

保育支援のための子どもたちの行動分析及び 心的状態推定システムの開発

神奈川大学工学部 特別助教
張 畔

1. 研究目的

本研究は、保育士人材不足の社会問題に対し、人工知能（AI）技術に基づいて、保育支援のための子どもたちの行動分析及び心的状態推定システムの開発を行い、保育の高度化と保育士の業務軽減を目指す。具体的には、熟練した保育士の優れた知識と経験に基づいた目で、疲れることなく子供たちの行動を観察し、一人一人の成長と心的状態を理解し保育士にフィードバックすることで、各子どもの成長状況に合わせた保育の実現を目指す。保育園にセンサシステムを構築し、全方位的に子どもたちの活動を連続的に計測して保存する。記録したデータを分析し、各子どもの行動を分離し追跡する。観測された子どもの動きより興味や活動量などの心的状態を推定し、保育士に情報をフィードバックすることで、個人の特徴に合わせた保育が期待できる。また、保育士の仕事内容と保護者の希望に合わせて、情報提供ツールを開発することで、子ども、保護者と保育士の間のスムーズなコミュニケーションと信頼関係が構築することができる。

2. 研究方法

AI技術に基づいた情報化保育システムの開発は以下のようを行う。

[計測] まず、子ども達が活動する部屋に、D435というRGB-Dセンサを複数（4つ）設置し、全方位的に子どもたちの活動を定期的に計測して、記録する。また、教員にマイクとカメラを付けさせ、授業中の話す内容と注視しているシーンも記録する。

[分析] センサから取得した画像情報、距離情報を有機的に統合し、顔認識や服の色を用いて個人認証をするとともに、各子どもの空間座標をパーティクルフィルタで追跡する。表情・動作認識と場面認識を行い、子どもたちの複数の行動特徴を抽出し、時系列データとして保存する。長時期の観察を通じて、子どもの行動情報から各自の個性や趣味など心的状態を推定する。

[対応] 保育士の仕事内容をヒアリングし、実際のニーズに合わせて、子どもたちの情報提供ツールを開発する。提供された情報に基づいて保育士が各子どもの働き方を調整する。例えば、発達遅れの傾向がある子どもを提案システムより早期発見し、保育士がその子に特別な扱いをすれば、発達障害になる前に改善される可能性がある。また、この情報提供ツールで子どもの代表的なできごとを保護者に提供することで、子ども、保護者と保育士の間のスムーズなコミュニケーションの実現も役に立つ。子ども一人一人の個性や発達度合に合わせた最適な扱いが実現できる。

[評価] 手動で子どもたちの動き軌跡を抽出し、提案した個人追跡手法の結果と比較することで、定性と定量的に提案手法の有効性を示す。それから、推定した子ども心的状態と保育園の先生の判断と比較し、推定結果を評価する。実際に情報提供ツールを使ってもらう方々の意見をヒアリングし、情報提供の適切さの評価を行う。

3. 結果

複数RGB-Dセンサを用いてオクルージョンの多い教育現場での子どもたちのロバストな行動追跡を行った。教育現場でオクルージョンや照明条件の変化の影響を対応するため、複数RGB-Dセンサの異なる視点から得られたRGB-D情報を組み合わせることで相互に補完し、全方位的な三次元点群情報（空間座標と色を含めたXYZRGB情報）をクラスタリング手法で三次元の人物領域を検出する。カラー画像に対し、ディープラーニング（YOLO）手法を用いて人物の数を検出し、対応する人物領域を人数分に有効な色情報を取得する。抽出した色情報を登録した個人の色情報とマッチングすることで個人認識を行う。個人認識の結果をパーティクルフィルタの観測情報として用いて、子ども各々に対して追跡を行う。

子どもたちの行動理解のため、保育園の教室にセンサシステムを構築する。教室には4つのRGB-Dセンサ（D435）を図1のように設置し、2mの高さから見下ろして子どもたちをモニタリングする。複数のRGB-Dセンサの情報を統合し、完全な三次元点群情報（空間座標と色を含めたXYZRGB情報）を生成する。背景差分を用いて背景の領域を削除し、センサの計測範囲内の人物領域の点群のみを検出し、3次元点群クラスタリング手法を用いて、人物候補領域を検出する。同時に、カラー画像に対し、ディープラーニング手法YOLO-V3を用いて人物検出を行う。近くにいる複数人がつながっている一つの領域に対応している可能性があるため（図3(a)に示す）、カラー画像で検出した人数を参考し、対応する人物領域に対し再度にクラスタリングを行う。人の頭が一番高いところであるため、局所極大値を人の中心としクラスタリングを行い、点群が大きい方から人物と確認する（図3(c)に示す）。

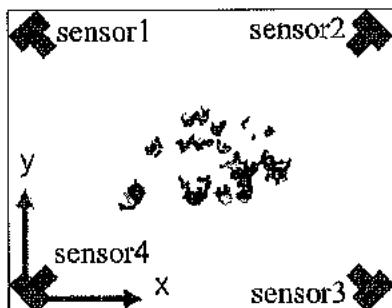


図1. センサ配置と人物の水平面への投影

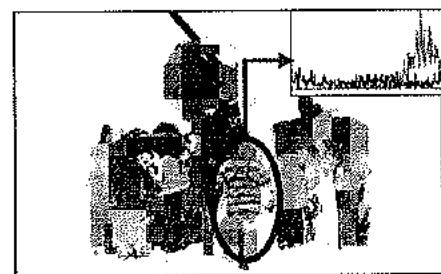


図2. 色情報を使った個人認証の結果

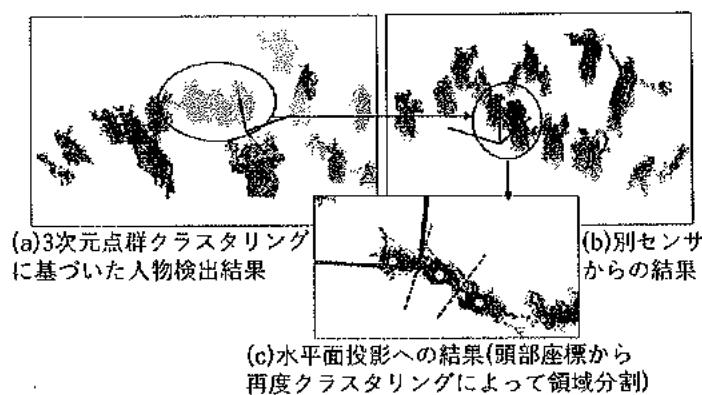


図3. クラスタリングによる人物検出の結果

服の色情報を用いて、追跡対象を認識する。あらかじめ登録した服の色ヒストグラムと、人物検出した結果により抽出した服の色ヒストグラムに対してIntersectionにより類似度

を計算し、認識する。マッチングの結果をパーティクルフィルタの観測値として追跡を行う。図2(a)に一人の対象の色ヒストグラムを示す。追跡は人物検出結果の水平への投影で行う。一人の子どもの追跡結果は図4に示す。水色の円形は子どもの居場所を示しており、ピンク色の点は追跡対象の軌跡を示す。19人がいる混雑環境下での追跡結果を人工的に記録した軌跡と比較する。提案手法では全員に対し長時間の追跡が可能で、90%以上の時間で正しい追跡されていることがわかる。最も良い結果としては追跡平均誤差が11.24cmで、分散が7.8cmである。それに対し、最も悪い結果としては追跡平均誤差が152.8cmで、誤差分散が102.4cmである。精度が低い対象としては同様な服色情報をもつ複数人に集中している。

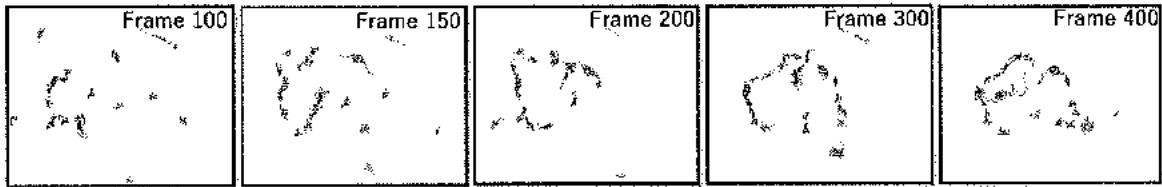


図4. パーティクルフィルタによる人物追跡の結果

子どもたちがリトミックを行うシーンを3ヶ月ごとに計測し、子どもたちの成長とともにパフォーマンスの変化する様子を記録する。子どもの運動範囲と運動量の変化が、子どもの成長を反映しているという意見を実際に保育士からもらったため、提案システムによって計測した行動軌跡から運動範囲と運動量を計算する。図5 (a) に示したドラムゲーム中の先生と子どもの運動量が図5 (b) であり、3人の運動範囲が図5 (c) である。成長とともに運動量と範囲が増加すると考えられるため、今後提案システムを用いた長期的な観測により定量的な指標を定義できる可能性がある。さらに、子どもの相対的な距離から、子どもの人間関係が推定できる可能性がある。図5 (a) のゲーム中に、2人の子どもと先生との相対距離の平均は1.768mと0.797mとなっている。距離の近い子どもは先生とより親しい関係を持っていることが予想される。さらに、子どもの間の相対距離が小さい方は仲がいいと予想される。ただし、この定量的な推定結果は相対距離の情報のみを用いたため、実際の人間関係をうまく反映したかを現場の保育士からヒアリングして評価する必要があり、今後の課題である。

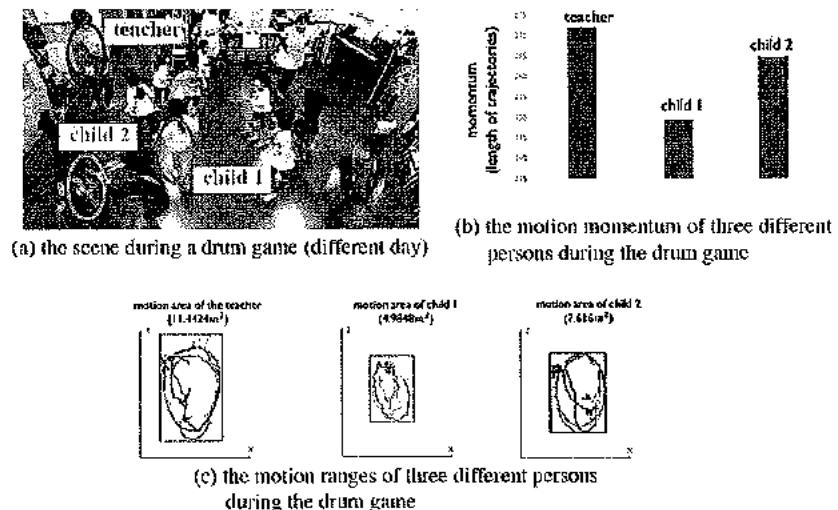


図5. ドラムゲーム中各人の運動量と運動範囲

4. 成果・考察

本研究の成果として、教育支援システムのための子どもたちの行動追跡システムを開発した。追跡結果に基づき、子どもの行動分析を行い、心的状態を推定してみた。その推定結果を利用し、保育士に情報を提供することで、一人一人に適した保育の実現に役に立つ。また、提案したシステムは汎用性のある環境理解手法として、様々な場面において応用できる。ここで、体表的なものを3つ述べる。

(1) 複数人物の行動理解のためのセンサシステムの構築

保育園のような複数人が存在する混雑環境下で、各々の行動を理解するために、環境全体をモニタリングする必要がある。本研究で提案するセンサシステムは日常活動に影響しないよう、教室の隅に設置した。オクルージョンの影響を削減するため、複数の視点からセンサを設置し、上から見下ろして情報を取得した。また、視野を拡張するためには、必要に応じて、センサの数を追加することも可能であり、全方位で環境をモニタリングすることができる。各センサは独立の情報処理プロセッサー（ノートパソコン）を持っており、無線を通じて中央情報処理機器と繋がるため、複雑な配線が必要としない。

(2) 混雑環境下で複数人物のロバストな追跡

複数人が走り回ったりしている混雑環境下で、それぞれの人物を追跡するためには、複数センサから取得したRGB-D情報に基づいたロバストな追跡手法を考案した。まず、クラスタリング手法を用いて三次元の人物領域を検出する。同時に、カラー画像に対し、ディープラーニング（YOLO）手法を用いて人物の数を検出し、対応する人物領域を人数分に有効な色情報を取得する。それから、抽出した色情報を登録した個人の色情報とマッチングすることで個人認識を行う。最後、個人認識の結果をパーティクルフィルタの観測情報として用いて、人物検出結果を水平面への投影に対し、子ども各々に対して追跡を行う。

(3) 行動分析による人物の心的状態理解

子どもたちの行動を長期的に観察することで、成長とともに動きの変化が把握できる。それから、各子どもの移動量や他人の相対位置関係から、授業に対する興味や仲間関係などの情報が推定する。推定結果を保育士に提供することで、子どもの状況をよりうまく把握でき、一人一人に適した保育が実現できると期待している。ただし、現段階では、各子どもの運動量、運動範囲、相対位置関係から子どもの状態を簡単に推定している（例：ゲーム内容に慣れていくと子どもの運動範囲が広がり、運動量が増える）。推定結果の適切さの判断は保育士に頼っている。

今後は人物の心的状態を自動的に推定するように研究を進みたい。保育士は子どもの状態を推定する際の判断基準をヒアリングし、手動でアノテーションした結果と子どもの行動分析の結果をディープラーニングの学習データとして扱い、心的状態を推定する深層ニューラルネットワークモデルを構築する。

持続可能な社会のための再生可能な有機ヒドリド試薬の創製

神奈川大学工学部 特別助教
松原 康郎

【序論】

近年、持続可能な社会の構築のため、人工光合成の研究が注目されている。光合成において有機ヒドリドは二酸化炭素からでんぶん材料を合成するための「試薬」として用いられている(図1)。人工光合成の研究や有機合成化学においてもヒドリド試薬は重要な還元剤として頻用されている。しかし自然と異なり、有機ヒドリド試薬の使用はラジカル二量化等の副反応が起こりやすいため、環境に重負荷な無機ヒドリド試薬が使用されることが多い。

そこで本研究では、(1) 使用中に意図せぬ副反応が起こらず、(2) 使用後も容易に再生できる様な有機ヒドリド試薬を創製することを目的とし、有機分子の一つである1,3-イミダゾリウムの電気化学的還元特性を調べた。

1,3-イミダゾリウムは、例えば好熱性メタン細菌中で有機ヒドリド分子の骨格に含まれており、優れた有機ヒドリドの前駆体となることが明らかにされている。しかし、1,3-イミダゾリウム分子をフラスコなどの反応容器中で用いようとすると、1電子還元された際に1電子還元体の2位の活性炭素中心同士での二量化反応といった副反応が起こりやすく[1,2]、容器中で不活性化してしまう問題がある。そこで、有機合成化学的に1,3-イミダゾリウムの立体構造を制御し活性部位である2位の炭素中心周辺を保護(もしくは安定化)することを考えた。具体的には、(1) 1,3位の窒素原子上に嵩高い置換基の導入、(2) さらに、2位の炭素上にも同様に嵩高い置換基の導入、の2通りが挙げられる。一般に、(1)のような合成法は多く存在するが、(2)のような化合物の合成法は、立体障害が大きすぎることから容易ではない。そのため、基礎的な合成法から検討を行い、合成した種々のイミダゾリウムの電気化学的反応性を評価した。

【結果と考察】

1. 嵩高い種々のイミダゾリウムの合成

活性炭素中心を保護するために、嵩高い置換基を導入したイミダゾリウムの合成を行った。予備的な分子軌道計算により1,3位に

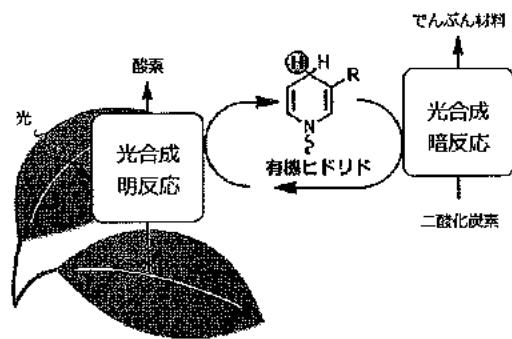
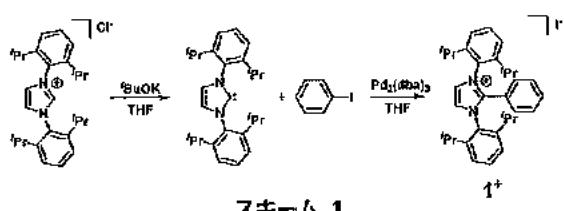
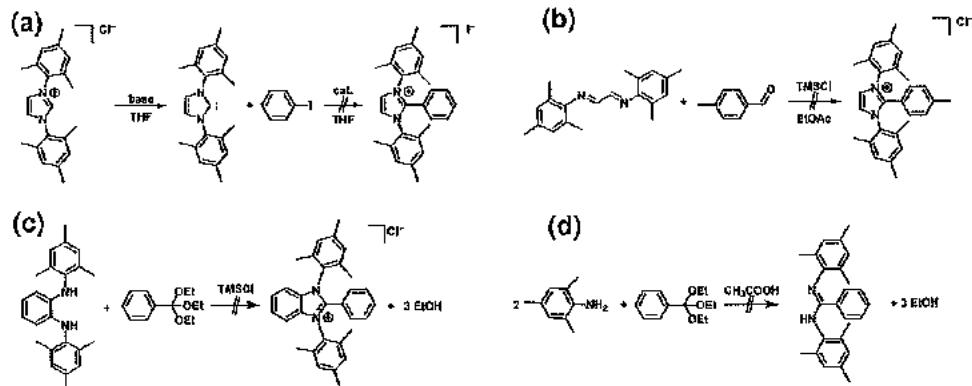


図1. 光合成は、光を利用する「明反応」部分と、でんぶん原料を合成する「暗反応」部分からなり、これらは有機ヒドリドを介してつながっている。



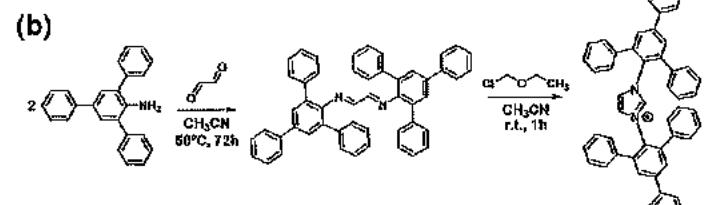
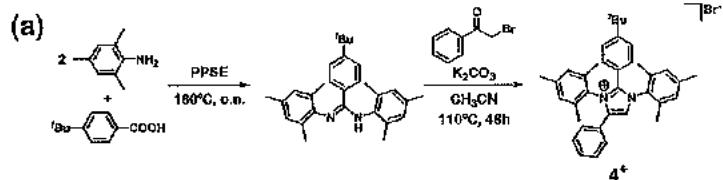
イソプロピル基、2位にフェニル基を導入したイミダゾリウム 1^+ (スキーム1)では、 H^+ に対して、活性部位の立体障害が大きすぎてしまうことがわかった。そこで、1,3位にメチル基、2位にフェニル基を導入したイミダゾリウムの合成を試みたが、1,3位にメチル基を導入したN-ヘテロ環状カルベンの2位の炭素上にフェニル基をカップリングさせることは

困難であった(スキーム 2a)。これは、カルベンが Pd 触媒の良い配位子となってしまい、還元的脱離が起こらなくなっているためであると考えた。そ



スキーム 2

のため、別の合成ルートを模索した結果(検討した合成法をスキーム 2 に示した)、リン酸触媒であるポリリン酸トリメチルシリルエステル(= PPSE)を用い、アニリンとカルボン酸を原料としてアミジン経由[3]で閉環反応を行ったところ、目的物であるイミダゾリウム 4^+ を得られることがわかった(スキーム 3a)。また 1,3 位に立体障害の大きい置換基としてターフェニル基を導入する場合、アニリンからジイミン経由[4]で閉環反応を行うことでイミダゾリウム 5^+ を得た(スキーム 3b)。



スキーム 3

2. 電気化学測定による反応性の評価

図 2 に示すイミダゾリウムにおいて 1 電子還元種の挙動を電気化学測定によって検討した。 1^+ および 4^+ を掃引速度 0.1 V/s で測定すると可逆な還元波がみられたのに対して、

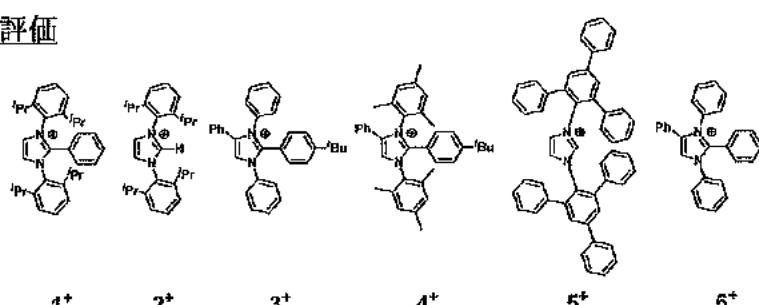


図 2. 本研究で 1 電子還元種の安定性を検討したイミダゾリウム。

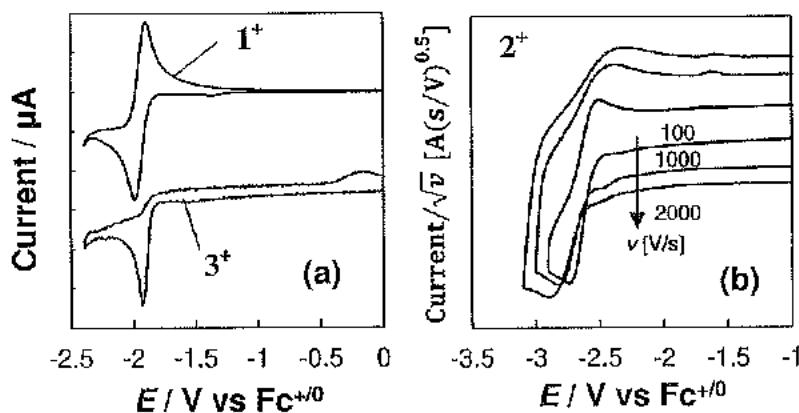


図 3. (a) イミダゾリウム 1^+ および 3^+ のサイクリックボルタモグラム(CV)。(b) イミダゾリウム 2^+ における CV の掃引速度依存性。測定は、イミダゾリウム(10 mM)と $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{PF}_6^-$ (0.1 M)を含むアセトニトリル中で作用電極として(a) グラッシャーカーボン(直径 3 mm); (b) 微小電極(ガラス状炭素; 直径 7 μm)を用いて窒素雰囲気下で行った。

2^+ および 3^+ では不可逆であった(図3a)。そこで、 2^+ を速い掃引速度で測定したところ可逆な還元波がみられた(図3b)。 2^+ のような嵩高いイソプロピル基を有する置換基を導入しても遅い掃引速度の場合、二量体が生成されていることが考えられる。つまり、速い掃引速度であれば二量化反応する前に電子の授受が可能である

ことを示している。また、イミダゾリウム 5^+ を掃引速度 0.1 V/s アセトニトリル中で測定したところ、還元波は不可逆であった。かなり嵩高い構造であるにもかかわらず、2位の炭素中心での二量化反応が進行することを示している。これは次節で述べる量子化学計算の結果からも支持された。一方で、同溶液で高速掃引を行ったところ、還元波の可逆性が増した(図4a)。掃引速度 1000 V/s のとき、ラジカルの酸化波(B_1)と二量体の酸化波(B_2)が同程度の大きさで観測されたことから二量化反応の速度定数 k_2 を約 $1\times 10^6\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と算出できた。そこで、さらに詳しく検討するために、溶媒を極性の低いテトラヒドロフランに変えて高速掃引を行ったところ、 1000 V/s で可逆的に応答することがわかった(図4b)。電位をさらに負側まで掃引することにより還元波は不可逆となり、アセトニトリル中と同様に-1.6V付近の二量体の酸化波(B_2)が観測された。これらのことから1,3位の置換基をかなり嵩高くしても二量化を抑制することは難しいとわかった。

これらのイミダゾリウムを水素化ホウ素ナトリウムによって反応させ、 $^1\text{H NMR}$ による生成物の検討も行った。その結果、イミダゾリウム 6^+ のみがヒドリド還元されることがわかった。このことから、 1^+ および 4^+ ほど嵩高い構造であると、二量化反応が起こらない一方で、 H^+ でさえも反応しにくくなってしまうことがわかった。基本骨格が同じであり立体障害の小さいイミダゾリウム 3^+ が還元されなかつた原因としては反応速度が遅いため、もしくは、電子的要因が考えられる。これらの結果から、イミダゾリウムよりもヒドリド受容能が上がるベンゾイミダゾリウム骨格の化合物でヒドリド還元反応を検討する必要があることがわかった。

3. 量子化学計算による二量化反応の予測

副反応として生成する二量化体の安定性に関して知見を得るために、イミダゾリウムの一電子還元種(イミダゾリルラジカルの二量体における安定化構造を計算した。図5に示す様に、

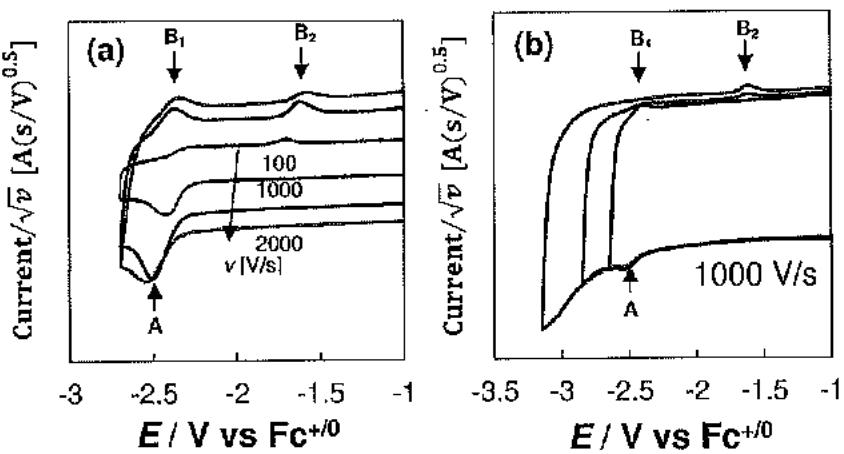


図4. (a) イミダゾリウム 5^+ におけるサイクリックボルタモグラム(CV)と掃引速度依存性。イミダゾリウム(10 mM)と $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{PF}_6^-$ (0.1 M)を含むアセトニトリル中、作用電極として微小電極(ガラス状炭素; 直径 $7\text{ }\mu\text{m}$)を用いて窒素雰囲気下で測定した。(b) テトラヒドロフラン中他は同条件での結果。

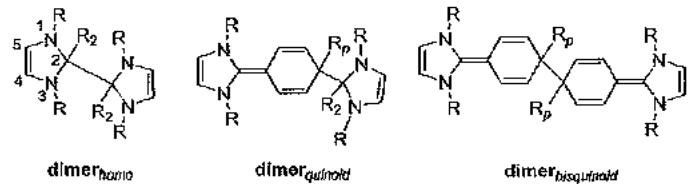


図5. イミダゾリウムが1電子還元された時に取りうるカップリング生成物の構造。

イミダゾリルラジカルが取りうるカップリング生成物の構造は、2位の炭素ラジカル同士での二量化($dimer_{homo}$)に加え、2位の置換基がフェニルの場合、キノイドとの二量化($dimer_{quinoid}$)およびキノイド同士での二量化($dimer_{bisquinoid}$)が考えられる。

図6に、計算したそれぞれの二量化反応における電子エネルギーの変化を示した結果を示す。1・および4は二量化体のエネルギーがどの構造でもラジカルと比べて大きく不安定になることがわかり、これは、電気化学測定において完全な可逆を示した結果と一致する。2位の炭素中心の構造がC-Hである2および5では、 $dimer_{homo}$ の電子エネルギーは同程度の結果となった。これらのイミダゾリウムはどちらも電気化学測定において高速掃引を行うと可逆になったことから、速度論的に二量化が阻害されていると考えられる。また、それぞれの1,3位に結合しているフェニル基のオルト位にジイソプロピル基を有する2と、フェニル基を有する5で比較すると置換基による効果は類似していることがわかった。これらのことから、イミダゾリウム上の置換基の設計が重要であり、置換基の高さによって二量化反応の程度が左右されることが示唆された。

【結論】

本研究では、再生可能な有機ヒドリド試薬の創製に関して、持続可能な社会を構築するための有機分子として1,3-イミダゾリウム分子の電気化学的な還元特性を調査した。その結果、イミダゾリウムを再生不可能に至らしめているラジカル二量化反応の速度は、イミダゾリウム環周りの立体環境によって大きく影響されることが明らかになった。また、ヒドリド還元反応も検討し、イミダゾリウム骨格自体は、ベンゾイミダゾリウム等の拡張π共役系を用いる方が良いことがわかった。これらの知見は、再生可能な有機ヒドリド分子の設計において重要な指針となるものである。

【参考文献】

- [1] D. Rottschäfer and R. S. Ghadwal *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 4765-4768. [2] C. H. Lim and C. B. Musgrave *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 272-280. [3] S. Ogata, A. Mochizuki, M. Kakimoto and Y. Imai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1986**, *59*, 2171-2177. [4] S. G. Alexander, M. L. Cole and J. C. Morris, *New J. Chem.*, **2009**, *33*, 720-724.

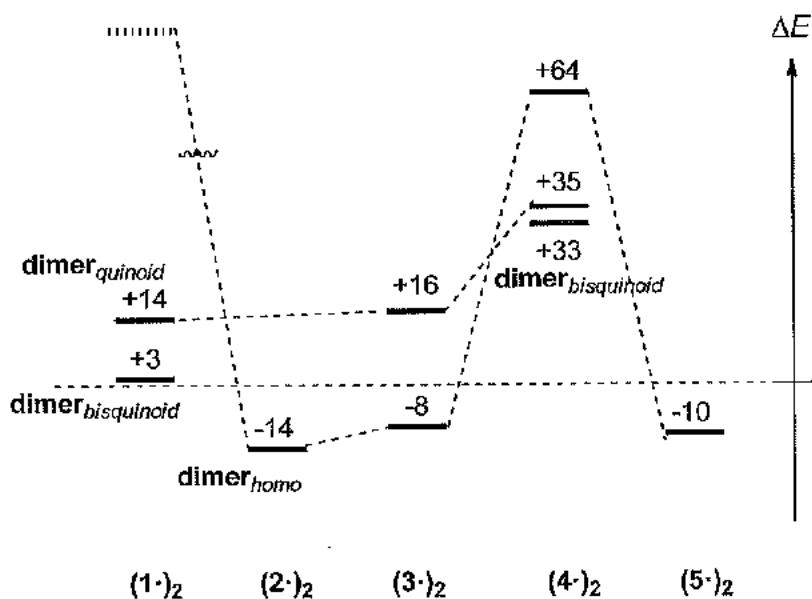


図6. イミダゾリルラジカル(1-5)の二量化反応における電子エネルギーの変化。ラジカル2個分のエネルギーを基準とした値(kcal / mol)で示す。電子エネルギーは、溶媒和モデル(アセトニトリル)中で密度汎関数法によって最安定化させた構造を基に算出した(UPW6B95+D3BJ+SMD/def2-svp)。

強度とリサイクル性を兼ね備えたホウ酸エステル構造に基づく環境低負荷ハイブリッド材料の創製

神奈川大学工学部 特別助教
高橋 明

(研究目的)

本研究はホウ酸エステル($B(OR)_3$)を構成単位とする環境低負荷・高機能ハイブリッド材料の創製を目的として遂行した。ホウ酸はホウ酸塩鉱物を精製することで得られる天然資源の一つであり、ガラス原料や各種薬剤として用いられている。ホウ酸とアルコールの脱水縮合により合成されるホウ酸エステルはC-C結合の1.5倍以上の結合エネルギーをもつB-O結合を有しており、さらに加水分解により可逆的かつ簡便に出発原料へと分解可能である。すなわち、ホウ酸エステルを基本骨格としてポリマーを合成することで強度と分解・リサイクルの簡便さの相反する要素を併せ持つ有機無機ハイブリッドポリマーが得られると着想し、今回これを検証した。

(研究方法)

ホウ酸またはイソプロピルボレートを種々のジアルコールおよびモノアルコールとともに等モル条件で脱水縮合を行うことで(図1)、ポリボレートの合成を検討した。溶媒は水またはアルコールと共に沸する溶媒を選択し、加熱還流条件下でのDean-Starkトラップを用いた脱水、硫酸銅(II)による脱水、および減圧下での共沸除去等の方法による水・アルコール類の系外除去を検討した。

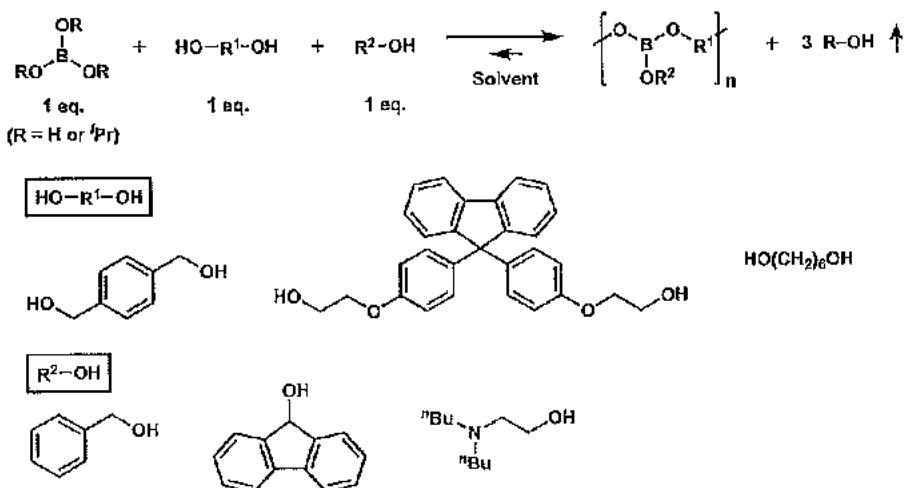


図1. ポリボレート合成スキームおよび代表的な原料の構造.

(結果・考察)

最初の検討として、ホウ酸を1,4-ビス(ヒドロキシメチル)ベンゼン(HMB)、ベンジルアルコール($BnOH$)を水/トルエン混合溶媒に溶解し、Dean-Starkトラップを装着したプラスコ

中、104 °Cで22時間加熱することでポリボレートPB-1の合成を検討した（図2）。反応の結果、粉末状固体と塊状固体の2種類を得たが、前者は各種の解析から原料の混合物であることがわかったため、塊状固体について構造解析を行った。しかし、反応混合物の¹H-NMR測定では生成物の存在割合が非常に小さいことがわかり（表1）、さらに親水性の測定溶媒中ではよりその割合が低下する傾向が見られた（図3）。以上の結果から、元々の脱水縮合自体の反応率が低いこと、および生成物が非常に加水分解を受けやすいことが示唆された。

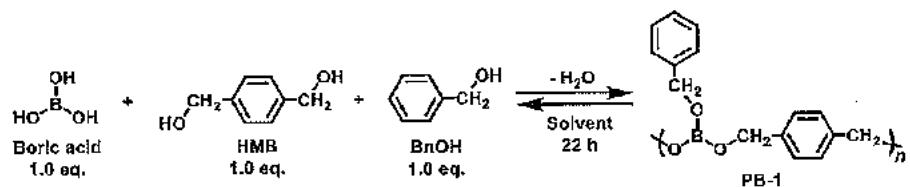


図2. 脱水縮合によるポリボレートPB-1の合成スキーム。

表1. PB-1の合成条件および結果

Polymer	Solvent (conc.)	Temp. (°C)	Time (h)	Yield (%) Bulk	Yield (%) Powder	CH ₂ -OB/CH ₂ -OH in crude (%)
PB-1a	Toluene/H ₂ O (15/2, 0.34 M)	110	22	13.1	36.0	16.4
PB-1b	CPME/H ₂ O (15/2, 0.67 M)	105	22	42.3	—	14.8

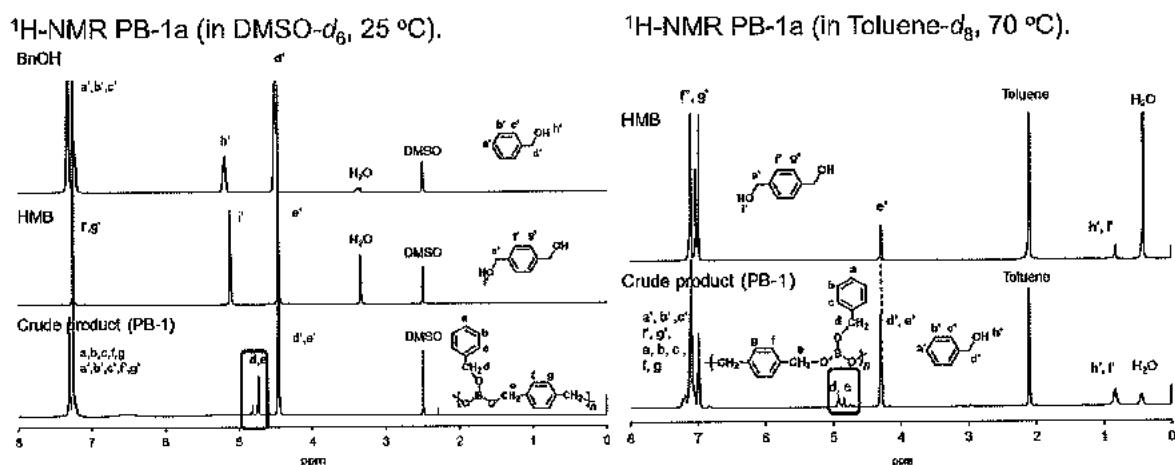


図3. 種々の測定条件におけるPB-1aの¹H-NMRスペクトル。

続いて、より疎水性の高い骨格を用いることで加水分解を抑制できると考え、より多くの芳香環から成るフルオレン含有ジアルコール(BHEPF)およびモノアルコール(Fnol)を用いて、同様に脱水縮合を検討した（図4）。しかしながら、結果はHMBおよびBnOHを用いた場合と大きく変わらず（表2）、同様に生成物の加水分解性の高さから十分に脱水縮合が進行しない結果となった。

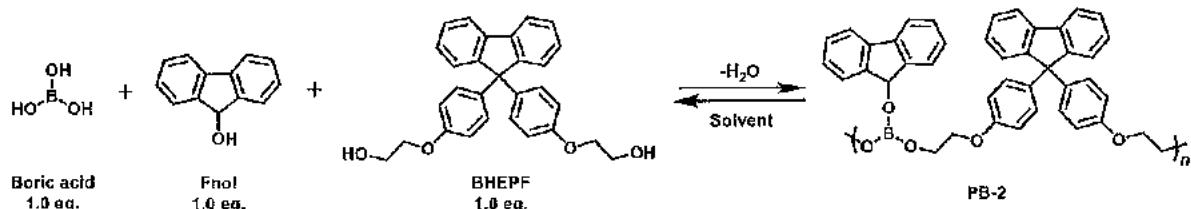


図4. 脱水縮合によるフルオレン骨格含有ポリボレートPB-2の合成スキーム。

表2. PB-2の合成条件および結果

Polymer	Solvent (conc.)	Temp. (°C)	Time (h)	Yield (%) Bulk	Yield (%) Powder	$\text{CH}_2\text{-OB}/\text{CH}_2\text{-OH}$ in crude (%)
PB-2a	Toluene/H ₂ O (12/1, 0.63M)	110	23	23.1	58.5	25.1
PB-2b	CPME/H ₂ O (8/1, 0.75M)	100	20	49.1	11.8	19.4

ここで、ホウ酸エステル結合はホウ素上の空軌道に水分子が攻撃することにより起こる。従って、空軌道をルイス塩基等の孤立電子対により塞ぐことで加水分解が抑制できるのではないかと考え、モデル化合物としてジブチルアミノエタノール(DBAE)、3-フェノキシ-1,2-ブロパンジオール(3PP)とトリイソプロピルボレート(TIPB)を用いて低分子モデルN配位ボレートB-1の合成を検討した(図5)。その結果、¹H-NMRから縮合反応の進行を確認し、さらに¹¹B-NMRからB-1のホウ素上の電子密度がTIPBより高いことが分かった(図6)。即ち、

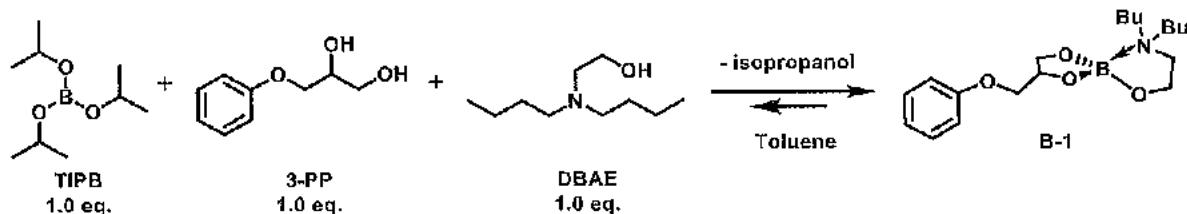


図5. 低分子モデルN配位ボレートB-1の合成スキーム。

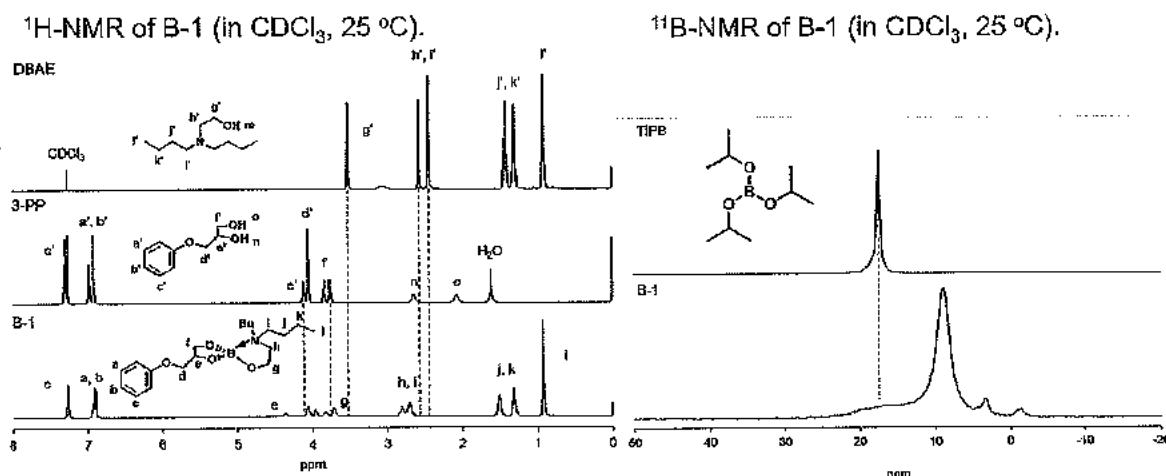


図6. 低分子モデルN配位ボレートB-1の¹H-, ¹¹B-NMRスペクトルおよび原料との比較。

DBAEのN原子が効果的にB原子に配位することで、ホウ酸エステル（ポレート）構造が安定化されたことが示唆された。

この結果を元に、同様の条件で1, 6-ヘキサンジオール(HD)とDBAEを用いてPB-3の合成を検討した（図7）。¹H-NMRから縮合反応の進行が示唆された一方、¹¹B-NMRではB-1とは異なり、PB-3のピークトップが原料のTIPBと比べて大きく変化しなかった（図8）。このことから、B-N結合は形成されたがB-1よりも弱いことが分かり、1, 2-ジオールによる立体構造の安定化もB-N結合の形成に寄与することが示唆された。

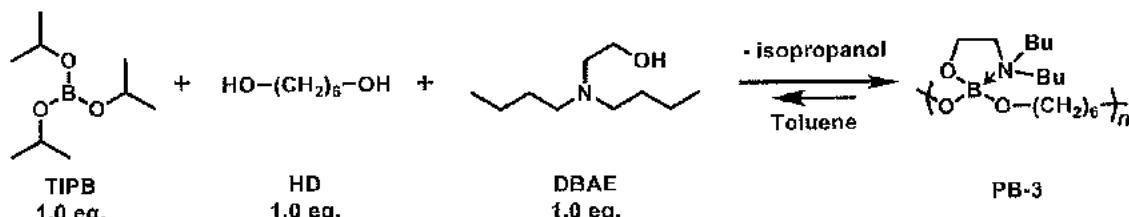


図7. N配位ポリポレートPB-3の合成スキーム。

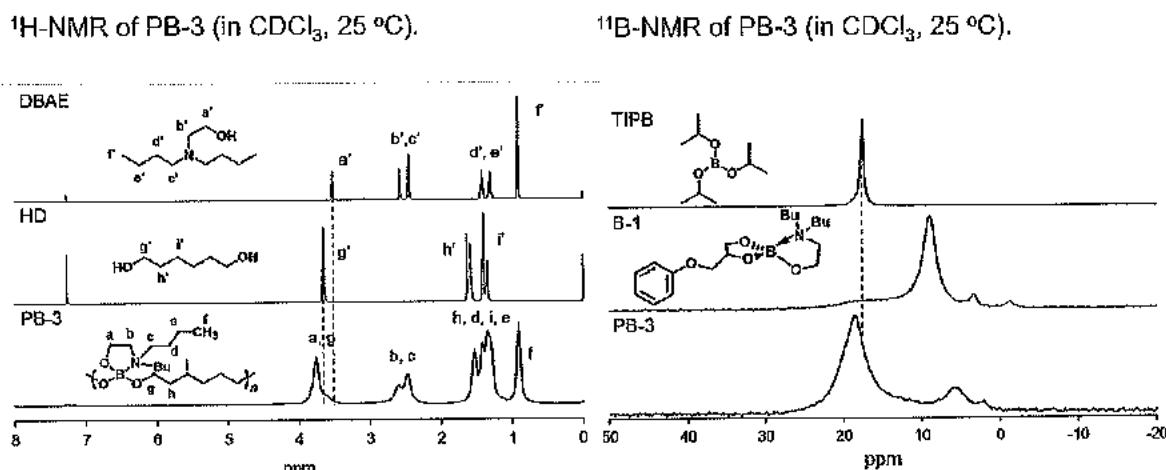


図8. N配位ポリポレートPB-3の¹H-, ¹¹B-NMRスペクトルおよび原料等との比較。

(まとめ・成果)

本研究ではホウ酸類と種々のアルコール類を用いたポリポレートの合成と、生成物の加水分解を抑制するための分子設計について検討を行い、生成物の諸特性について明らかにした。本来ターゲットとしていたポリポレートが加水分解性の高さにより合成が難航することとなつた一方、N配位ポレートという新たなポリポレート合成アプローチを着想でき、学術的にも目新しいポリポレート研究への展開につながった。これについては現在もさらなる検討を重ねており、それらの研究成果は今回得られた知見と合わせて今後の学会や学術論文等において発表する。

[学会発表]

高橋 明, 王 文瑞, 龍山 敦, ホウ酸類を原料とした安定ポレートエステル類およびポリマー誘導体の開発, 第69回高分子学会年次大会, 3Pd104, 福岡, 2020年5月.

“微・微生物”の探索：横浜の海から展開する超微小微生物の生態研究の最前線

横浜市立大学理学部 助教
守 次朗

(研究目的)

地球上では、我々ヒトの目に見えないサイズの微生物が様々な環境に生息している。中でも、最もサイズの小さいグループに属するのが細菌（バクテリア）や古細菌（アーキア）であり、その標準的な細胞サイズは $1\text{ }\mu\text{m}$ 程度である。その小ささ故に、他の高等生物のように、「一目見ただけ」でその種類を特定することや、詳しい生態を知ることはできない。よって、こうした微生物の環境中での役割を知るためにには、環境中からできるだけ多くの微生物を捕集し、それらを実験室で培養して増やしたり、その遺伝子を抽出してゲノム情報を調べたりする必要がある。こうした、研究に用いる微生物の捕集、もしくは除菌を目的とした微生物の除去のため、生命科学研究全般、および医学、食品衛生、工学等の幅広い分野において、孔径 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ の除菌フィルターが広く汎用されている。先に述べた通り、バクテリアやアーキアの細胞サイズは $1\text{ }\mu\text{m}$ 程度であることから、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ の孔を通過することができないため、全ての微生物をこのフィルター上に捕集することができる。

ところが、既知の微生物よりも細胞サイズが小さく、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ フィルターを通過することができる微生物が自然界に少なからず存在することが、1980年代から提唱されてきた。こうした微生物は「超微小微生物(Ultra-small microorganisms)」などと呼ばれている。超微小微生物が自然界に広く分布しているとすれば、上述した多分野における除菌フィルターの運用について、無視できない課題を与えることとなる。しかしながら、超微小微生物の分布や詳しい生態については、ほとんど明らかになっていない。

本研究に先立って、当研究グループでは、横浜市金沢区の沿岸海水から $0.2\text{ }\mu\text{m}$ フィルターを通過できる細菌株(Ultra-small bacterium H-1株)の単離・培養に成功している。超微小微生物はこれまでに、地下水や砂漠といった貧栄養環境から単離されたものが複数報告されているが、これらに比較して栄養条件が優れないと考えられる沿岸海水においては、こうした超微小微生物の単離株はほとんど報告がない。そこで本研究では、以下の三つの課題の解決をめざした。

課題(1) 海水超微小微生物画分のマイクロバイオーム解析

課題(2) 超微小微生物H-1株の生理・形態研究

課題(3) 超微小微生物H-1株の全ゲノム解析

(研究方法)

(1) 海水超微小微生物画分のマイクロバイオーム解析

H-1株は、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ フィルターを通過した海水を孔径 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ フィルターに通過させ、フィルター上に捕捉された微生物画分から単離された。 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ の各フィルター上に捕集し

た海洋微生物群集からそれぞれ菌体DNAを抽出し、生物技研（株）の微生物16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンス解析(Illumina MiSeq platform)に供することで、それぞれの画分の微生物叢の解析を行った。

(2) 超微小微生物H-1株の生理・形態研究

単離されたH-1株の簡易的な遺伝子解析の結果、これは*Flavobacterium*属近縁の未分類の細菌種であることが示唆されている。そこで、H-1株を異なる条件で培養してその生育を評価し、その生育条件や生理機構の詳しい特徴付けを行った。具体的には、H-1株を異なる炭素源・窒素源濃度条件下で培養し、その増殖能力を評価した。さらに、培養したH-1株の細胞を光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡で観察することで、H-1株の細胞のサイズや形状を詳しく解析し、また、異なる培養条件下での細胞の形状やサイズへの影響について調べた。

(3) 超微小微生物H-1株の全ゲノム解析

培養したH-1株から菌体DNAを抽出し、生物技研（株）の微生物ゲノムシーケンス解析(Illumina MiSeq platform)に供することで、H-1株の全ゲノム配列を解読した。得られたゲノム情報について、Joint Genome Instituteが提供するIntegrated Microbial Genomes System (IMG)データベースを用い、その詳しい系統や、機能性遺伝子の有無を調査した。これらの結果について、課題(2)の結果と照合することで、H-1株の代謝能力や生態系における役割について考察した。

（結 果）

(1) 海水超微小微生物画分のマイクロバイオーム解析

0.2 μm フィルターを通過し、0.1 μm フィルター上に捕捉された微生物群集構造を解析したところ、海洋中に普遍的に存在する未培養のバクテリア群であるSAR11グループがそのおよそ半分(49.9%)を占めており、次いで未培養の放線菌の一一種であるOCS155と呼ばれるグループが豊富に存在していた(18.1%)。H-1株が属するFlavobacteriaceae科は、全体のおよそ2.74%を占めており、SAR11、OCS155、Microbacteriaceae、Coxiellaceae、Bacteriovoracaceaeに次いで6番目に豊富なグループであった(図1A)。また、0.2 μm フィルター上の微生物画分では、Flavobacteriaceaeは全体の22.23%を占め、最も優占的なグループであった(図1B)。

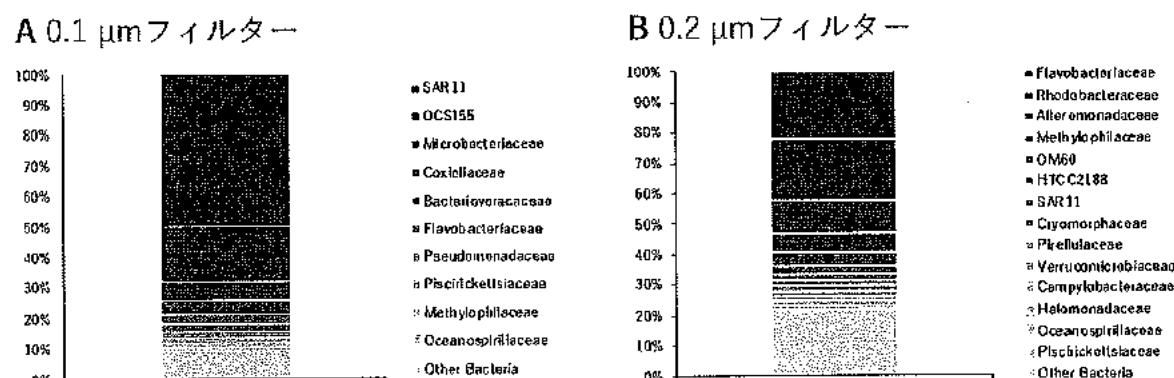


図1: 孔径0.1 μm (A)、0.2 μm (B) 各フィルター上に捕捉された海洋微生物群集の細菌叢解析結果 (16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンス)

(2) 超微小微生物H-1株の生理・形態研究

H-1株は炭素源としてグルコース、窒素源として塩化アンモニウムをそれぞれ10 mMの濃度で与えた人工海水培地中で活発に増殖した。これらの炭素源、もしくは窒素源を除いた条件で培養すると、いずれの場合においてもH-1株の増殖は全く見られなかった。しかし、それぞれの栄養源を1/100量に制限した0.1 mMの濃度条件では、増殖速度は著しく低下したもの、増殖が確認できた。

増殖したH-1株の細胞を光学顕微鏡で観察すると、長さが5-10 μm程度の非常に細長い桿菌であることがわかった(図2A)。さらに細胞のサイズを正確に測定するため、走査型電子顕微鏡下で観察・測定したところ、細胞の太さは280 nm (0.28 μm)程度であることがわかった(図2B)。興味深いことに、炭素源であるグルコースを1/100量に制限した培養物中においては、細胞の太さが240 nm (0.24 μm)程度とやや細くなる傾向が観察された(図2C)。

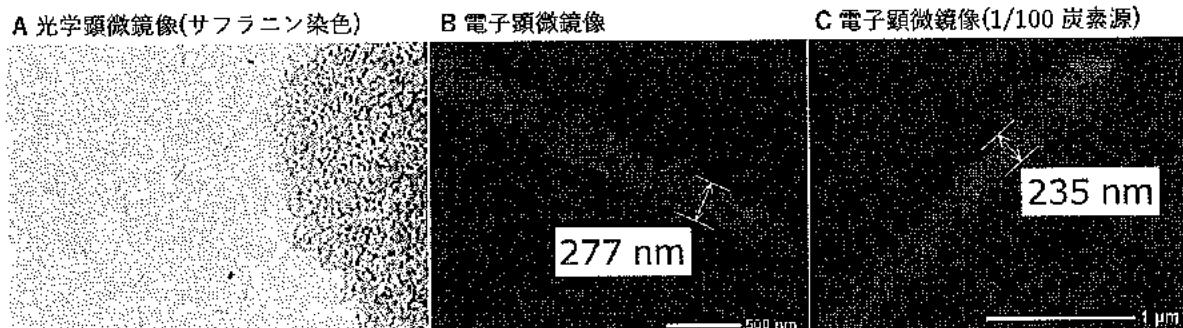


図2: 光学顕微鏡(A)および走査型電子顕微鏡(B, C)を用いたH-1株細胞の検鏡像

(3) 超微小微生物H-1株の全ゲノム解析

H-1株の全ゲノムシーケンスによって、4,057,822 bpの塩基配列を解読し、およそ完全長(98.4%)のゲノム情報を得た。得られたゲノム情報を元にH-1株の詳しい系統解析を行ったところ、データベース上の最も近縁な細菌株 (*Algibacter alginicilyticus* HZ22株)との遺伝子相対性が77.32%にとどまり(表1)、属レベルで新規の細菌種であることが示された。

さらに、H-1株のゲノム上にコードされた機能性遺伝子を解析すると、従属栄養生物に見られる有機炭素源を栄養源として利用する既知の遺伝子群が検出された。一方で、独立栄養生物に見られる炭酸固定の遺伝子群や、窒素固定細菌に見られる窒素固定の遺伝子群は検出されなかった。これらの結果は、先の培養試験の結果を支持するものであった。

表1: H-1株およびその近縁細菌種ゲノム間における遺伝子相同意解析結果

H-1株 近縁細菌種	遺伝子相同意 (全ゲノム配列)	遺伝子相同意 (16S rRNA遺伝子)
<i>Algibacter alginicilyticus</i> HZ22株	77.32%	90.19%
<i>Sediminicola</i> sp. YIK13株	77.24%	90.72%
<i>Kordia</i> sp. SMS9株	77.21%	90.51%
<i>Aquimarina</i> sp. BL5株	76.64%	90.55%
<i>Olleya</i> sp. Bg11-27株	76.53%	90.34%

(成果・考察)

0.2 μm、0.1 μmの各フィルター上に捕集した海洋微生物群集の解析により、金沢湾沿岸より採集した海水中にはFlavobacteriaceaeに属する細菌群が最も豊富に存在し(図1B)、0.2 μm フィルターを通過したH-1株もこのグループに属するものであった。Flavobacteriaceaeは0.2 μm フィルターを通過した画分においても全体の6番目に豊富なグループとして存在していたが、この画分においては、未培養の細菌群として知られるSAR11やOCS155と呼ばれるグループがより豊富に存在していた(図1A)。従って、過去の文献でも報告されている通り、0.2 μm フィルターを通過する多様な海洋微生物が存在するが、その多くは実験室において培養が困難であることが示唆された。それでも、本研究において、海洋中に最も豊富に存在する細菌種の一つであるFlavobacteriaceaeに属し、0.2 μm フィルターを通過する新規の細菌種であるH-1株の単離・培養に成功した。また、培養試験や顕微鏡による検鏡、ゲノム解析を通してその詳しい形態・生態について調査することができた。

H-1株は、その培養試験とゲノム解析の結果から、炭酸固定や窒素固定の能力を持たず、炭素源と窒素源を有機物に依存する従属栄養性の細菌であることがわかった。こうしたライフスタイルは、沿岸海水環境中において最も豊富に存在する「ありふれた」グループであると考えられる。しかしながら、H-1株の細胞は5-10 μmと長く、一方で0.3 μmに満たないという細長い独特な形状をしていた。さらに、その細胞の太さは、栄養源が制限された条件下では文字通り「痩せ細る」ことも示唆された(図2BC)。実験室での培養条件と比較し、自然環境中では利用できる栄養源が制限されており、その結果、H-1株の細長い細胞は0.2 μm フィルターを通過したと考えられる。よって、H-1株は既知の微生物よりも極端に細胞サイズの小さい「超微小微生物」には該当しないと考えられるものの、こうしたユニークな形態により除菌フィルターを通過したと予想される。また、このことは、同様な形態の細胞を持つ微生物が環境中に普遍的に存在する可能性を提唱するものである。

0.2 μm フィルターを通過でき、また実験室で継続的に培養可能なH-1株は、海水中に普遍に存在するFlavobacteriaceaeに属するが、最も高い遺伝子相同性を持つもの(*Algibacter alginicilyticus* HZ22株)との遺伝子相同性はわずか77.32%にとどまった(表1)。このことから、H-1株は属レベルで新規の細菌種であることが示された。H-1株の近縁種はいずれも海洋環境から発見されており、本研究で用いた沿岸海水は他の海洋環境と区別される特筆すべき特徴が無いことから、H-1株も海洋環境に広く分布する細菌種である可能性が高い。細胞サイズの極端に小さい超微小微生物の単離・培養は依然として困難であると考えられるが、0.2 μm フィルターを通過した海水画分から微生物を単離することは、H-1株のような未知・未分類の微生物種を得られる可能性の高い研究アプローチであることを暗示している。現在、H-1株を新規の細菌属として国際データベースに登録申請中であり、また、その詳しい生態・生理機構、ゲノム情報について、研究成果を学術論文で発表予定である。

本研究で得られたH-1株のように、0.2 μm フィルターを通過でき、かつ実験室で容易に培養できる微生物が自然界に広く存在するとすれば、除菌を目的とした濾過法や、研究を目的とした環境微生物の捕集法について、克服すべき課題を与えるものである。今後、異なる場所で採集した海水を用いて同様の実験を行うなどし、H-1株に類似した微生物種の普遍性を評価する研究を行う予定である。

次世代材料応用へ向けたタンパク質結晶の力学特性の解明

横浜市立大学 理学部 助教
鈴木 凌

(研究目的)

本研究の目的は、タンパク質結晶の力学的性質を転位論に基づいて解明することである。転位とは結晶内に存在する欠陥の一つで、材料の強度を決めるファクターの一つである。その転位がどのようにして生成され、運動が引き起こされるのか、応力条件の下でどのようにふるまうのかということを明らかにすることで、タンパク質結晶の強度を理解する。

タンパク質結晶は複雑な形状を有する巨大なタンパク質分子から構成された結晶性材料であり、その分子間には最大70 vol.%もの水が含まれている。これまでの一般的な材料にはない「結晶水を他の物質と置換できる」という類稀な特徴を有していることから、次世代の結晶性生体材料として注目されている (K. Malek, Biotechnol. Lett. 2007)。しかし、そもそも結晶の育成が難しく、力学的性質に関する知見を得ることが出来なかった。

本研究では、研究代表者が高品質化に成功したグルコースイソメラーゼ結晶 (Suzuki et al., PNAS 2018) を対象とする。X線トポグラフィと力学試験を同時にを行うことで、これまで前例のないタンパク質結晶の変形のその場観察を行う。タンパク質結晶は脆く壊れやすいといった定性的知見で留まっていた一方、未解明な変形挙動を明らかにすることで、タンパク質結晶の強度の定量的な理解へと落とし込む。

(研究方法)

2019年度は大きく分けて下記2つの実験を行った。

1. 工業用グレードのグルコースイソメラーゼを利用した高品質結晶の作製

本研究の最重要ポイントの1つが高品質なタンパク質結晶を用いた力学特性の解明であった。X線トポグラフィは結晶の品質に非常に敏感であり、結晶性の定量的な評価を行うことができる手法である。一方、品質に敏感なことから、欠陥が存在する低品質な結晶を用いてしまうと、目的である外から加わった力による影響が見えなくなってしまう。そのため、以前作製に成功した高品質な結晶を用いることで、インデンテーションや圧縮変形などの外力による影響を明らかにすることが出来ると期待していた。そのような状況の中、試薬の販売中止が問題となった。

別の試薬など色々検討を行った結果、工業用の酵素として御しているバイオメーカーが同種のグルコースイソメラーゼを取り扱っていることが分かり、協力を依頼した。試薬こそ廃盤になったものの、グルコースイソメラーゼ自体は清涼飲料水の製造現場で大量に使用される酵素であり、工業的には需要が大きい。一方で、工業的に使用される分、純度は試薬ほど高くなく、放線菌に作製させたグルコースイソメラーゼをそのまま濃縮していることや、防腐剤などの不純物も多く含まれていることが分かっていた。結晶化には目的タンパク質の純度が鍵となる。そこで、高品質な結晶を作製するために精製から条件を探索した。

2. 工業用グレードから得られたタンパク質結晶の品質評価

X線トポグラフィを用いた結晶の品質評価を行う。X線トポグラフィは上述のように結晶内部の欠陥状態が観察することができる。また、結晶を微小回転させながらその回折強度を記録することで、回折強度曲線（ロッキングカーブ）を描くことができる。ロッキングカーブは結晶の品質を評価するうえで一つの指標となる半値幅などを見積もることが出来る。一般に、結晶の品質が高い方がロッキングカーブの幅は狭くなり、より鋭いピークとなる。一方で、欠陥やひずみなどの品質悪化につながる状態が存在する場合、ロッキングカーブの形が広がることや崩れことがある。その強度の分布から結晶の品質を定量的に評価することが出来る。

3. 変形試験に向けたタンパク質結晶の固定方法の確立

後述する応力負荷試験の際、結晶の固定方法は重要になる。力を加えていても、結晶が動いてしまうと、結晶に対して正確な大きさの力を加えることが出来なくなる。さらに、タンパク質結晶は水和した状態が基本体であり、脱水和によって加速度的に結晶の品質が悪化する。そのため、外部から力を加えることが可能であるものの、結晶の乾燥を防ぐことが出来るといった、トレードオフの関係をバランス良く構築しなければならない。そのような条件を満たした結晶ホルダーの作製を行った。

4. 応力負荷によるタンパク質結晶の変形挙動の解明

開発した応力負荷装置を用いて、リアルタイムで観察可能なCCDカメラでX線トポグラフィを撮影しながら無軸位GI結晶に応力負荷を行う。結晶中に発生する軸位の導入過程や軸位の動く方向、その伝搬速度を明らかにする。

(結果)

1. 工業用グレードの試薬から高品質なタンパク質結晶の作製

はじめに、分画分子量の決まった透析膜を利用し、工業用グルコースイソメラーゼの透析を行った。浸透圧効果により、目的のグルコースイソメラーゼの濃度が薄まるので、吸湿性の高分子を利用して濃縮を行い、濃度調製を行った。

結晶化条件のパラメーターとなるタンパク質濃度、沈殿剤濃度、pH、温度の最適化を行った結果、半年以上かかったものの、目的の単結晶の作製に成功した。得られた単結晶を用いて、応力負荷試験を行った。

2. 工業用グレードから得られたタンパク質結晶の品質評価

上述した工業用グレードから得られた結晶の品質評価をX線トポグラフィおよびロッキングカーブ測定により行った。X線トポグラフィからは完全結晶由来のX線の多重反射による干渉縞が見られた。さらに、ロッキングカーブ測定では結晶の回転角度に伴い強度が振動する様子が見られた。これはロッキングカーブの形状が崩れているわけではなく、結晶内部におけるX線の多重反射が明瞭に見られていることを示している。すなわち、工業用グレードといった純度の低いグルコースイソメラーゼを原料とした場合でも、極めて完全性の高い結晶を作製することが可能であることが示された。

3. 変形試験に向けたタンパク質結晶の固定方法の確立

最終的にはまだ改善の余地が多くあるが、結晶を育成した状態からハンドリングフリーで乾燥を防ぐことが出来る状態で応力負荷が可能となるアクリルホルダーの設計を行うことが出来た。実際に後述の応力負荷試験を成功させることができたため、本プロトタイプを原点として、今後も改善を行っていく。

4. 応力負荷によるタンパク質結晶の変形挙動の解明

パルスマーター制御装置を用いて、縫い針をインデンターとして測定を行った。変形条件を確認するため、小さいものでは数 μm 、大きいものでは数十 μm を1パルスの変形量として、X線CCDカメラで観察しながら結晶に縫い針を導入した。結果として、縫い針が結晶に当たった瞬間に変形領域において完全領域とは異なるコントラストが観察された。さらには、応力負荷箇所からハーフループ状のコントラストが発生した様子が明瞭に見られた試料もあった。これらは結晶外形の観察と合わせると結晶欠陥である転位の導入が観察されたものであると考えており、今後の展望として転位のキャラクタリゼーションを行う。

(成果)

・学術論文

1. Marina Abe, Ryo Suzuki, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana, "Evaluation of crystal quality of protein crystals with thin thickness based on kinematical and dynamical theory of X-ray diffraction", IUCrJ, in press.

・学会発表

1. 鈴木凌, 熊坂崇, 馬場清喜, 水野伸宏, 長谷川和也, 小島謙一, 橋勝, 「タンパク質結晶のX線による照射損傷」, 日本物理学会2019年秋季大会(日本, 岐阜), 2019年9月
2. 鈴木凌, 熊坂崇, 馬場清喜, 水野伸宏, 長谷川和也, 小泉晴比古, 小島謙一, 橋勝, 「タンパク質結晶のX線照射損傷の観察」, 第48回結晶成長国内会議(日本, 大阪), 2019年11月
3. Ryo Suzuki, Haruhiko Koizumi, Keiichi Hirano, Takashi Kumazaka, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana, 「Observation of dynamical diffraction in high-quality protein crystals」, 16th Conference of the Asian Crystallographic Association (Singapore), 17-20 December 2019
4. 鈴木凌, 阿部満理奈, 小島謙一, 橋勝, 「タンパク質結晶の動力学的回折に関する研究」, 日本物理学会第75回年次大会(日本, 愛知), 2020年3月

・受賞

1. 鈴木凌, 第48回結晶成長国内会議 講演奨励賞, 日本, 2019年11月
2. Ryo Suzuki, AsCA2019 Rising Star Award, Singapore, December 2019

生体内分子イメージングを志向した発光プローブの創製

横浜市立大学理学部 助教
服部 伸吾

(研究目的)

生体内において発光することで特定の物質や組織を可視化する光機能性分子を発光プローブといい、微小がんの検出に有用な分子イメージングツールとして注目されている（浦野泰照、がんの分子イメージング、化学同人）。強いりん光を示す白金錯体は、会合形成により生体透過性の高い近赤外の発光が可能であり、近年、白金錯体ベースの発光プローブの開発が盛んに行われている（M. Mauro, et al., *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 4144.）。白金錯体は、その構造に依存して基底会合体と励起会合体（光励起後に会合形成）を作製することが可能であり、その会合制御は、(i)発光の生体透過性の向上、(ii)がん細胞における取り込みの選択性の向上等の観点から重要である。一方、会合形成メカニズムに関する包括的な知見は得られていない。この解説には、合成化学に基づく分子創製と理論計算に基づく解析が必要である。本研究では、水溶液中での会合形成が期待できる置換基を導入した白金錯体ベースの新規発光プローブの創製、及び会合形成メカニズムの解明を目的とし、（1）水溶性白金錯体の合成、（2）水溶性白金錯体の分光特性と構造相関性の解明に関する研究を行う。

(研究方法)

(1) 水溶性白金錯体の合成

水溶性置換基を導入した三座配位子からなるN⁺C⁻N型白金錯体を合成する。合成後、カラムクロマトグラフィーにより単離し、¹H-NMR、ESI-MS、IRにより、化合物の同定を行う。

(2) 水溶性白金錯体の分光特性と構造相関の解明

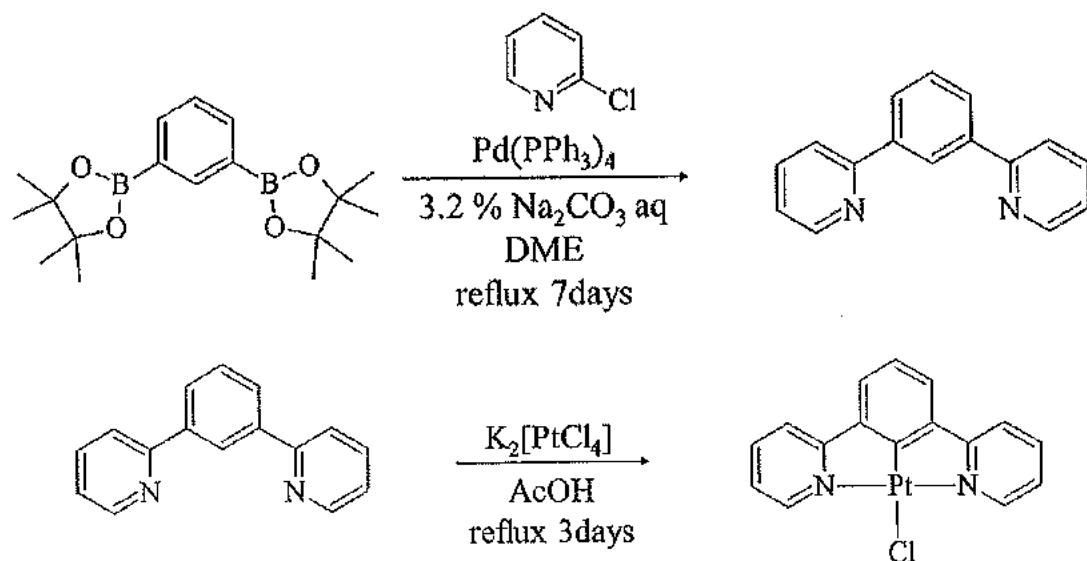
白金錯体水溶液における電子吸収、発光スペクトルを測定し、会合体の種類（基底会合体か励起会合体）と会合形成条件を明らかとする。また、配位子の構造の違いによる会合形成条件の違いについて考察する。さらに、量子化学計算（DFT）により構造と分光特性を対応づけ、会合形成メカニズムを解明する。

(結 果)

(1) 水溶性白金錯体の合成

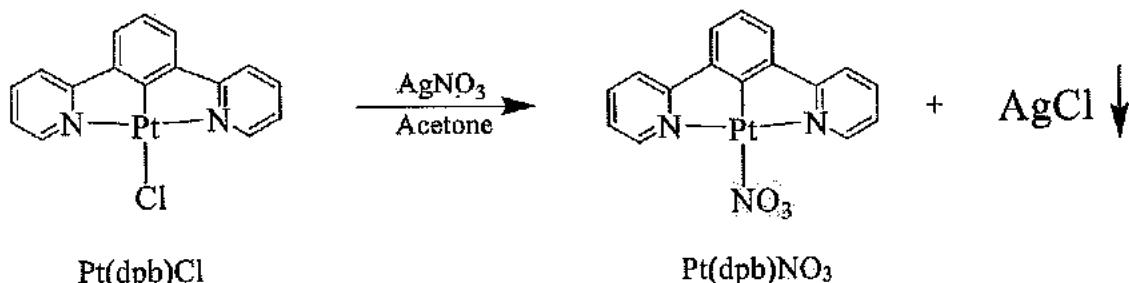
本研究では、N⁺C⁻N型白金錯体骨格として、高い発光量子収率を示し励起会合体を形成可能なPt(dp_b)Cl₂錯体を採用した。初めに、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)触媒 (Pd(PPh₃)₄) を用いたSuzuki-Miyaura Couplingにより、1,3-ベンゼンジボロン酸ビス(ピナコール)からdp_b配位子を7日間加熱還流により合成した (Scheme 1上段)。シリカゲルクロマトグラフィーにより精製後、¹H-NMRにより同定した。続いて、dp_b配位子とテトラ白金酸カリウムを酢酸中で3日間加熱還流することにより、Pt(dp_b)Cl₂を合成した (Scheme 1下段)。シ

リカゲルクロマトグラフィーにより精製後、¹H-NMRにより同定した。



Scheme 1. Pt(dpb)Clの合成

水に不溶であるPt(dpb)Clにおいて水溶性を獲得するため、カウンターアニオンの交換 ($\text{Cl}^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) に着目し、Pt(dpb)NO₃の合成を行った。Pt(dpb)Clをアセトンに溶解させ、さらに塩化銀を加えた後、室温攪拌した。沈殿物を濾過により除去し、濾液を濃縮して固体を得た。得られた固体では、ESI-MS、IRより、NO₃基の存在が確認された。また、得られた固体は水に溶解したことから、水溶性白金錯体 (Pt(dpb)NO₃) の合成に成功した。興味深いことに、通常有機溶媒中で黄色溶液であるPt(dpb)Clとは対照的に、水溶液中においてPt(dpb)NO₃は青色溶液であり、特異的な電子状態を有することが示唆された。



Scheme 2. Pt(dpb) NO₃の合成

(2) 水溶性白金錯体の分光特性と構造相関の解明

Figure 1aに、Pt(dpb)NO₃水溶液の電子吸収スペクトルを示す。300-350 nm付近にはdpb配位子由来の $\pi-\pi^*$ 遷移に由来する吸収帯、380-450 nm付近には電荷移動遷移に由来する吸収帯がそれぞれ観測された。Pt(dpb)NO₃をモデル分子として行った量子化学計算(TD-DFT)により、

380-450 nmに観測された遷移は、白金からピリジンへの電荷移動とベンゼンからピリジンへの電荷移動が混合した遷移に対応しており、有機溶媒中のPt(dp_b)Clの電子状態とよく一致した。一方、これらの吸収帶に加え、590 nm付近に新たな吸収帶が観測された。これは、白金錯体から成る基底会合体に由来する遷移に類似していることから、Pt(dp_b)NO₃は水溶液中で基底会合体を形成していることが示唆された。これより、Pt(dp_b)NO₃の特異的な溶液色（青色）は、アニオンの交換による電子状態の変化ではなく、基底会合体に由来する吸収に起因することが明らかとなった。

Figure 1bに、Pt(dp_b)NO₃の発光スペクトルを示す。490 nm、520 nm付近に、発光ピークがそれぞれ観測された。これは、有機溶媒中のPt(dp_b)Clの発光スペクトル類似しており、0-0、0-1バンドに由来すると考えられる。一方、これらに加え、750 nm付近に新たな発光ピークが観測された。これは、白金錯体から成る会合体に由来する発光形状に類似しており、Pt(dp_b)NO₃会合体由来の発光であると考えられる。これより、水溶性を示し、生体組織透過性の高い赤色~近赤外光領域（650 nm以上）に発光を示す白金錯体ベースの発光プローブの開発に成功した。この会合は水溶液中で特異的に起こることから、疎水性相互作用により、会合体が形成することが示唆された。

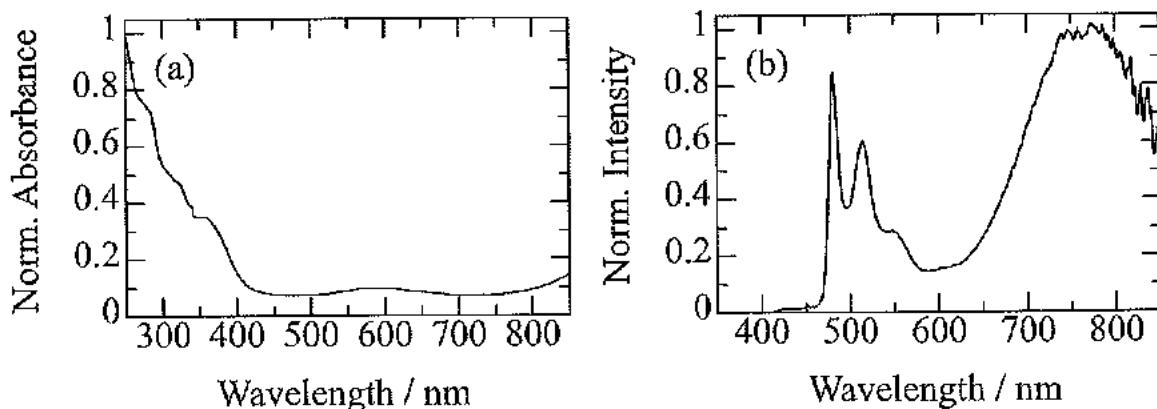


Figure 1. 水溶性 Pt(dp_b)の電子吸収(a)、発光スペクトル(b)

(成果・考察) 等

本研究期間中に、以下の成果を報告した。

【学会発表】

1. 大和田李菜、服部伸吾、篠崎一英、「N^C^N型白金(II)錯体における水溶化と発光挙動」第31回配位化合物の光化学討論会
2. 川尻柊星、服部伸吾、篠崎一英、「異なる置換基を有する白金二価錯体の固体状態における会合体構造の決定」、第31回配位化合物の光化学討論会
3. 平田俊太郎、服部伸吾、篠崎一英、「*fac*-Ir(ppy)₃の発光に生協を及ぼす溶媒和の研究」、第31回配位化合物の光化学討論会
4. 水野雄貴、服部伸吾、村田慧、石井和之、「機械的回転を用いて作製したフタロシアニンキラル薄膜の分光学的性質」、第31回配位化合物の光化学討論会
5. 和田純弥、服部伸吾、北川裕一、木下雄介、伊佐治恵、民秋均、石井和之、「緑色光合成細菌のアンテナクロロフィル会合体における分光学的性質」、第31回配位化合物の光化学討論会
6. 和田純弥、服部伸吾、北川裕一、木下雄介、伊佐治恵、民秋均、石井和之、「Magneto chiral dichroism of green photosynthetic bacteria」、2019年光化学討論会
7. 小林奈那子、服部伸吾、篠崎一英、「置換基を導入した白金(II)錯体を用いた二量体・三量体の発光制御」錯体化学会第69回討論会
8. 永井智也、服部伸吾、篠崎一英、「すりつぶしにより合成される複錯体結晶の研究」錯体化学会第69回討論会
9. 水野雄貴、服部伸吾、村田慧、石井和之、「機械的回転を用いた第10族遷移金属フタロシアニン錯体薄膜のキラリティ誘起と動的挙動」、錯体化学会第69回討論会
10. 中野匠、小林奈那子、服部伸吾、篠崎一英、「クロロホルム蒸気に感応して特異的に赤色発光を示す N^C^N型白金二価錯体」、日本化学会第100春季年会

【査読付き学術論文】

1. M. Kuroha, S. Nambu, S. Hattori, Y. Kitagawa, K. Niimura, Y. Mizuno, F. Hamba, K. Ishii, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, 58, 18454.
2. K. Ishii, S. Hattori, Y. Kitagawa, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2020, 19, 8.
3. M. Asahara, H. Kurimoto, M. Nakamizu, S. Hattori, K. Shinozaki, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020, 22, 6361.

【アウトリーチ活動】

1. 東京大学 プレスリリース 2019年11月5日
<https://www.iis.u-tokyo.ac.jp/ja/news/3185/>
2. 日本経済新聞 2019年11月5日
https://www.nikkei.com/article/DGXRSP522705_V01C19A1000000/
3. Chem-Station スポットライトリサーチ 2019年12月12日
<https://www.chem-station.com/blog/2019/12/evaporot.html>

創薬シーズとして有望な天然有機化合物の 新規構造決定法の開発

横浜市立大学理学部 助教
入江 樂

(研究目的)

海洋生物には、多彩な生理・薬理作用を有する天然有機化合物（海洋天然物）が豊富に含まれている。海綿動物から見出された微小管ダイナミクス阻害剤・ハリコンドリンBが医薬品に応用されるなど、有用化合物の探索源として利用されてきた。一般に海洋天然物に関する研究は、①化学構造が複雑であるものが多い、②試料が稀少である、などを課題として抱えており、本研究代表者が研究対象としているポエシラストリン類（図1）も、構造未決定で残された有用海洋天然物である。ポエシラストリン類は、骨粗鬆症やがんの増殖・転移への関与が明らかになっている膜タンパク質V-ATPaseの阻害によって強力な細胞毒性を示すが、上述の2つの要因により立体化学を含めた完全な構造決定がなされていない^{1,2}。分子ツールや創薬シードとしての利活用のためには、その構造的基盤の確立が不可欠である。

近年の分析技術の進歩によって、以前は構造決定まで到達できなかった化合物を研究対象にすることが可能になりつつあるが、分子サイズが大きく複雑に官能基化された鎖状部分を有する天然物の構造決定は、スペクトルデータのみからでは困難である。この場合、解析対象となる不斉炭素原子の数を減らすために基本骨格の分解が必要となるが、これまでにカップリングなどの結合生成反応は盛んに研究してきた一方で、分解反応のバリエーションはきわめて少ない。ポエシラストリン類のような化合物は、一般的な反応条件に付しても複雑な混合物が生成してしまう問題点があった。そこで本研究では、同様の複雑な天然物に対して幅広く適用可能な構造決定法を開拓することを目的とした。

(研究方法)

本研究では、構造が複雑な天然物を構造解析が容易なフラグメントに分解するにあたって、アミド結合と水酸基が隣接した部分構造（N-アシル-β-アミノアルコール）に着目した。この部分構造は、ポエシラストリン類をはじめとして、セリンやスレオニンなどのアミノ酸残基を有するペプチド系化合物や、ポリケチドとよばれる生合成系とのハイブリッド化合物（Plitidepsin; PhaseIII; 図2）など、創薬シーズとして有望な天然物にも多く見られる。

一般にアミドは、タンパク質などにも含まれる比較的安定な結合であり、その開裂には化合物全体にダメージを与えるような強条件（塩酸加水分解など）を要する。しかしN-アシル-β-アミノアルコールの場合は、①アミドと隣接する水酸基の間で環形成させ、アミドの平面性を崩しておけば、②低温で酸化剤を作用させるなど、穏和な条件で環外のアミドを切断することが可能になるとえた（図3）。この誘導体化手法には、①環化によって

アミドと水酸基の配座が固定されるため、立体配置の解析が直接行える、②当該箇所のアミドを選択的に切断できるため、構造決定だけでなく構造活性相関研究にも有用である、という利点がある。

以上の戦略を念頭に本研究ではまず、*N*-アシル- β -アミノアルコールを部分構造に含むシンプルなモデル基質を合成し、これを用いて望みの反応を実現する条件を確立したうえで、天然物を含む基質適用範囲の拡大を目指すこととした。

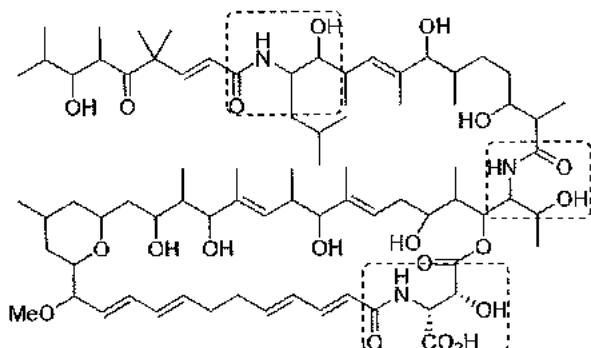


図1. ポエシラストリンCの化学構造
(囲みは*N*-アシル- β -アミノアルコール部分構造)

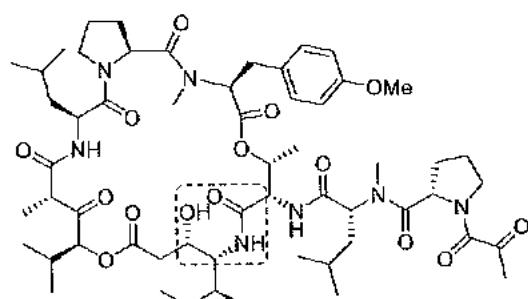


図2. Plitidepsinの化学構造

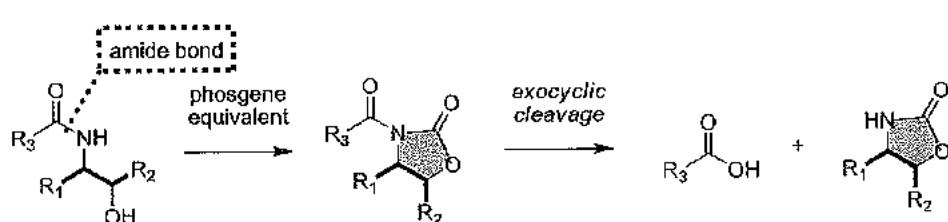


図3. *N*-アシル- β -アミノアルコールの分解反応計画

(結果と考察)

・反応検討のための基質の設計と調製

N-アシル- β -アミノアルコールを含むモデル基質としては、脱アシル化反応の評価を簡便に行うため、図3におけるR₁基とR₂基が同一なものを用いることとした。その調製に際しては、対称なオレフィンを前駆体に設定し、官能基の導入を順次行うことを計画した（図4）。すなわち、市販の5-ヘキセン-1-オール（1）をベンジルエーテルにより保護し、得られた2をGrubbs第一世代触媒を用いたメタセシス反応により二量化したところ、オレフィン3をE/Z 4:1の生成比で与えた。3をメタクロロ過安息香酸（mCPBA）によりエポキシ化し、アジ化ナトリウムを用いて開環させた。得られたアルコール4を無水酢酸によりO-アセチル化物5とした後、アジド基を接触水素化によりアミノ基に還元した。続いてトリエチルアミンを作用させたところ、O→Nアシル転位が起こり、目的とする*N*-アセチル- β -アミノアルコ

ールがジアステレオ混合物として生成した。ここでジアステレオマー（6、7）をHPLCにより分離し、目的とする基質を得た。

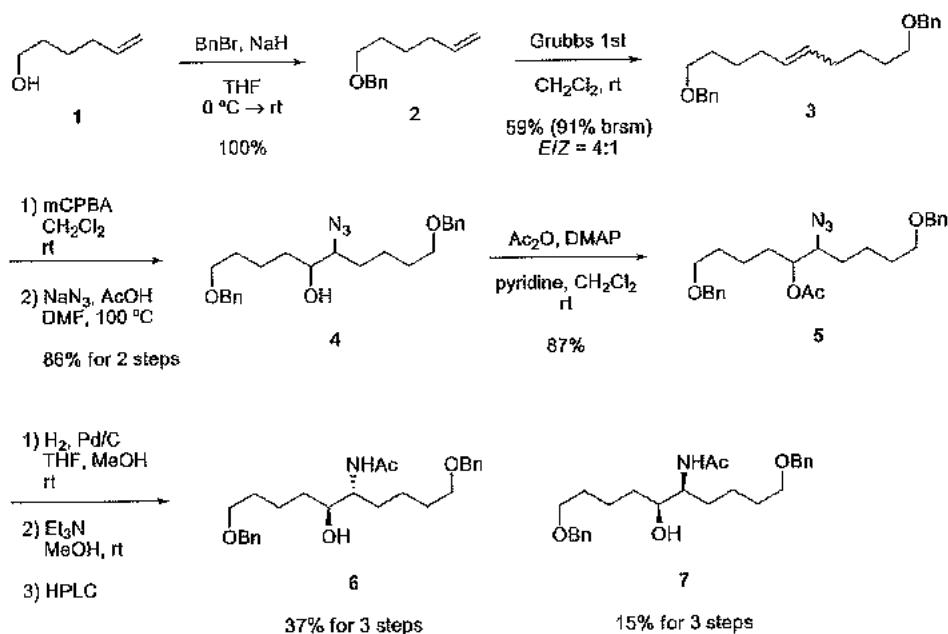


図4. モデル基質6, 7の合成

・反応検討

N-アセチル- β -アミノアルコール6に対し、種々のホスゲン等価体を用いてオキサゾリジノン形成を試みたが、直接の環化は困難であった。しかしながら検討の中で、ジクロロメタン中で1, 1-カルボニルジイミダゾール(CDI)を作用させると、イミダゾリルカルバメート8が定量的に得られることがわかった(図5)。

N-アシル化されていない、 β -アミノアルコールからのオキサゾリジノン形成の反応例は数多い。この場合は、基質のアミノ基が先にホスゲン等価体のカルボニル炭素に求核攻撃し、生成したカルバミドに対して基質の水酸基がさらに求核攻撃することで、オキサゾリジノン形成が起こる。一方で*N*-アシル- β -アミノアルコールの場合は、アシル基の電子求引性により求核性が低下しているため、ホスゲン等価体のカルボニル炭素に水酸基のみが先に求核攻撃し、カルバメートの状態で反応が停止したと考えられた。

そこで、アミド基の水素を引き抜いて求核性を高めれば環化を起こすことができるという仮説を立て、次の実験を行った。イミダゾール(4当量)と水素化ナトリウム(2当量)をテトラヒドロフラン(THF)中で混合しておき、基質のTHF溶液を加えたところ、速やかにオキサゾリジノン化が進行し、さらに脱アセチル化された9が单一の生成物として得られた。この反応では、まず系中で生成したナトリウムイミダゾリドが塩基として働き、基質のアセトアミド基の水素(NH)を引き抜いたことにより、狙い通りの環化が進行した。水素のpKaは36程度、イミダゾールは14.5であるのに対してアミドは20前後とされており、本実験においてナトリウムイミダゾリドは相対的に弱い塩基であるが、イミダゾリルカルバメートが脱離能にすぐれた中間体であるため、環化によるイミダゾリル基の脱離を駆動力

として、反応がスムーズに進行したものと考えられる。そして、生じたN-アセチル-2-オキサゾリジノンのアセチル基のカルボニル炭素にナトリウムイミダゾリドが今度は求核攻撃し、脱アシル化が起こったと考えられた。

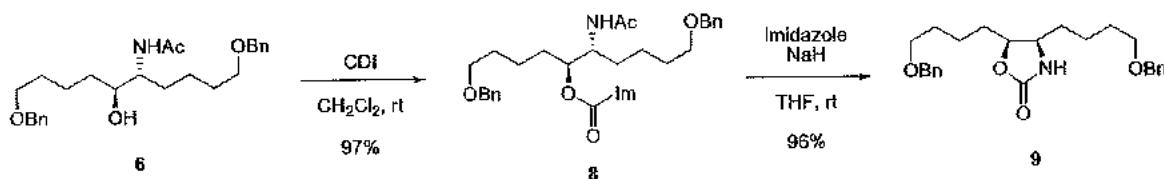


図5. オキサゾリジノン形成と脱アシル化反応

対照実験として、イミダゾールのみ（2当量）、水素化ナトリウムのみ（2当量）をそれぞれ基質に作用させたところ、前者は反応が起らなかったが、後者は環化反応が完結し、脱アシル化も大部分が進行した。前者の結果から、反応の活性種はナトリウムイミダゾリドであることが支持された。また水素化ナトリウムは、塩基性は極めて高い一方で求核性は低いため、後者の結果から、脱アシル化を引き起こしているのは環化により脱離したイミダゾリル基であることが示唆された。

6のジアステレオマー7についても図5と同様の反応が進行した。また、アセトアミドをフェニルプロパンアミドに代えたモデル基質を別途調製し、同様の条件に付したところ、脱アシル化によって遊離したカルボン酸（フェニルプロパン酸）が回収可能なこともわかつた。現在、より官能基の多い基質を用いて反応条件の最適化を行っている。

（学会発表）

1. イミダゾールの化学を利用したN-アシル-β-アミノアルコール選択性的脱アシル化反応
入江 樂、及川 雅人
日本化学会第100春季年会、東京理科大学野田キャンパス、2020年3月

（謝辞）

本研究助成を賜りました、公益財団法人 横浜学術教育振興財団様に深く感謝申し上げます。

（参考文献）

1. K. Takada, B. W. Choi, M. A. Rashid, W. R. Gamble, J. H. Cardellina, II, Q. N. Van, J. R. Lloyd, J. B. McMahon and K. R. Gustafson, *J. Nat. Prod.* 2007, **70**, 428–431.
2. R. Irie, K. Takada, Y. Ise, S. Ohtsuka, S. Okada, K. R. Gustafson and S. Matsunaga, *Org. Lett.* 2017, **19**, 5395–5397.

ハイパープランチポリマーを含むジブロック共重合体の 自己組織化による新規ナノ構造体の創製

神奈川大学 工学部 特別助教
太田 佳宏

(研究目的)

研究代表者は最近、疎水性のハイパープランチポリアミド(HBPA)とエステル部位にトリエチレングリコール(TEG)鎖を有する親水性のHBPAで構成される両親媒性Janus型ジブロック共重合体を合成し、それを水中で自己組織化させると、温度に応じて集合体の構造が球状、シリンダー状、樹木状に変わることを見出した。研究代表者の知る限り、A-B型ジブロック共重合体から樹木状の集合体を形成した初の例である。この特異な構造の形成には、HBPAの末端に多数存在するTEG鎖の温度応答を利用している。このようにハイパープランチポリマーの構造的な特徴を利用して自己組織化すれば、既存のジブロック共重合体からは得られない、新規ナノ構造体の形成が期待できる。さらにジブロック共重合体の組成とナノ構造体との関係をライブラリー化することで、新規ナノ構造体の形成に必要な因子の解明が期待できる。しかしながら、HBPAを含むブロック共重合体などの各種アキテクチャの自己組織化構造を系統的に明らかにするために、アキテクチャの中のHBPA成分の性質を変えたい場合、これまでの合成法では、再度AB₂モノマーの合成から行う必要があった。

そこで本研究では、HBPAを含むブロック共重合体などの各種アキテクチャの自己組織化構造を系統的に明らかにすることを目指し、HBPAの生長末端の官能基化によって種々性質の異なるHBPAを容易に合成するために、エステル部位にプロモフェニル基を有するAB₂モノマーの連鎖縮合重合を検討し、得られたHBPAの生長末端の官能基化を鈴木・宮浦カップリング反応によって行った。

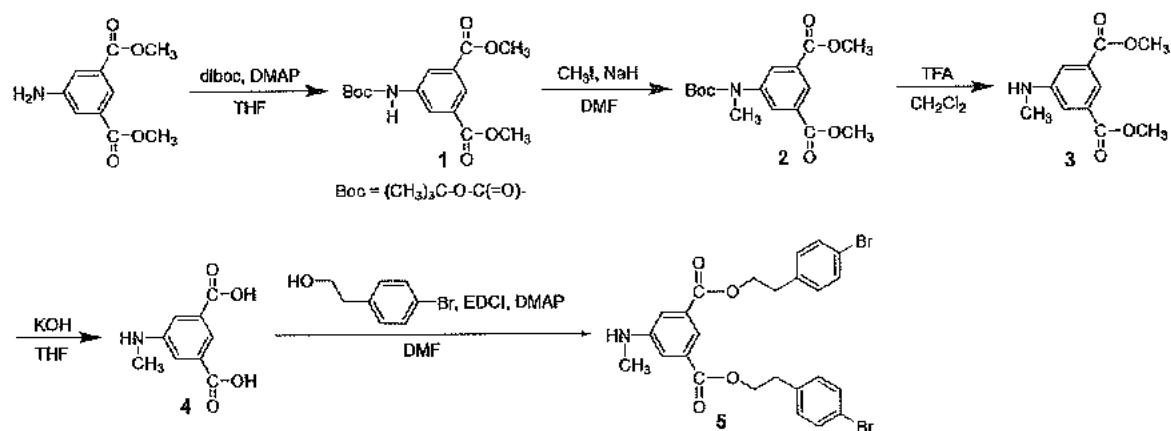
(研究方法)

まず、AB₂モノマーと開始剤を合成し、それらを用いて重合の検討を行った。その後、得られたポリマーの生長末端官能基化を鈴木・宮浦カップリング反応によって行った。生成物は、必要に応じてシリカゲルカラムクロマトグラフィー、再結晶、沈殿操作、分取HPLCによって精製し、¹H NMR、IR、GPC、GPC-MALLS、MALDI-TOF質量分析によって生成物の構造、分子量、分子量分布の解析を行った。

(結果)

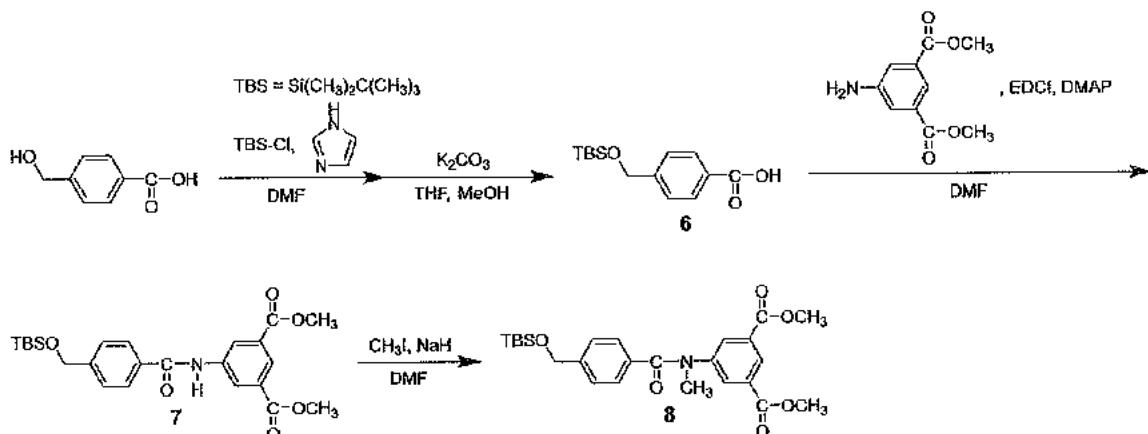
まず、AB₂モノマーの合成を以下のように行った(反応式1)。5-アミノイソフタル酸ジメチルと二炭酸ジ-*tert*-ブチル(diboc)を4, 4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)存在下で反応させて、*tert*-ブトキシカルボニル(Boc)基が導入された1を収率81%で得た。次に、1に水素化ナトリウムを作用させた後にヨードメタンと反応させて*N*-メチル化を行うことで、2を収率79%で得た。次に、トリフルオロ酢酸を用いて2のBoc基の除去し、3を収率90%で得た。続いて、水酸化カリウムを用いて3の加水分解を行い、4を収率55%で得た。最後に、4と2-(4-ブ

ロモフェニル)エチルアルコールとの脱水縮合をDMAPと1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDCI)存在下で行い、AB₂モノマー5を收率38%で得た。



反応式1. AB₂モノマー5の合成

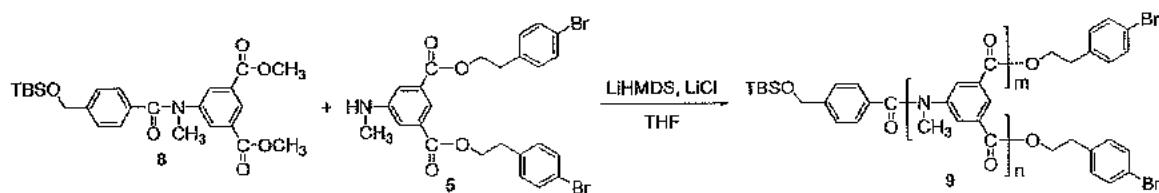
次に、開始剤の合成を以下のように行った(反応式2)。



反応式2. 開始剤8の合成

まず、イミダゾール存在下で4-ヒドロキシメチル安息香酸とtert-ブチルジメチルクロロシラン(TBS-Cl)を反応させた後に炭酸カリウム水溶液を作用させて、6を得た。次に、6と5-アミノイソフタル酸ジメチルとの脱水縮合をDMAPとEDCIの存在下で行い、7を收率70%で得た。最後に、7のN-メチル化を水素化ナトリウムとヨードメタンを用いて行い、開始剤8を收率78%で得た。

次に、開始剤8存在下でAB₂モノマー5の重合を行った(反応式3)。



反応式3. 開始剤8を用いたAB₂モノマー5の重合

リチウムヘキサメチルジシラシド(LiHMDS)と塩化リチウム存在下、開始剤8を用いたAB₂モノマー5の重合をTHF中で行った。その結果、得られたポリマーのGPC溶出曲線は単峰性を示し、分子量分布は狭かった($M_w(GPC) = 3570$, $M_w/M_n = 1.11$) (図1C)。脱離成分などの低分子成分を除くために分取HPLCによる精製を行った結果、GPC溶出曲線から低分子量領域のピークは消失し、ポリマーのピークのみになった($M_w(MALLS) = 6230$, $M_w/M_n = 1.11$) (図1D)。得られたポリマーの分子量は、仕込み比([5]₀/[8]₀)から算出される理論分子量(6210)とほぼ一致した。また、得られたポリマーの¹H NMRスペクトルとMALDI-TOF質量分析の解析結果から、ポリマーに開始剤部位が導入されていることがわかった。

そこで、AB₂モノマー5と開始剤8との仕込み比([5]₀/[8]₀)を種々変えて5の重合を行った。その結果、仕込み比([5]₀/[8]₀)の増加に伴い生成ポリマーの分子量は直線的に増加し、ポリマーの分子量分布はいずれも狭い値を示した(図2)。これらの結果から、本重合が連鎖縮合重合様式で進行していることがわかった。

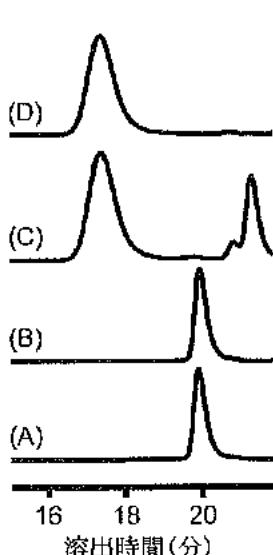


図1.GPC溶出曲線: (A)開始剤8、
(B)AB₂モノマー5、(C)粗生成物、
(D)精製後の生成物

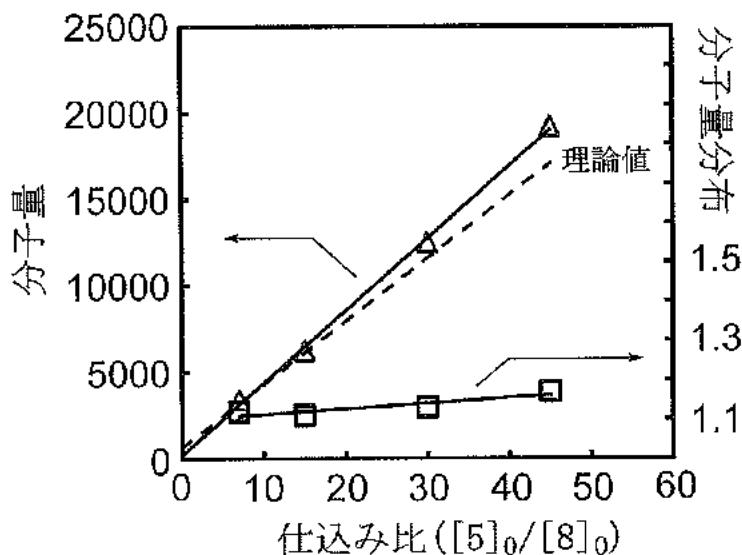
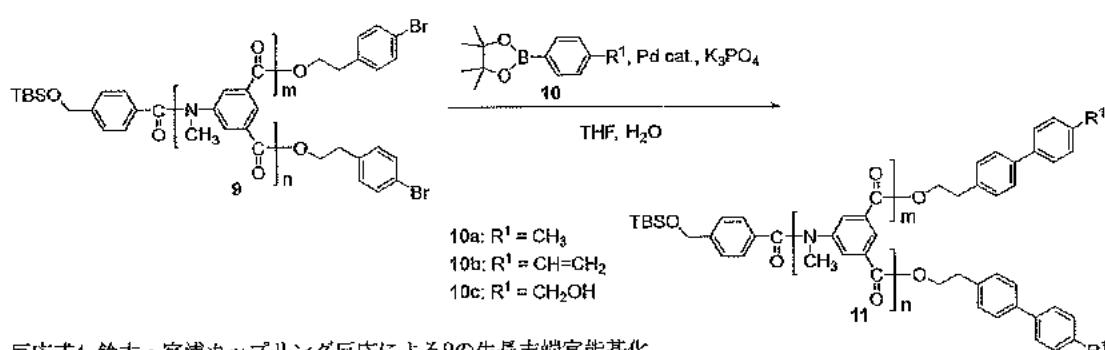


図2.仕込み比に対する生成ポリマーの分子量と分子量分布の関係

次に、鈴木・宮浦カップリング反応による得られたポリマー9の生長末端官能基化を検討した(反応式4)。



Pd触媒とリン酸三カリウム存在下、9とボロン酸エステル10aとの反応を行った。その結果、得られた粗生成物のGPC溶出曲線は、官能基化前(図3A)の狭い分子量分布を維持したまま高分子量側にシフトした(図3B)。低分子成分を除去するために分取HPLCによる精製を行った結果、ポリマーを分離できた($M_w(\text{GPC}) = 6720$, $M_w/M_n = 1.09$)(図3C)。¹H NMRスペクトルより、末端導入率を算出すると94%であった。

そこで、9の重合度を変えた場合の導入率を調べた。その結果、調べたいずれの重合度においても高い導入率であった(図4)。

次に、他の官能基が導入できるか検討するため、10bや10cをそれぞれ用いて9との鈴木・宮浦カップリング反応を行った。その結果、末端導入率はそれぞれ81%、82%であった。これらのことから、この方法によって種々の官能基が導入できることがわかった。

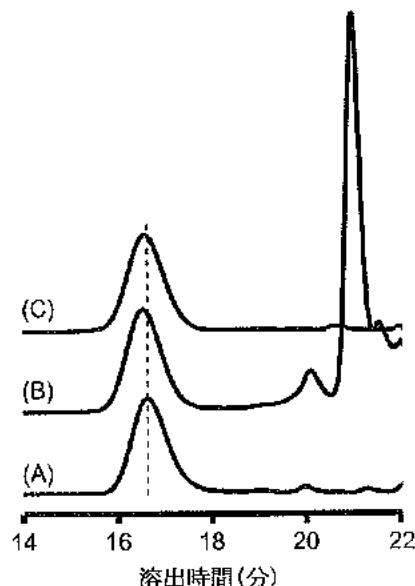


図3. GPC溶出曲線: (A) 9、(B) 粗生成物、
(C) 精製後の生成物

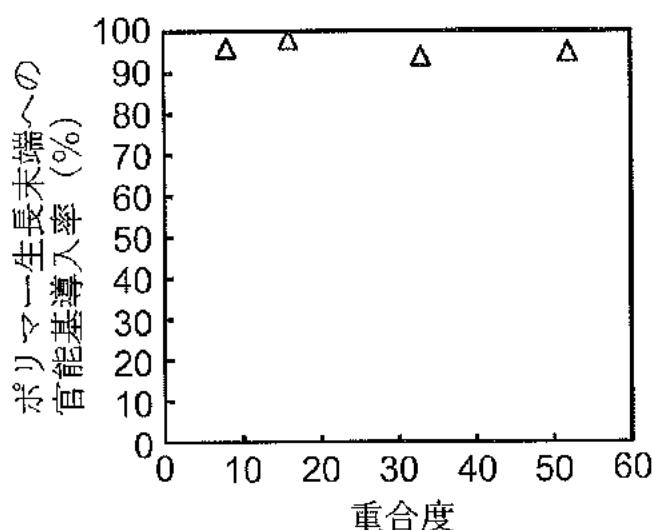


図4. 重合度とポリマー生長末端への官能基導入率との関係

(成果・考察) 等

AB_2 モノマー5の重合が連鎖縮合重合様式で進行することを明らかにし、分子量分布の狭いHBPA9の分子量を制御して合成する方法を確立した。得られた9と種々のボロン酸エ斯特ルとの鈴木・宮浦カップリング反応によって、HBPAの生長末端に種々の官能基を導入できることを明らかにした。今回確立した方法を使えば、HBPAをブロック共重合体などの各種アーキテクチャに組み込む前、組み込んだ後のいずれでも、HBPAの生長末端の官能基を変換することが可能と考えられ、従来法よりもアーキテクチャ中のHBPAの性質を容易に変えることができる。今後、この手法を利用して、HBPAを含む各種アーキテクチャを合成し、それらの自己組織化構造を系統的に明らかにしていく予定である。

乳腺幹細胞における新規のリン酸化シグナル伝達の解明と 乳がん治療への展開

横浜市立大学大学院医学研究科分子生物学 助教
佐々木和教

(研究目的)

近年、上皮間葉転換に関する転写因子が乳腺の幹細胞機能を調節し、乳腺上皮組織の形態形成や維持に必須な役割を果たすことが分かってきた。このメカニズムの破綻は、乳がんのがん幹細胞の出現や悪性化、転移に関与している。そこで本研究では、上皮間葉転換に関する転写因子の転写活性を調節する分子機構を明らかにし、分子標的薬の新しいターゲットを見出すことを目的とした。これまでに細胞極性を司るタンパク質aPKC (atypical protein kinase C)の機能を解析し、aPKCがある転写因子の転写活性を調節し、乳腺幹細胞機能に関与することを見出している。そこで、シグナル伝達経路の構成因子とその役割を明らかにするため、aPKCの結合タンパク質を網羅的に探索し、aPKCの周辺分子の同定を試みた。そして、乳がんの治療標的を新たに探索するため、この経路の異常が乳がんの発生や進展にどのように関与するのかを明らかにすることを目指した。

(研究方法)

細胞培養

本研究では、細胞を10% FBSを添加したDMEM培地で培養した。安定発現株は、aPKC α -FLAG-SBPコンストラクトをトランスフェクションし、ピューロマイシンで選択して取得した。細胞の極性化には、トランズウェル(Corning)を用いた。

細胞質分画と核分画の抽出

Dignam et al Nucleic Acids Res. 1983に従い、細胞質と核を生化学的に分画した。

タンデム精製

本研究では、1回目に抗FLAG抗体を用いた免疫沈降、2回目にSBPタグを用いたアフィニティー精製でのタンデム精製を行った。まず、細胞質と核分画それぞれに抗FLAG M2抗体アフィニティビーズ(SIGMA-Aldrich)を加え、4°Cで攪拌した。洗浄バッファーで洗浄後、精製画分を3xFLAGペプチドで溶出した。このFLAGペプチド溶出画分に対して、2回目の精製としてStreptavidin Mag Sepharose (GEヘルスケアライフサイエンス)を加え、4°Cで攪拌した。洗浄バッファーで洗浄後、タンデム精製画分をビオチンで溶出した。SDS-PAGE後のゲルを銀染色IIキット(ワコー)で銀染色し、精製画分を可視化した。

SILAC法を用いたアフィニティー精製

SILAC法を用いたアフィニティー精製は、Ong et al Mol. Cell. Proteomics 2002に従つ

た。aPKC λ -FLAG-SBPを発現させた細胞とコントロール細胞をそれぞれ¹³C-Lys又は¹²C-Lysを含む培地で培養し、SBPタグを用いてaPKC λ -FLAG-SBPを精製した。質量分析にて結合タンパク質の同定を行い、同位体比を計測した。

ウエスタンプロット

細胞に1xSDSサンプルバッファーを加えて95°Cで5分処理し、SDS-PAGE用の抽出液を調整した。ゲノムDNAの剪断にはQIA shredder (QIAGEN)を用いた。抽出液をアクリルアミドゲルにロードして電気泳動し、PVDF膜に転写した。1%スキムミルクを含むTBS-Tでブロックング後、一次抗体反応を一晩4°Cで行った。TBS-Tで3回洗浄後、二次抗体反応を行った。ウエスタンプロットの現像は、ImageQuant LAS4000システムを用いた。

免疫染色

細胞の固定にはパラホルムアルデヒドを用いた。抗体の浸透性を高めるため、0.5% TritonX-100を含むPBS (-)で細胞を処理した。10% 正常ヤギ血清を含むPBS (-)でブロックングした後、一次抗体反応を一晵4°Cで行った。TBS-Tで3回洗浄後、二次抗体反応を行った。退色を防ぐマウント剤を用いてスライドガラスにマウントした。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss) を用いて蛍光像を取得した。

(結 果)

本研究ではaPKCに結合するタンパク質を網羅的に同定するため、以下に示す2通りのプロテオミクス解析を行った。

(1) HeLaS3安定発現株からのaPKC結合タンパク質の精製

FLAGタグとSBPタグをタンデムにつないだaPKCをHeLaS3細胞に発現させ、薬剤で選択しクローニングした。タグに対するウエスタンプロットからいくつかの安定発現株を樹立した(図1A、黒矢頭)。このクローニングを大量培養し、Dignam法を用いて細胞質と核を生化学的に分画した。それぞれの分画に抗FLAG抗体を加えてベイトであるaPKCを免疫沈降し、銀染色を行った(図1B)。コントロールにおいて非特異的なバンドが多数検出され、特異的な結合タンパク質の特定が不可能であった。そこでこの免疫沈降分画に対して、SBPタグを用いた

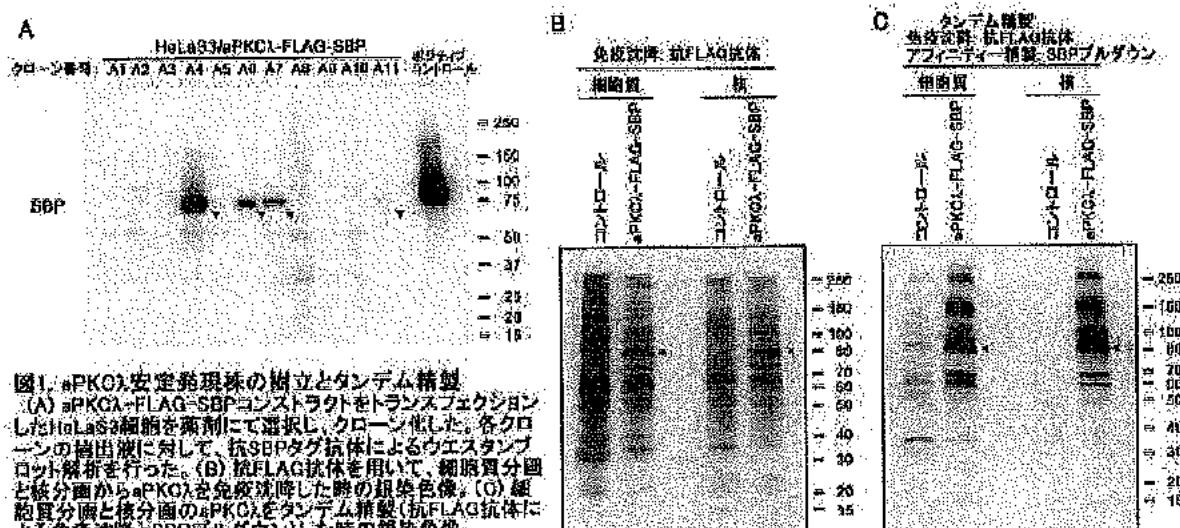


図1. aPKC λ 安定発現株の樹立とタンデム精製。
(A) aPKC λ -FLAG-SBPコンストラクトをトランスフェクションしたHeLaS3細胞を薬剤にて選択し、クローニングした。各クローニングの抽出液に対して、抗SBPタグ抗体によるウエスタンプロット解析を行った。(B) 抗FLAG抗体を用いて、細胞質分画と核分画からaPKC λ を免疫沈降した時の銀染色像。(C) 細胞質分画と核分画のaPKC λ をタンデム精製(抗FLAG抗体による免疫沈降とSBPブルダック)した時の銀染色像。

アフィニティー精製を行い、aPKCを再精製した。その銀染色の結果を図1Cに示す。タンデム精製を行ったことにより、図1Bで検出された非特異的なバンドが顕著に消失し、aPKCと共に精製された特異的な結合タンパク質が多数検出された。質量分析の結果、既知のaPKC結合タンパク質と共に、いくつかの新たな結合タンパク質が同定された。

(2) SILAC法を用いたaPKC結合タンパク質の同定

aPKC λ -FLAG-SBPを発現させたMDCK細胞とコントロール細胞をSILAC法に準拠して安定同位体存在下で培養した後、SBPタグを用いてaPKCを精製した。質量分析により同位体の存在比を計測したところ、既知のaPKC結合タンパク質と共に、新規な結合タンパク質がいくつか同定された(図2A)。本研究では、足場タンパク質であるShank2に着目して解析を進めた。HEK293T

にHAタグ付きaPKCとSBP-sfGFPタグ付きShank2を発現させ、抗HA抗体でHA-aPKCを免疫沈降したところ、SBP-sfGFP-Shank2の共沈降が認められた(図2B)。さらに、極性化させた上皮細胞を特異抗体で免疫染色したところ、Shank2は上皮細胞のタイトジャンクションにおいてaPKCと共に局在することが分かった(図2C)。

(成果・考察) 等

(1) HeLaS3安定発現株からのaPKC結合タンパク質の精製

本研究により、結合タンパク質の精製において、抗FLAG抗体による免疫沈降とSBPタグによるアフィニティー精製をタンデムで行う精製系が非常に有用であることが分かった。現在、いくつかの新規結合タンパク質について、乳腺幹細胞においてどのような役割を果たしているか機能解析を進めている。

(2) SILAC法を用いたaPKC結合タンパク質の同定

SILAC法をもとにした精製系により、新規のaPKC結合タンパク質としてShank2を同定した。このShank2は低分子量GTPase Rap1とともにタイトジャンクション形成に関与することも明らかにしている。これら一連の成果をまとめて国際誌に発表した(Sasaki et al Cell Reports 2020)。現在、乳腺幹細胞におけるaPKC-Shank2複合体の役割を検討している。

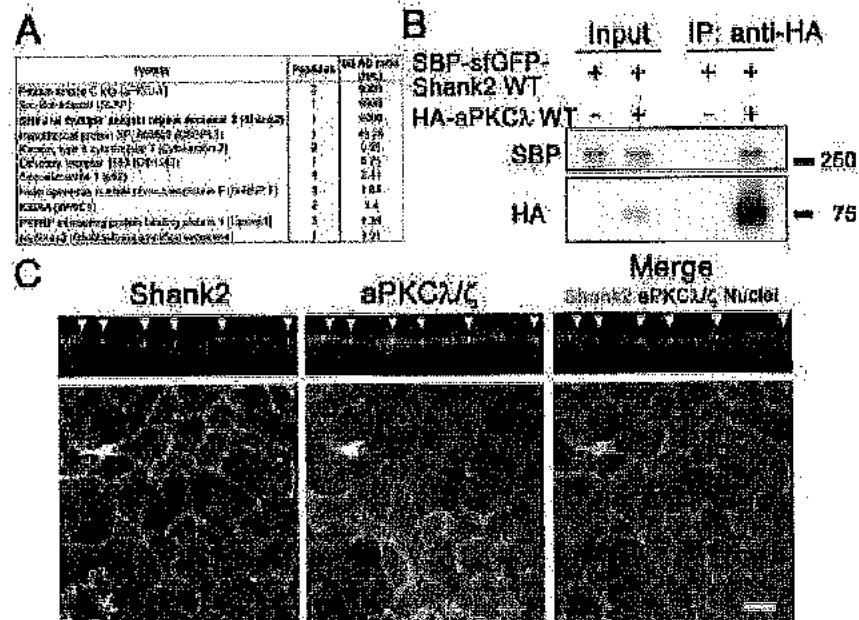


図2 新規のaPKC結合タンパク質Shank2の同定
(A) SILAC法と質量分析を用いて同定したaPKC結合タンパク質のリスト。
(B) HEK293Tの過剝発現系で免疫沈降を行った時のウエスタンプロット像。
aPKCの免疫沈降とともにShank2が共沈降した。
(C) 極性化させた上皮細胞におけるShank2とaPKCの免疫染色像。
aPKCとShank2は上皮細胞のタイトジャンクションに共局在した。
Sasaki et al Cell Reports 2020より引用

学会発表

佐々木和教, 麻谷典子, 廣瀬博子, 吉濱陽平, 高柳亜由美, 山下暁朗, 中谷雅明, 平野久,
高橋秀尚, 大野茂男

新規のaPKC結合タンパク質Shank2と低分子量GTPase Rap1によるタイトジャンクション形成
の調節

第42回日本分子生物学会年会 2019年12月

発表論文

1. Tokinaga-Uchiyama A, Mizushima T, Akimoto K, Nagashima Y, Sasaki K, Nakaya M, Ohashi K, Kubota K, Maruyama Y, Kato H, Hirahara F, Miyagi E, Ohno S, Asai-Sato M
Aberrant nuclear localization of aPKC λ/ι is associated with poorer prognosis in uterine cervical cancer.

International Journal of Gynecologic Pathology 38, 301–309, 2019.

2. Sasaki K*, Kojitani N, Hirose H, Yoshihama Y, Suzuki H, Shimada M, Takayanagi A, Yamashita A, Nakaya M, Hirano H, Takahashi H*, Ohno S* (* Correspondence)
Shank2 binds to aPKC and controls tight junction formation with Rap1 signaling during establishment of epithelial cell polarity.

Cell Reports 31, 107407, 2020.

3. Miyake N, Takahashi H, Nakamura K, Isidor B, Hiraki Y, Koshimizu E, Shiina M, Sasaki K, Suzuki H, Abe R, Kimura Y, Akiyama T, Tomizawa SI, Hirose T, Hamanaka K, Miyatake S, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Obo K, Kato M, Ogata K, Matsumoto N

Gain-of-Function MN1 Truncation Variants Cause a Recognizable Syndrome with Craniofacial and Brain Abnormalities.

American Journal of Human Genetics 106, 13–25, 2020.

4. Takahashi H, Ranjan A, Chen S, Suzuki H, Shibata M, Hirose T, Hirose H, Sasaki K, Abe R, Chen K, He Y, Zhang Y, Takigawa I, Tsukiyama T, Watanabe M, Fujii S, Iida M, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Washburn MP, Saraf A, Florens L, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway RC, Conaway JW, Hatakeyama S.

The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination.
Nature Communications 11, 1063, 2020.

中枢神経原発悪性リンパ腫の患者由来細胞株を用いた NF- κ B 経路を標的とした治療の開発

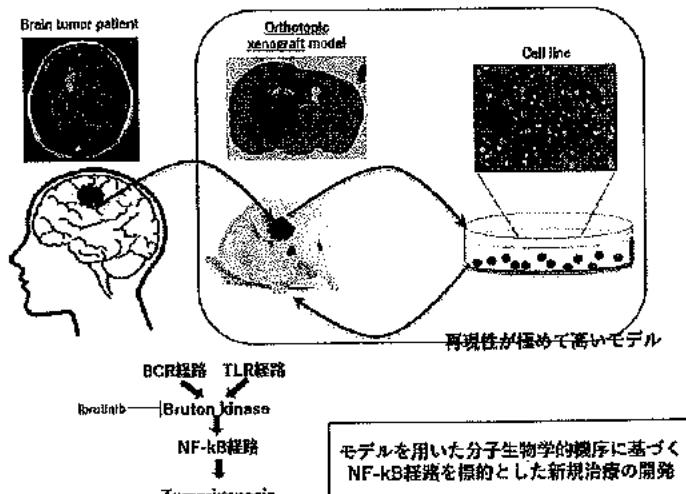
横浜市立大学 医学研究科 脳神経外科 助教
三宅 勇平

(研究目的)

中枢神経原発悪性リンパ腫 (PCNSL) ではNF- κ B経路の恒常的な活性化が腫瘍増殖に関与しているとされ、その上流にはB cell receptor (BCR) signaling、Toll like receptor (TLR) signalingが存在する。BCRシグナルの一つであるbruton kinaseに対する阻害剤 ibrutinibが臨床応用されたが、既存の治療を凌駕する成績は得られなかった(Grommes, et al. Cancer Discov. 2017)。この研究ではPI3K signaling pathwayやCARD11変異といった機構が耐性に関与していると推測された。本研究の目的は、PCNSLの患者由来細胞株を用いて、ibrutinibの薬剤耐性機序の解明、さらにNF- κ B経路、特にp65/RelAを標的とした新規標的薬の開発をすることである。

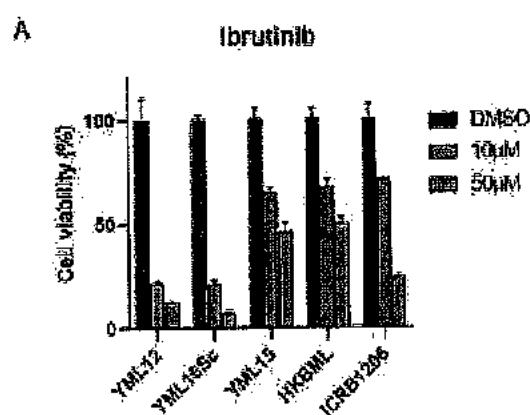
(研究方法)

患者より採取した腫瘍細胞を用い、細胞株を作成した。免疫不全マウスの大脳に移植し、脳腫瘍マウスモデルを作成した。複数のこれらのモデルを用い、薬剤感受性の相違、遺伝子発現の相違などからibrutinibの耐性について検討した。また強力な細胞毒性を発揮する化合物を同定した。特定した化合物が脳腫瘍マウスモデルにて生存期間を延長させるか検討した。

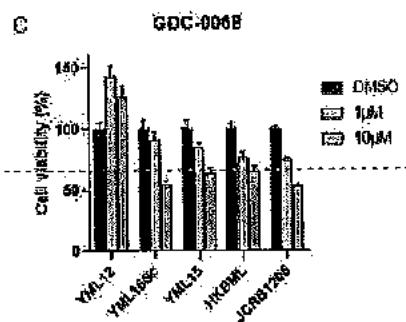


(結 果)

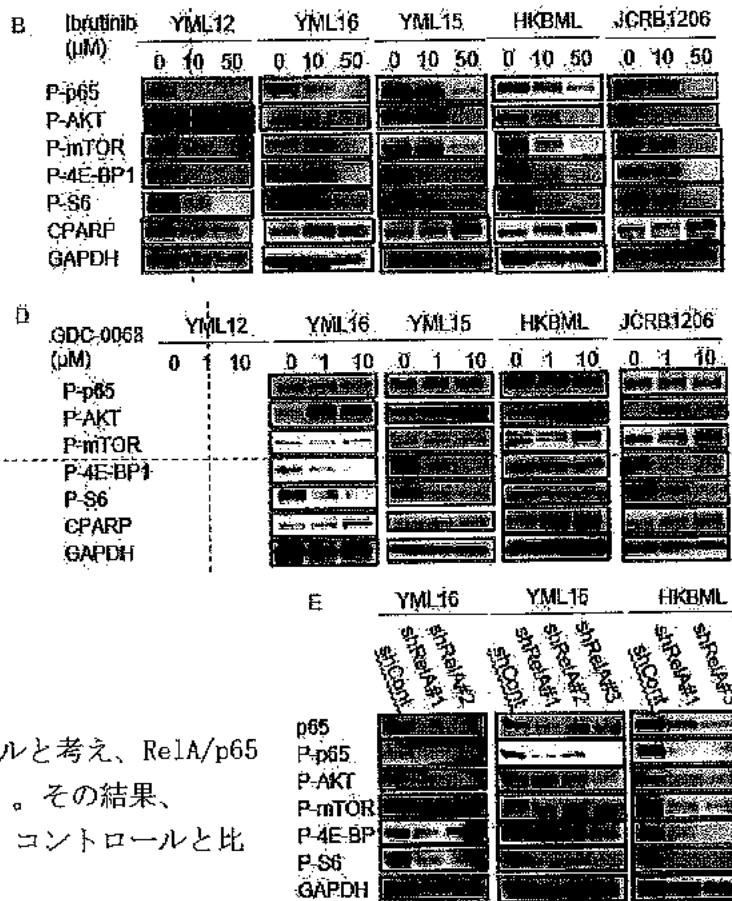
細胞株によってibrutinibに対する薬剤感受性が異なった (A)。これはCARD11遺伝子プロファイアルに依存しなかった (data not shown)。Ibrutinib感受性を示した細胞株においては、ウェスタンブロットにて、RelA/p65のリン酸化の低下がみられた (B)。一方、PI3K pathwayのシグナルは感受性を示さない濃度においても低下がみられた (B)。



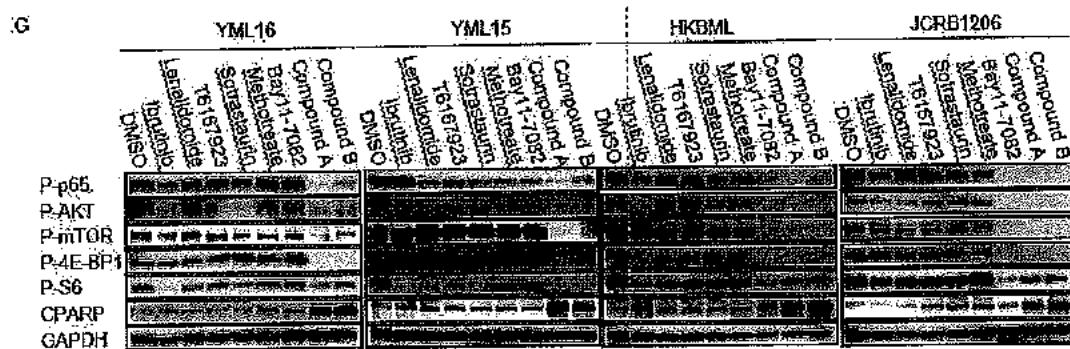
次にPI3K pathwayの重要なシグナルであるAKTの阻害剤であるGDC-0068を使用すると、PI3K pathwayのシグナルが下がるにも関わらず、細胞毒性は見られなかった(C,D)。またこれらの細胞株においてRelA/p65の低下は認められなかった(D)。

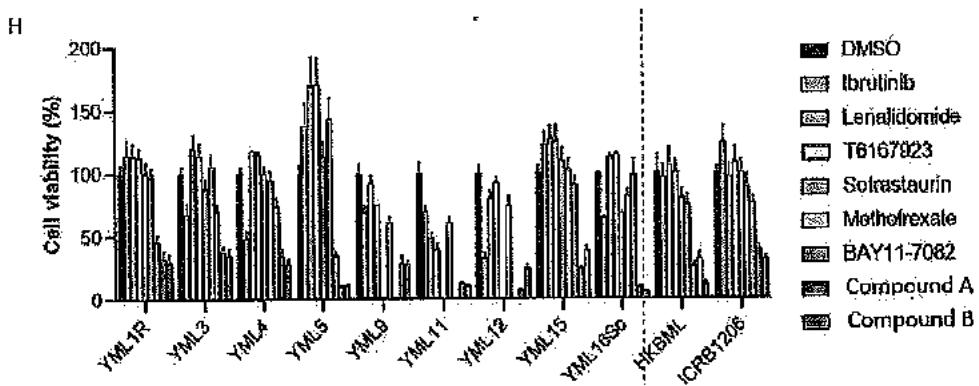


よって、RelA/p65が重要なシグナルと考え、RelA/p65をshRNAによりknockdownした(E)。その結果、knockdownが得られた細胞株では、コントロールと比べ細胞活性が低下した。



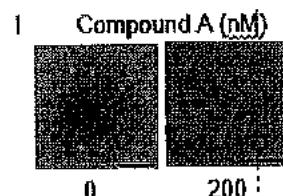
次にRelA/p65を効率よく低下させる薬剤をスクリーニングした。結果、同様の機序を持つ2剤(Compound A, Bとする)を見出した(G)。これらの薬剤においては、すべての細胞株において著明な細胞毒性が認められた(H)。



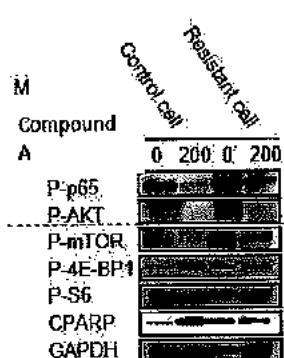
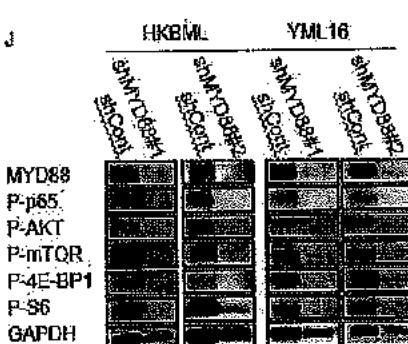
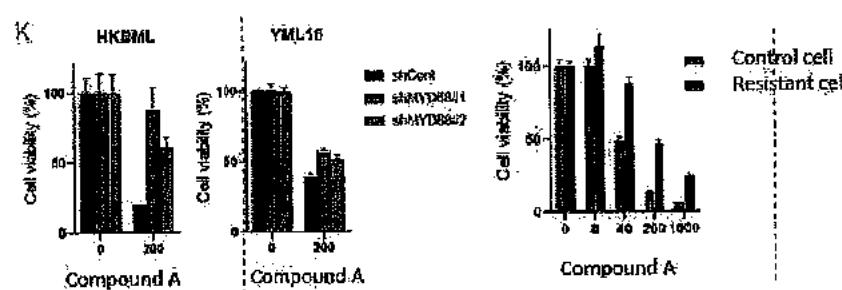


Compound A, Bにおいては、dose dependent、time dependentに細胞毒性が認められた。またRelA/p65の低下も同様にdose dependent、time dependentに認められた (data not shown)。

Compound Aにおいては、投与Day 1の段階で細胞スフェアの崩壊が認められた (I)。



次にCompound A,BのターゲットがRelA/p65であるか検証するために、RelA/p65の上流であるMYD88を、shRNAを用いてknockdownした。MYD88の発現低下とともにRelA/p65のリン酸化が抑制された (J)。Knockdownされた細胞株においてはCompound Aの薬剤感受性がリバースされた (K)。またCompound Aを低濃度長期間曝露し、Compound A resistant cellを作成した (L)。このreisitant cellにおいては、Compound Aの投与下でもRelA/p65のリン酸化は生じなかった。以上の結果より、Compound A, BはRelA/p65を直接ターゲットとし、著明な抗腫瘍効果を持つ薬剤と考えられた。



最後にCompound AをPCNSLの脳腫瘍マウスモデルに対し、腹腔内投与した。JCRB1206、YML12の2つの細胞株を用いた。Dose 150 μ g/kg、週1回投与では生存期間が延長しなかったが、180–200 μ g/kg、週1回投与では有意に生存期間が延長した (data not shown)。

(成果・考察) 等

過去の知見より、PCNSLの腫瘍維持にはNF- κ B経路の下流にあるRelA/p65が重要であることが推測されていた。またPI3K pathwayも腫瘍維持に関わることが報告されていた。今回、患者由来細胞株を用いた検証では、BTK (NF- κ B経路の上流) の阻害薬であるibrutinibにおいて、RelA/p65のリン酸化の抑制と細胞毒性がリンクしていた。一方で、PI3K pathwayの抑制は細胞毒性とリンクしなかった。よって、RelA/p65が細胞生存におけるより重要なシグナルであることが示唆された。RelA/p65をknockdownすると細胞活性が落ちることからも、RelA/p65の重要性が支持された。

より効率よくRelA/p65のリン酸化を抑制する薬剤を検証したところ、同様の機序を持つ薬剤 (Compound A, Bとする) が発見された。これらの薬剤は低濃度で強力にRelA/p65のリン酸化を抑制し、PCNSL細胞株の細胞活性を減衰させた。さらにibrutinibと異なり、すべての細胞株において効果を發揮した。よってNF- κ B経路、RelA/p65をターゲットする有望な治療薬であることが示唆された。マウスモデルにおいても生存期間の延長が証明できしたことより、臨床的にも有用であることが期待される。

一方本研究においては、ibrutinib耐性と*CARD11*遺伝子変異との関連付けは見いだされなかった。これまでの先行研究において、*CARD11*変異がある例では、*CARD11*の発現が亢進し、BTKを介さないRelA/p65の活性が起こるとされ、これによりibrutinib耐性を持つとされてきた。これに対して今回の検討では、*CARD11*変異がない細胞株においてもibrutinib耐性を呈する細胞の存在が明らかになった。今後、*CARD11*の発現解析、knockdown、knockinを行い、*CARD11*とibrutinib耐性の関係を検証、更には*CARD11*発現とCompound A, Bの感受性に関連があるか検証する必要がある。

肥満者の特性を活かした新たな創傷ケア確立に向けて -皮膚における Leptin シグナル伝達分子の解析-

横浜市立大学大学院医学研究科看護学専攻看護生命科学分野
博士前期課程 2 年 長尾 晏寿美

(研究目的)

本研究は、肥満者に対する新たな創傷ケア方法の確立を目指し、創傷治癒促進作用を有するLeptinおよびそのシグナル伝達分子の発現量とBMIの関連についてヒト皮膚組織で解析することを目的とした。

肥満による健康障害の一つに術後の創傷治癒の遅延があるが (Amri *et al.*, 2014) 、肥満者では創傷治癒促進作用をもつLeptinの発現量が皮下脂肪組織において増加することが報告されている (Lönnqvist *et al.*, 1997)。肥満者は脳などの他のLeptin標的臓器において、Leptinが十分に発現しているにも関わらず作用しないLeptin抵抗性状態にあると考えられている (Münzberg *et al.*, 2004)。そのため、肥満者の皮膚においてもLeptin抵抗性が引き起こされており、創傷治癒遅延のメカニズムとして関与しているのではないかと考えた。Leptinは受容体であるObRbからJanus kinase (JAK) /Signal transducer and activator of transcription (STAT) シグナル伝達経路を介して、標的遺伝子を発現させる (Bates *et al.*, 2003)。本研究では、Leptinのシグナル伝達分子としてObRb、JAK2、STAT3の発現量を解析した。

本研究により、皮膚におけるLeptin抵抗性のメカニズムの一端を解析することは、肥満者で増加するLeptinを創傷治癒促進へと利用する知見の一つとなり、肥満者の特性を活かした皮膚創傷ケアの確立につながると考えた。

(研究方法)

I) 対象者：手術時に同一部位の皮膚残余組織が生じる乳房再建術を実施した日本人女性を対象者とし、余剰腹部皮膚組織を解析に用いた。対象者の除外基準として、Leptinの発現量を変動させる可能性がある以下の3点を考慮した。1) 乳癌患者では腫瘍周囲の皮下脂肪組織におけるLeptin mRNA発現量の増加が報告されている (Tessitore *et al.*, 2000)。本研究では腹部の皮膚組織を解析に用いるが、乳房再建時に癌の切除を同時に実施する1次再建に関しては除外とした。2) タモキシフェンを使用することで血漿Leptin濃度が上昇すると報告されていることから (Ozet *et al.*, 2001)、タモキシフェンを入院時に持参薬として使用している患者を除外した。3) 糖尿病患者で、Leptin血漿濃度が増加すると報告されていることから (Mehmet Akif Buyukbese *et al.*, 2004)、糖尿病患者を除外した。さらに、皮膚の解析に影響を与える可能性のある、アトピー性皮膚炎などの全身性皮膚疾患有している患者を除外した。このうち、RNA抽出不良であった3サンプルを除き解析対象者は81名とした。電子カルテから体重および身長の情報を取得し、Body Mass Index (BMI) を算出し、体格の指標として使用した。

2) 分子生物学的解析：手術当日に採取された皮膚を解析に用いた。皮下脂肪組織は *RNA later™* stabilization solution (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) 中で4°Cで一晩浸漬しRNAを安定化させた。表皮は、皮下脂肪組織の除去後、3mm以下に細断し、2U/mL dispase (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) in PBS中で4°Cで一晩反応させ、真皮を剥離し使用した。皮下脂肪組織及び表皮のサンプルは解析まで-80°Cで保存した。皮下脂肪組織と表皮それぞれからRNAを抽出し、cDNA合成を行った。このcDNAを用いてRT-qPCR法を使用して、皮下脂肪組織における*Leptin*のmRNA発現量及び表皮における*ObRb*, *JAK2*, *STAT3*の mRNA発現量をそれぞれ定量した。各遺伝子発現量は内部標準遺伝子である*ACTB*で補正し算出した。使用したプライマーの配列を表1に示した。

表1. プライマーの配列

Gene name	Forward	Reverse
<i>ACTB</i>	attgccgacaggatgcaga	gagtacttgcgcctcaggagga
<i>LEP</i>	ccaaaacctcatcaagacaatt	accggtgactttctgtttgga
<i>ObRb</i>	acaccagagtgtatgcaggttt	atgctcaaacgtttctggcttc
<i>JAK2</i>	gatgagaatagccaaagaaaaacg	ttgctgaataaatctgcgaaat
<i>STAT3</i>	gcttttgtcagcgatggagt	atttgtgacgggtctgaagtt

3) 統計学的解析：統計解析には、統計ソフトIBM SPSS Statistics version 24.0を用いた。相関関係は、Shapiro-Wilkの検定で正規性を確認後、正規分布のデータではPearsonの相関係数、非正規分布のデータではSpearmanの順位相関係数を用いて解析した。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

4) 倫理的配慮：本研究は、横浜市立大学ヒトゲノム・遺伝子研究倫理委員会の承認 (A200300013) を得て実施した。

(結 果)

1. 対象者の基本属性

本研究で対象とした81名の基本属性を表2に示した。対象者の年齢は 53.2 ± 5.7 (43–69) 歳、BMIは 22.9 ± 3.5 (17.7–34.7) kg/m²であった。

表2 対象者の基本属性

	全体	
	n	平均±SD; n(%)
年齢(year)	81	53.2±5.7
BMI(kg/m ²)	81	22.9±3.5
化学療法	79	42(53)
ホルモン療法	79	57(72)

ホルモン療法及び化学療法を実施の有無が不明な対象者が3名含まれていた。

2. 分子生物学的解析

1) 皮下脂肪組織における*Leptin* mRNA発現量とBMIの相関分析

本研究の対象者における*Leptin* mRNA発現量とBMIの相関関係を図1に示した。*Leptin* mRNA発現量とBMIとの間に有意な弱い正の相関関係が示された。(Spearman's $\rho = 0.301$, $p = 0.006$)

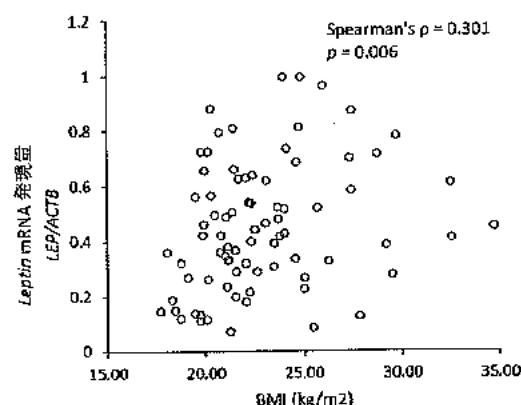


図1. *Leptin* mRNA発現量とBMIの相関

2) 表皮における*Leptin*シグナル伝達分子 (*ObRb*, *JAK2*, *STAT3*) mRNA発現量の解析

*ObRb*の解析を実施したが、発現量が低く現行の方法では安定した定量を行うことが出来なかった。

BMIと*JAK2* mRNA発現量及び*STAT3* mRNA発現量の間の相関関係を解析した結果、*JAK2*, *STAT3*とともに、BMIとの間に相関関係は示さなかった(表3)。次に、*Leptin* mRNA発現量と*JAK2*及び*STAT3* mRNA発現量の間の相関関係を解析した。その結果、*JAK2*, *STAT3*とともに、*Leptin*との間に相関関係は示されなかった(表4)。

JAK2 mRNA発現量と*STAT3* mRNA発現量との間に有意な中等度の正の相関関係が示された(Spearman's $\rho = 0.484$, $p < 0.001$) (図2)。

表3 BMIと*JAK2*及び*STAT3* mRNA発現量の相関関係 (N=81)

	coefficient	p
<i>JAK2</i>	0.077	0.495
<i>STAT3</i>	-0.019	0.863

Spearmanの順位相関係数

表4 *Leptin* mRNA発現量と*JAK2*及び*STAT3* mRNA発現量の相関関係 (N=81)

	coefficient	p
<i>JAK2</i>	0.154	0.170
<i>STAT3</i>	-0.032	0.776

Spearmanの順位相関係数

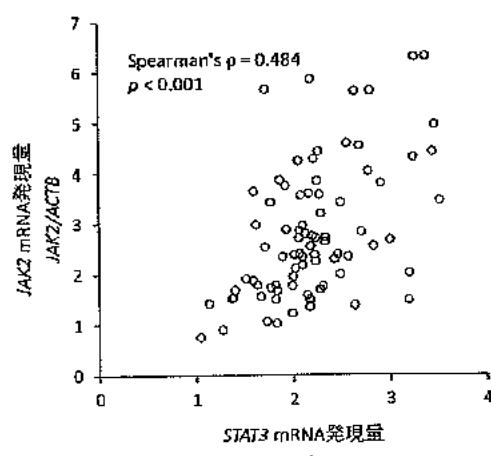


図2. *JAK2*と*STAT3* mRNA発現量の相関

(成果・考察) 等

本研究は、肥満者の術後創傷治癒遅延のメカニズムの一つに皮膚での*Leptin*抵抗性が関与しているのではないかと考え、*Leptin*とそのシグナル伝達分子の発現量のBMIに伴う変動

をヒト皮膚組織で解析した。

はじめに、皮下脂肪組織の*Leptin* mRNA発現量とBMIの関連を解析し、皮下脂肪組織の*Leptin* mRNA発現量とBMIとの間に有意な弱い正の相関が示された。Montagueらは、BMI20–34kg/m²の欧米人女性15名を対象とし、腹部皮下脂肪組織における*Leptin* mRNA発現量とBMIの間に中等度の正の相関が示されることを報告している (Montague et al., 1996)。このことから、BMIの範囲が狭い、軽度な肥満によって皮下脂肪組織の*Leptin* mRNA発現量は増加することが示された。日本人においては、BMI14.8–36.3 kg/m²の女性 353名を解析し、BMIの増加に伴い*Leptin*血漿濃度が上昇することが報告されているが (Matsubara et al., 2002)、皮下脂肪組織における発現增加との関連については示されていなかった。本研究は、日本人女性において、先行研究で示された欧米人女性同様、BMIの範囲が狭い軽度なBMIの増加によっても皮下脂肪組織の*Leptin* mRNA発現量が上昇することを初めて示した。

*Leptin*はObRbに結合することで、JAK2がリン酸化によって活性化される。その後、JAK2のリン酸化により、ObRbがリン酸化され、STAT3のリン酸化及び活性化が誘導され、標的遺伝子が発現する (Bates et al., 2003)。本研究では、表皮における*Leptin*シグナル伝達分子 (ObRb, JAK2, STAT3) の発現量とBMIの関連について解析した。ObRbについては、発現量が低く現行の方法では安定した定量を行うことが出来なかつた。そのため、ObRbの定量については解析方法を検討し今後の課題とした。ObRbの下流で*Leptin*シグナル伝達に関するJAK2及びSTAT3のmRNA発現量は、BMIとの間において、また*Leptin* mRNA発現量との間において相関関係を示さなかつた。つまり肥満者では*Leptin*の発現量が増加しているが、シグナル伝達に関するJAK2とSTAT3の発現量は*Leptin*の発現量に関連しないことから、増加した*Leptin*のシグナルが下流への伝達につながらない可能性が考えられる。

JAK2とSTAT3の関連を解析した結果から、JAK2 mRNA発現量とSTAT3 mRNA発現量の間に有意な中等度の正の相関関係が認められた。このことから、表皮における*Leptin*のシグナルは受容体結合後にさらに、JAK2およびSTAT3の発現量に応じて制御される可能性がある。

本研究では、JAK2及びSTAT3のmRNA発現量の解析を実施したが、*Leptin*のシグナルはこれらのリン酸化を介して伝達される。したがって今後は、ObRb、JAK2、STAT3のリン酸化を解析することが必要である。また、マウスを用いた先行研究において、肥満によって誘発される*Leptin*シグナル伝達経路には、抑制に働く分子の存在も報告されている。Protein tyrosine phosphatase receptor type J (PTPRJ)、Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) はJAK2リン酸化を抑制し (Zabolotny et al., 2002; Shintani et al., 2017)、Suppressor of cytokine signaling (SOCS3) はJAK2リン酸化とObRbリン酸化を抑制する (Bjorbak et al., 2000; Howard et al., 2004)。肥満者の皮膚においても、*Leptin*シグナル伝達の抑制に寄与する分子が、*Leptin*抵抗性に関与している可能性が考えられる。そのため、*Leptin*のシグナル伝達を抑制する分子を含めた解析が必要である。

今後、肥満者の皮膚における*Leptin*シグナル伝達の解析が進むことで、将来的に*Leptin*の発現が増加している肥満者の特性を活かした創傷ケアの確立につながると考える。

(学会発表)

・長尾晏寿美、横原弘子、赤瀬智子；肥満者の腹部皮下脂肪における*LEP*と表皮における*TGMI*、*KRT14*遺伝子発現量の解析、第42回日本分子生物学会年会、福岡、2019年12月

手術後患者に潜む「不快」に関する関連因子の探索

横浜市立大学医学研究科博士前期課程看護学専攻 周麻酔期看護学領域
芝 紘一

(研究目的)

周手術期に従事する医療従事者および患者の目標は、「手術を安全に行い、できる限り短時間で社会復帰すること」(日本麻酔科学会・周術期管理チーム委員会, 2016)である。患者は疾患の治療のために手術を行うにもかかわらず、多くの手術後患者は、手術後の一定期間、疼痛や恶心などを抱える。患者は、このような手術後に降りかかるものを「不快」と感じていると考えられる。質の高い医療の提供を行うべき看護者として、患者の不快な症状や現象の消失・軽減に努めることは重要課題のひとつであると考える。

手術後患者の不快を明らかにするために、看護者の記載する診療録に着目した。看護者は、自由記述によって、検温表などのテンプレートに当てはまらないものを記載し、スタッフ間で情報を共有する。そのテキストデータには一般化されていない背景因子や要因が記載されている可能性があるため、患者の不快な症状やその背景因子を抽出する際に有用であると考えた。

本研究は、手術後患者に「不快」な症状や現象が起こっているか、背景となる因子は何かを明らかにすることを目的とする。そして、手術後患者の不快の発生予測につながり、発生予防の一助となることを本研究の意義とする。

(研究方法)

本研究は、既存の診療録情報を用いた後ろ向き観察研究である。看護記録に関する解析は、テキストマイニングアプローチを使用した。研究対象は2018年1月～12月の1年間、A大学附属B病院で手術を受けた患者のうち、(1) 手術当日に20歳以上であること、(2) 手術後4日以上入院しており、手術後3日間のデータ収集が行えること、以上の条件を全て満たすものとした。

以下の情報を抽出した。

【対象者の基礎情報】年齢、性別、身長、体重、既往歴

【周手術期に関する情報】主診療科、手術術式、麻酔様式、ASA-PS

【周手術期の患者の状態】看護師記載の経過記録・SOAP記録、検温表より疼痛、恶心、嘔吐の有無

解析ソフトはSPSS Statistics Ver. 26 (IBM, NY, USA)、KH Coder3 (ver. 3. Alpha. 17a)および同ソフトのプラグインである文錦™レポーティング for KH Coderを使用した。

KH Coderは、定型化されていない文章の集まりを、自然言語処理 (natural language processing) の手法を使って単語やフレーズに分割し、それらの出現頻度や相関関係を分析して、有用な情報を抽出するもので、近年の情報処理技術の進歩を取り入れたシステムである (Higuchi, 2016, 2017)。また、「KH Coder Index Page」によると、令和2年3月26日現在、「KH Coder」を用いた研究事例件数は3586件である。

各患者の看護記録記載全文を電子カルテの記録より、テキストデータとして取得し解析した。全患者分のテキストファイルについて、KH Coder が搭載している標準辞書（ChaSen）にて形態素解析を行った。形態素分析の際、標準辞書のみでは重複や誤記、表記の揺れがあった場合解析に影響する可能性があり、また医療用語の多くが未知語として認識された。そのため、解析時に KWIC コンコーダンス機能にて抽出した語を吟味し、研究者が文脈を考慮した上で、同一の語をまとめ、データクレンジングを実施した。その後、単語の出現回数および、出現頻度を算出した。抽出された単語のうち、一般的に解析対象外となる数、記号、英字、固有名詞、接尾語を一括で除外したほか、診療記録のシステムとして、テンプレート上に組み込まれている語を除外した。コーディングルールファイルを作成し、不快の因子を抽出できるようにした。対応分析を行い、抽出語同士および抽出語と外部変数の関連を分析した。語最小出現数の設定は、より広く因子を探索しつつ、質の担保を行うため 100 とした。

看護記録以外の各属性の関係性については、SPSS にて χ^2 検定および残差分析を実施した。

（結 果）

本研究の分析対象者は、男性 1690 名（43.70%）、女性 2181 名（56.30%）であった。年齢の平均値は 57.49 歳であった。診療科（全 19 診療科）としては消化器外科が 15.80% と最も多く、整形外科（12.76%）、婦人科（10.54%）と続いている。先行研究から不快と考えられる現象をのうち、実際の診療録情報から「疼痛」「吐き気」「嘔吐」を抽出した。

看護記録の形態素分析の結果、「疼痛」は 3085 人（79.70%）、延べ出現回数 21352 回であり、抽出語のなかで最も多かった。コロケーション集計では、「疼痛」の直後に出現する語は「あり」（1798 回）、「自制内」（1909 回）であり、「なし」（796 回）を大きく上回っている。疼痛については、術後患者に広く存在する不快であるといえる。本稿では、紙面の都合上、抽出できた 3 つの不快の要因のうち最も多くの患者が体験している「疼痛」について示す。

＜検温表および基本属性を分析対象とした、 χ^2 検定および残差分析＞

疼痛の訴えが多い属性として以下が挙げられた。ここでは標準調整済み残差が +1.96 以上のものを示す。

40～64 歳 ($\chi^2=25.03$ 、df=2、p<.01)、女性 ($\chi^2=47.43$ 、df=1、p<.01)、ASA-PS1・2 ($\chi^2=631.17$ 、df=4、p<.01)、BMI25 以上 ($\chi^2=5.13$ 、df=1、p<.05)、予定手術患者 ($\chi^2=113.89$ 、df=1、p<.01)、特定の診療科〔形成、口腔外科、産科、耳鼻科、消化器、整形、乳腺、泌尿器、婦人科〕 ($\chi^2=1374.67$ 、df=18、p<.01)。

＜テキストマイニングを利用した不快の背景因子の探索＞

KH coder を使用し以下の手順で分析を実施した。

診療科：有意差ありの診療科が多く、解析を煩雑にする可能性があるため、有意に疼痛と正の関連があった診療科、有意に負の関連があった診療科、有意差なしの診療科の 3 群に分けた。前述の 3 群を外部変数とし、抽出語との対応分析を実施した（図 1）。疼痛を多く訴えてい

る診療科群と同ペクトルには「鎮痛薬」「飲水」「自制内」「膀胱留置カテーテル」「嘔吐」が布置されていた。

年齢：年齢と有意に疼痛と正の関連があった群である40～64歳と同ペクトルには「鎮痛薬」「体動」「疼痛」「下肢」「転落」が布置されていた。

女性：「夜間」「覚醒」「皮膚トラブル」「食事」といった語が布置されていた。

(成果・考察) 等

「鎮痛薬」「飲水」「自制内」「膀胱留置カテーテル」「嘔吐」が有意に疼痛を訴えている診療科に特徴的に布置されている。疼痛のある患者は多くの場合、鎮痛薬を使用している。その背景として、膀胱留置カテーテルが一因となっている可能性がある。膀胱留置術後患者の疼痛の原因として一般的なものは手術による創部痛であるが、術後安静のために数時間から数日は、膀胱留置カテーテルが挿入される。術後の膀胱留置カテーテルの不快感については、特に泌尿器科領域で問題となっており Catheter-Related Bladder Discomfort (CRBD) と呼称される。

先行研究では、患者が CRBD を「膀胱への刺激、排尿衝動を伴う灼熱感が引き起こす不快感」と表現している(Agarwal et al., 2005)。膀胱留置カテーテルは覚醒している患者にとって苦痛であり、CRBD の発生率を低下させる鎮痛薬以外の薬剤も検討されている(Hur et al., 2019)。疼痛と関連する語として「膀胱留置カテーテル」が布置されていることから、患者は CRBD を「疼痛」として表現している可能性がある。よって患者が「疼痛」を訴えた際には、創部痛だけでなく、CRBD を念頭におくことで、より適切な術後管理を行うことができると考えられる。

年齢：

「鎮痛薬」「体動」「下肢」「転落」「行く」が有意に疼痛を訴えている40～64歳に特徴的な語として抽出された。診療科の考察と同様、鎮痛薬が使用されていることがうかがえる。また、「下肢」「転落」「体動」より、下肢の疾患や外傷により体動が制限され、その結果ベッドなどから転落している可能性がある。コロケーション集計より「行く」の前に出現している語として「トイレ」が最も多い。このことから、下肢の疾患や外傷を抱えた患者が、トイレに行こうとした結果、ベッドから転落している可能性が示唆される。

性別：

「夜間」「覚醒」「皮膚トラブル」「食事」が女性に特徴的な語として抽出された。コロケーション集計より「夜間」の後に続く語として2位に「疼痛」があり、夜間に疼痛があり覚醒している可能性が単語より推察できる。入院中の睡眠障害は、疼痛が一因となっており、さらに睡眠障害が持続すると患者の回復が妨げられるとされている(Gong et al., 2019)。このような点から、女性は疼痛による睡眠障害が起こっており、それが持続すると術後の回復遅延に繋がる可能性があることが示唆される。

本研究は、手術後患者の不快の有無とその背景要因を探索することを目的とした研究であった。その結果、「疼痛」に関しては、膀胱留置カテーテルや下肢の疾患による体動制限、夜間覚醒が不快の背景因子として抽出された。

看護記録を使用し患者の状態を探索的に調査する研究である。看護記録を調査することで、手術後患者の状況がより鮮明になったと考えられる。今後は、疼痛以外の不快の因子についても同様の解析を行い、背景因子を探索する必要がある。

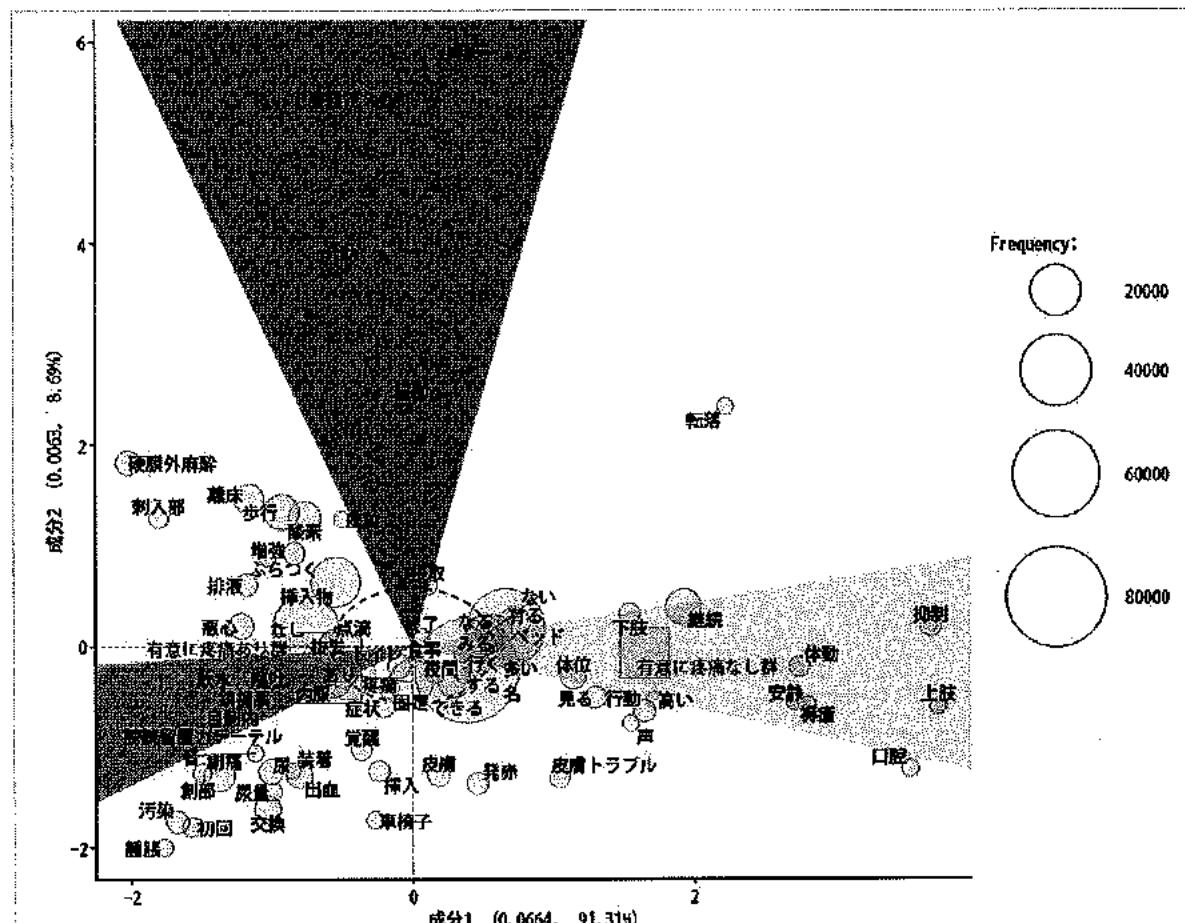


図 1. 痛みと診療科の対応分析

- Gong, L., Sun, S., Zhang, H., Zhao, Y., Yao, H., Li, T., . . . Wang, Z. (2019). Analysis of patients' sleep disorder after total knee arthroplasty-A retrospective study. [膝関節全置換術後の睡眠障害の解析 後ろ向き研究]. *Journal of Orthopaedic Science*, 24(1), 116-120.
- Higuchi, K. (2016). A Two-Step Approach to Quantitative Content Analysis-KH Coder Tutorial Using Anne of Green Gables (Part I). *Ritsumeikan Social Science Review*, 52(3), 77-91.
- Higuchi, K. (2017). A Two-Step Approach to Quantitative Content Analysis: KH Coder Tutorial Using Anne of Green Gables (Part II). *Ritsumeikan Social Science Review*, 65(1), 137-147.
- 日本麻酔科学会・周術期管理チーム委員会. (2016). *周術期管理チームテキスト* (3 ed.); 公益財団法人 日本麻酔科学会.