネの栄養素吸収能力に関する量的形質遺伝子座解析	630,000	629,928
14	院生	佐藤 友里	生命科学研究科	生命科学	根建 拓	骨格筋分泌因子を介した暑熱依存的な皮膚機能制御の解明	630,000	630,000
15	院生	大牧 創	生命科学研究科	生命科学	小柴 和子	魚類におけるhand遺伝子の多様化と機能	630,000	563,084
16	院生	橋本 奈々美	生命科学研究科	生命科学	三浦 健	ボイセンベリー葉成分が培養細胞に及ぼす機能性評価	616,000	564,528
17	院生	堀口 元氣	生命科学研究科	生命科学	廣津 直樹	網羅的遺伝子発現解析による水陸両生植物における水中順応の分子メカニズムの解明	560,000	560,000
18	院生	塩野 鈴佳	生命科学研究科	生命科学	金子 律子	自閉症の性差に関する「性ステロイド仮説」を自閉症モデルマウスを使って検証する	559,000	510,691
19	院生	片野 亘	生命科学研究科	生命科学	小柴 和子	心臓再生を目指したSal1の機能解析	560,000	507,990
20	院生	加藤 萌	生命科学研究科	生命科学	川口 英夫	HT22細胞における暑熱ストレス応答のメカニズムの解析	560,000	547,294
21	院生	澤辺 舞衣	生命科学研究科	生命科学	児島 伸彦	ドレプリン欠損マウスにおける行動表現型とシナプス形態異常に関する研究	552,000	451,431
22	院生	沖田 圭介	生命科学研究科	生命科学	金子 律子	成熟T細胞でGnRH3ニューロンが嗅上皮から発生するか また11-KTはそれを促進するか？	556,000	529,500
23	院生	齊藤 可剛	生命科学研究科	生命科学	三浦 健	カフェイン耐性乳酸菌におけるカフェイン耐性機構の解明	480,000	479,403
24	院生	諏訪 浩貴	生命科学研究科	生命科学	吉永 淳	ウミネコはどうやってハダカイワシを利用しているのか？ー夜間採餌行動の解明	560,000	559,999
25	院生	河野 翔	食環境科学研究科	食環境科学	矢野 友啓	低酸素培養モデルを用いた機能性食素材アサトー由来トリコセンの抗中皮腫作用の解析および中皮腫細胞に対するビタミンDの生物学的利用能の比較	700,000	690,961
26	院生	長竹 舞子	食環境科学研究科	食環境科学	矢野 友啓	II型糖尿病合併症としての乳がんの発症メカニズムの解析および食品機能性素材による新たな予防法構築の可能性	700,000	699,977
27	辞退に伴う欠番	—	—	—	—	—	630,000	—
28	院生	山崎 倫生	食環境科学研究科	食環境科学	太田 昌子	一過性有酸素運動後に抗酸化能を発揮する栄養素の探索	630,000	629,889
29	院生	芹澤 奈保	食環境科学研究科	食環境科学	矢野 友啓	δ-トコトリエンールによるヒト血中LDLコレステロール低下の検討	601,000	566,603
30	院生	遠藤 大輝	食環境科学研究科	食環境科学	矢野 友啓	NK細胞による新規がん予防法の構築を目指した悪性中皮腫スフェア集団のがん幹細胞性解析	630,000	629,994
31	院生	山本 かおり	食環境科学研究科	食環境科学	矢野 友啓	地域在住高齢者の認知機能と睡眠の質に対する多様な食品摂取を目的とした栄養プログラムの効果検証:ランダム化比較試験	630,000	629,220
32	院生	Asma Ben Salah	学際・融合科学研究科	バイオナノサイエンス融合	前川 透	Patterns formed by magnetic particles in fluctuating magnetic fields	680,000	675,690
33	院生	SHUKURO IBROHIMJON	学際・融合科学研究科	バイオナノサイエンス融合	モハメッド シェイク モハメッド	A Comparative Investigation on the Anti-Cancer Effects of Chaga Mushroom Extracts from Uzbekistan and Japan	630,000	628,874
34	院生	田沼 友理	学際・融合科学研究科	バイオナノサイエンス融合	前川 透	Experimental and theoretical studies of endohedral fullerene functionalisation and growth	560,000	548,568
35	院生	EDEN MARIAM JACOB	学際・融合科学研究科	バイオナノサイエンス融合	ダサバン ナイル サクチ クマール	SYNTHESIS OF POLYSACCHARIDE BASED NANOPARTICLES FOR THE ORAL DELIVERY OF QUERCETIN IN TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES(炎症性腸疾患の治療における	544,000	543,867
大学院学生 合計35件							21,455,000	20,374,191

【校友】

					(単位:千円)		(単位:円)	
	身分	研究代表者			指導教員名	研究課題名	採択額	執行額
		氏名	学部/研究科/センター	学科/専攻				
1	校友	上村正裕	文学研究科	史学専攻	森公章	平安期王権構造の総合的研究	680,000	679,968
2	校友	松野聡子	文学研究科	史学専攻	白川部達夫	秋田地域の信仰圏と在地宗教者	700,000	413,874
3	校友	松井 宏介	理工学研究科	応用化学専攻	安藤 直子	Fusarium属菌の生産するトリコセンの新規配糖体の同定、およびその食へのリスクの検証	560,000	559,992
4	校友	佐川 まこと	福祉社会デザイン研究科	ヒューマンデザイン専攻	白石 弘巳	精神障害者のACTIにおける家族支援に関する研究 -経年に渡る家族からの聞き取り調査から-	560,000	147,307
校友 合計4件							2,500,000	1,801,141

【教員】

(単位:円) (単位:円)

	資格	研究代表者			研究課題名	採択額	執行額
		氏名	学部/研究科	学科/専攻			
1	教授	佐々木 啓介	経済	経済	地方公営企業法の改正と公営企業の効率性改善について	481,000	322,380
2	教授	金子 友裕	経営	会計ファイナンス	デジタル経済を想定した場合の課税所得計算	276,000	276,000
3	教授	井沢 泰樹	社会	社会文化システム	社会的マイノリティにおけるメンタルヘルスとセーフティネット構築に関する研究	525,000	523,368
4	助教	伊藤 大将	国際	グローバルイノベーション	クラウドソーシングと公募型パネルを用いたウェブサーベイデータの質の調査	152,000	152,000
5	教授	市川 颯	国際	グローバルイノベーション	ユンカー欧州委員会におけるEUエネルギー同盟の政治過程	1,190,000	1,076,988
6	講師	高岩 裕也	理工学部	建築学科	炭素繊維複合材料による耐震補強を適応した既存木造建築物における長期耐久性の解明	2,000,000	1,999,485
7	准教授	青木 宗之	理工学部	都市環境デザイン学科	急勾配な水路式魚道における魚類の遡上率向上を目指した粗度要素や配置に関する研究	1,140,000	1,140,000
8	教授	藤井 修治	食環境科学部	食環境科学科	バイオブロープを利用した細胞核内動的構造秩序の基本原理探索	2,000,000	2,000,000
9	教授	吉永 淳	生命科学部	応用生物科学科	炭素窒素安定同位体比に基づく現代日本人の食性解析	1,250,000	1,222,791
10	助教	井ノ口 蘭	生命科学部	生命科学科	トラザメの胚期に特有の塩類細胞から謎多き軟骨魚類のイオン調節機構を解明する	800,000	319,717
11	助教	谷 智子	情報連携	情報連携	「利害」が生じる日中異文化接触場面におけるイン/ボライタネス研究	910,000	434,269
12	准教授	本多 泰理	情報連携	情報連携	関数解析的手法のネットワーク解析への応用	700,000	693,305
13	教授	神場 知成	情報連携	情報連携	創造性を高めるオフィス実現に向けた環境自動制御の研究	773,000	771,459
14	准教授	加知 範康	情報連携	情報連携	非居住地域へのグリーンインフラ導入による都市域縮退の実現可能性	2,000,000	1,916,014
15	助教	伊藤 健彦	情報連携	情報連携	第二言語使用を抑制・促進する社会生態学的基盤の解明:関係流動性に着目して	613,000	612,165
教員 合計15件						14,810,000	13,459,941

個人研究(院生・校友・教員)合計54件	38,765,000	35,635,273
---------------------	------------	------------

【共同研究】

(単位:円) (単位:円)

【教員】

	資格	研究代表者			研究分担者	研究課題名	採択額	執行額
		氏名	学部/研究科	学科/専攻				
1	教授	大野 裕之	経済	国際経済	林田実	個人投資家の証券投資に関する行動・意思決定の総合的研究	821,000	821,000
2	准教授	山口 裕之	経営	経営	阿部智和 大原亨	ビジネスモデルの漸進的逸脱プロセスの追跡	800,000	330,042
3	教授	井上 貴也	法	企業法	後藤武秀	珠海デルタ地域における会社法の展開について	939,000	939,000
4	廃止に伴う欠番	—	—	—	—	—	300,000	—
5	教授	北脇 秀敏	国際	国際地域	眞子岳 松藤康司 村上淑子	開発途上国における廃棄物発電の導入可能性評価指標の開発に関する実証的研究	1,200,000	1,199,518
6	准教授	吉岡 勉	国際観光	国際観光	青木章通 田坂公	観光サービスにおける労働生産性の向上に関する研究	1,000,000	1,000,000
7	准教授	井坂 和一	理工学部	応用化学科	池道彦 見島伊織	特殊菌を利用した1,4-ジオキサン処理における微量元素種と最低濃度条件の解明	1,200,000	1,199,984
8	教授	吉田 泰彦	理工学部	応用化学科	佐々木直樹	iPS細胞に基づくマイクロ腫瘍モデルの構築とナノ薬剤評価への応用	798,000	798,000
9	教授	後藤 颯一	食環境科学部	食環境科学科	松尾知明 高橋三男 伊藤克治 野内頼一 川崎弘作	「科学の有用性」を実感し、探究型の学びの実現を目指す学習モデルに関する研究	2,000,000	2,000,000
教員 合計9件							9,058,000	8,287,544

【海外協定校との共同研究】

(単位:円) (単位:円)

	身分	研究代表者			海外協定校(国/大学名等)	研究分担者(本学専任教員)	共同研究先の主な研究者	研究課題名	採択額	執行額
		氏名	学部/研究科/センター	学科/専攻						
1	教授	伊吹敦	文学部	東洋思想学科	中国人民大学(中国)・金剛大学校(韓国)	岩井昌悟(文学部教授) 渡辺章悟(文学部教授) 山口しのぶ(文学部教授)	趙風雷 李承南 張文良 鄭祥教	中国人民大学(中国)・金剛大学校(韓国)と結んだ交流協定に基づく国際シンポジウム「東アジア仏教における生活規範―戒律・大乗戒・清規・非憎非俗」の共同開催	2,000,000	1,700,975
2	教授	太矢一彦	法学部	企業法学科	国民大学校(韓国)		崔喜植 李元徳 殷泰奉	高齢者の住まい及び高齢者の生活資金融資に関する日韓比較研究	1,913,000	1,890,308
3	教授	山本須美子	社会学部	社会文化システム学科	温州大学(中国)		徐輝	中国浙江省出身の若者にみるトランスナショナリズムに関する教育人類学的研究	2,000,000	1,234,404
4	教授	金子 律子	生命科学部	生命科学科	台湾国 中央研究院細胞個体生物学研究所(台湾)	小柴 和子	黃鵬鵬 曾肅哲	脳の性差や性転換に及ぼす性ステロイドの影響	1,983,000	1,983,000
5	教授	廣津 直樹	生命科学部	生命科学科	スリランカ国立基礎研究所(スリランカ)	長坂 征治	Saman Seneweera Siril Wijesundara Ishara Perera	スリランカにおけるイネ収量および亜鉛吸収効率向上のための遺伝構造解析	1,800,000	1,800,000
6	教授	矢野 友啓	食環境科学部	食環境科学科	サンパウロ大学(ブラジル)		Maria Lucia Zaidan Dagli Francisco Javier Hernandez Blazquez	ヒトメラノーマ予防法開発のためのモデルとしてのイヌメラノーマの可能性	1,990,000	1,960,112
教員 合計6件									11,686,000	10,568,799

【新規・研究所プロジェクト】

(単位:円) (単位:円)

	研究所	身分	研究代表者			研究分担者	研究課題名	採択額	執行額
			氏名	学部/研究科 /センター	学科/専攻				
1	アジア文化研究所	教授	長津 一史	社会学部	社会文化システム学科	箕曲在弘左地亮子寺内大左渡邊暁子合地幸子鈴木佑記	東南アジアにおける帰還移民の社会経済的再統合 -日本就労経験者を中心に	1,800,000	1,799,367
2	ライフサイエンス学研究所	教授	宮越 雄一	食環境科学部	健康栄養学科	矢野 友啓	大腸がん幹細胞を標的とした新たな大腸がん予防法の構築	1,782,000	1,782,000
教員 合計2件								3,582,000	3,581,367

【継続・研究所プロジェクト】

(単位:円) (単位:円)

	研究所名	身分	研究代表者			研究分担者	研究課題名	採択額	執行額
			氏名	学部/研究科/センター	学科/専攻				
1	アジア文化研究所	教授	千葉正史	文学部	史学科	三沢伸生・大室智人	東洋大学に所蔵される中国語諸史資料のデータベース構築と活用開発	1,800,000	1,800,000
2	東洋学研究所	教授	渡辺章悟	文学部	東洋思想文化学科	山口しのぶ・岩井昌吾・現銀谷史明・石川美恵	初期大乗仏教の成立と展開－テキスト・ことば・思想－	680,000	680,000
3	アジア文化研究所	教授	後藤武秀	法学部	法律学科	芦野訓和・大坂恵里・深川裕佳・井上貴也・朱大明	珠江デルタ地帯における民事法統一化傾向の研究	1,576,000	1,576,000
4	人間科学総合研究所	教授	森田明美	社会学部	社会福祉学科	内田塔子・林大介・上田美香・安ウンギョン	被災地における子どもと子育て家庭の居場所づくりに関する継続的な取り組み支援研究－当事者参加型支援モデルを手掛かりにして	1,800,000	1,392,918
5	アジア文化研究所	教授	山本須美子	社会学部	社会文化システム学科	三沢伸生・長津一史・箕曲在弘・宮下良子	首都圏在住アジア系の若者にみるトランスナショナリズムに関する比較研究	1,800,000	1,800,000
6	工業技術研究所	教授	蒲生(西谷)美香	理工学部	応用化学科	相沢宏明・井坂和一・物部秀二・吉野隆・吉本智巳・村野昭人・稲本将史・伴雅人・江口美佳・中川清晴	新規球状ナノ炭素材料「マリモカーボン」の合成と用途探索-エネルギー・環境・生体分野への応用を目指して-	1,800,000	1,799,994
教員 合計6件								9,456,000	9,048,912

共同研究(専任教員・海外協定校・研究所プロジェクト)合計23件									33,782,000	31,486,622
---------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	------------	------------

【刊行の助成】(単位:円) (単位:円)

	身分	研究代表者			研究課題名	採択額	執行額
		氏名	学部/研究科/センター	学科/専攻			
1	校友	畑一成	文学研究科	哲学専攻	ゲーテ ポイエーシス的自然学の想像力―色彩論と生成する自然の力の源泉	803,000	803,000
2	教授	小澤浩明	社会学部	社会学科	ブルデューの教育社会学理論―教育システムと社会階級・社会秩序の再生産と変革の理論―	669,000	649,820
3	教授	菊地 章太	ライフデザイン学部	健康スポーツ学科	『小鳥が歌う-古いポルトガル語による聖母マリアの詩』	800,000	800,000
教員2件・校友1件 計3件						2,272,000	2,252,820

刊行の助成 合計3件	2,272,000	2,252,820
------------	-----------	-----------

(単位:円) (単位:円)		
個人研究、共同研究(海外協定校との共同研究・研究所プロジェクト)刊行助成 計80件	74,819,000	69,374,715

【井上円了記念研究助成 研究助成・刊行助成 審査・運営費】(単位:円) (単位:円)

	措置額	執行額
井上円了記念研究助成(研究助成・刊行助成)審査・運営経費等	2,681,000	1,458,080

【東洋大学出版会による刊行の助成】(単位:円) (単位:円)

	身分	著 者		職	共同執筆者	出 版 書 名		措置額	執行額
		氏名	学部	学科					
1	教員	三石 庸子	社会	社会文化システム	教授	単著	カリブに生きる -文献から辿る小地域の人びとの豊かな遺産-	2,500,000	2,395,696
2	東洋大学出版会審査・運営経費								4,050

合計	80,000,000	73,232,541
----	------------	------------