

研究題目	高齢者の幸福と認知機能・身体機能促進に寄与する要因の解明
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部 薬学・和漢系/助教・稲田祐奈
分野	神経心理学
キーワード	幸福度、認知機能、身体機能

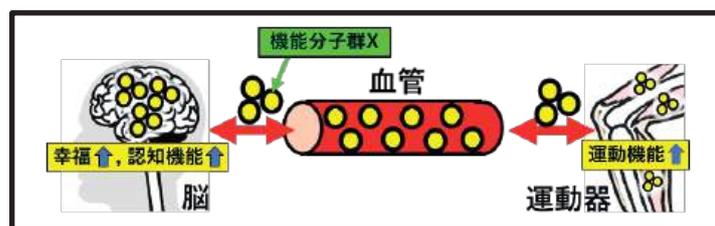
1. 研究の背景と目的

精神的概念である幸福と、健康状態との関連性について多くの報告がなされている。例えば、身体活動の促進が高齢期の幸福度の悪化を抑制すること(Wang et al., 2012)、認知機能のレベルは幸福度と相関することが明らかとなっており(Wilson et al., 2013)、心身の健康状態や機能はそれぞれが関連し、相互的に寄与していると考えられる。つまり幸福で健康な状態では、少なくとも幸福や認知を司る脳のみならず、運動器、心臓などの複数の臓器が良い状態を保っていると予想される。

我々は幸福と、高齢者の日常生活に大きく関わる認知機能と身体機能の連関に着目した。幸福と認知機能・身体機能の全てが良い状態に保たれる理由として、何らかの機能分子が脳あるいは運動器で生成・分泌され、身体の中を循環して幸福度や認知機能を司る脳と、身体機能や日常生活の活動に関わる運動器に届いて幸福や機能を促進させるエンドクラインフィードバックのプロセスがあると考え、この証明によって幸福と認知機能・身体機能とのつながりの実体が明らかにできるのではないかと考えた。ヒトにおいてはこの機能分子群の存在を、全身を循環する血漿から調べ、また動物研究によって機能分子の体内動態、到達臓器や到達過程を知ることができれば、幸福、認知機能、身体機能の因果関係も明らかにできる可能性がある。このように一連の機構として捉えて機能分子があると仮定すると、これまで明らかにされてこなかった幸福と認知機能・身体機能の関連性の実体の解明に近づけると我々は考えた。

そこで本研究では、幸福と認知機能・身体機能を促進させることには、脳から運動器、あるいは運動器から脳へ移行するいくつかの機能分子群の働きが寄与していることを明らかにし、幸福と認知機能・身体機能が相互作用しながら

向上するメカニズムを解明する。そのためにまずは幸福感の亢進と脳機能、運動機能向上に寄与する機能分子 X をヒト観察研究により探索した。さらに、この機能分子 X が本当に脳や骨格筋等の関連臓器(脳・筋肉)に存在するのかを動物実験により検討した。



本研究の仮説

2. 研究方法の概要

検討1) ヒト観察研究

日常生活に支障のない認知機能、身体機能を維持している65歳以上の健常高齢者45名(72.78 ± 5.23 years (男性24名、女性21名))を対象に、幸福度、認知機能、身体機能、日常活動量の測定、日常生活実態調査及び、血漿を採取した(実施項目は方法の詳細を参照)。

方法の詳細

- ・対象: 65歳以上の健常高齢者
- ・評価項目:
 - WB: Oxford Happiness Questionnaire (OHQ), QOL (WHO-QOL26)
 - 採血(血漿)
 - 認知機能: Mini Mental State Examination (MMSE), Wechsler Adult Intelligence Scale—4th Edition (WAIS-IV)
 - 身体機能: 2ステップテスト、5m歩行テスト、立ち上がりテスト、Locomotive syndrome questionnaire (GLFS-25)
 - 日常活動量: 加速度計による消費カロリー、歩数、運動強度計測

本研究の前提として、本当に幸福と認知機能、身体機能が関連するのかを確認するために、血漿データ以外の全ての測定データについて、共分散構造分析により因果関係を検討した。また、個別に幸福度、認知機能・身体機能の高さを定量後、測定項目のパターンの違いによって被験者を群分けし、群ごとに1つの血漿サンプルを作製した。各群の血漿中のタンパク質を定量的プロテオーム解析(Tandem Mass Tag法)によって、網羅的に定量・群間比較した。この解析から、幸福度依存的に変化したタンパク質を、機能分X子候補とした。その後、機能分子が本当に幸福度依存的に増減しているかを調べるため、機能分子Xを個別にELISA法により定量し、幸福度との相関を算出した。

検討2) 動物実験

機能分子Xが本当に機能の関連臓器(脳・筋肉)及び血漿中に存在するか、またヒト研究のように機能分子Xは情動に関連するのかを、マウス実験により検討した。しかしマウスの幸福度を測定する、あるいは幸福度の高いマウスを作製することは現状困難であることから、本研究では、抗うつ効果が期待できるEnriched environmentを施すことで、これを高幸福マウスとして実験に用いることとした。Enriched environmentでは通常よりも物理的視覚的に刺激の多い環境で飼育し、これにより抗うつおよび抗不安効果があることが多くの研究から示されている(Brenes JC et al., 2008; Benaroya-Milshtein et al., 2004 etc.)。

Enriched environment (図1(A))マウスと通常の飼育環境に置いたStandard environment (図1(B))マウスを6週間それぞれの環境で飼育し、その後、血漿、全脳、骨格筋を摘出し、各臓器に機能分子が存在するかを検討した。脳は摘出した全脳を-30℃で凍らせた後、脳組織切片を作製し、機能分子の抗体を用いた蛍光免疫染色により、局在および蛍光量を測定した。骨格筋である前脛骨筋は-30℃で凍結後、破碎してlysateを作製した。血漿および前脛骨筋におけるProtein Xの定量を、抗Protein X抗体を用いたWestern Blottingにより行った。

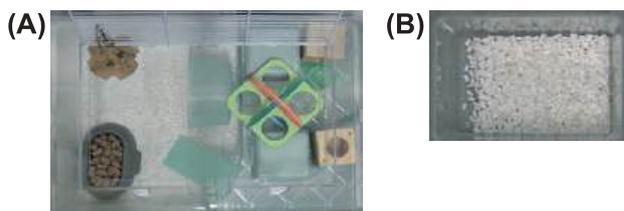


図1. Enriched/Standard environmentの飼育条件

(A) Enriched environment:

大ケージ (55 × 39 × 27cm) 内で集団飼育し、16種類の玩具をケージ内に入れた。

(B) Standard environment:

通常ケージ (23 × 16.5 × 12cm) 内で集団飼育を行った。

3. 研究成果

3-1. 健常高齢者における幸福度、認知機能、身体機能の因果関係の検討

65歳以上の健常高齢者45名に対して測定した幸福度、認知機能、身体機能、日常活動量の因果関係を共分散構造分析により検討したところ、図2のような結果が最適モデルとして得られた(モデル適合度: $\chi^2 = 76.59, p = 0.117, GFI = 0.800, AGFI = 0.712, CFI = 0.946, RMSEA = 0.070$). 健常高齢者の心身の健康状態において、日常活動量は身体機能の高さを説明し、身体機能の高さは、認知機能の高さを説明し、認知機能の高さはQOLと幸福度を説明するという一続きの因果関係があることが示された(Inada & Tohda, 2023)。

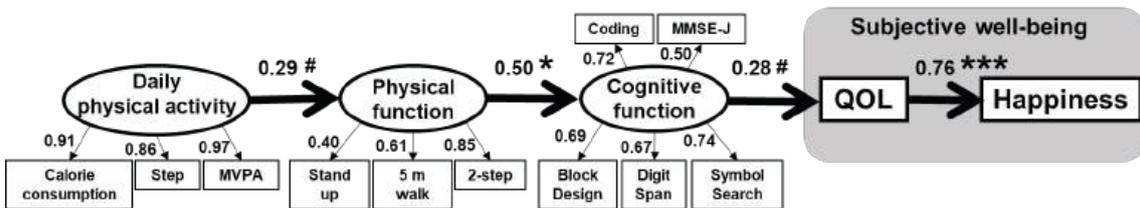


図2. 共分散構造分析により得られた幸福度、認知機能、身体機能の因果関係の最適モデル

3-2. 幸福度に依存して血漿中で増える機能分子Xの探索

65歳以上の健常高齢者45名を幸福度によって被験者を4群に分けて、4群の血漿タンパク質を定量的プロテオーム解析によって網羅的に比較した。その結果、163のタンパク質について群差が生じた。この163個のうち、群間比較で幸福度の高い順に血漿中で高値を示すタンパク質であるProtein X (秘匿のため仮名)を機能分子候補として見出した。Protein Xはヒトにおいて様々な脳神経疾患患者の血中や脳脊髄液中で低下することが複数報告されている。Protein Xと高齢者45名の幸福度の相関を調べたところ、有意な相関が見られた(図3; Spearman's $r = 0.335, p = 0.033$)。

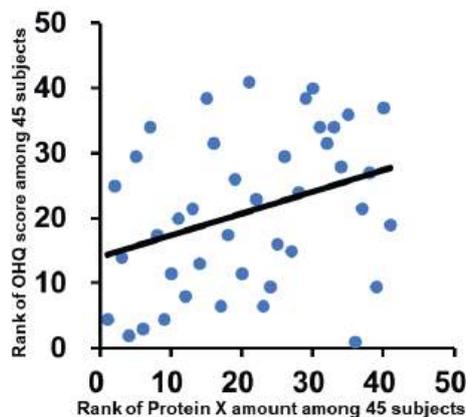
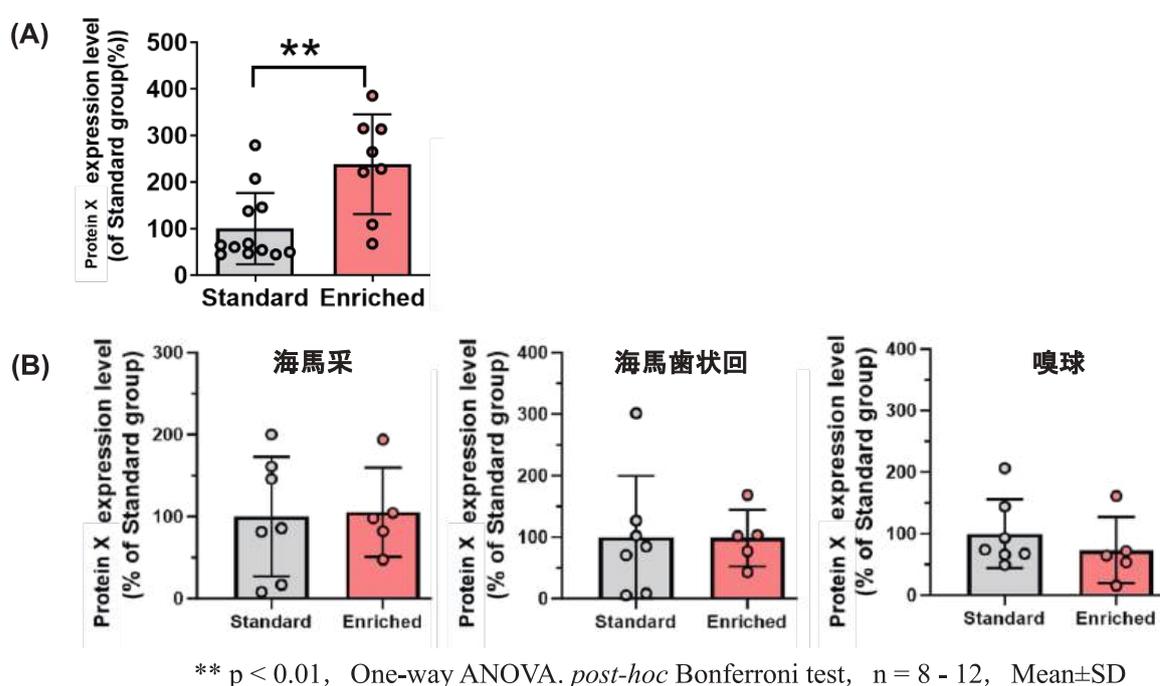


図3. Protein Xと幸福度の相関図

3-3. Protein X は Enriched environment マウスで増加するのか

飼育環境を操作することでうつ様行動が減少するマウスを作製し、これを高幸福度状態のマウスと仮定し、Protein X の局在を調べたところ、骨格筋のうち前脛骨筋の Protein X 量が Enriched environment マウスで高くなることを確認された(図 4(A))。脳においては海馬采と海馬歯状回、嗅球で、Protein X の発現が見られたが、群差はみられなかった(図 4(B))。血漿中の Protein X 量の測定を試みたが、Protein X の分子量付近に、Protein X 以外の分子と考えられるバンドが広範囲にわたって見られ、Protein X のバンドを評価できなかった(データ未掲載)。動物実験については、ごく限られた部位での検討しか行えておらず、また再現性を確認できていないため、引き続き検討を継続する。



** p < 0.01, One-way ANOVA. *post-hoc* Bonferroni test, n = 8 - 12, Mean±SD

図 4. Protein X 量の測定結果
(A) 前脛骨筋 (B) 海馬采、海馬歯状回、嗅球

4. 今後の展望

本研究により、健常高齢者の幸福度に関連して増減している Protein X を見出した。またこの Protein X はマウスの脳や筋肉に存在することも確認された。このことから、本研究で設定した仮説である、Protein X が脳や運動器等全身を、血液を介して循環し、脳・運動器に良い作用をもたらしているという仮説に相違しない結果が得られているが、これらは断片的な結果に過ぎず、本当に Protein X が幸福度を上げる、あるいは幸福度が高いことを反映して血漿中で上がるのか、また Protein X 自体が全身を循環することでよい作用をもたらしているのか等明らかでないことばかりである。これらを証明するために、本研究の検討 2 を引き続き継続するほか、幸福度を上げる介入により Protein X が増加するのかを証明する介入臨床研究および、Protein X を血漿中で

人為的に増加させることで、情動状態、認知機能、運動機能等に変化が生じるのかを検討する動物実験を実施予定である。

5. 参考文献

1. Wang F, Orpana HM, Morrison H, de Groh M, Dai S, Luo W. Long-term association between leisure-time physical activity and changes in happiness: analysis of the Prospective National Population Health Survey. *Am J Epidemiol*. 2012 Dec 15;176(12):1095-100.
2. Wilson RS, Boyle PA, Segawa E, Yu L, Begeny CT, Anagnos SE, Bennett DA. The influence of cognitive decline on well-being in old age. *Psychol Aging*. 2013 Jun;28(2):304-13.
3. Brenes JC, Rodríguez O, Fornaguera J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 Mar;89(1):85-93. doi: 10.1016/j.pbb.2007.11.004.
4. Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci*. 2004 Sep;20(5):1341-7. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x.
5. Inada Y, Tohda C. Causal Relationships between Daily Physical Activity, Physical Function, and Cognitive Function Ultimately Leading to Happiness. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Feb 9;20(4):3016. doi: 10.3390/ijerph20043016.

研究題目	呉羽山礫層の古地磁気層序
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部都市デザイン学系・准教授・川崎 一雄
分野	地球惑星科学
キーワード	古地磁気学, 呉羽山礫層, 再帯磁

1. 研究の背景と目的

この研究は、呉羽山丘陵で認められる呉羽山礫層の砂層に着目し、古地磁気学の手法から堆積年代を推定することを目的とする。呉羽山丘陵は、富山積成盆地の富山中部隆起域に属し、富山平野西縁をなす鮮新世後期から更新世後期の碎屑性堆積物（坂本ほか, 1959）からなり、呉羽山礫層はその構成堆積層の一つである。富山県（1997）で行われた呉羽山丘陵を横切る反射法地震探査の結果、呉羽山断層は丘陵東縁の崖から南東へ 1 km 離れた地点で地表に達する西傾斜の断層であると考えられ、呉羽山丘陵はその呉羽山断層の背斜構造の一部である。金谷ほか（2001）は丘陵中南部では中期更新世の長慶寺砂層堆積後に背斜構造の形成が始まり、その後呉羽山礫層が堆積し逆断層運動が顕在化したと報告している。そのため呉羽山断層の活動史を解明する上で呉羽山礫層の堆積年代は重要であるが、呉羽山礫層中は化石やテフラなどの鍵層が乏しく、呉羽山礫層上部の桃色凝灰岩層 (pt) と下位の長慶寺砂層中の長慶寺火山灰層 (Chk) の間である 0.60 Ma - 2.2 Ma の堆積年代より詳細な年代情報の報告例はない。一方、予察的研究として呉羽山丘陵から採取されたボーリングコア試料を対象とした古地磁気測定では、呉羽山礫層から地磁気の逆転層の存在が示唆されている。本研究は、野外露頭から連続的に採取する試料を対象にした古地磁気・岩石磁気解析から、予察的研究で示唆された逆帯磁層を同定し、古地磁気層序を確立することを目的とする。得られた結果より、呉羽山礫層の堆積年代や堆積速度を推定するとともに、逆転層が同定できれば地磁気逆転の様相を検討する。

2. 地質概要

呉羽山丘陵は富山積成盆地の中央に位置しており、東側の富山平野と西側の射水平野を隔てている。富山積成盆地には新第三紀後半と第四紀の地層だけが分布し、これらの地層は下位の先中生代の飛騨変成岩類、花崗岩類、中生代手取層群などを一様に覆って分布する(坂本, 1963)。呉羽山丘陵周辺には下位から新第三紀の海成層

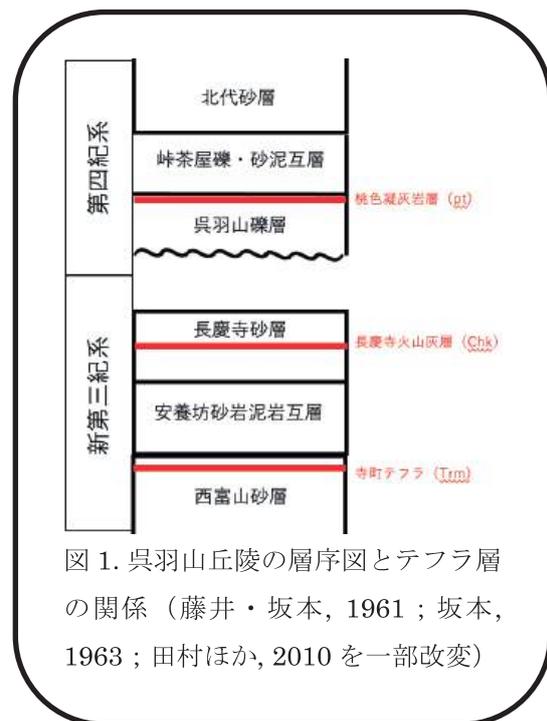


図 1. 呉羽山丘陵の層序図とテフラ層の関係（藤井・坂本, 1961；坂本, 1963；田村ほか, 2010 を一部改変）

である西富山砂岩層、安養坊砂岩泥岩互層、長慶寺砂層が整合に重なり、その上を呉羽山礫層が不整合に覆っており、呉羽山礫層の上位には峠茶屋礫・砂泥互層、北代砂層が整合に重なる（藤井・坂本, 1961）（図 1）。呉羽山礫層は富山平野を取り巻いて断続的に分布する扇状地礫層で、背後の山地由来の巨礫花崗岩を含む（坂本・野沢, 1960；田村ほか, 2010）。

呉羽山丘陵周辺の層序の中から複数のテフラが報告されており、田村ほか（2010）により、西富山砂岩層中から寺町テフラ層（Trm）が、長慶寺砂層中から長慶寺火山灰層（Chk）が、呉羽山礫層の上部から桃色凝灰岩層（pt, 坂本, 1963）があり、寺町テフラ（Trm）は大田-Znp テフラ（3.7 - 3.9 Ma）と、長慶寺火山灰層（Chk）は谷口テフラ（Tng）（2.2 - 2.3 Ma）と、桃色凝灰岩層（pt）は上宝テフラ（KMT）（0.6 Ma）と対比される。なお、呉羽山丘陵周辺では長慶寺砂層中で認められた谷口テフラは、富山平野東部の上市町白岩ムクロジ沢では呉羽山礫層の中部層準に狭在すると考えられる。

3. 研究方法

3.1. 試料採取

研究を実施するために、呉羽山丘陵を横断する県道 44 号線より南側の 5 サイト（サイト 1-5）で試料採取を行った（図 2）。試料は露頭より 7 cm³ プラスチックキューブを用いて磁気コンパスを用いて定方位で採取した。サイト 1 は県道 44 号線横のスカイライン道路沿いに位置しており、露頭観察よりから後述のサイト 2 よりやや下位に位置すると考えられるため、サイト 1 はサイト 2 で認められる桃色凝灰岩層（pt）より下位と考える。露頭上部の大きな礫を含んだ礫層と、その下位の砂層から成る露頭で、試料は砂層部分から同一層準で 3 個ずつ 5 層準から合計 15 試料を採取した。なお、最下位の試料から最上位の試料までの高さは約 23.5 cm である。

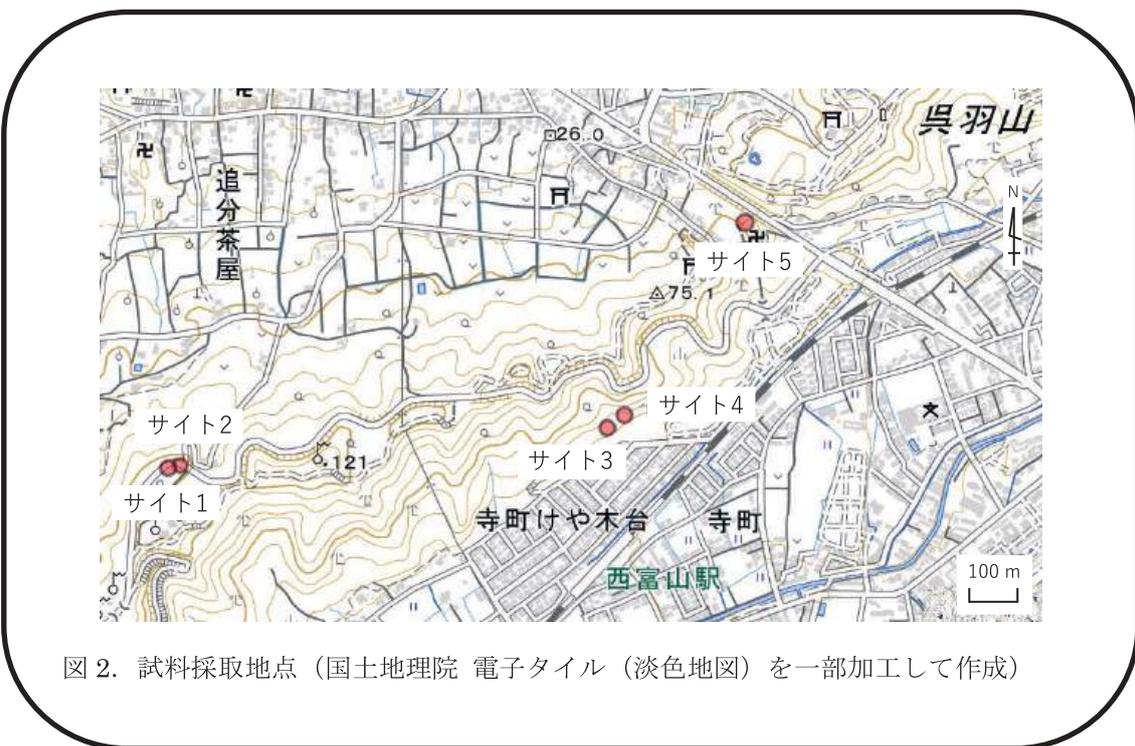


図 2. 試料採取地点（国土地理院 電子タイル（淡色地図）を一部加工して作成）

サイト 2 は県道 44 号線からスカイラインを進んだ道路沿いにある電波塔下の露頭で、サイト 1 より西に約 50 m 進んだ位置となる。露頭は、上位より桃色凝灰岩層 (pt) , 砂層, 砂礫層, 白黒の粘土層, 赤色の粘土層からなる。試料は上部の砂層, 砂礫層部分からは同一層準で 1 個ずつ 4 層準, 下部の粘土層部分からは同一層準で 2 個ずつ 6 層準 (ただし, 最下位は 1 個で 1 層準) の合計 15 試料を採取した。最下位の試料から最上位の試料までの高さは約 100 cm であった。

サイト 3 は JR 高山本線西富山駅北東にある寺町けやき台公園北側の斜面を約 10-15 m 登った地点で、上部の砂泥互層と、下部の砂層からなる露頭である。サイト 3 の地層の走行は 276°, 傾斜は 52° である。なお、走向傾斜は Right-Hand Rule で測定している。露頭より下位で白色の寺町テフラ (Trm) が認められる。試料は上部の砂泥互層部分から同一層準で 3 個ずつ 4 層準, 下部の砂層部分から同一層準で 3 個ずつ 4 層準から合計 27 試料を採取した。最下位の試料から最上位の試料までの高さは約 63 cm であった。

サイト 4 はサイト 3 より東側に約 20 m の位置しており、サイト 3 と同一層準と考えられる。サイト 3 同様に露頭より下位で Trm が認められる。サイト 4 の地層の走向は 249°, 傾斜 42° である。露頭は、上位より砂層, 小さい礫を含む砂礫層, 砂層からなり、試料は上部の砂層部分から同一層準で 3 個ずつ 3 層準, 砂礫層部分から同一層準で 3 個ずつ 3 層準, 下部の砂層部分から同一層準で 3 個ずつ 4 層準の合計 30 試料を採取した。最下位の試料から最上位の試料までの高さは約 126 cm であった。

地点 5 は呉羽丘陵多目的広場駐車場から北西に約 100 m の位置にある。サイト 1-4 との層序関係は不明瞭であるが、坂本 (1963) より桃色凝灰岩層より下位にあり呉羽山礫層または長慶寺砂層と考えられる。露頭は全体的に砂層からなり、最下位から 16.5 cm から 23.5 cm では同一層準で 3 個ずつ 3 層準, 他では同一層準で 2 個ずつ 5 層準の合計 19 試料を採取した。最下位の試料から最上位の試料までの高さは約 27.5 cm であった。

3. 2. 実験手法

採取試料の初磁化率は、Bartington 社製 MS2-B 初磁化率計を用いて測定した。なお、1 試料につき 3 回測定し、その平均値を採用し、試料の重量を用いて質量初磁化率を求めた。

試料の自然残留磁化 (NRM) は 2G Enterprises 社製パススルー型 760R 超伝導磁力計を用いて測定した。試料の NRM を測定後は、0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 mT の 12 段階で段階交流消磁実験を行った。なお、一部の試料については、80, 100 mT での交流消磁段階を追加した。測定結果は、ザイダーベルト投影法 (Zijderveld, 1967) と主成分解析法 (Kirschvink, 1980) を用いて解析し、原点に向かう直線性が認められる 3 消磁段階以上の残留磁化成分を試料の安定な固有残留磁化 (ChRM) とした。なお、本研究では、直線性は原点を通る直線の最大角分散 (MAD) が 15° 未満になることを条件とした (小玉, 1999)。

試料に含まれる磁性鉱物の種類とその磁区構造を推定するため、各採取地点から代表的な 2~3 個の試料を対象に岩石磁気分析を実施した。熱磁気分析では栄光電機製熱磁気天秤 EB-CA3 を

用いて、直流磁場下で、空気中にて 8°C/分の加熱・冷却速度で室温から 720°Cまで昇温後、室温まで冷却し、誘導磁化の変化を測定した。磁気ヒステリシス測定は Lake Shore 社製 PMC MicroMag 試料振動型磁力計 (VSM) 3900-04RK を用いて実施した。最大印加磁場 1.0 T で測定を行い、ヒステリシス曲線より保磁力 (Hc)、飽和磁化 (Ms)、飽和残留磁化 (Mrs) を得て、その後、Mrs に対する段階的な直流消磁と残留磁化測定により残留保磁力 (Hcr) を求めた。

4. 研究成果

4.1. 残留磁化方位

段階交流消磁の結果、地点 1 と地点 2 及び地点 5 では低消磁段階 (0-6 mT) で消磁される原点に向かわない不安定成分とそれ以降の消磁段階で原点に向かう安定成分の 2 成分が認められた (図 3abe)。一方、サイト 3 と 4 では同様な低消磁段階で消磁される試料は数個にとどまり、多くの試料で低消磁段階から高消磁段階まで直線的に原点に向かう安定な一成分が認められた (図 3cd)。なお、本研究では安定な磁化成分として原点に向かう $MAD < 15^\circ$ を満たす直線成分としたが、サイト 1~4 では全試料が $MAD < 5^\circ$ を示した。

各試料の ChRM 方向から求めたサイト平均 ChRM 方向は以下の結果となった。サイト 1: 試料数 $N = 15$, 偏角 $D = 4.7^\circ$, 伏角 $I = 59.4^\circ$, 95%信頼限界円錐 $\alpha_{95} = 10.3^\circ$, 集中度パラメータ $k = 14.8$ (Fisher, 1953), サイト 2: $N = 15$, $D = 13.4^\circ$, $I = 62.2^\circ$, $\alpha_{95} = 6.8^\circ$, $k = 32.6$, サイト 3: $N = 27$, $D = 11.3^\circ$, $I = 45.6^\circ$, $\alpha_{95} = 5.5^\circ$, $k = 26.8$, サイト 4: $N = 30$, $D = -0.1^\circ$, $I = 46.6^\circ$, $\alpha_{95} = 2.0^\circ$, $k = 168.$, サイト 5: $N = 15$, $D = 0.9^\circ$, $I = 47.2^\circ$, $\alpha_{95} = 9.6^\circ$, $k = 16.8$ 。なお、サイト 3 と 4 は傾動補正前の値である。また、現在の呉羽山の地磁気方向は $D = -8.5^\circ$, $I = 51.3^\circ$ (IGRF-13) である。

同一層準と考えられるサイト 3 と 4 は傾動が認められたため傾動補正後の地点平均 ChRM 方位を求め、褶曲テスト (Watson and Enkin, 1993) を行った。その結果、unfolding が 0% の時は $k = 207.3$ で 100% の時は $k = 30.6$ を示し、褶曲テストは不合格であった (図 4)。したがって、少なくともサイト 3 と 4 で認められた ChRM は、褶曲後に再帯磁したものと考えられる。

4.2. 岩石磁気

初磁化率の測定結果、各サイトの平均初磁化率は、サイト 1: $4.65 \pm 0.96 \text{ m}^3/\text{kg}$ (試料数 $N = 15$), サイト 2: $15.79 \pm 18.48 \text{ m}^3/\text{kg}$ ($N = 15$), サイト 3: $9.55 \pm 3.20 \text{ m}^3/\text{kg}$ ($N = 27$), サイト 4: $12.76 \pm 6.93 \text{ m}^3/\text{kg}$ ($N = 30$), サイト 5: $0.61 \pm 0.06 \text{ m}^3/\text{kg}$ となった。サイト 2 は、露頭下部で認められた黒色の粘土層試料で他の試料よりも顕著に高い値となった。また、サイト 5 は他の 4 サイトよりも一桁弱い初磁化率を示した。これらの層は、今後の呉羽山丘陵における同様な古地磁気研究において、地層の対比等に用いることができる可能性がある。

熱磁気分析の結果、全ての測定試料で温度上昇に伴い緩やかに磁化が減少していき、580 °C 付近で磁化が消失する傾向が認められた (図 5)。なお、サイト 1 の 1 試料については 330 °C 付近で磁化の減少も認められた。

磁気ヒステリシス測定から得られた H_c , M_s , M_{rs} , H_{cr} の 4 種のパラメータを用いて, Day

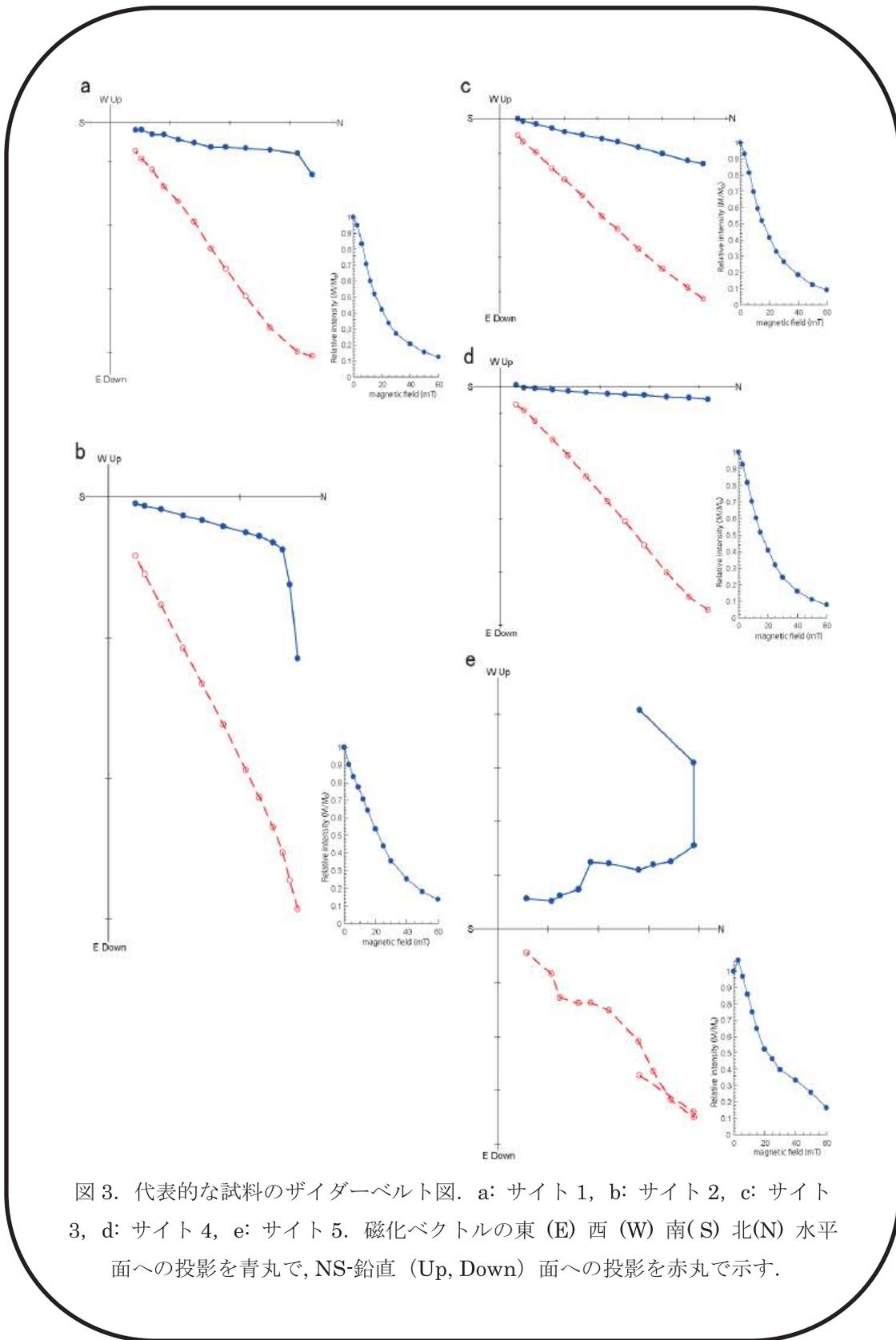


図 3. 代表的な試料のザイダーベルト図. a: サイト 1, b: サイト 2, c: サイト 3, d: サイト 4, e: サイト 5. 磁化ベクトルの東 (E) 西 (W) 南 (S) 北 (N) 水平面への投影を青丸で, NS-鉛直 (Up, Down) 面への投影を赤丸で示す.

plot 解析を行った結果、ほぼすべての試料が疑似単磁区 (PSD) 領域を示した (Day et al., 1977; Dunlop, 2002ab).

岩石磁気分析の結果と段階交流消磁実験の結果を統合すると、ChRM を担う主要な磁性鉱物は、全てのサイトに説いて PSD もしくは単磁区 (SD) と多磁区 (MD) が混合したマグネタイトであると考えられる。一方、サイト 1 ではマグネタイトのほかにマグヘタイトもしくはチタノマグネタイトの含有も考えられる。

4. 3. 呉羽山礫層の堆積年代

サイト平均 ChRM 方向と現在の地磁気方向を比べると、サイト 5 を除くサイト 1~4 では有意に異なる方向を示した (図 6)。また、現在の磁極期での地心軸双極子磁場の平均方向と比較するとサイト 1 と 2 は同一方向であり、サイト 3~5 は異なる方向である (図 6)。

サイト 1 と 2 の ChRM 方向は、不安定成分な 2 次磁化成分の消磁後の成分であり、また現在の地磁気方向とは有意に異なることから、初生的な堆積残留磁化 (DRM) 起源であると仮定する。サイト 1 と 2 の平均 ChRM 方向は正帯磁を示しており、これらのサイトの直上には桃色凝灰岩層 (0.6 Ma) があることから正磁極期の中でもブルン正磁極期に堆積したと考えられ、ブルン正磁極期の開始時期 (0.77 Ma) を考慮すると、サイト 1 と 2 の堆積時期は 0.6 Ma - 0.77 Ma の間と示唆される。なお、サイト 1 と 2 のサイト平均 ChRM 方向と現在の磁極期の地心双極子磁場の平均方向は統計学的に同一方向であり、現在と同じブルン正磁極期に堆積したと整合的である。

サイト 3 と 4 は褶曲テストに不合格のため、褶曲後の再帯磁が示されており、古地磁気学的手法から堆積時期は推定できない。サイト 3 および 4 の上位に位置するサイト 1 と 2 では傾動は認められないため、サイト 3 と 4 の褶曲は、露頭下部で認められた寺町テフラ (3.7-3.9 Ma) か

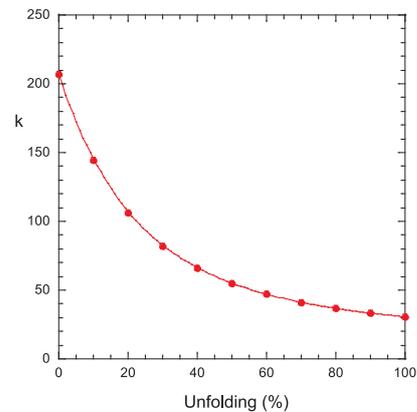


図 4. 褶曲テストの結果. k: 集中度パラメータ (Fisher, 1953).

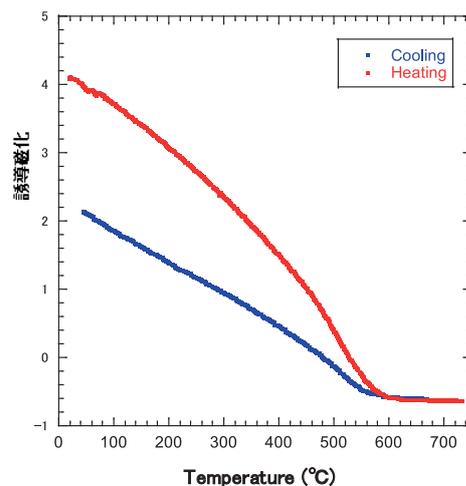


図 5. 代表的な熱磁気分析の結果 (サイト 3). 測定は空気中で実施した。

らサイト2上部の桃色凝灰岩層(0.6 Ma)の間に発生したイベントと考えられる。また、それぞれのサイトの平均 ChRM 方向と褶曲テストの結果から、正磁極期内に再帯磁をしたと考えられる。なお、サイト3および4の平均 ChRM 方向は、現在の地磁気方向と地心軸双極子磁場の平均方向のいずれとも異なる方向を示しており、現在の地磁気下あるいは現在の磁極期下で獲得した粘性残留磁化 (VRM) とは異なる可能性が高い。

呉羽山丘陵で採取されたボーリングコアを用いた予察的研究では呉羽山礫層内の砂層で逆帯磁が示唆されている。ここで、褶曲している層が全て再帯磁の影響を被っていると仮定すると、褶曲した層は正磁極期に再帯

磁しているため、この再帯磁現象の影響を被っていない逆帯磁を示す砂層は褶曲イベント後に堆積したと示唆される。したがって、褶曲イベントは少なくとも 0.77 Ma の地磁気の逆転以前に発生したと考えられ、寺町テフラの年代を考慮するとサイト3と4で認められた褶曲イベントは 0.77 Ma - 3.7 Ma の間に起きたと示唆される。なお、現在の磁極期の地心双極子磁場の平均方向と同一方向を示すサイト1と2の平均 ChRM 方向とサイト3と4の平均 ChRM 方向は有意に異なっているため、サイト1, 2は少なくともサイト3, 4と同時期の再帯磁は被っていないと考えられる。また、予察的研究で報告されている呉羽山礫層内の逆帯磁を示す砂層も再帯磁していないと考えられ、さらに正磁極期に再帯磁が起きていることから、サイト3と4の再帯磁は松山逆磁極期内の四つ (Jaramillo: 0.990 - 1.070 Ma, Cobb Mountain: 1.180 - 1.215 Ma, Olduvai: 1.775 - 1.934 Ma, Feni: 2.116 - 2.140 Ma, Ogg, 2020) のサブクロンもしくは 3.7 Ma 以降の Gauss 正磁極期に発生したと示唆される。

サイト5で得られた ChRM が初生的な DRM 起源であると仮定すると、サイト5は桃色凝灰岩層(0.6 Ma)より下位で呉羽山礫層か長慶寺砂層の一部と考えられる。一方、サイト1および2の平均 ChRM 方向とは異なっているため、サイト1と2と同時期の堆積ではないと考えられる。また、サイト5の平均 ChRM 方向はサイト3および4と同一方向を示していることから、サイト5はサイト3と4の再帯磁時期と同時期もしくは同磁極期内の堆積が示唆され、長慶寺砂層(2.2 Ma 付近)以降を考えると、正帯磁を示すことから上述の松山逆磁極期内の四つのサブクロンでの堆積が示唆される。

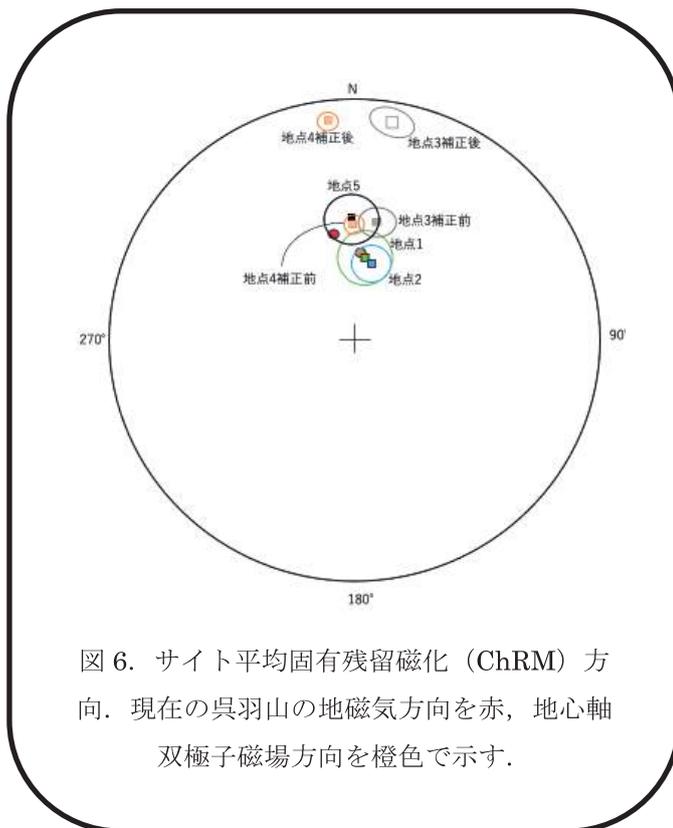


図 6. サイト平均固有残留磁化 (ChRM) 方向。現在の呉羽山の地磁気方向を赤、地心軸双極子磁場方向を橙色で示す。

5. 今後の展望

本研究では、呉羽山礫層の露頭を対象とした古地磁気・岩石磁気測定から、呉羽山礫層内の褶曲した層の再帯磁が松山逆磁極期内の四つのサブクロンもしくは 3.7 Ma 以降のガウス正磁極期に起きたことを示し、その褶曲イベントは 0.77-3.7 Ma の間に生じたことを指摘できた。ボーリングコア試料を用いた予察的研究で示唆された逆帯磁層は本研究では発見には至らなかったが、呉羽山礫層の砂層が安定な残留磁化を保持していることが明らかとなった。また、逆帯磁層は再帯磁の影響を被っていないと考えられ、逆帯磁層が露頭で認められる可能性は高いと考える。逆帯磁層の発見は、地磁気の逆転の様相だけでなく年代決定においても重要であり、更なる呉羽山礫層を対象とした古地磁気研究が望まれる。

6. 参考文献

1. 坂本亨, 今井功, 水野篤行, 角靖男, 井上正昭. 1959. 富山積成盆地南縁部の新生界. 地調月報, 10, 75-82.
2. 金谷隆行, 竹内章, 川中卓. 2001. 富山平野西縁, 呉羽山断層周辺の地下構造と丘陵形成史. 地球惑星科学関連学会 2001 年合同学会講演要旨集, Gm-P007.
3. 富山県. 1997. 呉羽山断層に関する調査. 平成 7 年度地震調査研究交付金成果報告書, 235p.
4. 坂本亨. 1963. 5 万分の 1 地質図幅「富山」及び同説明書. 地質調査所, 45 p.
5. 藤井昭二, 坂本亨. 1961. 呉羽山丘陵の地質—富山県下の第四系, その 3. 新生代の研究, 32, 797-803.
6. 田村糸子, 山崎晴雄, 中村洋介. 2010. 富山積成盆地, 北陸層群の広域テフラと第四紀テクトニクス. 地質学雑誌, 116 Supplement, S1-S20.
7. 坂本亨, 野沢保. 1960. 5 万分の 1 地質図幅「八尾」及び同説明書. 地質調査所, 60 p.
8. Zijdeveld, J.D.A. 1967. A.C. demagnetization of rocks: analysis of result. *In* D.W. Collinson, K.M. Creer, S.K. Runcorn (Eds.), *Methods in paleomagnetism*. Elsevier, New York, 254-286.
9. Kirschvink, J.L. 1980. The least-squares line and plane and the analysis of palaeomagnetic data. *Geophysical Journal International*, 62, 699-718.
10. 小玉一人. 1999. 古地磁気学. 東京大学出版会, 248p.
11. Fisher R.A. 1953. Dispersion on a sphere. *Proceedings of the Royal Society of London A217*, 295-305.
12. Watson, G.S., Enkin, R.J. 1993. The fold test in paleomagnetism as a parameter estimation problem. *Geophysical Research Letters*, 20, 2135-2137.
13. Day, R., Fuller, M., Schmidt, V. 1977. Hysteresis properties of titanomagnetites: grain-size and compositional dependence. *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 13, 260-267.

- 
14. Dunlop, D.J. 2002a. Theory and application of the Day plot (Mrs/Ms versus Hcr/Hc) 1. Theoretical curves and tests using titanomagnetite data. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 107, EPM 4-1-EPM 4-22.
 15. Dunlop, D.J. 2002b. Theory and application of the Day plot (Mrs/Ms versus Hcr/Hc) 2. Application to data for rocks, sediments, and soils. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 107, EPM 5-1-EPM 5-15.
 16. Ogg, J.G. 2020. Geomagnetic polarity time scale. In F.M. Gradstein, J.G. Ogg, M.D. Schmitz, G.M. Ogg (Eds.), *Geologic Time Scale 2020*, Elsevier, Amsterdam, 159-192.

研究題目	安全なゲノムの書き換えを実現する DNA 結合タンパク質の開発
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部工学系・准教授・迫野昌文
分野	理工系
キーワード	DNA 結合タンパク質, ゲノム編集

1. 研究の背景と目的

近年、ゲノム中の特定の塩基配列を改変するゲノム編集技術を、遺伝子疾患の治療に適用する試みがなされている。生体内で直接ゲノム編集を行う治療は“*in vivo* 遺伝子修正”と呼ばれ、次世代遺伝子治療技術として注目されている(図 1(A))。遺伝子修正による治療効果を上げるためには、ターゲット以外の書き換え(オフターゲット効果)の抑制が重要であり、予定外の遺伝子書き換えにともなうガン化リスクを避ける必要がある。

本研究は、DNA 配列を厳密に区別する DNA 結合タンパク質の構築が重要となる。ゲノム編集ツールとして、DNA 結合タンパク質 Transcription activator-like effector (TALE) と DNA 切断酵素を融合した TALEN を用いる¹(図 1(B))。申請者は、TALE 調製の際に、ターゲット配列と異なるミスマッチな DNA 認識部位を組み込むことで、DNA-TALE 間の会合定数を大きく変化させる“ミスマッチ法”を見出した。本手法は、TALE と DNA 間のミスマッチの数による会合定数の変化を利用したものであり、申請者の独自技術となる。会合定数を調整することで、ターゲット配列のみを認識し、異常細胞を選択的に治療する遺伝子修正が可能になる。

2. 研究方法

(プラスミド作製)

TGGTGGCGTAGGC または TGAAGGCGTAGGC を認識する TALE-DNA 配列を含む発現ベクターは、標準手順に従い、ゴールデンゲートプロトコルを使用して構築した。TALEN の生

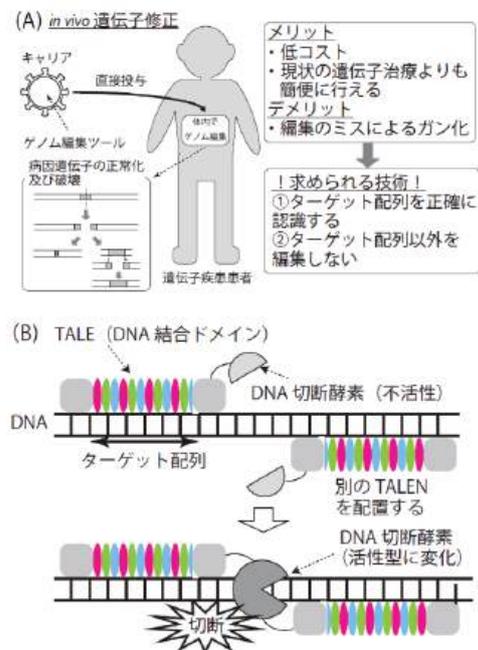


図 1 (A)*in vivo* 遺伝子修正
(B)TALEN を用いた DNA 切断反応
の概略図

成に使用したプラスミドキットは、Daniel Voytas と Adam Bogdanove から提供された (Addgene # 1000000024)²。TALE タンパク質をコードする DNA 配列は、pCold I プラスミドにインサートし(pCold-TALE)、BL21 を宿主として定法に従って TALE の発現を行った。また、pCold-TALE プラスミドに、蛍光タンパク質 Venus および Renilla luciferase (RLuc) の遺伝子を挿入し、発光タンパク質を融合した TALE を発現するプラスミドを作製した。

(BRET 測定)

TALE-RLuc および TALE-Venus を含むバッファーを、Slide-A-Lyzer 透析カセット(MWCO: 10 KDa) を使用して 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) および 200 mM NaCl に交換した。精製したプラスミド TALE-RLuc および TALE-Venus を 25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、200 mM NaCl に溶解し、25 °C で 60 分間インキュベートした。インキュベーション後、150 μM セレンテラジン-h を加え、535 nm 光学フィルターを備えたマイクロプレートリーダーを使用して Venus 蛍光を測定した。

(TALEN 作製および評価)

TALE と FokI の融合は、pTal ベクターを使用した従来のプロトコルに従って行った。TALEN-R は、TGATTCTGAATTAGCT をターゲットとして認識するように設計した。Slide-A-Lyzer 透析カセット (MWCO: 10 KDa) を使用して、TALEN を含むバッファーを 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、および 10 mM MgCl₂ に置き換えた。TALEN の *in vitro* 切断活性は、KRAS を含む DNA フラグメント (600 bp) の消化で評価した。DNA フラグメントは、PCR を使用した遺伝子増幅によって取得した。作製したプラスミド (KRASwt、KRASmut (GAT)、KRASmut (GAT)) を鋳型として、Primestar GXL DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社製) を用いて KRAS 遺伝子を含む DNA 断片を増幅した。フォワードプライマーの 5' 末端はフルオレセインで修飾した。DNA 断片 (DNA 断片 10 nM) を 30 nM TALEN-L および 30 nM TALEN-R 存在下、37 °C で 1 時間消化した。消化後、反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。アガロースゲル中の DNA 断片は、フォワードプライマーに結合したフルオレセインの蛍光を用いて検出した。切断されていない DNA の割合は、TALEN 処理済みサンプルのバンド強度と TALEN 未処理サンプルのバンド強度の比から計算した。バンド強度は ImageJ を使用して定量化した。

3. 研究成果

TALE と標的 DNA との相互作用を簡便に評価するため、生物発光共鳴エネルギー移転 (BRET) ベースの遺伝子検出システムを構築した。KRASwt 配列の一部を認識する 2 種類の TALE を調製した。DNA 配列の上流で結合する TALE の C 末端に、生物発光を産生するレニラ・ルシフェラーゼ (RLuc) を融合させ、この融合タンパク質をライトドナーと命名した。同様に、TALE (TALE1 と命名) と黄色蛍光タンパク質である Venus を融合したものを光受容体として構築した。TALE1 は、コドン 12 (GGT) を含む KRASwt 配列の下流 TGGGTGCGTAGGC を認識するように設計された。これらの融合タンパク質が標的配列に結合することで、光受容体

RLuc を介して生成された発光が光受容体の Venus を励起し、BRET シグナルが検出されることが期待される。また、コドン 12 変異体である GTT を含む DNA では、BRET 検出系に負の影響を及ぼすことが予想された。KRASwt の DNA、光ドナー、光アクセプターを共存させると、強い BRET シグナルが観測された。また、KRASmut の DNA を用いたシグナルは、予想通り KRASwt の DNA を用いたシグナルよりも低かった。しかし、シグナル低下の程度は限定的であり、TALE1 の多くがミスマッチ配列と結合していることが示唆された。発光強度の違いは、DNA の複合体形成比率の違いによるものと考えられ、BRET システムのシグナル強度は TALE と DNA の会合定数に大きく影響されることが示唆された。また、TALE のリピート 2 にミスマッチが 1 つ存在しても、標的配列との会合に大きな支障はないことが示された。

リピート 3 のミスマッチが DNA-TALE 複合体形成に及ぼす影響を調べた。蛍光偏光アッセイを dsDNA1 を用いて行った。dsDNA1 は、TALE1 のリピート 3 において単一のミスマッチを有する。TALE1 は dsDNA1 と良好に相互作用した。dsDNA1 と TALE1 の推定会合定数は $3.50 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ で、KRASmut(GTT) と TALE1 のそれとほぼ同じであった。リピート 2 と 3 の 2 箇所ダブルミスマッチを持つ dsDNA2 でも同様の実験を行ったところ、シングルミスマッチの結果とは異なり、複合体形成量が著しく減少することが示された。TALE1 と dsDNA2 の推定会合定数は $0.77 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以下であり、ダブルミスマッチが TALE-DNA 複合体形成に悪影響を及ぼしていることが示唆された。

二重ミスマッチによる会合定数の減少が他の配列でも同様に起こることを確認するため、KRASwt および KRASmut (GTT) 配列との二重ミスマッチを持つ TALE2 を設計した。TALE2 は、KRAS 遺伝子の変異体である KRASmut (GAT) とリピート 3 でシングルミスマッチを有する。相互作用測定の結果、TALE2 と KRASmut (GAT) の複合体形成が観察された。この複合体の会合定数は $3.34 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であり、上記の単一ミスマッチの結果とよく一致した。これらの結果から、単一のミスマッチは TALE と DNA の相互作用に有意な影響を与えないことが示された。一方、ミスマッチが 2 箇所存在する KRASwt および KRASmut (GTT) では、TALE2 と KRASwt の会合定数はそれぞれ $0.49 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ および $0.75 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ を下回り、予想通り会合性能が低下した。これらの結果は、繰り返し 2 および 3 における連続的なミスマッチが TALE-DNA 複合体形成を困難にしていることを示している。

ダブルミスマッチを用いた標的配列の正確な認識は、類似配列の非選択的ゲノム編集を効果的に抑制することが期待される。二重ミスマッチに基づいて設計された TALE を用いて、TALEN による *in vitro* DNA 配列切断を行った。TALEN-L と TALEN-R は図 2(A) に示すように設計し、19 塩基からなるスペーサーを TALEN 間に配置した。TALE TALEN-L は TALE1 または TALE2 を用いて構築され、KRAS コドン 12 の配列を認識する。TALEN-L、TALEN-R、および KRAS 遺伝子を含む DNA を混合し、一定時間後に電気泳動を行って DNA 切断を評価した。TALE1 をベースとした TALEN-L を用いた場合、全ての種類の DNA で明らかなバンドの消失が観察された (図 2(B))。一方、TALE2 ベースの TALEN-L を用いた場合は、KRASmut(GAT) 配列を含む DNA バンドのみが消失した (図 2(C))。TALEN によって切断され

なかった DNA の割合を図 2(D)に示す。TALE1 ベースの TALEN-L を用いた場合、すべての KRAS 遺伝子が約 80%切断された。一方、TALE2 ベースの TALEN-L を用いた場合、ダブルミスマッチである KRASmut(GAT)だけが主に切断され、シングルミスマッチである KRASwt(GGT)と KRASmut(GTT)はほとんど切断されなかった。したがって、ダブルミスマッチに基づく TALE 設計は、ゲノム編集における厳密な DNA 認識特異性の向上につながると期待される。

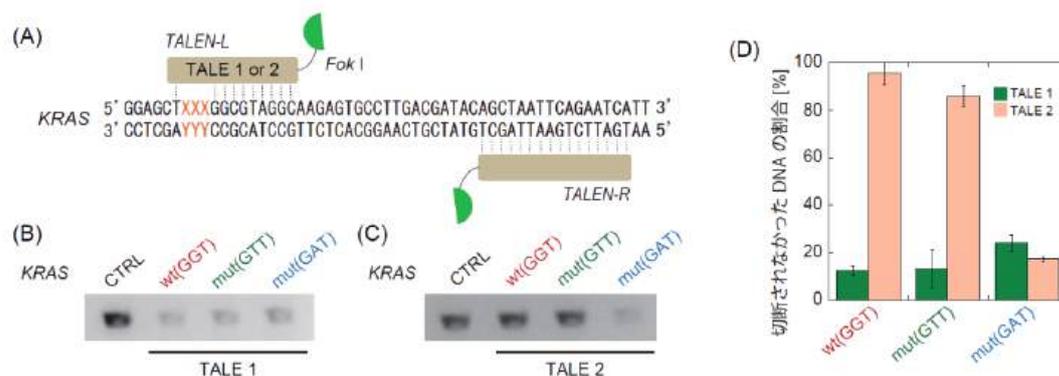


図 2 (A) TALEN を用いた DNA 切断の模式図。KRAS 配列の XXX は GGT、GTT、GAT を示す。(B) TALE1 ベースの TALEN-L および TALEN-R を用いた KRAS 配列を含むオリゴ DNA の切断。アガロースゲル電気泳動後のオリゴ DNA は、フォワードプライマーに結合したフルオレセインの蛍光を用いて検出した。(C) TALE2 ベースの TALEN-L および TALEN-R を用いた KRAS 配列を含むオリゴ DNA の切断。アガロースゲル電気泳動後のオリゴ DNA を、フォワードプライマーに結合したフルオレセインの蛍光を用いて検出した。(D)TALEN によって切断されなかった DNA の割合。

4. 今後の展望

本研究では、ミスマッチが TALE と DNA 配列との相互作用に及ぼす影響について検討した。TALE のリピート 2 または 3 における単一のミスマッチは DNA との複合体形成を阻害しなかったが、リピート 2 および 3 における連続的なミスマッチは標的 DNA との会合特性を著しく低下させた。シングルミスマッチと連続ミスマッチの会合定数の違いを利用して、標的配列の 1 塩基の違いを識別する TALE を構築した。ダブルミスマッチを基に設計した TALE を用いた BRET システムにより、1 塩基の違いを識別する高精度な遺伝子検出が可能となった。また、同じ設計原理で作製した TALEN は、一塩基ミスマッチの DNA を切断し、連続ミスマッチの類似配列は処理しなかった。二重ミスマッチに基づく TALEN 構築は、遺伝子治療や作物育種など、高精度な遺伝子操作が求められる分野に大きく貢献すると期待される。また、TALE は複数のミスマッチを含む非標的配列に対しても弱い結合を示すことから、ゲノム中の標的配列に対する TALE の分子認識により親和性が低下している可能性が示唆される。本技術をゲノム編集に応用するためには、過剰な非標的配列の存在下で、TALE に対するシングルミスマッチとダ

ブルミスマッチの会合定数に十分な差を得ることが必要である。今後は、細胞核内の環境を模倣した反応系において、高精度なゲノム編集を可能とする TALEN の構築を検討していく。

5. 参考文献

1. J. N. F. Scott, A. P. Kupinski, J. Boyes, *FEBS J.* **2014**, *281*, 4583–4597.
2. T. Cermak, E. L. Doyle, M. Christian, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. A. Baller, N. V. Somia, A. J. Bogdanove, D. F. Voytas, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, e82.

研究題目	祭りの継承に関わる人びとと組織のあり方 に関する人類学的研究 ：北陸地域の獅子舞を対象として
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部芸術文化学系・講師・田邊 元
分野	文化人類学
キーワード	獅子舞、祭り、担い手不足

1. 研究の背景と目的

1.1 研究背景

日本には数多くの祭りが存在するが、それらの祭りがその継承に苦心していることはよく知られるところであろう。祭りに限らず、大都市部を除いた地域社会における人口減少に全く歯止めが利かない状況は、加速するばかりである。こういった問題は一般に「担い手不足」と呼ばれている。従来、地縁や血縁といった人びとのつながりを基盤として継承されてきた祭りが、地域社会の人口減少に対して脆いことは言うまでもない。そうした状況は、高度経済成長期あたりを境に現在まで半世紀以上に渡り続いている現象である。祭り組織がそれぞれの事情に合わせて、その継承のために新規加入者を募ってきたことは、民俗学や社会学、文化人類学といった領域において長く議論されてきた話題である。特に人びとの移動が顕著であり、そのつながりが広がる現代社会では、職場や趣味、子どもの通う学校を通じた保護者、飲み友といった、さまざまな縁をきっかけとして、祭りへの参加が為されている（牧野，2021）。多様な人びとの参加背景には、祭りの継承と関わり整備されてきた、無形文化に対する保護制度のあり方も関わる。例えば、今日では当たり前になりつつある「保存会」と呼ばれる組織は文化財保護制度との関係のなかで生まれたものであるが（俵木，2018）、地縁集団から保存会組織へと移行することで、従来メンバーシップを持たない人びとの加入も可能になった側面がある。他方で、近年の文化財保護法やユネスコによる文化遺産制度は、登録された後に「活用」を促進させることが推奨されている。そうした「活用」は経済的な効果を発揮する面に注目が集まるが、同時に国を中心に地方行政が取り組む「関係人口」の増加策とも相まって、祭りに関わる人びとを拡大させている。

ところで、これまで述べてきたような祭りの継承にまつわる人びとの拡大は、当然のことながら円満に進むとは限らない。新規加入者と従来メンバーによる対立、そこから生まれる軋轢、葛藤は、その都度、祭りの場に集まった人びとの間で、より良いあり方を巡り工夫が為されてきたために生じるものだ。いわゆる「外」からやってきた「よそ者」は、地縁関係が濃い祭り組織において時として疎外感を感じることもあり、あまりにそれが強ければ辞めていってしまうこともある。同時に、「内」には無い力を持つといわれる「よそ者」は、時として従来通りのやり方

を変えていくような力を発揮することもあるだろうが（敷田，2009）、そのことが人びとに受け入れられることもあれば、反発を受けることもあるだろう。「関係人口」の増加を目指した「よそ者」の参入が推奨されることは人口減少の現代社会において有効手段であろうが、しかし現実にはそんなに簡単ではない。「外」からみれば、祭りを継承していくことは美徳に映るかもしれないが、実践する人びとにとって、「よそ者」を加入させて継承すること自体が意味を為さないこともある（木内 2010；上田 2016）。また文化財諸制度により「資源」とみなされることが、時としてしがらみとなるような場合もある。補助金などが付けられることにより、「公開」と「活用」が義務的に感じられる「保存のイデオロギー」にさらされ、外部資本の参入なども加わり活動が拡大していくことにより、実践する人びとが「これは違う」と感じるようなことも生じうる（足立 2010）。近年世界的に議論される「持続可能性」に対して、文化的側面も考慮した「文化的持続可能性」が強調されるようになってきている（原 2023）。そうした「文化的持続可能性」は、まさに祭りという人びとの関係性によりそのあり方が大きく揺れ動く実践においては、どういった文脈のうえに現状が生まれたのかを丁寧に見ることで示されるものであろう。

以上のように、現代における祭りの継承において、当事者たちが疲弊している状況が存在している。それは、筆者らが住む北陸地域においても同様である。北陸地域は非常に多くの祭りが実践される地域であり、曳山や獅子舞が全国的に知られる。特に獅子舞について、富山県は香川県と並び全国一、その伝承数が多いといわれるものの（無形文化遺産部 2019）、しかし休止している団体も増えてきており、実践できている団体の数は年々減少している可能性が高い。加えて、そういった状況に追い打ちをかけるように 2019 年から新型コロナウイルス感染症（以下「コロナ」と略す）の流行による、全国的な祭りの”自粛”が起こった。コロナを理由とした休止は、祭りの実践者たちにそのあり方を様ざまに考えさせた。田邊が参加していた K 獅子舞は、表向きはコロナを理由とした休止であったが、その決定をする会議で話し合われたことは、実働部隊である 20～30 代の人数が足りないための疲弊をいかに解決するかであった。獅子舞を実践すること自体ではなく、その他の地域社会の仕事も兼務する青年団自体が彼らにとって負担となっていたため、コロナ期間中に青年団は解散した。幸い、その後保存会と名称を改めて”復活”したものの、「担い手不足」と呼ばれるような現状は変わらず、そういった中で祭りを実践することの意義を彼らは考えている。

これまで背景として述べてきた現代社会における祭りの現状は、担い手が足りない中で何とかやっている、といった想像を掻き立てるものであり、どちらかといえばネガティブな現状を想起させる。しかし祭りが行われる場において、我々はそういったネガティブな側面よりも、観客たちも巻き込み熱狂する姿を目にすることも多いだろう。そうした姿からは、「担い手不足」が引き起こすネガティブな側面がありつつも、それでも祭りがしたいという切実な想いも感じられる。東日本大震災以降、盛んに論じられたレジリエンス論において、地域社会の復興に際しての祭りの重要性が指摘されてきた（例えば、高倉・滝本（2014）や橋本（2015）、高倉・山口（2018）、日高（2021）など）。実際に、2024 年 1 月 1 日に発生した能登半島地震の被害は未だに全く収まっていない状況にあるが、そういった中で祭りの実施を何とか実現させたいという動きは、富

山県下で被害があった地域においても様ざまに生まれている。こういった、決して万全の状態ではなくとも、どうしても祭りがしたいという人びとの想いからは、先に挙げてきた「担い手不足」というネガティブな状況に落胆している姿は見えてこない。そうした生き活きとした姿もまた、学術研究の遡上に乗せて議論していく必要があるだろう。よって、本研究では担い手不足という状況の前提として、必ずしもネガティブに捉えるということをしなない。そうした前提が、時として祭りの現状への理解を妨げることもあり得ると考えられるからである。

以上を踏まえ、現代において祭りを継承していくこと自体にどういった意義が見出されるのか。場合によってはその継承自体が現代において無意味に思われる祭りの継承に対して、「何を大切に継承してきたのか」を明らかにしていくことは、祭り与人びと、地域社会のあり方を改めて考える契機となる。

1.2 研究目的

本研究では北陸地域に数多く伝承される獅子舞を対象に、どういった人びとが今日の継承を支え、またどういった仕組みのなかで継承しているのかを明らかにしていくことを目指した。様々な人びとが関わる今日の獅子舞において、その実践の場には彼らの持つ多様な属性が持ち込まれる。その中で何が許され、何が許されなかったのかに注目することで、何を大切に継承が行われてきたのかに注目した。それらを通じて、今後も加速していく人口減少や高齢化といった解消され難い問題下において、地域社会で継承される祭りやその組織のあり方への展望を開くことを目指した。

2. 研究方法

本研究では、筆者ら 3 名の、文化人類学をバックグラウンドの一つに持つ研究者らがそれぞれにフィールドワークを行い、その結果を持ち寄り議論することを通じて目的の達成を目指した。それぞれの対象は以下のとおりである。

2.1 南砺市（田邊担当）

南砺市では行政や地元企業、市民、学識者を中心に「南砺獅子舞共演会実行委員会」が結成され、2023年10月に「第式幕 南砺 獅子舞『秋の陣 五箇山』」（以下「第2回共演会」と略す）を開催した。この取組は、2019年8月「南砺獅子舞 令和元年夏の陣」（以下「第1回共演会」と略す）に続く南砺市の獅子舞イベントであるが、その意図するところは開催地域の獅子舞団体間の交流を生み出すことにある。実際に、第1回共演会時には、開催地である井波地域に「井波地域獅子舞連絡協議会」が発足し、現在まで継続的に井波地域の獅子舞についての意見共有が為されている。

田邊は、2022年に組織された第2回共演会の実行委員会の委員として参与し、獅子舞団体それぞれの相互の関係性などの聞き取りを関係者らに行った。

2.2 射水市新湊地域（田邊・野澤担当）

射水市の新湊旧市街地は、現在でも多くの獅子舞が行われる地域であり、曳山祭りの存在もあり、祭りが盛んな地域として知られる。新湊地区は大きく3つの地区に分けることが可能であり、新湊大橋より東側にあたる海老江や堀岡などの地域、新湊大橋西側にあたる地区で放生津小学校の校区（以下「放生津小校区」とする）と、新湊小学校の校区（以下「新湊小校区」とする）の3つである。

放生津小校区では、現時点で獅子舞祭を実施しているすべての町内が加盟する「放生津地区獅子舞連絡協議会」が結成された。このネットワークを活かして、2023年と2024年には「放生津地区獅子舞演舞会」が開催された。連絡協議会は、各種イベントへの出演依頼の窓口でもある。田邊と野澤は協議会設立の経緯と今後の見通しなどについて関係者に聞き取りを行った。

新湊小校区では放生津地区のようなネットワークはまだ存在していないが、旧町それぞれが独自のネットワークを持ち、協力体制もみられるという。新興住宅地である桜町には、もともと獅子舞が存在していなかったが、地域外である高岡市の吉久と新富町との協力関係を持ち、獅子舞を実施している。そこには、高岡市や射水市を中心に渡り歩く祭り好きの人や、富大の学生なども参加している。田邊は桜町に外部から参加する人びとを中心に聞き取りを行った。

2.3 高岡市伏木地域（田邊・西島・野澤担当）

高岡市伏木地域もまた、曳山祭りと多くの獅子舞が実践される地域として知られる。祭りが盛んな印象も強い伏木地域であるが、「担い手不足」問題は深刻であると聞く。曳山の参加者には伏木外からも多くあることは知られるが、では獅子舞の場合はどういった動きがあるのか。田邊は加古川地区での聞き取りを、西島と野澤はいくつかの地区における獅子舞の観察を行った。

2.4 高岡市長慶寺（西島担当）

高岡市長慶寺では、約200年前に伝わったとされる獅子舞を村の15～25歳の男性で組織される「青年団」が春季祭礼の一部として演じてきた。県外の大学生が帰省できるよう祭礼の日を平日の固定日から週末に変更したり（1980年）、村の全戸（約200戸）で行っていた門付けを班長宅（20軒）に縮小したり（2005年）、それまで女人禁制だった「青年団」に笛として女子を加えたり（2010年）といった工夫をしながら続けていたが、担い手不足のため2017年に休止した。しかし2023年に門付けは行われなかったものの復活を遂げ、2024年には休止前と同様に門付けも行われた。西島は復活した獅子舞の参与観察と、復活に至る経緯についての聞き取りを高岡市長慶寺の住民に行った。

2.5 射水市三ヶ錦町（西島・野澤担当）

射水市の三ヶ錦町獅子舞保存会は、2021年度～2023年度まで射水市・三ヶ地域振興会・三ヶ錦町獅子舞保存会の三者による「三ヶ獅子舞講座」を開講した。この講座は、新型コロナウイルス

ス感染症の影響を受け、獅子舞が維持できなくなることを危惧した三ヶ錦町獅子舞保存会が、錦町や三ヶの住民に限らずひろく担い手を育成するために開始した取り組みである。西島と野澤は、講座の2年目と3年目（2022年度～2023年度）に受講生（笛）として、月に1度開講される講座を受講した。三ヶの祭礼をはじめ、下条川桜まつりや太閤山まつりなどにも三ヶ錦町獅子舞保存会のメンバーと共に出演し、参与観察を行った。また西島は、講座の中心メンバーらに聞き取り調査を行った。

2.6 高岡市笹八口・八口（野澤担当）

高岡市の笹八口と八口（いずれも国吉小学校通学区域）では、互いの獅子舞祭礼において必要な人手を提供し合うという「協力関係」が築かれている。野澤は、両者の関係性が構築される過程やその課題について、それぞれの集落における青年団長や団長経験者らを中心に聞き取り調査を行った。

3. 研究成果

冒頭で述べたとおり、現在の祭りの多くでは担い手不足問題がその継承に関わることから大きな問題として存在している。「2. 研究方法」において示した各地域いずれにおいても、その問題は存在していた。冒頭で富山県は獅子舞の数が日本一といわれることを述べたが、数が多いということは地区毎に獅子舞が存在しているということであり、多くの場合、その運営は地縁を中心としたものである。現代においても、獅子舞は地域社会と人びとを結びつける。例えば、祭りの当日の夜は、「嫁花」と呼ばれる地域社会への結婚披露宴や、新築や出産の祝いとして獅子舞に来てもらい特別な演目を舞ってもらうが、こうした習慣はほとんどの獅子舞でみられた。よって、獅子舞に参加する人びとの参加理由の多くは、やはり地縁によるものであろう。しかし、聞き取りにより、地縁以外の参加も様ざまにあることが分かった。

筆者らは、それぞれに行った聞き取りの内容を持ち寄り、それらを3人で検討するなかで、以下に挙げる3点の視点を見出した。3点の視点とはすなわち、「協力体制」、「女性の参加」、「参加ハードルの多様性」である。以下、3点からそれぞれ成果を述べる。

3.1 協力体制

各獅子舞団体において聞き取りを行うなかで、多くの団体において担い手不足に対して、何かしらの対策を行っていたことがわかった。その最も多かったあり方が、他の獅子舞団体との協力体制構築である。協力体制にはいくつかのあり方がみられた。以下、具体的な事例を示す。

射水市新湊地域では、獅子舞団体のほとんどにおいて、別団体から参加する人がいた。新湊地域は従来5月15日が祭礼日であるが、一部の団体は5月第二土曜や日曜開催に10年ほど前から日付を変更した。これにより、15日に祭りを実施しない団体は他の団体への参加が可能となり、友人関係などを基本に参加している。例えば、15日に実施している東町本町獅子方若連中

には法土寺町獅子舞保存会のメンバーが例年参加しているが、そういった関係が生まれたのは法土寺町へ東町本町から嫁にいった人物がおり、そのことから獅子舞の交流が生まれたという。また友人関係から参加する事例もあり、小学校や中学校時代の友人関係からの参加は特に多く聞かれた。一方、新興住宅街である桜町の場合、獅子舞を作る時点から高岡市吉久や富岡町の獅子舞団体から協力を得ており、その縁から毎年お互いの祭りにそれぞれのメンバーが参加しているという。また桜町は、2023年度から当時の団長が個人的な伝手から富大の学生を2名引き入れており、加えて2024年からは新湊地域で働く富大卒業生も参加している。このように、新湊地域の場合、地縁外の参加に対してのハードルが全体的に低いようである。

こういった取組は、高岡市伏木地域においても聞かれた。例えば、加古川地区で天狗を務める人物は、大学を卒業し地元を離れるまでは、中学の友達がいる伏木地域内の獅子舞へ参加していた。参加理由は仲間と一緒に獅子舞をするのが楽しいという理由に加え、アルバイト替わりになるからだともいう。自身が通う高校においてアルバイトが禁止されていたため、他所の祭りへ参加した際の御礼が彼にとって大事な収入源だったという。彼の話によれば、こうした協力への御礼はよく聞かれる話であるといい、確かに新湊地域においても同様の話を聞くことがあった。

一方で、南砺市においては協力体制について、批判的な意見が聞かれた。現在休止状態にある山間部にある地域では、住民の数がそもそも少なく、子どもも非常に少ない。そういった中で、大学進学と共に獅子舞への参加が厳しくなった地元出身者の存在が、獅子舞の継続を困難にさせた。だからといって、他所の者の参加を募り実施することは絶対ないと断言する。土地に住む者によって獅子舞がやれないのであれば、そこにやる意味が見出せず、それならばやる必要がないという。他方で、井波地区の山見獅子舞青年団では、地域に住むほぼ全員の子どもの参加しており、他所からの参加は今のところはなく、必要もないと考えているようだ。子どもたちのほとんどが参加するのはなぜなのかという点、獅子舞の練習が楽しい場であることを実感してもらうための工夫を重ねているからだという。例えば、メンバー全員で釣りに行き、その後BBQをするなど年代を越えた交流機会を設けているという。もちろん、こういった取組が必ずしもポジティブに受け入れられるかは分からないが、担い手側もそういった事情を考慮しながら維持のための工夫を凝らしている様子が伺える。

三ヶ錦町獅子舞保存会の講座の取組み(2.5)は、担い手不足の解消というねらいを達成している。講座では、「花笠」(獅子をあやす子どもの役)を習う小学生をはじめとし、高校生や大学生、社会人まで幅広い年齢層が受講している。また、三ヶ錦町のある射水市の住民だけではなく、富山市や中新川郡といった市外から通う受講生らもいる。こうした受講生らが講座を経て祭礼に参加するようになり、受講生の参加がなければ、獅子舞の実施が危ぶまれた年もあった。獅子舞では「主役」とみなされる天狗は地域によって属性が限定されていた場合もあったが(例:長男のみ)、三ヶ錦町獅子舞保存会は天狗も受講生に教えており、2023年度・2024年度の祭礼では受講生が天狗を務めている。三ヶ錦町獅子舞保存会の講座は、年齢や性別、出身といった属性の条件に関係なく、すべての役割(天狗、獅子、太鼓・笛)がひらかれていることが特徴であると言える。

一方で、高岡市長慶寺（2.4）のように地縁を基盤とする地域も多い。長慶寺の6年間の休止を経ての復活では、休止前の中心メンバーらが復活に向けてうごき、実際の復活に際しても同メンバーが先頭にたって人集めや準備・練習に尽力していた。2024年度には、中心メンバーが声をかけて集ったメンバーが、県外の長慶寺出身者にも声をかけ、愛知や大阪など県外からも祭礼への参加があった。長慶寺という土地を中心として、コアメンバー、彼らと親しいメンバー、彼らが声をかけた（県外者も含めた）メンバーといったように遠心状にメンバーが構成されていると言える。

3.2 女性の参加

冒頭で述べたとおり、地縁や血縁に頼れなくなった日本の祭りの多くは、それまでの参加者以外の人びとを加入させてきた。その中でも、多くの祭りにおいて議論になるのは、「女」の参加である。現在では多くの祭りにおいて女性が参加していることは知られるところであるが、多くの祭りがかつては「長男」に限定して行われていたように、慣習的に後継ぎと見做される人物＝「男」がやるものと見なされてきた。富山県の獅子舞においても、やはり「男の世界」というイメージは現在でも色濃く残り、またそういった声は現在も聞かれる。明確に女性の参入を禁止している団体もあり、南砺市のある団体では「女は…。仲いい仲間（＝男友達）で獅子を舞わして酒飲みたい」といった声が聞かれた。また特定の地域に限らず、特に40～50代の女性たちからも「男がやりたいことだから」という声が聞かれ、獅子舞が「男の世界」であるという意識は存在している。

とはいえ、現在では富山県下の獅子舞の多くで、女性が参入している。富山県では2000年代に獅子舞に女子・女性が参入し始め、今では花笠や笛に女子のいない団体を探すのが難しいほどになっている。もっとも一般的なのは囃子方の笛で、地区によっては笛担当者の全員が女性ということも珍しくない。元来、女人禁制だった獅子舞祭で女性が笛を吹き始めるようになった時期はさまざまだが、おそらく30年前から10年前にかけて増えていったようである。ほかにも、射水型の獅子舞でよくみられる「キリコ」や「花笠」とよばれる子どもの役でも、おそらく十数年ほど前から女子も参加できるようになっていった。ただし、獅子方において女性が参加する例は、現在でもほとんど見られない。

射水市新湊地域では太鼓を打つ女性も増えており、高岡市伏木地域では女性が天狗を務めることも一般化している。こうした女子・女性の参加がさらに浸透している様子が、2024年4月の氷見市で確認された。氷見市園では2024年度より地区全体の承認を得て、獅子方に女性が入り始めた。担い手不足を解消するため保存会のメンバーが獅子方にも女性に入ってもらうことを提案し、自治会において承認されたのだという。実際に女性にも獅子方への参加が呼びかけられたところ、希望者が1名おり、2024年度の祭礼から獅子方として獅子舞に参加するようになった。また、氷見市深原では、ある機会（2023年）に「深原では女性の参加は笛まで」と聞くことがあった。しかし、2024年度4月の深原の祭礼では、女性が天狗を担うシーンがあった。その女性の兄弟の嫁花という特別な場ではあったが、何らかの条件（兄弟の嫁花など）があれば

性別の限定は打破されるということでもある。とはいえ、そうした条件があったとしても女性が天狗を務めることは一昔前では考えられなかったことであり、いっそうの女性参加の加速が感じられる事例だと言える。

こうした変化は、「伝統」の側から見れば古いしきたりの変化だが、祭りを存続させるために担い手たちが編み出した工夫だとみることでもある。

3.3 参加ハードルの多様性

参与観察をしていて気づくのは、獅子舞においてはその役割によって参加するための「ハードル」が異なる、換言すると参加のヒエラルキーが存在するという点である。その典型が（成人の）天狗役や獅子頭の担当で、協力体制や女性の参加が一般化してきた現在でも、これらは「地元出身・在住の男性」しか担当できないという半ば暗黙の了解がある場合が、意外と多く存在していた。かつてはこれらの役割が長男にしか認められていなかった地区も多い。ほかにも、「カヤ」と呼ばれる胴幕に入る獅子方は、（とりわけ激しい動きをする場合には）体力のある青年から壮年にかけての男性でなければ難しい。反対に、囃子方、とりわけ笛などは女性や子供、地域に移り住んできた新住民などにとっても参加のハードルが低い。

興味深いのは、参加のハードルには「しきたり」や「体力」だけではなく、当人のアイデンティティも関わるといえる点である。たとえば、放生津の二の丸地区では新興住宅地に移り住んできた新住民の子どもは「キリコ」の役にしばしば加わるが、父親は（たとえ年齢的に程よい場合でも）獅子方に加わるということは滅多にないという。青少年期から続く人間関係のなかで獅子舞に馴染んできたかどうかという経験が、この場合には影響するのだろう。新湊地域の桜町に笛で外部から参加した女性は、天狗や囃子方の人たちとの交流は盛んであるが、獅子方だけでは飲み会においてもなかなか交流が生まれないと話す。「地元の友達って感じで。入っていけない。」と彼女は話していたが、まさに経験を共有していないことが要因にありそうだ。実は、こうした仲間意識の場合には、「男」に限らずその関係性を理解する「女」も参加可能である場合がある。従来の地縁ではないが、いわゆる「ジモト」が一緒であるという意味での「地縁」は、獅子方に特に強く現れている可能性が考えられる。そうした「地縁」が、過酷な社会背景のなかでは時として生きていく際にネガティブに作用することもあるというが（打越, 2019）、獅子を舞わすことに対してはポジティブに作用しているようにも考えられる。

ただ、参加のヒエラルキーがあるということは、決して悪いことばかりではない。新たなタイプの参加者が祭りの維持に必要なようになってきたという場合に、子どもや女性、新住民という「コアな属性」をもたない者も獅子舞に貢献できることを意味するからである。

4. 今後の展望

以上のように、本研究では富山県下の獅子舞の抱える人的継承の問題について、3つの視点を

見いだした。協力体制や女性の参加といった現象、そしてそこから見いだされた参加ハードルの多様性からは、冒頭で述べたように、それぞれが持つ文脈がどれだけ大切なのかが、改めて明らかになっただろう。こういったあり方は、近年みられるような「開く」ことに偏重した地域社会へのまなざしに対して、いったんの留保を促す。すなわち、必ずしも「開く」ことが正解ではなく、また「開く」と「閉じている」ことが二項対立的に捉えられるわけでも無いことを示唆する。その都度その都度、祭りに参加できるメンバーも流動的な状況であったとしても、そのメンバーによって実践される一回限りの獅子舞を肯定的に捉え、それを良しとし、「うちの獅子が一番」と誇りに思うあり方は、単純に担い手を増加させるだけでは難しいだろう。協力体制や女性の参加については、今後より拡大していくことが予想される。その際に参加ハードルがどうあるのかは、その獅子舞が何を大切にしているかを知るための重要な要素になり得ると考えられる。引続き、本研究を通じて得られた3つの視点から検討を続けたい。

加えて、本研究では取り組むことが出来なかったものとして、直接的に獅子舞の運営に関わらないまでも、SNS などを通じて獅子舞情報を積極的に発信し、その活動を支援する人びとの存在がある。何より、筆者らは彼らの発信する情報を頼りに、獅子舞がどこで何時から行われているのかを知ることも多かった。そういった人びとは、実践者たちにも当然知られている。例えば、北陸地域の祭りに特化した YouTuber などそこには含まれるが、彼らの存在は祭りの存在を「外」に対して認知させることにつながる一方で、実践者たちに対してはどう作用するのか。新湊地域の桜町ではある場所での演舞の時に、ある YouTuber が撮影していたために一段と気合が入ったという話も聞いた。氷見市でも、YouTuber の来訪を歓迎する姿がたびたびみられた。彼らの存在は、獅子舞の継承をめぐる現状とどう関わるのか。今後検討する必要がある。

5. 参考文献

1. 足立重和 2010 郡上八幡 伝統を生きる—地域社会の語りとリアリティ. 新曜社.
2. 橋本裕之 2015 震災と芸能: 地域再生の原動力. 追手門学院大学出版会.
3. 原知章 編 2023 文化的持続可能性とは何か: 文化のゆるやかな共鳴を捉えるために. ナカニシヤ出版.
4. 日高真吾 編 2021 継承される地域文化 災害復興から社会創発へ. 臨川書店.
5. 俵木悟 2018 文化財/文化遺産としての民俗芸能: 無形文化遺産時代の研究と保護. 勉誠出版.
6. 木内明 2010 民俗行事の消滅と共同体の変容--北海道夕張郡栗山町の盤持大会をめぐる地域社会の変容. スポーツ人類学研究, 12; 75-94.
7. 牧野修也 編 2021 変貌する祭礼と担いのしくみ. 学文社.
8. 無形文化遺産部 編 2019 シシマイ×シシマイ: 祭ネットワーク報告二〇一八: 富山 VS 香川 日本一の獅子舞王国. Vol.1. 国立文化財機構東京文化財研究所.
9. 敷田麻実 2009 よそ者と地域づくりにおけるその役割にかんする研究. 国際広報メディ

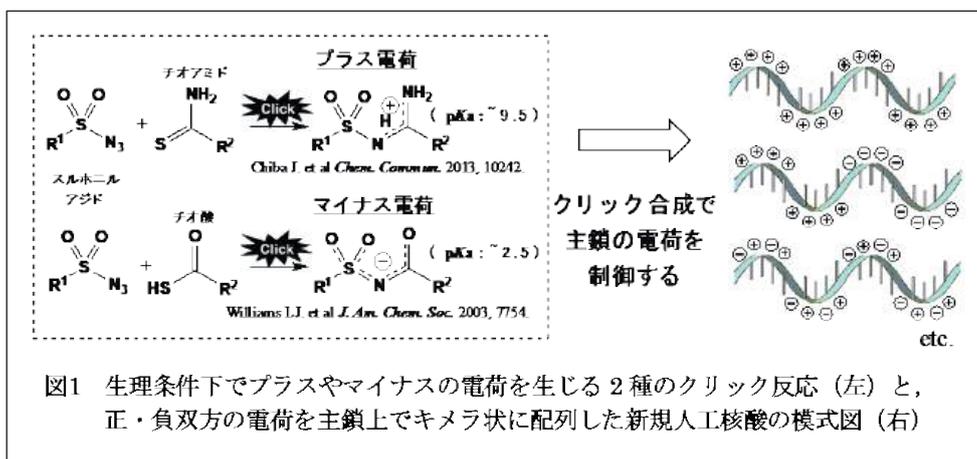
- ア・観光学ジャーナル, 9; 79-100.
10. 高倉浩樹, 滝澤克彦 編 2014 無形民俗文化財が被災するということ—東日本大震災と宮城県沿岸部地域社会の民俗誌. 新泉社.
 11. 高倉浩樹, 山口睦 編 2018 震災後の地域文化と被災者の民俗誌—フィールド災害人文学の構築. 新泉社.
 12. 植田今日子 2016 存続の岐路に立つむら ダム・災害・限界集落の先に. 昭和堂, 201-223.
 13. 打越正行 2019 ヤンキーと地元 解体屋、風俗経営者、ヤミ業者になった沖縄の若者たち. 筑摩書房.

研究題目	クリックケミストリーを利用した 新規人工核酸の開発
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部薬学・和漢系・准教授・千葉 順哉
分野	ケミカルバイオロジー
キーワード	クリックケミストリー、人工 DNA、核酸医薬品

1. 研究の背景と目的

2022 年のノーベル化学賞の対象となったクリックケミストリーは、核酸やタンパク質などの生体分子を効率的に化学修飾できる手法として注目を集めており、更なる飛躍の時を迎えている。また近年、核酸医薬品の実用化が進んでおり、新たな人工核酸の開発研究が重要度を増している。

我々の研究グループでは以前から、人工 DNA の開発研究を展開してきた。¹⁻³⁾ また別途、生成する結合が生理的条件下でプラス電荷を帯びる新しいクリック反応を開発し、報告した (図 1 左上)。⁴⁻⁶⁾ 本研究ではこの反応に、マイナス電荷を生じる既存のクリック反応 (左下) を組み合わせて、電荷を任意に配置できる核酸主鎖のクリック合成法を確立し、新規人工核酸の創成を目指した。人工 DNA にクリックケミストリーを取り入れることで、核酸主鎖の電荷を制御可能な新たな人工核酸を開発し、核酸医薬品としての展開を目指した。



2. 研究方法

開発する人工核酸の具体的な構想を図 2 に示す。クリック反応によりプラス電荷を生じるユニットとして「チオアミド型モノマー」を、またマイナス電荷用には「チオ酸型モノマー」を設計した。最終的には新規人工核酸の固相合成を検討するが、本課題の研究期間では、主に次の 2 点に焦点を絞って研究を推進した。

- ① 人工核酸のビルディングブロックとなるモノマーユニットの設計および化学合成
- ② モノマーユニットを用いたクリック反応による人工核酸の主鎖形成評価

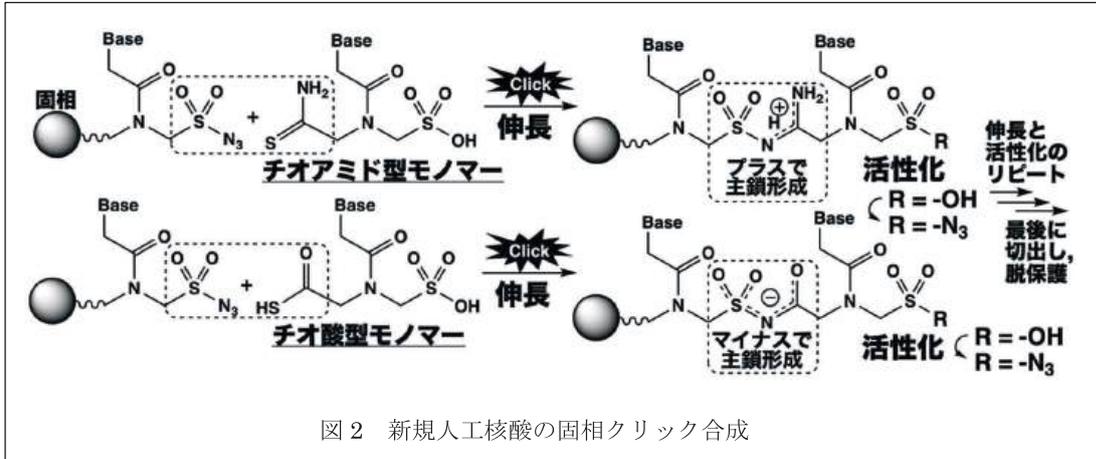


図2 新規人工核酸の固相クリック合成

3. 研究成果

- ① 人工核酸モノマーユニットの設計・化学合成

チオ酸型（マイナス電荷用）およびチオアミド型（プラス電荷用）それぞれのモノマーユニットの合成を進め、現在までに「チオ酸型モノマー」の化学合成を達成した（図3）。市販のチミン **3** とブロモ酢酸との反応により化合物 **4** へと誘導し、活性エステル化して核酸塩基ユニット **5** を得た。また、市販の化合物 **1** とブロモ酢酸誘導体との反応により **2** へと誘導し、その後チミン誘導体 **5** とのアミド化により、化合物 **6** を得た。末端のスルホン酸をスルホニルアジドへと変換することで、化合物 **8** へと誘導した。脱保護後にチオエステル化することで、「チオ酸型モノマー」の Fmoc 保護体

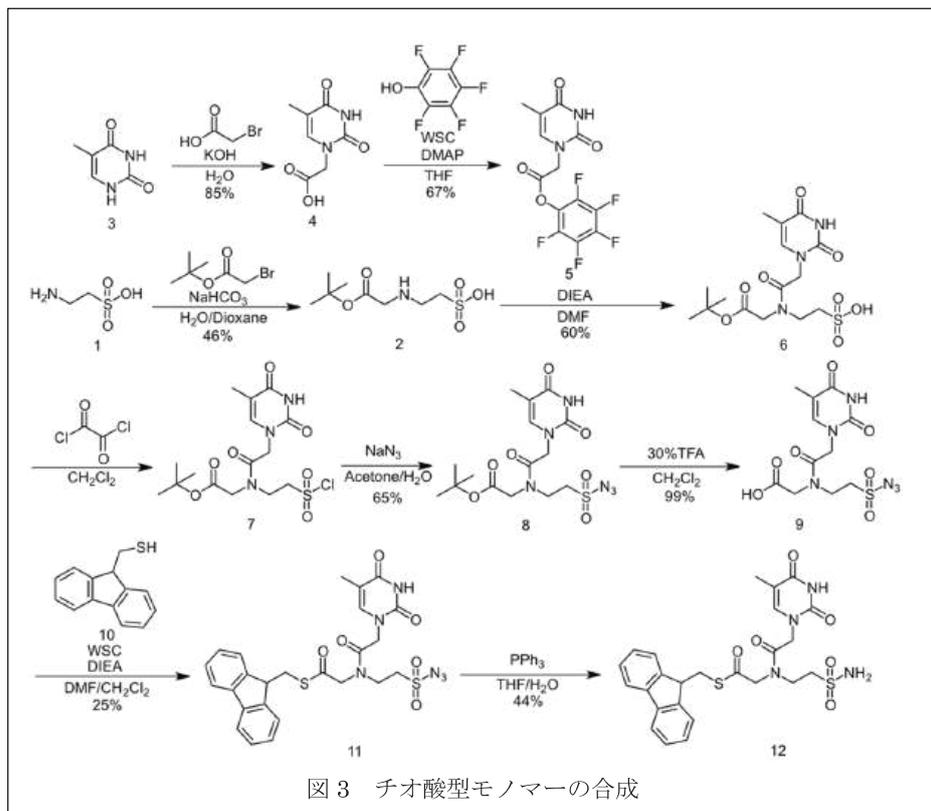


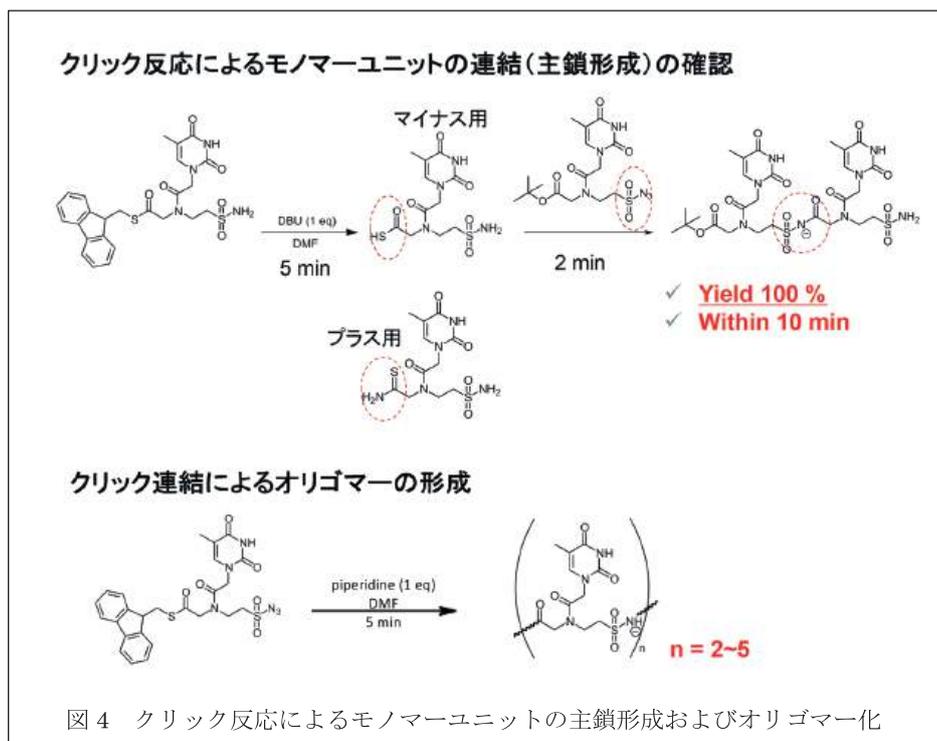
図3 チオ酸型モノマーの合成

Fmoc 保護体

11 の合成を達成した。さらに、クリック反応による主鎖形成の確認実験に必要な 12 も合成した。

② クリック反応による人工核酸の主鎖形成

化学合成したモノマーユニットを用いて、クリック反応による主鎖形成について評価した (図 4)。まず、化合物 12 の Fmoc 基を脱保護してチオ酸体に誘導し、続いてスルホニルアジド体 8 とのクリック反応を行ったところ、目的とする 2 量体を室温で 10 分以内にはほぼ定量的に得ることができた (図 4 上)。非常に効率良く 2 量体を得られたことから、人工核酸の主鎖形成におけるクリック反応の有用性を確認することができた。続いて、モノマーユニットが複数連結したオリゴマーの合成も試みた (図 4 下)。スルホニルアジド誘導体 11 の Fmoc 基を脱保護すると、反応溶液内で連続的なクリック反応が進行し、2~5 量体のオリゴマーが生成した。この実験においてもクリック反応の有用性が確認できた。



4. 今後の展望

今後、マイナス電荷用の「チオ酸型モノマー」については、チミン以外の核酸塩基の導入について検討を進める。また、プラス電荷用の「チオアミド型モノマー」の化学合成も順調に進んでいることから、モノマーユニットの化学合成を完了させる。そしてこれらのモノマーユニットを用いて固相合成へと展開し、より効率的なオリゴマー合成法を確立する。さらに得られた人工核酸オリゴマーの物性を評価し、核酸医薬品としての展開を推進する。

5. 参考文献

- 1 . 2-Aminopyridine as a Nucleobase Substitute for Adenine in DNA-like Architectures: Synthesis of Alkynyl C-Nucleotides and Their Hybridization Characteristics. F. Kurosaki, J. Chiba, Y. Oda, A. Hino, M. Inouye, *J. Org. Chem.*, *85*, 2565–2569 (2020).
- 2 . A Firmly Hybridizable, DNA-like Architecture with DAD/ADA- and ADD/DAA-type Nonnatural Base Pairs as an Extracellular Genetic Candidate. W. Shirato, J. Chiba, M. Inouye, *Chem. Commun.*, *51*, 7043–7046 (2015).
- 3 . Artificial DNA Made Exclusively of Non-Natural C-Nucleosides with Four Types of Nonnatural Bases. Y. Doi, J. Chiba, T. Morikawa, M. Inouye, *J. Am. Chem. Soc.*, *130*, 8762–8768 (2008).
- 4 . Coupling Reaction of Thioamides with Sulfonyl Azides: An Efficient Catalyst-Free Click-Type Ligation under Mild Conditions. M. Aswad, J. Chiba, T. Tomohiro, Y. Hatanaka, *Chem. Commun.*, *49*, 10242–10244 (2013).
- 5 . Syndecan-4 is a receptor for clathrin-mediated endocytosis of arginine-rich cell-penetrating peptides. Y. Kawaguchi, T. Takeuchi, K. Kuwata, J. Chiba, Y. Hatanaka, Y. Futaki, *Bioconjugate Chem.*, *14*, 398–402 (2016).
- 6 . Novel coupling reaction between sulfonyl azide and *N,N,N',N'*-tetramethylthiourea. M. Aswad, J. Chiba, Y. Hatanaka, T. Tomohiro, *Tetrahedron. Lett.*, *60*, 1611–1613 (2019).

研究題目	COVID-19 感染早期免疫応答の解明と 画像診断法の確立
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部医学系・准教授・長岡健太郎
分野	臨床感染症
キーワード	COVID-19、画像診断

1. 研究の背景と目的

本研究の学術的背景

2020年1月以降、COVID-19 パンデミックが起り、本邦でも2024年6月に至るまで複数回の流行期がみられた [1]。COVID-19 は、第1～3波までは都心部に多くみられたが、第4波以降、SARS-CoV-2 ウイルスの変異株の発生が起り、富山県を含めた地方都市でも徐々に感染者の増加をみた。第4波ではアルファ株、第5波ではデルタ株が COVID-19 の流行変異株となり、従来株と比較して増強した病原性が認められた。人工呼吸器装着を要する重症患者が第4波（2021年4月～6月）以降増加に転じ、特にデルタ株流行期には30-40代の健康成人でも SARS-CoV-2 肺炎から重症呼吸不全を来し、人工呼吸器装着を要する患者が多数発生した。当時の日本国内では COVID-19 患者全例を隔離対象とし、重症症を問わず感染者を指定病床へ入院させていた。都心部では病床が不足し、自宅や隔離施設（医療機関以外の療養所）で経過観察されていた COVID-19 患者が重症化し、急死に至る事例が全国的に散発した。

COVID-19 の重症化は、SARS-CoV-2 によるウイルス肺炎と呼吸不全の急速な進行が主体とされる。肺以外の感染臓器として、心筋、髄膜や脳などもあるが稀である。致死的な市中肺炎を起こす病原体である肺炎球菌やインフルエンザウイルスの重症例と比較しても、COVID-19 重症での呼吸不全進行は急速である点が特徴的であった [1]。

こうした急速な呼吸不全の進行につながる SARS-CoV-2 肺炎における重要な病態生理として、「血管への感染・炎症波及が顕著である」という点があげられる。パンデミック初期の COVID-19 剖検例では、肺内の微小血管に SARS-CoV-2 ウイルス、炎症細胞の浸潤がみられ、また微小血管塞栓や血管拡張が顕著であることが報告されている [2, 3]。これらは、SARS-CoV-2 ウイルスが肺血管に感染し、「肺塞栓症」に準じた病態が形成されていることを意味する。肺塞栓症は通常、数 mm から 1 cm 前後の血栓が大静脈を通過して肺動脈主幹部に詰まり、肺内で急速な血流換気不均衡（V/Q ミスマッチ）を起こし、肺動脈の血流低下が顕著の場合は右心への負荷が増加し、右心不全に至る。通常、肺塞栓の発症は、血液中の線溶系マーカーの上昇や造影胸部 CT で肺血管内の血栓を確認することができる。一方、COVID-19 重症例では、微小な血栓が肺内末梢血管部分で起きるため、軽度の線溶系マーカー上昇はみら

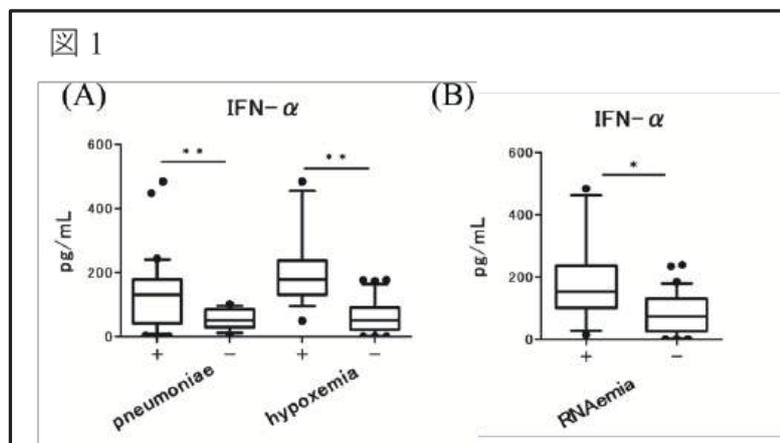
れるものの、胸部CTで血栓を確認できることは稀である。また、COVID-19での肺血管における微小血栓塞栓や血管炎では肺動脈の血流低下は限定的であり、右心不全（輸液負荷や昇圧剤で補正されない頑強な血圧低下）がみられることも稀とされた[1]。これらから、COVID-19重症肺炎の特徴の一つといえる急速な呼吸不全の進行は、肺間質～微小血管でのSARS-CoV-2感染に誘発された炎症、微小血管傷害・血栓塞栓によるV/Qミスマッチが主な病因とされた[1-3]。

COVID-19肺炎やそれに伴う呼吸不全は、SARS-CoV-2感染後数日（多くは5-7日）で顕在化する。感染後の重症化予測はCOVID-19診療上、特に重要であり、パンデミック発生後から多くの重症化予測因子が報告・提案され、その中でも年齢、高血圧、肥満、糖尿病が重要なリスク因子とされてきた[1]。血液検査では、IL-6やIFN- γ などがCOVID-19重症化予測因子として指摘されたが[4, 5]、いずれも実用性や特異性に課題が残り、十分な汎用には至らなかった。

こうした背景をふまえ、当院の前向き観察研究の中で、私は二つの研究を担当した。パンデミック初期（第1～5波）より当院では前向き観察として、COVID-19入院患者全例より同意取得の上、採血時の血清を全て保存し、流行期ごとの病態生理や臨床的特徴の解析を行っており、担当した二つの研究は前向き観察研究の一部として企画・実施された。

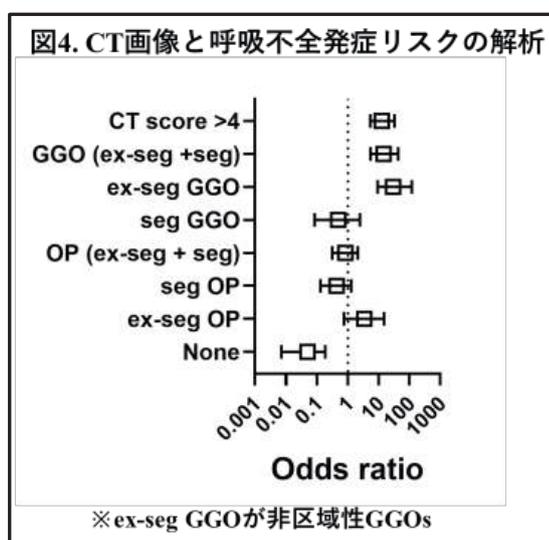
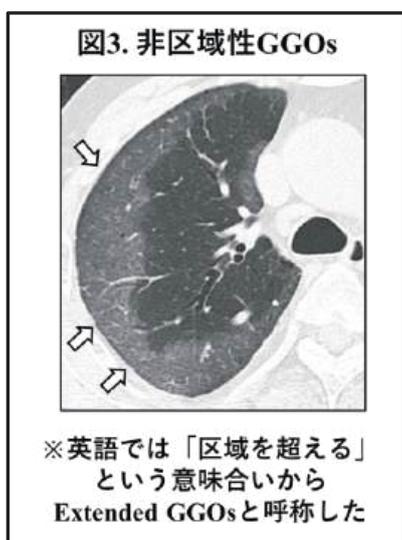
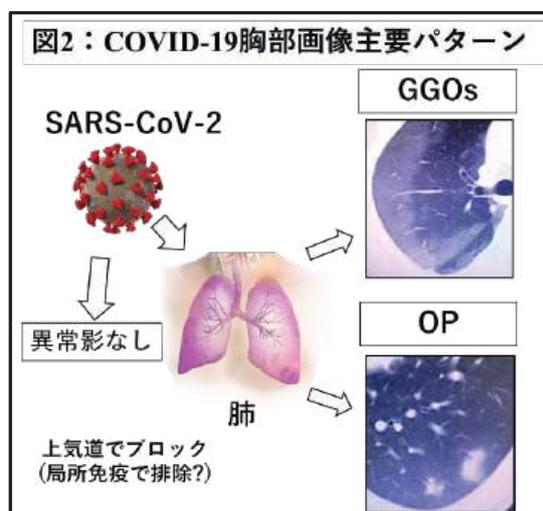
私が担当した一つ目の研究テーマが、「COVID-19重症肺炎例における主要な免疫応答の探索」であった[6]。海外でのCOVID-19重症肺炎例では、感染初期の血清中インターフェロン- α （IFN- α ）が低値となり、IFN- α を介した初期免疫応答が不十分となることが重症化の主因と理解されていた。しかしながら第5波に至るまで、海外でのCOVID-19での重症患者数や死亡数は国内よりも顕著に多く、日本人における重症化の病態生理が必ずしも同一の感染免疫を介さない可能性も考えられた。そこで、第4波・富山大学附属病院入院患者について感染初期のIFN- α を含む主要なサイトカインを測定し、肺炎発症や重症呼吸不全発症との関連性の検証を行った。結果としては、当院入院患者の肺炎、呼吸不全のいずれにもIFN- α 「高値」が関連していたことが判明した（図1A）。当院での肺炎発症者では、海外事例と比較して重症呼吸不全への進行頻度は低く、またほとんどが救命可能であった。

こうした病態ではIFN- α を介した免疫経路が十分応答していても、呼吸不全が起きることが示唆された。また、IFN- α は血中SARS-CoV-2値（RNAemia）と顕著に相関することも判明した（図1B）。IFN- α は、ウイルスへの生体防御への主要な自然免疫を構



成するインターフェロンの一つであり、血中に存在する樹状細胞で主に産生される [7]。このため、ウイルス感染初期の IFN- α 増加は血中へのウイルス侵襲を強く反映するものと考えられた。血中への SARS-CoV-2 侵襲は COVID-19 の重症化や死亡と相関することが複数報告されており [8]、また上述の SARS-CoV-2 と肺毛細血管との関連性などから、SARS-CoV-2 と微小血管侵襲に着目したさらなる検証が必要と考えるに至った。

COVID-19 前向き観察研究で私が担当した二つ目のテーマが、COVID-19 における胸部画像の検討であった [9]。COVID-19 肺炎の診断基準に「肺での新規異常影の出現」があり、CT での診断は最も確実な異常影同定方法である。第 4-5 波流行期の段階では、COVID-19 肺炎の胸部 CT 画像としてすりガラス影 (ground glass opacities, GGOs) が典型的な陰影であり、GGOs を含めた異常影の範囲が予後と相関することが、複数の論文にて報告されていた [10, 11] また、肺炎を発症したあと呼吸不全が軽度にとどまる症例では、器質化肺炎 (organizing pneumonia, OP) 像を呈する経口が COVID-19 の胸部画像の典型所見と理解されていた (図 2)。上述のように当院での COVID-19 患者は重症例が少なかったこともあり、胸部 CT 画像所見で最も多かった所見が GGOs である点は共通していたものの、GGOs の範囲よりも分布が呼吸不全とより強く関連する、あるいは OP 影が既報告よりも多い、などの特徴がみられていた。そこで、第 1~5 波における当院入院 COVID-19 全例の CT 画像所見と呼吸不全発症についての関連性を検証したところ、「胸膜直下に分布する非区域性 GGOs (図 3)」が、最も強く COVID-19 呼吸不全発症と相関することが判明した (図 4)。



さらに、RNAemia と非区域性 GGOs が強い相関性を示すことも判明した (表1)。これらから、胸膜直下に分布する非区域性 GGOs は肺末梢の静脈流が最も弱い部分に血流に沿って SARS-CoV-2 感染が拡大した所見を示すことが推察された。SARS-CoV-2 の血管侵襲は、COVID-19 重症化の最も重要な要因であり、非区域性 GGOs が感染早期の肺での微小血管侵襲と相関した場合、同画像パターンを検出が感染早期に重症化を予測する最も鋭敏な

表1. COVID-19主要画像パターンと呼吸不全/ウイルス量との関連性

	GGOs (n=48)	OP (n=29)	異常影なし (n=78)
呼吸不全発症	44 (91.7%)	7 (24.1%) *	2 (2.6%) *
鼻咽頭ウイルス量 (log copies/ μ L)	4.27 [2.5-5.1]	3.78 [2.2-4.4]	4.86 [3.7-5.6]
ウイルス血症	28/48 (58.3%)	5/29 (17.2%) *	11/75 (14.7%) *

ウイルス量：中央値 [4分位範囲]. *: $p < 0.05$ vs GGOs.

指標になると言える。COVID-19 重症化予測で最も汎用される CT スコア (肺での異常影の範囲を定量的スコアで評価したもの) と比較したところ、本研究コホート内では非区域性 GGOs が最も強い呼吸不全予測因子であることが判明した。この研究成果は、COVID-19 画像診断に関する欧州主要ジャーナルに掲載されることとなった [9]。

こうした第5波までの COVID-19 に関する研究を行う中、2021年には SARS-CoV-2 に対するワクチンが普及し、本邦でも 2021年4~9月のワクチン接種の実施後、一旦 COVID-19 流行はおさまるところとなった。しかしながら、2022年1月からはオミクロン株の流行が起これ、ワクチン普及前の流行期と比較しさらに多大な感染者が発生するところとなった。SARS-CoV-2 の感染性が増強した一方、その病原性については減弱が指摘されるようになった [1]。ワクチン普及前には、感染者の約 30%に呼吸不全、9%に人工呼吸器装着を要する重症呼吸不全がみられたが、ワクチン普及後 (第6波以降)には肺炎・呼吸不全合併頻度の減少が報告されている [1]。当院での入院例でも第1~5波 (326例)の肺炎合併頻度が約7割であったのに対し、第6~8波 (225例)では約1割までの減少がみられた。このように第6波以降、COVID-19における肺炎発症頻度は減少傾向であったが、一定数の重症 COVID-19 肺炎例は発生し続けていた。多数の患者から少数の重症例を抽出する上で胸部 CT による画像診断は重要であり、主要な免疫応答との関連性を解明し、それに基づいた診断方法の確立は急務と考え、オミクロン株流行後の感染早期免疫応答と画像診断法についてさらに検討することとした。

本研究の目的

2022年1月以降に流行したオミクロン株感染者における感染早期の免疫応答と胸部 CT 所見の関連性を検証し、重症予測方法につながる知見を得ることを目的とした。オミクロン株流行前の COVID-19 と流行後の COVID-19 における相違点を明らかにすることも目的とした。

2. 研究方法

研究デザイン：

富山大学附属病院で実施されていた COVID-19 前向き観察研究の一部として行った（院内倫理委員会承認：R2019167）。対象患者は、2022年1月～4月までに RT-PCR 法で SARS-CoV-2 感染を診断された COVID-19 入院患者とした。また、対照群として、2020年12月～2021年9月までに入院した COVID-19 患者も評価対象とした。入院時に行われた採血検体のうち、血清は -80°C 冷凍庫に保管され、血清中のサイトカイン測定に使用した。

定義、選択基準：

肺炎は、入院時 CT 画像で新規炎症像を呈したものと定義した。呼吸不全は、室内気で SpO₂ 93%未満となった状態と定義した。

診療録から臨床経過、検査結果、予後、画像所見についてデータを収集した。

オミクロン流行期の患者選択基準は、18歳以上で、入院時胸部 CT 画像を撮像すること、入院2週間前までにワクチン接種を2回受けたこととした。一方、オミクロン流行前の患者については、入院2週間前までにワクチン接種のないことを選択基準とした。

CT 画像については、放射線科医と呼吸器科/感染症科医の二人で画像所見を確認し、画像的特徴について Fleischner Society Glossary of Terms for Thoracic Imaging [12]に基づき評価した。

画像パターンについては、GGOs、OP、それ以外とし、GGOs、OP については範囲が区域性、あるいは区域内か、それ以上に及ぶか（非区域性）について分類した。

CT 画像所見の定量的評価指標として、CT score も採用した [6, 11]。CT score 判定は既報に準じて、肺葉5領域について異常影の範囲ごとに採点を行い、総合点にて算出した：0点、関与なし；1点、肺葉<5%に異常影あり；2点、肺葉5–25%に異常影あり；3点、肺葉26–50%に異常影あり；4点、肺葉51–75%に異常影あり；5点、肺葉>75%に異常影あり。

RT-qPCR

RT-qPCR は当院微生物学教室にて実施した。定量評価は AcroMetrix Coronavirus 2019 (COVID-19) RNA Control (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA)を用いて行った。検出限度は 0.4 copies/ μL (2 copies/5 μL)となった。

インターフェロン、サイトカイン測定

血清インターフェロン、サイトカイン (IFN- α , IL-6, CXCL10, and VEGF) は市販の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)キットを用いて測定した。IFN- α は VeriKine-HS Human IFN Alpha All Subtype ELISA Kit (PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA)、CXCL-10 は Human CXCL10/IP-10 ELISA Kit (Proteintech, Rosemont, IL, USA)、IL-6 は AuthentiKine™ Human IL-6 ELISA Kit (Proteintech)、VEGF は AuthentiKine™ Human VEGF ELISA Kit (Proteintech)を用いた。

シュードウイルス中和活性

シュードウイルスを使用したウイルス中和活性について、富山大学微生物学教室で Chemiluminescent reduction-neutralizing 試験を用いて測定した。Vero 細胞 (E6/TMPRSS2) を 100 倍希釈した患者血清を加え、pseudo-type SARS-CoV-2 とともに 24 時間培養。その後、ルシフェラーゼ活性を測定し、シュードウイルスへの感染性を評価した。本研究では、シュードウイルスとして以下の 4 タイプのウイルスを作成した： pCAG-SARS-CoV-2 S (Wuhan; WT); pCAGG-pm3-SARS2-Shu-d19-B1.1.7 (Alpha-derived variant); pCAGG-pm3-SARS2-Shu-d19-B1.617.2 (Delta-derived variant); and pCAGG-pm3-SARS2-Shu-d19-B1.1.529.1 (Omicron BA.1-derived variant)。

統計学的解析

患者の臨床像については中央値あるいは比率（パーセント）で表記した。2 群間の差は Mann-Whitney 検定か Fisher exact 検定を用いて評価した。3 群間の評価においては Steel-Dwass 検定を用いた。

相関性については、スピアマンの相関係数を用いて算出した。

3. 研究成果 [文献 13 より引用、一部改訂]

患者背景・臨床像・胸部画像所見

本研究では、オミクロン流行後感染例 48 人（ワクチン 2 回接種済）とオミクロン流行前感染例 137 人が解析対象となった。臨床像や主要画像パターンについて表 2 に提示する。

診断結果についてオミクロン感染群で年齢が有意に高い結果となった。また、オミクロン感染群では基礎疾患を持たないものが少なく、高血圧や糖尿病を基礎疾患として有するものが有意に多い結果となった。

RNAemia、呼吸不全、GGOs を主体とした肺炎の発症頻度は、両群間で有意な差は認められなかった。

一方、OP を主体とした肺炎

の発症頻度は、オミクロン群で有意に少ない結果となった。30 日以内に死亡した症例は本研究のコホートには含まれなかった。

胸部画像については、異常影を認めなかった頻度が、オミクロン感染群で 67%、非オミクロン

表2. COVID-19オミクロン前後での臨床的特徴

	オミクロン 流行前 (n=137)	オミクロン 流行後 (n=48)	P-value
年齢	49 [32-54]	63 [51-74]	<0.001
男性/女性	79/58	31/17	0.401
基礎疾患			
特になし	74 (54)	14 (29)	0.003
高血圧	25 (18)	20 (42)	0.001
糖尿病	8 (6)	8 (17)	0.046
BMI (kg/m ²)	22.5 [21-25]	25.4 [23-28]	<0.001
鼻咽頭ウイルス量 (log copies/μL)	4.8 [3.8-5.6]	4.4 [4.0-5.0]	0.112
RNAemia	31 (23)	5 (10)	0.104
呼吸不全	33 (24)	8 (17)	0.389
人工呼吸器装着	6	2	0.594
画像所見			
GGOs	46 (34)	11 (23)	0.169
OP	27 (20)	1 (2)	0.007
CT score	1.5 [0-6]	0 [0-1]	0.041
30日内の死亡	0 (0%)	0 (0%)	—

感染群で 45%となり、有意にオミクロン感染群で高い結果となった ($p<0.01$)。また、CT score は、オミクロン感染群で 0 [0-1] 点、非オミクロン感染群で 1.5 [0-6] 点となり、オミクロン感染群で有意に低い結果となった。

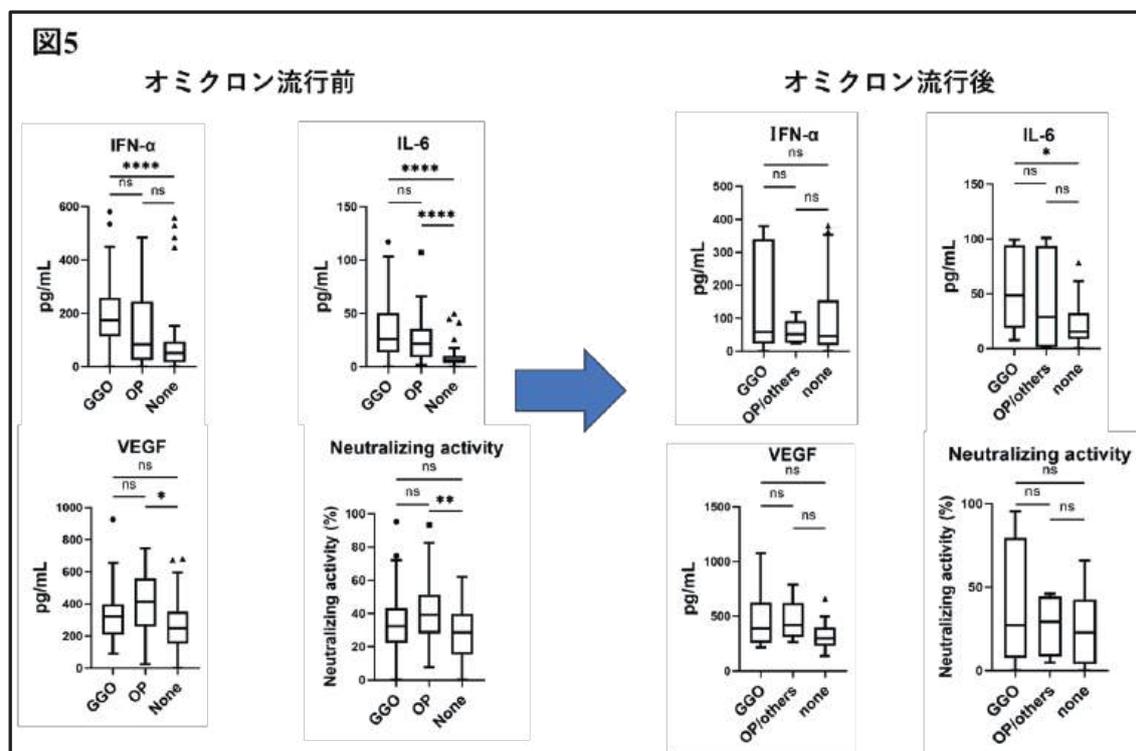
これらから、オミクロン群では「高齢者、基礎疾患を有する群が多く、肺炎は少なく、特に OP を主要画像パターンとする頻度が、オミクロン流行前の COVID-19 と比較して少ない」特徴が認められた。

オミクロン流行前後での各 biomarker 値と胸部画像所見との関連性

非オミクロン感染群では、異常影のなかった患者と比較し、GGOs が主体の肺炎群で IFN- α 、IL-6 が高値を示し、OP が主体の肺炎群で中和活性、VEGF が高値を示す結果となった [図 5 左]。

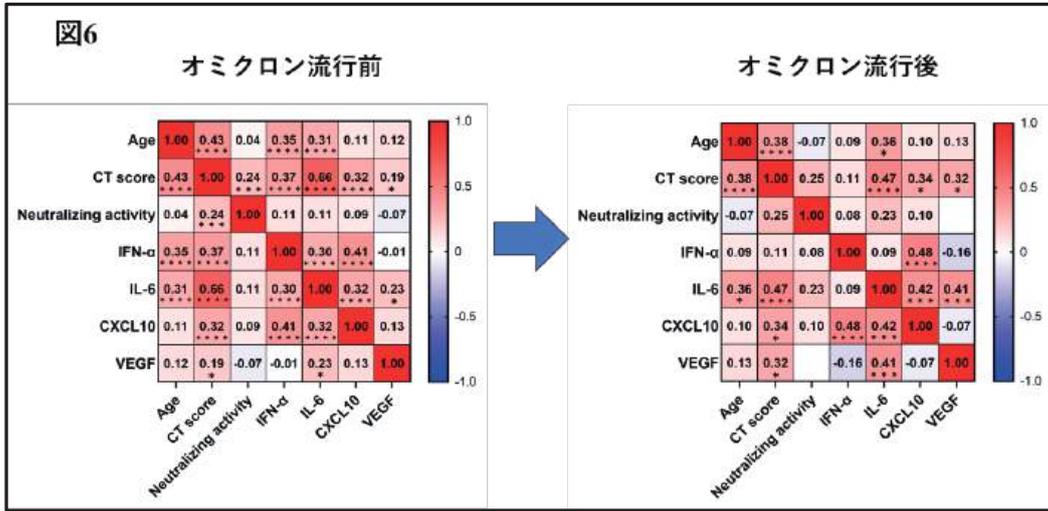
一方、オミクロン感染群では、異常影のなかった患者と比較し、GGOs が主体の肺炎群で IL-6 が高値を示し、OP が主体の肺炎群では有意な違いはみられなかった [図 5 右]。

オミクロン感染群では OP を主体とした肺炎例が少なかったこともあり、OP と免疫指標との関連性を十分検証できなかった可能性は残るが、全体の結果から、オミクロン感染群での肺炎発症患者では非肺炎発症患者と比較して IL-6 が高く、IFN- α と肺炎発症との関連が乏しい傾向を認めた。



オミクロン流行前後での各 biomarker 値と CT score との関連性

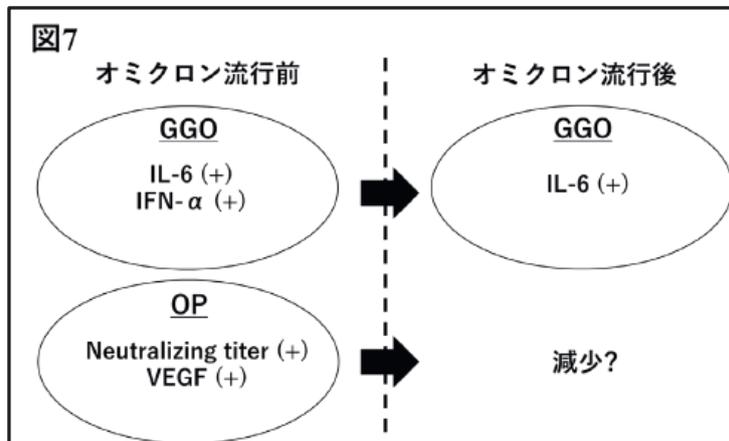
オミクロン流行前後の各 biomarker と CT score との相関値を correlation matrix (図6)にて示す。この解析にて、オミクロン流行後に IFN- α と CT score との関連性も低くなっており、IFN- α と肺炎との関連性が乏しくなっていることが確認された。



結果のまとめ

本研究にて、オミクロン流行後では肺炎、特に OP を主体とした肺炎の発症頻度が減少したことが確認された。また、オミクロン感染例では IFN- α と肺炎との関連性がみられなかった。先行研究[6]で、IFN- α 値は肺炎や呼吸不全、RNAemia と顕著な関連性を示していたが、これらの変化はオミクロン感染で発症頻度が低くなったことと何らかの関連性があるものと考えられた。

オミクロン株では、肺胞上皮細胞への接着能が低下するという報告[14]や、IFN- α を含むインターフェロンからの逃避能が従来株と比較して高い傾向が報告されている[15, 16]。富山大学で診療した COVID-19 入院患者の検証でも、オミクロン株感染時に IFN- α を up-regulate する機序が作動しなかった可能性が示唆される結果がえられた。一方、オミクロン株による肺炎でも IL-6 は肺炎発症と強い関連性を示した。また、オミクロン株による重症肺炎も一定頻度で発生しており、その際の画像所見では GGOs が主体であった。これらの結果より、オミクロン株による COVID-19 肺炎では IL-6 と GGOs が呼吸不全発症と顕著に関連しており、診療時に留意すべきと考えられた。



4. 今後の展望

今回、富山大学附属病院への COVID-19 入院患者全例を対象とした前向き観察研究を通じ、オミクロン株流行前後での肺炎、呼吸不全発症と胸部画像所見、感染初期の主要な免疫応答との関連性を検証することができた。全体を通して、本研究から「非区域性 GGOs」が SARS-CoV-2 ウイルス性肺炎において呼吸不全発症を予測する最も顕著な臨床因子であることを解明しえたことが、最大の研究成果であった。

2024年6月時点で、COVID-19による重症肺炎例は2022年1月以降と類似した頻度で発生している。当初期待された集団免疫による SARS-CoV-2 の消滅は達成されず、ワクチンや獲得免疫によるウイルス中和活性の研究報告などから、獲得免疫の経時的な減衰に従って SARS-CoV-2 変異株流行は周期的に発生することが予想される。その中で、本研究で得た SARS-CoV-2 肺炎の主要画像所見や IL-6 を主要経路とした感染免疫応答の理解は、今後も有用な知見として国内外の診療の基盤になりうるものと考ええる。

私個人は、本研究が単施設で行わざるを得なかった当時の状況に一番の課題を考えるに至った。本研究成果は本質的に COVID-19 診療の核心に触れたものであり、国内外でより広く周知する上で、単施設の研究デザインが limitation となった。

そこで今年度、当講座が中心となり県内基幹病院 7 施設で菌血症に関する多施設共同研究を企画・遂行するに至った。菌血症は全病院での感染対策上、最も頻度が高く、重要な感染症である。そうした感染症を県内施設でリアルタイムに共有し、現状の課題、新規病原菌発生状況などを把握し、積極的に県外に発信できる体制を構築する見込みである。

COVID-19 で経験した新興感染症の脅威に対し、感染症専門医は当時での診療に学んだ教訓を振り返り、次にパンデミックが起こった際に十分な備えをしていく必要がある。県内での感染症ネットワークを実診療や学術的な視点でも強固にし、COVID-19 を含めた主要感染症にリアルタイムに対応していける体制の構築を目指して行きたい。

5. 参考文献

1. COVID-19 診療の手引き 第 10.1 版; 2024 年 4 月
2. Calabrese F, Pezzuto F, Fortarezza F, et al. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European pulmonary pathologists. *Virchows Arch* 2020;477:359-72.
3. Kianzad A, Meijboom LJ, Nossent EJ, et al. COVID-19: Histopathological correlates of imaging patterns on chest computed tomography. *Respirology* 2021;26:869-877.
4. Coperchini F, Chiovato L, Rotondi M. Interleukin-6, CXCL10 and Infiltrating Macrophages in COVID-19-Related Cytokine Storm: Not One for All But All for One! *Front Immunol.* 2021;12:668507.

5. Sugiyama M, Kinoshita N, Ide S, et al. Serum 17CCL Serum CCL17 level becomes a predictive marker to distinguish between mild/moderate and severe/critical disease in patients with COVID-19. *Gene*. 2021;766:145145.
6. Nagaoka K, Kawasuji H, Murai Y, et al. Circulating Type I Interferon Levels in the Early Phase of COVID-19 Are Associated With the Development of Respiratory Failure. *Front Immunol*. 2022;13:844304.
7. Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:231-42.
8. Ram-Mohan N, Kim D, Zudock EJ, et al. SARS-CoV-2 RNAemia predicts clinical deterioration and extrapulmonary complications from COVID-19. *Clin Infect Dis* 2022;74:218-226.
9. Nagaoka K, Kawasuji H, Takegoshi Y, et al. Association of subpleural ground-glass opacities with respiratory failure and RNAemia in COVID-19. *Eur Radiol*. 2023;33:4713-4722.
10. Colombi D, Bodini FC, Petrini M, et al. Well-aerated lung on admitting chest CT to predict adverse outcome in COVID-19 pneumonia. *Radiology* 2020;296:E86-E96.
11. Francone M, Iafrate F, Masci GM, et al. Chest CT score in COVID-19 patients: correlation with disease severity and short-term prognosis. *Eur Radiol* 2020;30:6808-6817.
12. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, et al. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology* 2008;246:697-722.
13. Nagaoka K, Kawasuji H, Takegoshi Y, et al. Dominant CT Patterns and Immune Responses during the Early Infection Phases of Different SARS-CoV-2 Variants. *Viruses*. 2023;15:1304.
14. Hui KPY, Ho JCW, Cheung MC, Ng KC, Ching RHH, Lai KL, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant replication in human bronchus and lung ex vivo. *Nature*. 2022;603:715-720.
15. Guo K, Barrett BS, Morrison JH, Mickens KL, Vladar EK, Hasenkrug KJ, et al. Interferon resistance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022; 119:e2203760119.
16. Alfi O, Hamdan M, Wald O, Yakirevitch A, Wandel O, Oiknine-Djian E, et al. SARS-CoV-2 Omicron Induces Enhanced Mucosal Interferon Response Compared to other Variants of Concern, Associated with Restricted Replication in Human Lung Tissues. *Viruses*. 2022;14:1583.

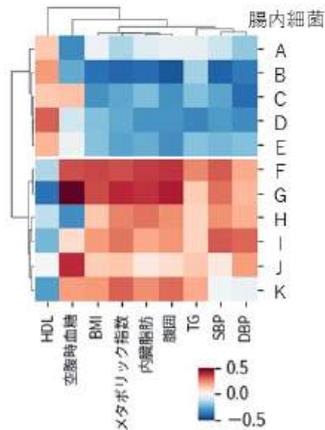
研究題目	メタボリック症候群の予防を目指したヒト腸内細菌の作用機序の解明
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部医学系・准教授・藤坂 志帆
分野	糖尿病代謝
キーワード	腸内細菌、肥満、生薬

1. 研究の背景と目的

近年、腸内細菌叢の破綻が肥満や糖尿病などの原因になることが知られるようになり、関心が高まっている[1]。本来腸内細菌は我々の健康にとって有益な作用を担うものであるが、高脂肪、低食物繊維などの偏った食事や様々な生活習慣が腸内細菌バランスの変化や多様性の低下を引き起こし、それが腸内細菌由来の代謝産物の変化、腸管バリア機能の破綻などを介して肥満や2型糖尿病などの代謝異常を引き起こす[2]。そのため、腸内細菌の生体への作用を理解し、その有

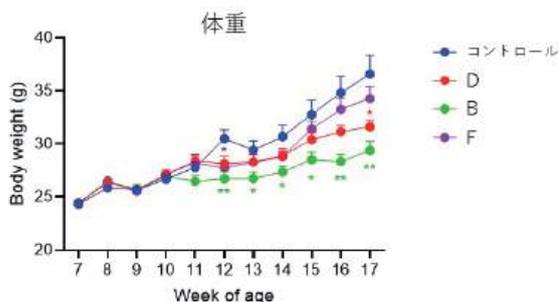
益な作用を引き出すことが、肥満やメタボリック症候群の新たな治療戦略として期待されている。

図1 メタボリック症候群の指標と相関のある腸内細菌



富山県企業健診受診者 49 名からメタボリック症候群関連項目（腹囲、内臓脂肪量、BMI、脂質、血糖、HbA1c など）と3日間の食事内容から算出した摂取栄養分析、生活習慣に関連する問診結果と便の腸内細菌叢を解析し各種パラメータとの相関解析を行った。その結果、メタボリック症候群の病態と相関のあった腸内細菌 11 種類を同定した（図1）。その中の腸内細菌 B と D は高脂肪食を投与したマウスに継続的に投与すると肥満が抑制され（図2）、糖代謝が改善した。本研究では、腸内細菌 B と D の肥満抑制作用のメカニズムを明らかにすることとした（目的①）。

図2 高脂肪食負荷マウスにおける、腸内細菌移植の体重への影響



腸内細菌 *A. muciniphila* はマウスやヒトにおいて代謝改善作用が報告されている菌種[3, 4]で、これを増加させる食品成分や薬剤の探索が世界的に行われている。我々はビールの醸造過程で産生されるホップ由来のポリフェノールであるイソキサントフモールが *A. muciniphila* を直接増加させ、抗肥満作用を示すことを報告した。この研究の中で、この *A. muciniphila* が小腸からの脂肪酸吸収トランスポーターの発現低下を介して脂質の吸収を阻害し、肥満を軽減することを見出

した[5]。さらに和漢薬、防風通聖散が高脂肪食負荷マウスにおいて、この腸内細菌 *A. muciniphila*を増加させて糖代謝を改善させる[6]。そこで *A. muciniphila*を増加させる生薬の同定を試みることにした（目的②）。

2. 研究方法

腸内細菌 B, D を嫌気チャンバー内で培養し、マウスに週 3 回経口投与しながら高脂肪食を与えた。体重や摂餌量、経口糖負荷試験、インスリン負荷試験などを評価し、便、血漿、小腸、大腸、内臓脂肪、肝臓などを摘出し解析に用いた。便の脂質分析、エネルギー量測定、小腸、大腸、内臓脂肪組織、肝臓の各種遺伝子発現を QPCR、タンパク量を組織染色、ウェスタンブロットなどで評価した。

また、生薬は富山大学和漢医薬総合研究所の所有する生薬ライブラリーの提供を受けた。嫌気チャンバー内で *A. muciniphila*を培養し、培地に生薬を 200 μ g/mL で添加し 24 時間培養したのち、培地の濁度測定 (OD₆₀₀)、*A. muciniphila*の DNA 量を定量することで *A. muciniphila*の増殖効率を評価した。In vivo 実験では、普通食、あるいは高脂肪食を投与したマウスに生薬を 1 mg/g 体重で 3~6 週間経口投与し、体重や糖代謝を評価した。腸内細菌叢解析は、新鮮な便を採取後に DNA を抽出し、生物技研に送付して 16S rRNA シークエンスを行い解析した。

3. 研究成果

<目的①>

高脂肪食負荷マウスに腸内細菌 B, D を経口投与したところ、肥満が抑制され脂肪肝や耐糖能が改善した（図 2）。一方これらの菌を 70℃で 30 分間低温で殺菌し投与すると、抗肥満作用、耐糖能改善作用がキャンセルされたことから腸内細菌 B, D による肥満予防作用は生菌の作用であることが示唆された。抗肥満作用のメカニズムとして、B 菌や D 菌を投与されたマウスは便中に排泄されるエネルギー量が有意に増加しており（図 3）、便中の脂肪酸とりわけ飽和脂肪酸含有量が増加していた。小腸の脂肪酸吸収トランスポーター CD36 の発現量が減少していたことから、これらの腸内細菌は小腸の脂肪酸吸収を抑制し、高脂肪食負荷下で抗肥満作用を発揮するもの

図 3 便中へのエネルギー排泄量

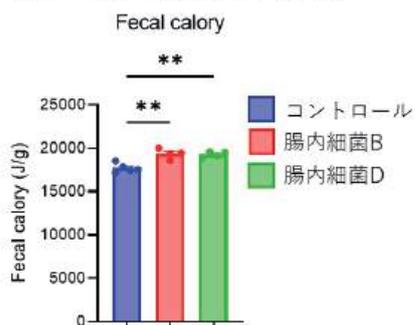
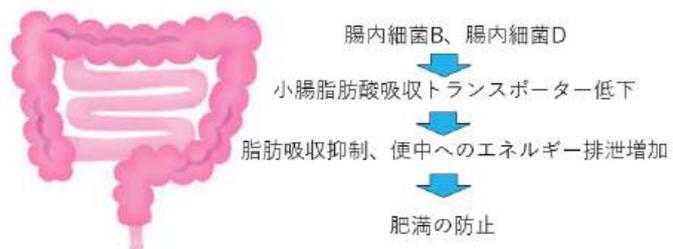


図 4



と考えられた (図4)。このように、健診では比較的健常と考えられるヒトにおいて、その生活習慣などの影響から腸内細菌叢が特徴づけられ、B 菌や D 菌の減少がメタボリック症候群の病態を促進する可能性が示唆された。

<目的②>

A. muciniphila を増加させる生薬の探索では富山大学和漢医薬総合研究所から提供を受けた生薬 119 種類を用いてスクリーニングを行った。*A. muciniphila* と 24 時間培養を行い、培地の濁度の上昇および *A. muciniphila* DNA 量の増加を認めたトップ 15 の生薬を選び出した (図5)。これらをマウスに投与し、最終的に *A. muciniphila* を最も効率的に高めた生薬として山

図5 生薬ライブラリーを用いた *A. muciniphila* の増殖を促す生薬のスクリーニング

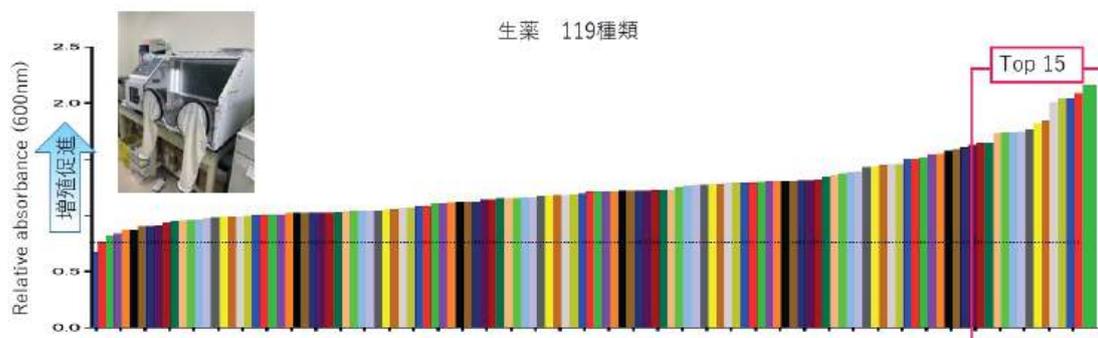


図6 山薬は体重増加を抑制する

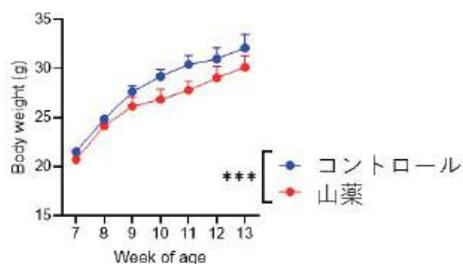
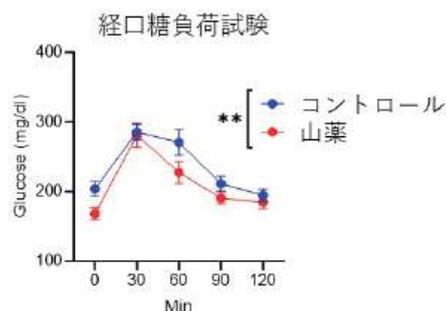


図7 山薬は糖代謝を改善する



薬を同定した。高脂肪食負荷マウスに山薬を投与すると、体重増加が抑制され (図6)、脂肪肝が改善し、糖負荷試験において糖代謝が改善した (図7)。*A. muciniphila* の増加とともに糖代謝が改善することを見出し、日本糖尿病学会の学会誌 *Diabetology International* に報告した [7]。

4. 今後の展望

近年腸内細菌は、私達の代謝や生命活動の恒常性に重要な役割を持つことが明らかとなり、アンバランスな食事や肥満が引き起こす腸内細菌叢の破綻がインスリン抵抗性を引き起こし 2 型

糖尿病などの疾患リスクを増加させることがわかってきた。腸内細菌叢の破綻を是正する方法として現在考えられるのは、食物繊維を含むバランスの取れた食事、プレバイオティクス、プロバイオティクス、それらを組み合わせたシンバイオティクス、薬剤や腸内細菌移植などである。これまでのところ肥満や2型糖尿病の治療に確立された腸内細菌治療はないものの、今回報告した腸内細菌BやDのように、個々の腸内細菌種は宿主に対し、エネルギー代謝を調節する役割を持っているものがある。日本人の健診受診者において、まだ病気と診断されないうちから生活習慣によって腸内細菌叢のプロファイルが変化している。その中からメタボを予防する効果がある腸内細菌種があることを示し、そのメカニズムを明らかにすることは、地域文化に根ざした生活習慣の改善を目指す上で大きな動機付けの要素となる。

富山県は一般に健康に良いと考えられる魚の摂取量が日本一であるにも関わらず、車社会で平均歩数が少なく、揚げ物や冷凍食品への支出が全国トップクラスでメタボリック症候群、2型糖尿病の罹患率が高い（厚生労働省特定健康診査・特定保健指導に関するデータ）。従って、県民に生活習慣改善への意識を高める対策が急がれる。

腸内環境への介入が、インスリン抵抗性を改善できる可能性



5. 参考文献

1. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500(7464):541-6. doi: 10.1038/nature12506.
2. Fujisaka S, Watanabe Y, Tobe K. The gut microbiome: a core regulator of metabolism. *J Endocrinol*. 2023;256(3). doi: 10.1530/JOE-22-0111.
3. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med*. 2017;23(1):107-13. doi: 10.1038/nm.4236.

- 
4. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med.* 2019;25(7):1096-103. doi: 10.1038/s41591-019-0495-2.
 5. Watanabe Y, Fujisaka S, Morinaga Y, Watanabe S, Nawaz A, Hatta H, et al. Isoxanthohumol improves obesity and glucose metabolism via inhibiting intestinal lipid absorption with a bloom of *Akkermansia muciniphila* in mice. *Mol Metab.* 2023;77:101797. doi: 10.1016/j.molmet.2023.101797.
 6. Fujisaka S, Usui I, Nawaz A, Igarashi Y, Okabe K, Furusawa Y, et al. Bofutsushosan improves gut barrier function with a bloom of *Akkermansia muciniphila* and improves glucose metabolism in mice with diet-induced obesity. *Sci Rep.* 2020;10(1):5544. doi: 10.1038/s41598-020-62506-w.
 7. Fujisaka S, Watanabe Y, Toume K, Morinaga Y, Nawaz A, Kado T, et al. Identification of herbal drug extracts that promote growth of *Akkermansia muciniphila* in high-fat diet fed mice. *Diabetol Int.* 2024; published: 06 April. doi: 10.1007/s13340-024-00713-w.

研究題目	睡眠時における記憶痕跡の活動動態
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部医学系・准教授・宮本大祐
分野	神経科学
キーワード	睡眠、記憶、情動、光遺伝学・光生理学、マウス

1. 研究の背景と目的

脳は一日中絶え間なく活動しているが、覚醒時に比べて睡眠時の脳が認知機能に果たす役割の解明は困難であった。そこで、研究代表者は、覚醒中の学習課題時と睡眠時を通じて神経回路をイメージング・光操作する実験系の開発により、睡眠と記憶の関係を研究している(図1; Miyamoto, Neurosci Res, 2022)。研究代表者は、睡眠時の記憶回路動態を脳領域/細胞/シナプスの各階層において解明してきた (Miyamoto et al., Science, 2016; Miyamoto et al., Front Neural Circuits, 2017; Miyamoto et al., Nat Commun, 2021)。まず、自然な睡眠/覚醒サイクルを生じる自由行動マウスにおいて、光ファイバーを用いた神経活動のイメージング・光操作法を確立した (Miyamoto & Murayama, Neurosci Res, 2016)。そして、脳波のリアルタイム解析による睡眠状態選択的なクロードループ光操作系を開発し、ノンレム睡眠時の大脳皮質トップダウン回路が記憶に果たす役割を因果的に解明した。さらに、学習後の睡眠時に、記憶痕跡細胞が再活性化し、記憶痕跡シナプスが相対的に強化されることを解明した。研究代表者は、イメージング・光操作技術を睡眠研究に適用することにより、睡眠時の神経回路動態をマルチスケールで解明してきている。

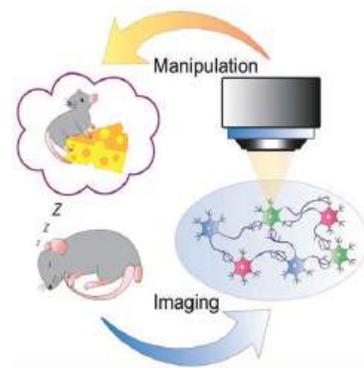


図 1. 睡眠時の記憶回路動態のイメージングと光操作。

精神疾患においては、睡眠障害や記憶障害を併発しやすい。不安障害の一つである心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の生涯有病率は男性が約 5%、女性が約 10%である。そして、睡眠は記憶を定着させる良い面もあるが、PTSD 患者はトラウマ体験のフラッシュバックや悪夢を生じる。しかし、生得的な性差と短時間のトラウマ体験を繋ぐ中時間スケールの睡眠の研究は未だ十分に行われていない(図 2)。脳研究に広く使用される脳波や fMRI は脳広域活動を計測できるが、恐怖/消去記憶回路の活動を分離できない。細い光ファイバーを使用して細胞種選択的に集合活動を蛍光計測するファイバーフォトメトリーは多数の脳領域を標的としやすい(Miyamoto & Murayama, Neurosci Res, 2016)。以上の背景を踏まえて、本研究は、睡眠が情動記憶に果たす役割における性差の解明と、情動記憶回路動態への生体光学的なアプローチの確立を目的とした。

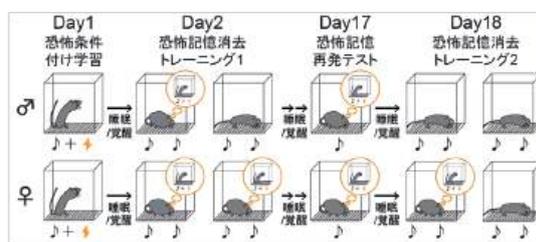


図 2. 生得的な性差と行動タスクを繋ぐ中時間スケールの睡眠を理解する。

2. 研究方法

マウスの恐怖条件付け課題

雌雄のマウスにおいて、音刺激と電気ショックを組み合わせる聴覚性恐怖条件付けと、その後音提示を単独で繰り返し提示する消去トレーニングを行った。30秒間の音刺激の最後に電気ショックを行う遅延条件付けのプロトコルを用いた。1日目の恐怖条件付け時に、雌雄のマウスにおいて、恐怖反応であるすくみ反応の上昇が生じた。雄マウスにおいて、消去トレーニング後の15日間のインターバルにより恐怖記憶の再発が生じ、その後2回目の消去トレーニングにより恐怖反応が抑制された(図3上)。雌マウスは1回目の消去トレーニングでは恐怖反応が抑制されなかったが、2回目の消去トレーニングにより恐怖反応が抑制された(図3下)。電気ショックと連合した音(CS+)は連合しなかった音(CS-)や音提示前のベースラインに比べて大きな恐怖反応を生じた。CS-やベースラインにおいて恐怖反応に性差は見られなかった。



♂: 恐怖記憶が再発する。♀: 消去学習が遅い。
図3. 遅延条件付けの消去学習における性差。

恐怖条件付けプロトコルとして、音刺激のあとにインターバルを置いてから電気ショックを提示するトレース条件付けも使用した(図4)。トレース条件付けにおいては、音と電気ショックを連合させるために、音情報をインターバルの間保持する必要がある。トレース条件付けは海馬依存的なタスクであり、睡眠時の海馬の脳波に依存する可能性がある。トレース条件付け直後の6時間断眠を行った。雄マウスの断眠は次の日の消去トレーニングに影響を与えなかったが、雌マウスの断眠は消去学習を促進した。断眠は2日目の消去トレーニングの初期に影響がないことから、恐怖記憶回路ではなく、消去記憶回路に影響している可能性が考えられる。一方で、恐怖条件付けにより活性化した恐怖記憶回路が学習直後の断眠の影響を受けている可能性も考えられる。

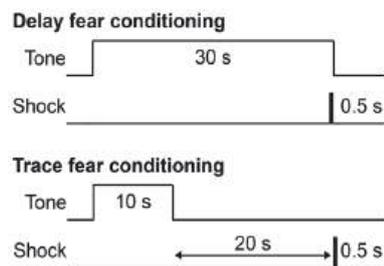


図4. 遅延条件付けとトレース条件付けのプロトコル

生体光学による神経活動の計測・操作

S/N比の良い遺伝子コード型のCa²⁺センサー(GECI)や高速計測が可能な膜電位センサー(GEVI)により、情動記憶に関連する前頭前皮質や海馬や扁桃体の活動を計測した。GECIやGEVIを細胞種選択的に発現させるために、アデノ随伴ウイルス(AAV)を使用した。GECIやGEVIのファイバーフォトメトリー、GEVIの一光子ワイドフィールドイメージング、GECIの二光子イメージングを行った。ファイバーフォトメトリーや一光子ワイドフィールド顕微鏡は高速計測に利点を有しており、二光子顕微鏡は空間解像度に利点を有している。特に、ファイバーフォトメトリーは自由行動下における行動タスク時や睡眠時の神経活動を計測できる。

ファイバーフォトメトリーにより、消去記憶を担う IL (infralmbic cortex) へ投射する神経細胞の Ca^{2+} 活動を扁桃体や腹側海馬において jGCaMP8s により計測した(図 5)。逆行性の AAV を IL に局所注入して、軸索末端から取り込まれて軸索を逆行的に伝送させて扁桃体や腹側海馬の IL 投射細胞に jGCaMP8s を発現させた。jGCaMP8s は紫外光(405nm) 励起による Ca^{2+} 非依存性蛍光と青色光(470nm) 励起による Ca^{2+} 依存性蛍光を交互に観察することができ、光ファイバーの湾曲や脳の揺れに伴うモーションアーチファクトの補正に利用した。

CMOS カメラを利用して、複数の光ファイバーの蛍光シグナルを同時計測できる(図 6)。市販品は 10 軸未満の光ファイバーを使用する製品が多いが、様々な情報を統合する役割のある前頭前皮質の入出力回路を理解するために、19 軸の光ファイバーバンドルを使用して計測システムを構築した。個々の光ファイバーをマウス脳内に埋め込んだ光ファイバーに接続して、 Ca^{2+} 依存的な蛍光シグナルを観察した。

神経細胞はミリ秒スケールで活動しており、GEVI による高速計測の実験系を構築した。扁桃体に光ファイバーを適用して、興奮性神経細胞を青色光により光遺伝学的に刺激して、その自己応答を赤蛍光の膜電位インディケータ(VARNAM)により高速計測した。初期の脱分極応答と後期の過分極応答を計測した。さらに、聴覚刺激や電気ショックに対する扁桃体の興奮性神経細胞の脱分極応答を膜電位計測した。また、一光子ワイドフィールド顕微鏡により麻酔下の大脳皮質徐波を計測した。

ファイバーフォトメトリーは個々の神経細胞の活動を分離することは困難である。そこで、恐怖記憶を担う PL (prelimbic cortex) や海馬において、2 光子多細胞 Ca^{2+} イメージングを行った(図 7)。GRIN (屈折率分布型) レンズを使用して、脳深部への光学アクセスを可能とした。

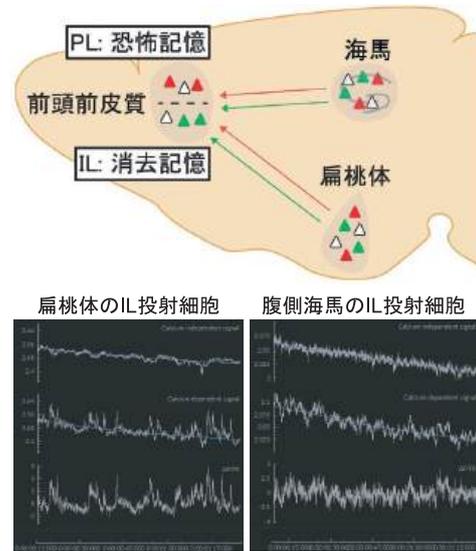


図 5. IL 投射細胞の Ca^{2+} 活動のファイバーフォトメトリー計測

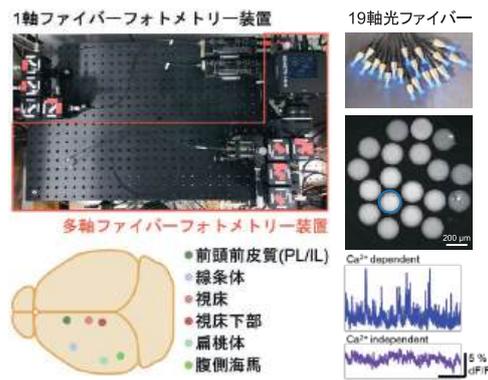


図 6. 多軸ファイバーフォトメトリー装置の構築

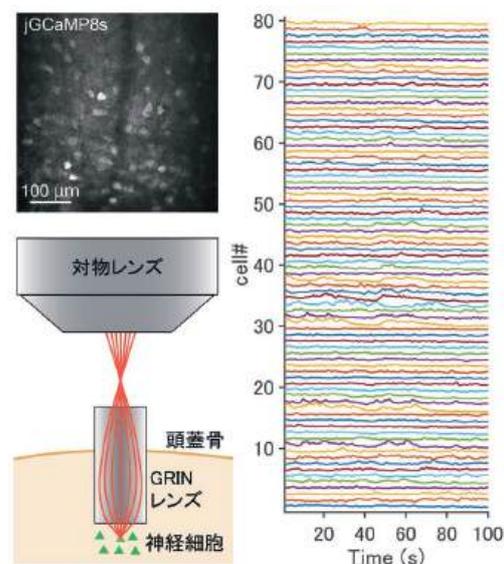


図 7. 脳深部 2 光子 Ca^{2+} イメージング

3. 研究成果

恐怖条件付けにおいて2種のプロトコルを検討して、性差を観察した。遅延条件付けにおいて、雌マウスは恐怖記憶の消去が遅かった。トレース条件付け直後の6時間の断眠は、次の日の恐怖記憶消去を促進した。断眠は消去トレーニング(約30分)の初期ではなく後期の恐怖反応を抑制した。この結果は運動学習の直後の断眠が2日目のトレーニング時の初期の運動成績を低下することを(Miyamoto et al., Nat Commun, 2021)踏まえると以外な結果であった。今後、恐怖記憶回路と消去記憶回路のどちらが断眠や性差の影響を受けるのかを解明することが求められる。トラウマ体験後の断眠実験は、ヒトの状況に擬えるとお通夜に近い。しかし、断眠実験もお通夜も多少のストレスを伴うものであるため、ストレスを与えずに睡眠時の神経活動を操作する光遺伝学実験(Miyamoto et al., Science, 2016)も今後行うべきであると考えられる。

生体光学計測技術は脳表面を中心として発展してきたが、本研究ではファイバーフォトメトリーやGRINレンズにより脳深部への適用を可能として、情動記憶回路の理解を進めた。前頭前皮質の入出力回路を広域解明するため、従来よりも多数の光ファイバーを用いた多軸ファイバーフォトメトリー装置の構築にも成功した。

4. 今後の展望

本研究期間において確立した脳広域の生体光学技術等を用いて、睡眠時の情動回路バランスの性差をマルチスケールに理解していきたい。さらに、脳活動計測や感覚刺激を利用した睡眠や情動記憶の理解は臨床的にも有意義な知見を与えると考えられる。

5. 参考文献

1. K. Inokuchi, D. Miyamoto, NSR special issue “The idling brain in cognition”, Neuroscience Research, 2023, 189, 1-2
2. D. Miyamoto, Neural circuit plasticity for complex non-declarative sensorimotor memory consolidation during sleep, Neuroscience Research, 2023, 189, 37-43
3. D. Miyamoto, Optical imaging and manipulation of sleeping-brain dynamics in memory processing, Neuroscience Research, 2022, 181, 9-16
4. D. Miyamoto, W. Marshall, G. Tononi, C. Cirelli, Net decrease in spine-surface GluA1-containing AMPA receptors after post-learning sleep in the adult mouse cortex, Nature Communications, 2021, 12(1), 1-13
5. D. Miyamoto, D. Hirai, M. Murayama, The roles of cortical slow waves in synaptic plasticity and Memory Consolidation, Frontiers in Neural Circuits, 2017, 11(92), 1-8
6. D. Miyamoto, D. Hirai, C. C. A. Fung, A. Inutsuka, M. Odagawa, T. Suzuki, R. Boehringer, C. Adaikkan, C. Matsubara, N. Matsuki, T. Fukai, T. J. McHugh, A. Yamanaka, M. Murayama, Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory, Science, 2016, 352(6291) 1315-1318

研究題目	機能性の精密制御容易な光応答性化合物の創出
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部理学系・助教・吉野惇郎
分野	有機化学
キーワード	フォトクロミズム、ホウ素、カルベン

1. 研究の背景と目的

光照射により色が変わるフォトクロミック化合物のうち、光酸化還元型有機化合物は、情報記録材料、偽造防止インク、あるいは X 線応答素材といったスマート素材の広い分野に应用可能性がある重要な化合物クラスである。ピオロゲン類(Figure 1)がその代表的存在であるが、光応答中心の分子構造に修飾を施す余地がほとんどなく、有機材料の利点である分子修飾による機能性の精密制御の可能性が損なわれている。それ故この化合物クラスのスマート素材としての研究は他のフォトクロミック化合物と比べていまひとつ遅滞していた。その一方で、カチオン性 4 配位ホウ素錯体(ボロニウム錯体)の一種であるビピリジン-ボロニウム錯体(Figure 2)は、ピオロゲン類に類似した電子構造を持ち、高い電子受容性が注目されてきたが、報告者ら以前には光応答性の研究は皆無であったところ、報告者らはビピリジン-ボロニウム錯体 **1** (Figure 3)の固体に紫外光を照射すると着色し、暗所で着色が消えることを初めて発見した¹。さらに、同様の固相光応答着色特性がビピリジン以外の含窒素配位子を有するボロニウム錯体でも発現することを見だし、構造-物性相関の解明を進めてきた(Figure 3)^{2,3}。

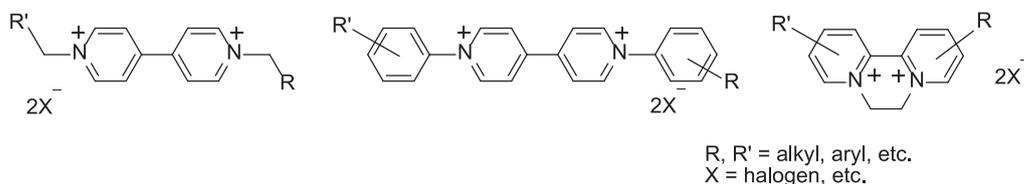


Figure 1. ピオロゲン類

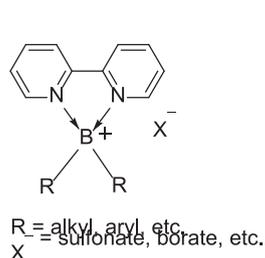


Figure 2. ビピリジン-ボロニウム錯体

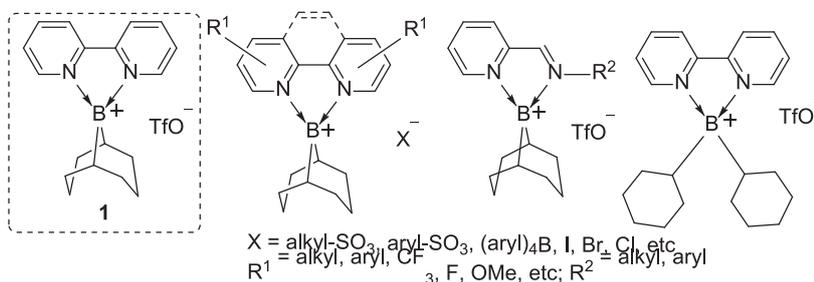


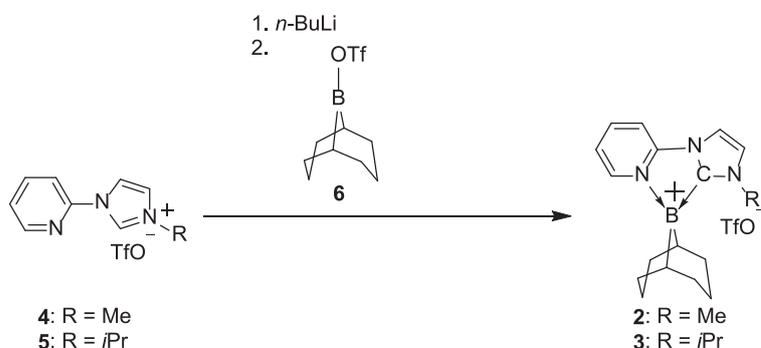
Figure 3. 固相光応答着色挙動を示すビピリジン-ボロニウム錯体

光酸化還元型有機フォトクロミック化合物からのスマート素材の開発発展促進には、光応答性と両立して機能性が精密に制御できることが重要である。ボロニウム錯体は光応答中心近傍

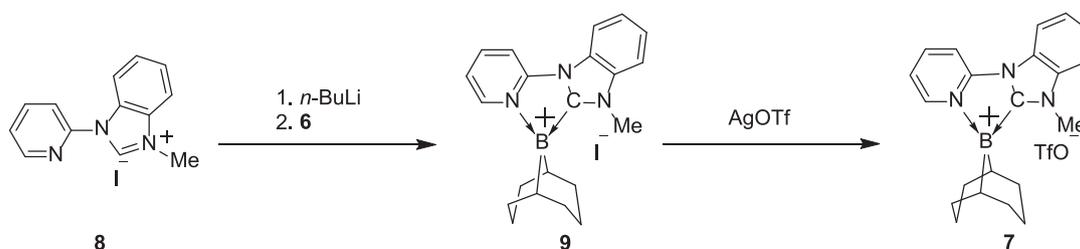
での分子修飾余地が多く機能性の精密制御が容易と期待されるが、窒素-ホウ素配位以外の配位構造を用いたボロニウム錯体が固相光応答着色挙動を示すのかは明らかではなかった。光応答性を示すボロニウム錯体の分子構造として、窒素-ホウ素配位以外の配位構造も利用できるようなになれば、光着色体の色相として実現できる範囲が拡大できると期待される。ここで、ピリジンとイミダゾールカルベンの配位子としての性質の類似性に着目すると、窒素-ホウ素配位結合をカルベン炭素-ホウ素配位結合に置き換えうると予想した。そこで本研究では、カルベン炭素-ホウ素配位をもつボロニウム錯体が固相光応答着色挙動を示すか、示す場合にはどのような挙動を示すか明らかにするために、ピリジン置換イミダゾールカルベンを配位子として有するボロニウム錯体を合成しその固相光応答着色挙動と分子構造の関係を調べた。

2. 研究方法

ピリジン置換イミダゾールカルベンを配位子として有するボロニウム錯体 **2** および **3** は、対応するピリジン置換イミダゾリウム塩 **4** および **5** に *n*-ブチルリチウムを作用させて脱プロトンによりカルベンを発生させた後、9-BBN トリフラート(**6**)と反応させることで合成した(Scheme 1)。ピリジン置換ベンズイミダゾールカルベンを配位子として有するボロニウム錯体 **7** は、同様の反応で前駆体ベンズイミダゾリウム塩 **8** からボロニウム錯体 **9** を合成した後、トリフルオロメタンスルホン酸銀(I)を用いて対アニオンをヨウ化物イオンからトリフラートイオンに交換することで得た(Scheme 2)。



Scheme 1. 化合物 **2** および **3** の合成



Scheme 2. 化合物 **7** の合成

得られた化合物 **2**, **3**, および **7** の構造は各種 NMR により決定した。さらに、**2** については単結晶 X 線構造解析を行い分子構造を決定した。光物性は溶液中の紫外可視吸収スペクトル、蛍光スペクトル測定および固体拡散反射スペクトル測定により調べた。固相光応答着色挙動を調べるために、UV ランプ UVGL-25 を用いて、化合物 **2**, **3**, および **7** の固体粉末に紫外光(365 nm)を照射し、光照射前後の固体の色変化を目視および固体拡散反射スペクトルにより分析した。光着色体の吸収波長と分子構造の関係を明らかにするために、Spartan'18 および Gaussian 16 ソフトウェアを用いて密度汎関数法(DFT)および時間依存 DFT 計算を行った。

3. 研究成果

各種 NMR スペクトルから **2**, **3**, および **7** はいずれもピリジン部位の窒素原子とイミダゾールカルベン部位のカルベン炭素原子がそれぞれホウ素原子に配位結合した、4 配位ホウ素構造をとっていることがわかった。とくに **2** については単結晶 X 線結晶構造解析により分子構造決定できた(Figure 4)。**2**, **3**, および **7** の固体に紫外光(365 nm)を照射したところ、いずれも無色から黄色に変化し、カルベン炭素-ホウ素配位をもつボロニウム錯体も固相光応答着色挙動を示すことがわかった(Scheme 3)。**2**, **3**, および **7** の光着色体の吸収波長は固体拡散反射スペクトルで 462, 464, およ

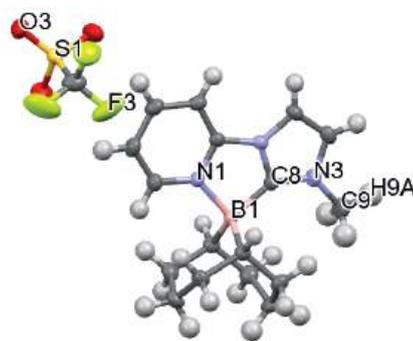
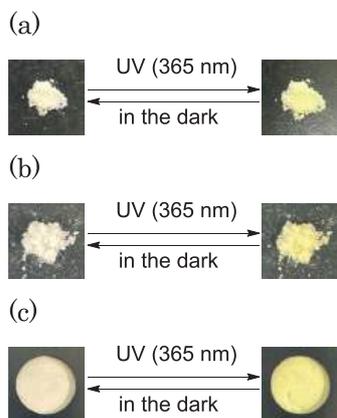


Figure 4. 化合物 **2** の Thermal ellipsoid plot (50% probability)



Scheme 3. 化合物 **2**, **3**, および **7** の固体の光照射前後の写真;
(a) **2**, (b) **3**, (c) **7**

び 449 nm に観測された(Figure 6)。窒素-ホウ素配位のみをもつボロニウム錯体においては、化合物 **10** (Figure 5)の固体に光照射して生じた光着色体が最も短波長の吸収波長(488 nm)を示していたが、**2**, **3**, および **7** の光着色体の吸収波長はこれと比較してもさらに大幅に短波長シフトしたことがわかった。窒素-ホウ素配位のみをもつボロニウム錯体の光応答着色の推定反応機構に基づいて、化合物 **2**, **3**, および **7** においてもその光反応生成物構造はカチオン部分の励起三重項状態の最安定構造と想定し、DFT 計算(UB3LYP/6-31G(d))により **2** の光着色体推定構造 **2'**の構造最適化を行ったところ、ホウ素原子まわりが 3 配位平面構造に近くなり、9-BBN 構造部分の 2 つの B-C 結合のうち一方が著しく伸長した構造が求められた(Figure 7)。可視光波長領域の吸収は、**2'**の時間依存 DFT 計算(UCAM-B3LYP/6-311++G(d,p))により 9-BBN 骨格上とピリジン-イミダゾールカルベン配位

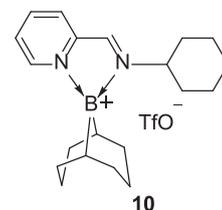


Figure 5.化合物 **10**

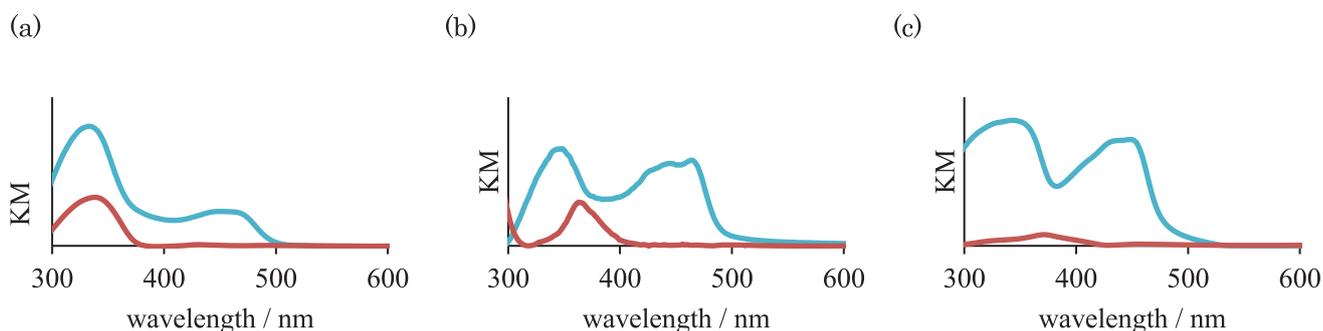


Figure 6. 化合物 **2**, **3**, および **7** の照射前後の固体拡散反射スペクトル. (a) 化合物 **2**, (b) 化合物 **3**, (c) 化合物 **7**. 赤線: 照射前, 青線: 365 nm 照射後

子上の両方にまたがって非局在化した α スピンの HOMO から配位子上に局在化した α スピンの LUMO への励起に対応した遷移に帰属された (Figure 7)。**2** の光着色体実際に観測された吸収波長 (462 nm) と計算によって推定された **2'** の遷移エネルギー (2.62 eV) が比較的よく一致していることから、推定された構造は妥当であると考えられる。ここで、**2'** と **10** の光着色体推定構造 **10'** の分子軌道のエネルギー準位を比較すると、 α スピンの HOMO のエネルギー準位 (**2'**: -7.31 eV, **10'**: -7.27 eV) はほぼ等しいのに対して、 α スピンの LUMO のエネルギー準位 (**2'**: -4.69 eV, **10'**: -4.81 eV) には 0.12 eV の差があると求められた。このことから、配位子が *N*-ヘテロ環状カルベン部位を含むことで光着色体の LUMO のエネルギー準位が上昇したことが光着色体の吸収の短波長シフトの主たる要因であるとわかった。

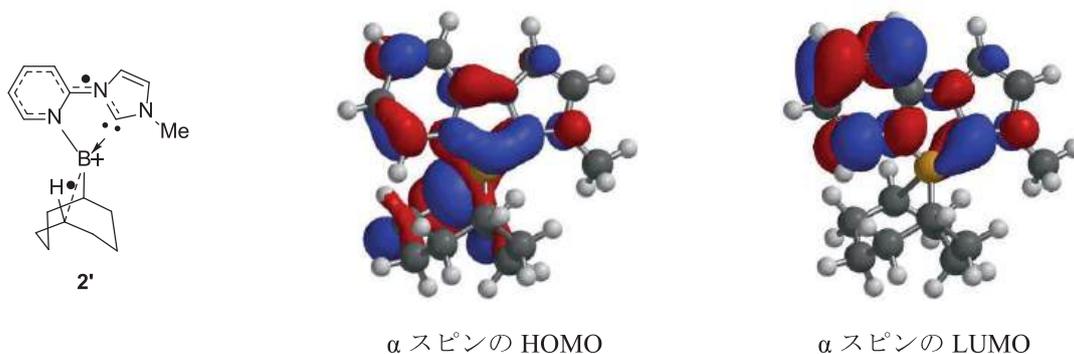


Figure 7. **2** の光着色体推定構造 **2'** の最適化構造とフロンティア軌道図 (UB3LYP/6-31G(d))

4. 今後の展望

本研究においては、窒素-ホウ素配位構造以外にカルベン炭素-ホウ素配位構造を有するボロニウム錯体においても固相光応答着色挙動を示すことを明らかにできた。またそのような炭素-ホウ素配位結合を有するボロニウム錯体を用いることで、これまで実現できていなかった、より短波長側に吸収をもつ光着色体を生じるボロニウム錯体の固相光応答着色挙動を実現し、機能性の制御可能範囲が拡大した。本研究の成果は、より機能性を精密制御容易な光応答性化合物の

分子設計の基盤として重要であり、今後様々なスマート素材の開発に資するものと期待される。

5. 参考文献

1. Yoshino, J.; Sekikawa, T.; Hatta, N.; Hayashi, N.; Higuchi, H. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 5489.
2. Yoshino, J.; Hirono, Y.; Akahane, R.; Higuchi, H.; Hayashi, N. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19*, 1517.
3. Yoshino, J.; Hirono, Y.; Kaneda, A.; Hayashi, N. *Dalton Trans.* **2023**, *52*, 15017.

研究題目	農薬曝露による神経発達障害モデルにおけるシナプス・分子病態の解明
機関名	富山大学
研究代表者	学術研究部医学系・准教授・吉田知之
分野	神経形態学、神経化学、細胞生物学、薬理学
キーワード	発達神経毒性、農薬曝露、シナプス調節

1. 研究の背景と目的

農薬は、農作業労働を軽減し、農作物の生産性を向上させることで、安定した供給に結びつけるための資材である。本来、その毒性は雑草を含む病害虫を対象としているが、生物活性を有する化学物質であるため、ヒトをはじめ様々な生態系への影響を十分に評価し、農薬の取り扱いに際しての適切な対策を講ずることが必要である。近年、周産期における農薬曝露が、胎児の神経発達に影響を与え、その後の有害性発現を導く一因として懸念されるようになってきた。周産期における農薬の曝露量は、事故的な曝露（誤飲や自殺など）と比べてかなり低いと推定される。そのため、周産期の農薬曝露による症状の隠蔽性は高く、子どもの発達障害を導く病態メカニズムは不明のままである。これに対して、数多くの動物実験から、農薬曝露によって誘発される細胞内シグナルや代謝、遺伝子発現といった「細胞レベルでの一次的な変化」や、記憶・学習障害や行動異常といった「個体レベルでの最終的なアウトプット」に関する膨大なデータが蓄積されてきた。今後は、これらを結ぶ「細胞集団レベルでの二次・三次的な変化」の評価が必要となるが、その中でも神経回路の構築基盤となるシナプスへの影響評価は重要と考えられる。

グルホシネートは、グリホサート耐性を示す雑草をコントロールするために開発された除草剤で、その使用量が増加傾向にある。植物に対するグルホシネートの作用機序としては、グルタミン合成酵素の阻害による活性酸素種の蓄積や脂質の過酸化反応を介して、短時間で細胞死を誘導する経路が考えられている。一方、グルホシネートは神経伝達物質の1つであるグルタミン酸と似た構造を持つ。この点が、哺乳類などの中枢神経系に対しても影響をもたらすのではないかと考えられている理由である。実際、ヒトにおける急性曝露後の後遺症として、記憶障害や認知機能不全などが報告されている。また、マウスを用いた動物実験では、妊娠マウスへグルホシネートを曝露することで、産児個体で運動量の減少や記憶障害、また自閉症様行動が観察されている。また、カナダのグループは、実際に周産期の母子からグルホシネートが検出されたと報告している。我々は、神経活動依存的な Arc 遺伝子の発現を個体レベルでモニターするためのルシフェラーゼトランスジェニック (Arc-Luc Tg) マウスを作製している。Arc は、神経細胞のシナプスの調節に関連する分子として、神経活動依存的に発現変化することが知られている。この Arc-Luc Tg マウスを用いて、生後発達期のマウスに慢性的なグルホシネート曝露を施すことで発光シグナルが減少することを見出した。このことから、発達期におけるグルホシネート曝露は、

神経回路形成やシナプス機能を変調させることで、学習や行動に障害をもたらす可能性が示唆された（文献1）。

哺乳類の脳は、数十億の神経細胞から成り、それらが互いにシナプスを介したネットワークを形成している。新たなシナプスは数時間程度で形成され、シナプスのうち約10%が日々再構築されると考えられている。そして、シナプスは隣接する神経細胞間でランダムに形成されるのではなく、ニューレキシン（NRXN）やニューロリギン（NLGN）などの「シナプスオーガナイザー」と呼ばれる接着分子によって緻密に制御されていることが知られている。これらの分子は、神経伝達物質の放出と受容に特化したシナプス特有の構造体を分化誘導するだけでなく、シナプス形成の標的選別においても重要な役割を担うことが明らかにされてきた。我々は、このシナプスオーガナイザーをコートしたマイクロビーズを用いて、様々な条件下での培養神経細胞のシナプス誘導活性を定量的に解析する方法をこれまでに構築してきた（文献2、3）。

上述のシナプス形成の解析方法等を駆使して、妊娠期のグルホシネート曝露が胎児および産児のシナプス形成、神経回路発達に与える影響を明らかにすることが本研究の目的である。

2. 研究方法

妊娠日を揃えるために、C57BL/6N マウスの凍結胚を偽妊娠 ICR マウスに移植し、実験に供した。胚移植後の ICR マウス（以下、妊娠マウスとよぶ）に対し、妊娠10～18日目まで GLA を経鼻投与（0.8 mg/kg）した。その後、胎児（妊娠18日目）の大脳皮質より培養神経細胞を調製し、シナプス形成の評価に用いた。同量の溶媒（生理食塩水）を投与した妊娠マウス由来の胎児で調製した培養神経細胞をコントロールとして用いた。一方、GLA を直接曝露する実験として、無処置（投与なし）の妊娠マウス由来の胎児より調製した培養神経細胞に対し、培養1日目から GLA（0.001~1 μ M）又は溶媒（生理食塩水, PBS）を添加して培養を継続し、シナプス形成の評価に用いた。培養13日目において、NLGN1-Fc 組換えタンパク質を配置したマイクロビーズ（以下、シナプス誘導ビーズ）を添加し、24時間後に培養神経細胞を固定した。また、Fc 組換えタンパク質を配置したマイクロビーズをコントロールとした。シナプスマーカーである Bassoon に対する免疫染色を行い、蛍光シグナルを測定・比較した。

上記と同様にして、妊娠マウスに GLA を経鼻投与（妊娠10～18日目）し、その胎児から調製した培養神経細胞（培養6、10、14日目）より RNA を抽出し、マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析を行った。実験に際しては、富山大学生命科学先端研究ユニット遺伝子施設の設備（GeneChip ハイブリダイゼーションオープン、GeneChip スキャナー）を使用した。Transcriptome Analysis Console software（Thermo Fisher Scientific）を用い、各培養日数における GLA 群とコントロール群の比較から発現変動遺伝子を抽出し、遺伝子オントロジー解析を実施した。発現変動を示した遺伝子のバリデーションを RT-qPCR にて実施した。

引き続き、妊娠マウスに対して GLA を経鼻投与（妊娠10日目～生後21日目）し、生後14日目又は生後21日目において、産児マウスの脳を4%パラホルムアルデヒドで固定した。脳スライスを作製し、ニューロンのマーカーである NeuN と抑制性ニューロンのマーカーの1つ

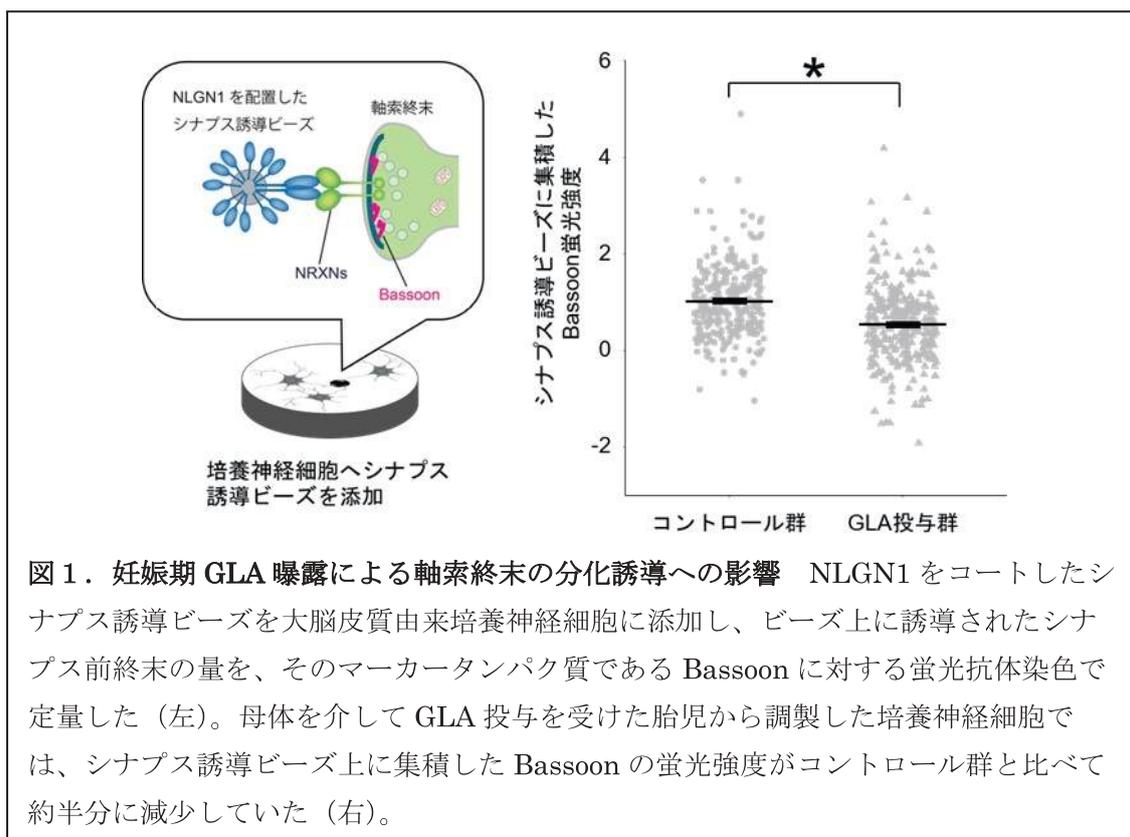
である Parvalbumin (Pvalb) に対する抗体を用いた共免疫組織染色を行い、Pvalb 陽性細胞数の割合 (Pvalb 陽性細胞/NeuN 陽性細胞) を測定・比較した。

なお、今回の動物実験のプロトコルは、富山大学動物実験委員会 (番号: A2023MED-05) の承認を受けたものである。また、動物実験の実施者は、富山大学の実験動物の飼育と飼養に関するガイドラインに従って十分な訓練を受けている。

3. 研究成果

3-1. 妊娠期 GLA 曝露によるシナプス形成量の減少

妊娠マウスに GLA を経鼻投与し、その胎児を用いて培養神経細胞を調製した。培養 1 3 日目において、シナプス誘導ビーズを添加し、2 4 時間後にビーズ上のシナプス形成量を解析したところ、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して、シナプス形成量が有意に減少していた (図 1)。同様の実験を繰り返した結果、妊娠期の GLA 曝露によるシナプス形成量の減少は再現されたが、妊娠マウス毎にその減少の割合が異なることも判った。なお、両群ともに Fc タンパク質を配置したコントロールビーズに対するシナプス形成は生じなかった。また、培養ディッシュでビーズ領域以外における Bassoon の蛍光強度については両群間に差は無かった。



続いて、GLA を細胞に作用させることによって、NMDA 受容体を介した神経細胞ネットワークの活性化、細胞接着や細胞分化の障害が報告されていることから、無処置の胎児から培養神経細胞を調製し、GLA を直接作用させた場合のシナプス形成量の変化について検討を行った。

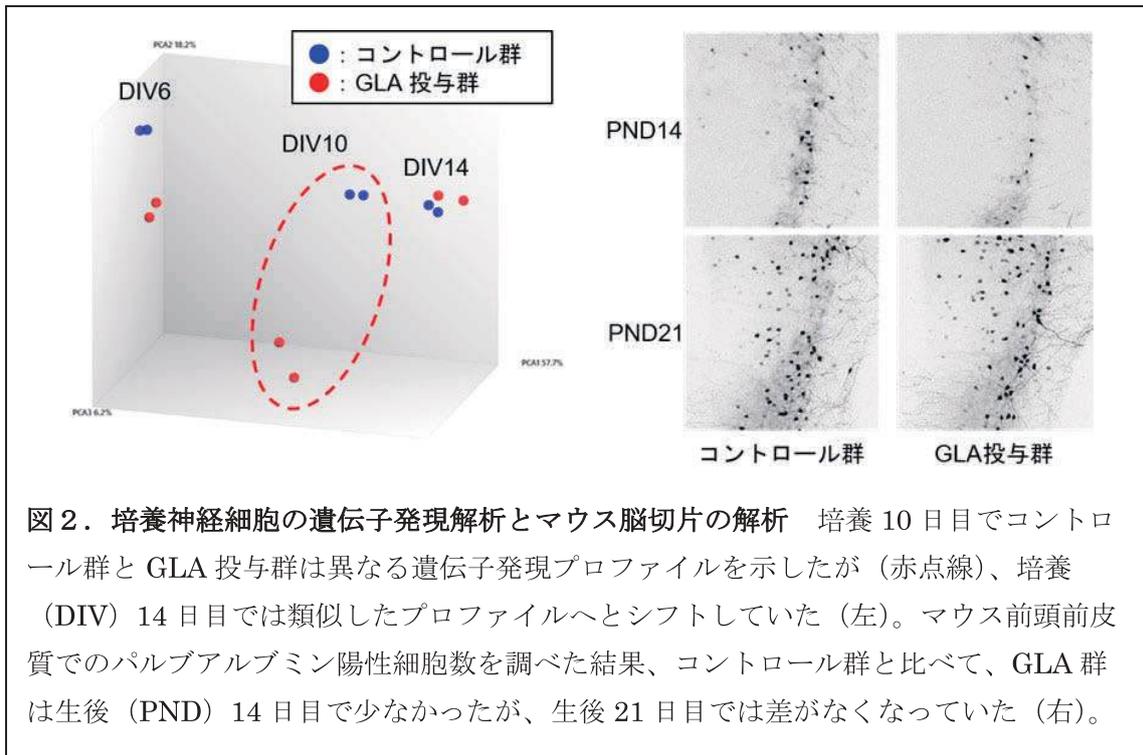
DIV1にてGLA (0.001–1 μ M) を培地に添加し、慢性的な曝露の条件下で培養した。DIV13において、シナプス誘導ビーズを添加し、24時間後にシナプス形成量の解析を行った結果、PBSを添加したコントロール群との間に有意な差はなかった。これらのことから、GLAの妊娠マウスへの曝露は胎児神経細胞のシナプス形成を抑制し、この効果はGLAの直接的な作用ではなく、何らかの母子間メディエーターを介してもたらされることが示唆された。

3-2. 妊娠期 GLA 曝露による遺伝子発現の変調

妊娠期 GLA 曝露によるシナプス形成の障害が、神経発達にて、どの段階で、どのような分子レベルでの変化によって引き起こされるのか、引き続き、遺伝子発現解析を通して検証した。母体を介して GLA 投与を受けた胎児から調製した培養神経細胞について、各発達段階（培養6、10、14日目）において網羅的遺伝子発現解析を行った。主成分分析の結果、培養神経細胞は発達段階に応じた特徴的な遺伝子発現を示すことが分かった（図2左）。培養6日目では、GLA曝露群はコントロール群と類似した遺伝子発現プロファイルを示した。しかし、培養10日目におけるGLA曝露群は、コントロール群と大きく異なる遺伝子発現プロファイルにシフトした。その後の培養14日目では、GLA曝露群は再びコントロール群と類似した遺伝子発現プロファイルに戻った。そこで、培養10日目にて減少を示した374個の遺伝子を用いて遺伝子オントロジー解析を実施した結果、生物学的プロセスオントロジー（BP）として「神経発達」のプロセス、細胞成分オントロジー（CC）ではシナプスや細胞接着に関連した遺伝子がエンリッチされていることが分かった。このことは、上述のGLA曝露群でシナプス形成能が低下するというシナプス誘導ビーズを用いた評価結果をサポートするものである。

3-3. 妊娠期 GLA 曝露による Pvalb 陽性細胞の発達に対する影響

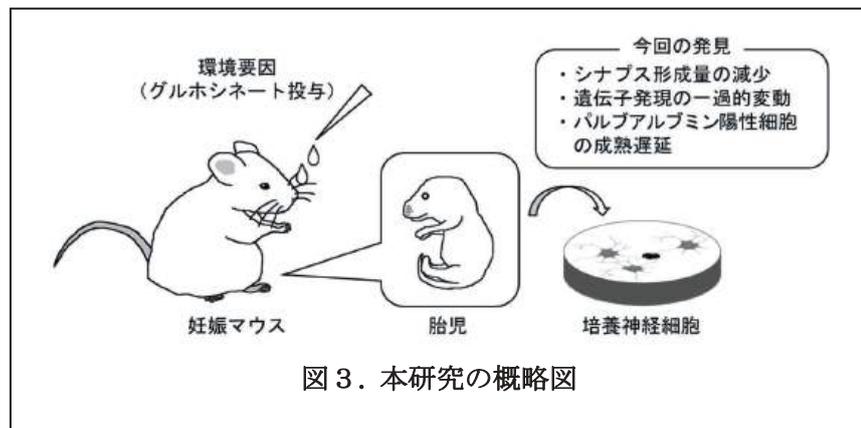
最後に、妊娠期の GLA 曝露が産児脳の神経回路の発達に与える影響について調べた。3-2で抽出した374個の変動遺伝子群には Parvalbumin (*Pvalb*) の発現に関連する遺伝子 (*Camk1g* や *Gad1* など) が含まれていた。*Pvalb* は大脳皮質の一部の抑制性ニューロンのマーカータンパク質であり、*Pvalb* 陽性細胞の数は神経回路発達の指標となることが知られている。実際、自閉スペクトラム症等の発達障害モデルマウスではその数が変化することも知られている。そこで、母体を介して GLA 投与を受けた産児の大脳皮質における *Pvalb* 陽性抑制性ニューロンの数を調べた。その結果、生理食塩水を投与したコントロール群と比べて、GLA投与群では生後14日目にその数は有意に減少していた。しかし、生後21日目ではその差は無くなっていた（図2右）。なお、両群の産児の体重に差は認められなかった。これらのことから、培養神経細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果と同様に、GLAの妊娠マウスへの曝露は産児脳発達の一過的な遅延を引き起こすことが示唆された。



4. 今後の展望

本研究によって妊娠期の GLA 曝露が胎児神経細胞のシナプス形成および産児脳の神経回路発達に影響を及ぼすことが明らかになった (文献 4、図 3)。一方、今回のマウスを用いた動物実験から得られた結果をそのまま私たちの実生活に当てはめて考えることができるか否かは現時点では不明である。そのため、マウスとヒトとの動物種差がどのように構成されているかを理解し、ヒトで直接得られない環境要因の影響を動物実験のデータから推定するためのシステム作りが重要であると考えられる。

最近、妊娠期の母体のウイルス感染や高血圧症と子どもの神経発達障害の因果関係が注目されており、そこには共通の病態メカニズムが存在する可能性が示唆されている。現在、農薬曝露がシナプス形成の調節機能を破綻させる分子メカニズムの解析をさらに進めている。例えば、鍵となる母子間メディエーターを明らかにすることで、新しい予防・治療法の開発に役立つことが期待される。



5. 参考文献

1. Izumi, H., Ishimoto, T., Yamamoto, H., and Mori, H. (2019). Bioluminescence imaging of Arc expression in mouse brain under acute and chronic exposure to pesticides. *Neurotoxicology* 71, 52–59.
2. Yoshida, T., Shiroshima, T., Lee, S. J., Yasumura, M., Uemura, T., Chen, X., et al. (2012). Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule. *J. Neurosci.* 32, 2588–2600.
3. Yoshida, T., Yamagata, A., Imai, A., Kim, J., Izumi, H., Nakashima, S., et al. (2021). Canonical versus non-canonical transsynaptic signaling of neuroligin 3 tunes development of sociality in mice. *Nat. Commun.* 12, 1848.
4. Izumi H., Demura M., Imai A., Ogawa R., Fukuchi M., Okubo T., Tabata T., Mori H., Yoshida T. (2023). Developmental synapse pathology triggered by maternal exposure to the herbicide glufosinate ammonium. *Front Mol Neurosci.* 16:1298238.

