

# 琉球大学学術リポジトリ

## 平成28年度医学科医科学研究ポスター発表会抄録集

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2018-12-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: - メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016888">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016888</a>

平成 28 年度

医学科 医科学研究ポスター発表会  
抄 録 集

2017 年 4 月 17 日（月）～ 4 月 18 日（火）

琉球大学医学部  
医学科 3 年次



001

## 世界初の新たな鎮痛法への挑戦 ～ラット疼痛モデルにおける軟膜下モルヒネ投与の鎮痛効果～

平安名 智貴 (学籍番号: 104108J)  
指導教員: ○垣花 学, 神里 興太  
琉球大学大学院医学研究科麻酔科学講座

臨床的にも膜下腔内投与は全身投与の100倍の鎮痛効果を持つといわれ、最も効果的な投与方法であると考えられている。しかし我々は、くも膜下腔内投与よりも効果的と考えられる軟膜下投与法を世界に先駆けて開発報告した。今回、軟膜下投与におけるモルヒネの鎮痛効果を髄腔内投与のそれと比較検討した。

方法: 雄性SDラットにホルマリンテストを用い、モルヒネ軟膜下投与とくも膜下腔内投与による鎮痛効果を比較した。軟膜下投与群(モルヒネ群 n=16, 対照 n=4)は、全身麻酔下に腰部椎弓切除術施行し脊髄を露出、軟膜下に生食及びモルヒネを注入した。くも膜下腔内投与群(モルヒネ群 n=16, 対照 n=4)では大後頭孔よりくも膜下腔内にカテーテルを挿入(8.5cm)、生食及びモルヒネを注入した。軟膜下投与群では注入30分後、くも膜下腔内投与群ではカテーテル挿入1週間後にモルヒネを投与しその30分後にホルマリンテストを施行した。テストは後肢足背部に2%パラフォルムアルデヒド0.05ccを皮下注入し、5分ごとのFlinch, Licking, Shakingなど疼痛行動の回数を測定した。疼痛行動の累積回数から濃度-効果曲線を用いモルヒネの50%有効量(ED50)を求めた。

結果: モルヒネ投与後の疼痛行動累積回数は、くも膜下腔内投与・軟膜下投与ともに第一相及び第二相のいずれの相においても生食投与に比べて有意に減少した。軟膜下モルヒネ投与群のED50は、第一相では0.034 $\mu$ g/ml、第二相で0.027 $\mu$ g/mlであった。一方、くも膜下腔内モルヒネ投与群では、第一相で28.7 $\mu$ g/ml、第二相で0.54 $\mu$ g/mlであった。

考察: 今回、くも膜下腔内モルヒネ投与よりも軟膜下に投与したほうが低濃度で疼痛行動を減弱させることが明らかとなった。軟膜にはモルヒネの通過を制限する何らかの機構が存在すると考えられる。

結語: 軟膜下投与はくも膜下腔よりも低濃度でモルヒネの鎮痛効果が発現することを初めて証明した。

002

## 脂肪組織由来間葉系幹細胞(Ad-MSC)の 継代経過における細胞性質の変化に関する検討

銘苅 正行 (学籍番号: 114162H)  
指導教員: ○西 由希子, 村山 裕子, 森島 聡子, 益崎 裕章  
琉球大学大学院医学研究科内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座  
(第二内科)

### 背景・目的

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)は骨、軟骨、脂肪組織への多分化能と免疫抑制能を有し、再生医療や同種造血幹細胞移植における移植片対宿主病の治療ツールとして臨床応用が始まっている(Muroi K *et al.* Int J Hematol. 2016; 103: 245-250.)。MSCは様々な組織から採取可能であるが、とりわけ脂肪組織由来MSC(Adipose derived MSC: Ad-MSC)は脂肪細胞を多量に採取可能であることが大きなアドバンテージとなる。臨床応用の際には利用可能な細胞の継代数を確定しておくことが極めて重要であることから継代によるAd-MSCの性質変化を解析した。

### 方法

C3H/Heマウスから皮下脂肪組織を採取し、脂肪幹細胞分離キット(R&D)を用いてAd-MSCを分離し、18代まで継代培養した。継代数ごとの細胞増殖率を検討するため、各継代細胞 $2 \times 10^5$ 個を72時間培養した後の細胞数を比較した。また細胞表面抗原の変化を検討するため、CD4・CD24・CD29・CD31・CD44・CD45・CD73・CD90.2・CD105・Sca1・TER119の発現をフローサイトメトリーで解析した。

### 結果

72時間後の細胞増殖率は200～400%で、継代数の増加に伴う増殖率の低下は認めなかった。MSCの表面抗原であるCD29・CD44・CD90.2・CD105・Sca1は検討した継代細胞のすべてで発現を認めた。一方、血球系細胞や内皮細胞に発現するCD4・CD24・CD31・CD45・CD73・TER119は陰性であった。

### 考察

18代までの継代によるAd-MSCの細胞増殖率、細胞表面抗原の発現に明らかに変化は観察されなかった。臨床応用に向けて、多分化能や免疫抑制能の比較、マウス・ヒト細胞間の種差の検討が重要である。

003

## 境界性パーソナリティ障害の気質・性格 —双極Ⅱ型障害との比較および両親の離婚の影響—

吉本 愛 (学籍番号: 124147J)  
指導教員: ○甲田 宗良, 近藤 毅  
琉球大学大学院医学研究科精神病理学講座

【問題と目的】境界性パーソナリティ障害(borderline personality disorder: BPD)は、対人関係、自己像、情動の不安定さと行動面の衝動性を特徴とし(DSM-5: APA, 2013)、その人格形成には幼少期の愛着欠損感の関与が指摘される(Laporte *et al.*, 2012)。本研究では、BPDの気質・性格特性を明瞭に描出すべく、健常対照群に加えて感情・行動面に不安定さを抱える双極Ⅱ型障害(bipolar disorder II: BD II)との比較を試み、さらに幼少期の両親の離婚の影響も検討した。

【方法】1. 指標 気質・性格の測定にはTemperament and Character Inventory (TCI: 木島ら, 1996)およびTemperament Evaluation of Memphis, Pisa, Paris and San Diego-autoquestionnaire version (TEMPS-A: Koda & Kondo, 2010)を用いた。

2. 対象者 TCIの比較はBPD患者13名(26.8 $\pm$ 8.5歳、女性11名)、TEMPS-Aの比較では別のBPD患者13名(28.3 $\pm$ 7.9歳、女性13名)を対象とした。BD IIと健常対照群は、BPDと年齢・性別を適合させたサンプルを抽出した。BPDとBD IIの診断はDSM-IV-TR (APA, 2000)に基づいた。

3. 手続き・倫理的配慮 対象者より書面による同意を得て、質問紙を配布し、口頭および紙面にて説明を行った。

【結果と考察】群間の比較では、両疾患群(BPD・BD II)と健常対照群との間に、複数の気質・性格得点に差異を認めたが、BPD - BD II間に有意差はなかった。つまり、BPDとBD IIは、気質・性格面においても同様の特性を共有する可能性が示唆された。

両親の離婚の影響について、BPD群内で比較した結果、両親の離婚を経験したBPD者は、高い不安気質や低い報酬依存を抱えながらも、新奇性追求や自己志向は高く、固執の得点が低かった。すなわち、両親の離婚の影響から不安や孤立に親和的だが、独力で従来の枠に囚われず柔軟に行動する特性も示唆された。したがって、BPDの心理アプローチでは、両親の離婚を単に愛着形成上の不利と片付けず、「自立に向けた契機」と捉え直す観点が必要だろう。

004

## 病理解剖における症例検討

上地 高志 (学籍番号: 124177A)  
指導教員: ○小山 寛文, 吉見 直己  
琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

人体解剖には系統解剖、法医学解剖、病理解剖の三つがあるが、その中で病理解剖とは、死体解剖保存法に基づき、病死者を遺族の承諾のもとに病理医が行う解剖のことで、死因をはじめ病変の本態、種類、程度や治療の効果および影響などを解明するために行われる。医学の急激な進歩によって、さまざまな疾患に対して新しい診断法や治療法が開発され、現代の医療は大変高度かつ複雑なものになってきたが、患者さんにおこる全ての出来事を予測し、対応することは現在でも難しいと言わざるを得ない。よって、より確実な、よりよい医療を行うために、診療の効果、問題点を絶えず検証する必要がある。病理解剖は非常に重要だと言える。

今回検討したのは重症心不全の既往のある50代男性が、入院中に突然の呼吸停止を来した症例である。各臓器を肉眼的及び、組織学的に観察して死因を考察することで病理解剖の意義について触れることを目的とした症例研究を行った。

肉眼的、組織学的に大動脈解離、冠動脈閉塞、肺動脈血栓塞栓、気管支閉塞は明らかでなく、刺激電導系にも著変を認めなかったが、右後頭葉に1cm大の脳出血を認めた。他方、左心室の広範囲の陳旧性心筋梗塞と著明な遠心性肥大が確認された。

以上の所見より本症例では、脳出血を来し、循環不全に陥り死亡に至った。背景に重症心不全があり、心予備能が低下していたものと推察された。発表時には、具体的な病理学的所見と考察を提示する予定である。

005

リアルタイム法を用いた  
皮膚細菌叢における DNA の定量

幸喜 健 (学籍番号: 124182G)

指導教員: ○木村 亮介, 石田 肇

琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

目的: リアルタイム PCR 法を用いて, 皮膚細菌叢サンプルにおける細菌由来 DNA の定量分析方法を確立する。また, 額におけるボルフィリン量や次世代シーケンサーを用いた細菌の割合とリアルタイム PCR 法による細菌 DNA 濃度との関係を調べる。

方法: 健康ボランティア 89 人に対して, 額の皮膚における水分, 油分, 蒸散量, 皮膚色を計り, ボルフィリンの数, サイズ, 強度について計測を行った。また, 額の 4cm 四方を綿棒でスワブし, 細菌叢サンプルを得た。細菌叢サンプルは, 次世代シーケンサーを用いた 16s rRNA 解析によって存在する属の割合が調べられた。本研究では, 皮膚サンプルをリアルタイム PCR 法を用いて細菌叢における細菌の DNA 濃度を求めた。各データを集計し, 相関を調べた。

結果: 定量 PCR により各サンプルにおける細菌由来 DNA の濃度を求めた。そのデータと, 次世代シーケンサーを用いた 16s rRNA 解析における細菌由来配列のリード数や細菌の相対的な割合, 額のボルフィリン強度との相関を調べた結果, ①細菌 DNA 濃度と 16SrRNA 解析の細菌由来配列リード数, ②細菌 DNA 濃度と Propionibacterium の細菌叢における割合, ③細菌の DNA 濃度と額のボルフィリン強度, ④ Propionibacterium の割合と額のボルフィリン強度, ⑤ Propionibacterium の DNA 数と額のボルフィリン強度に関して正の相関が認められた。

考察: 次世代シーケンサーを用いた 16s rRNA 解析では各サンプルのトータルリード数に厳密な定量性はないため, 本研究では, リアルタイム PCR によって細菌由来 DNA を定量する系を確立した。Propionibacterium は皮膚細菌叢で最も優勢の細菌であったが, 定量 PCR による細菌由来 DNA 濃度は Propionibacterium の割合と相関していた。また, ボルフィリンは主に Propionibacterium acnes による代謝産物であると考えられ, Propionibacterium の割合や量がボルフィリン強度と相関していることが観察された。定量 PCR による細菌由来 DNA 濃度の測定は, 次世代シーケンサーによる解析と合わせて, 細菌の絶対量を知る上で有用である。

007

線維骨異形成症における  
ナビゲーションによる手術支援

永島 由喜 (学籍番号: 124206H)

指導教員: ○松本 希<sup>1)</sup>, 鈴木幹男<sup>2)</sup><sup>1)</sup>九州大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学教室,<sup>2)</sup>琉球大学大学院医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

(背景)

骨の形成異常により, 骨が線維組織に置き換わり病的に増殖してしまう線維骨異形成症の治療法は, 手術による骨減量手術である。今回の症例の患部は右上顎骨で, 右頬部腫脹, 眼窩下縁の骨増殖による右眼位異常が見られた。そのため, 視神経・三叉神経の保護をしながら, 顔面の左右が対称に戻るよう骨減量手術を行うことが重要であった。今回は九州大学の開発したナビゲーションを用い骨減量の目標設定ラインまでの距離, 神経までの距離を執刀医に伝え手術を支援し, 目標設定ラインにどれだけ近づくことが出来るかを検討した。

(方法)

術前に撮影した CT の画像をナビゲーションソフト (3D slicer) に取り込み, CT データを構造物ごとに色付けし, 骨, 神経, 歯の 3D モデルを作成した。左側 (正常) の 3D モデルを角度や位置を考慮し右側 (患側) 反転させ, 骨減量の際の目標設定ラインである「術後 3D モデル」を作成し手術のプランニングをした。手術においては, 赤外線カメラに位置を伝える反射球のついた九州大学の開発した上顎歯用のマウスピースを患者に装着し, モニターに 3D モデルと患者の位置が正確に重ね合わせて表示されるようにした。執刀医がモニターを見ずとも, 手術の進捗状況を確認できるよう目標ライン・神経からの距離に合わせてアラーム音をコンピューターから鳴らし手術を支援した。術後 CT を撮り目標モデルとの誤差を評価した。

(結果)

術後 CT と目標モデルを照合すると, 視神経の近接する眼窩の奥を除いてほとんどのスライスでプランニング通りに骨減量できていた。

(考察)

実際の手術では, 皮膚切開の箇所が限られており目視での左右対称性の確認・進捗状況の確認が難しいためナビゲーションによる確認が有用であったと考える。ナビゲーションを用いることで安心かつ正確な手術をプランニングし, 骨減量手術を支援できたと考える。

006

cMOS カメラと膜電位感受性色素を用いた  
心臓興奮伝播パターンの光学的マッピングと  
ギャップ結合阻害薬ヘプタノールの作用の解析

与那覇 健 (学籍番号: 124201G)

指導教員: ○酒井 哲郎

琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

目的: cMOS カメラを用いて膜電位感受性色素 NK2761 で染色したラットの摘出右心耳標本の興奮伝播パターンを光学的にマッピングを行った。ギャップ結合阻害薬であるヘプタノールを投与し, この薬物の興奮伝播に及ぼす影響を調べた。この薬物の存在下でテタヌス刺激を与えて, 頻拍様興奮を誘発し, その際の興奮伝播パターンを解析した。

方法: ラットから摘出した右心耳標本を NK2761 で染色し, サイトカラシン D 40 μM で筋収縮を抑制した。標本に波長 700nm の光を照射し, 透過光の変化を cMOS カメラにより記録した。得られた画像を MATLAB でノイズを除去し, Image J で色付けを行い, アニメーションによるマッピングを行った。

結果: 波長 700nm での測定では, 活動電位由来の光学的シグナルの伝播が観察された。活動電位シグナル発現の後, 筋収縮によるアーチファクトが見られた。膜電位依存性のない波長 620nm では活動電位シグナルが消失し, アーチファクトのみ見られた。ヘプタノール 5 μM 存在下では, 興奮伝導速度が低下した。また筋収縮のアーチファクトは抑制された。この状態でテタヌス刺激を加えると, 活動電位シグナルが高頻度に発現する不整脈が発現した。マッピングでは異常自動能の発現が観察された。テタヌス刺激により誘発される不整脈は, 標準外液中では予め 3Hz5 分以上の高頻度刺激を与えた時のみ観察されたが, ヘプタノール存在下では高頻度刺激なしに不整脈が現れた。

考察: 5 μM のヘプタノールを投与による興奮伝導速度の低下は, ギャップ結合のコンダクタンスの低下によるものと考えられる。また筋収縮を抑制させる効果があると思われるが, この機序は不明である。今回の例での異常自動能の発現の機序は不明である。

008

ゲノムワイド関連解析による  
日本人乳癌の疾患感受性遺伝子領域の探索

安富祖 素子 (学籍番号: 134122H)

指導教員: ○今村 美菜子, 前田 土郎

琉球大学大学院医学研究科先進ゲノム検査医学講座

【背景と目的】現在までに, ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により 90 以上の遺伝子座と乳癌との関連が報告されている。それらの多くは欧米人を対象としたものであり, 東アジア人を対象とした研究は僅かである。そこで, 日本人乳癌の疾患関連遺伝子領域を GWAS にて探索することを目的として本研究を行った。【方法】国立研究開発法人科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) が公開しているデータのうち, NBDC Research ID: hum0014.v4 を使用した。遺伝型解析は Perlegen Sciences 社 high-density oligonucleotide arrays が用いられていた。乳癌を含む 34 疾患のデータを合算し, ハーディーワインベルグ平衡試験の p 値が  $1 \times 10^{-6}$  未満の一塩基多型 (SNP) を除外した後, 乳癌を疾患群, その他の 33 疾患を対照群として関連解析を行った。対照群においてマイナーアレル頻度が 0.05 未満の SNP は関連解析から除外した。Quality control (QC) 後の SNP 数は約 19 万, サンプル数は疾患群 195 名, 対照群 6,418 名であった (主解析)。QC 後, Cochran Armitage 検定にて関連解析を行った。対照群には男性のデータも含まれていたため, 女性に多い 5 疾患を対照群とし, サブ解析を行った (疾患群 195 名, 対照群 975 名)。【結果】 $p < 1 \times 10^{-4}$  を満たす候補領域は主解析では 14 SNPs, 12 領域, サブ解析では 18 SNPs, 16 領域同定され, 5 番染色体の rs16884161 が日本人乳癌と最も強い関連を示した (主解析:  $p = 5.65 \times 10^{-6}$ , オッズ比 = 1.65, 95% 信頼区間: 1.33–2.05)。両解析においてゲノムワイド水準 ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) を満たす乳癌との関連を示す SNP は得られなかった。【結論】今回の GWAS で, 乳癌疾患感受性候補領域が複数同定された。いずれもゲノムワイド水準に達していないため, 独立した乳癌集団と女性のみで構成される対照群を用いて, 更に検証を行う必要がある。現在, 過去に乳癌の GWAS を報告している研究者にデータ提供を依頼中である。

009

## EDAR 多型と耳介の特徴との関連

石川 桐子 (学籍番号: 134130J)  
 指導教員: ○木村 亮介, 石田 肇  
 琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

背景と目的: EDAR 遺伝子における非同義多型 V370A (rs3827760) は派生型アリルがアジア特異的に高頻度で存在し、毛髪の太さやシャベル型切歯と関連することが示されている (Fujimoto et al. 2008; Kimura et al. 2009)。また、5,000 人以上のラテンアメリカ人を対象とした非病理学的耳介形態のゲノムワイド関連研究では、耳介の特徴に有意に関連する 7 つの遺伝子座が同定されており、rs3827760 も耳介形態と関連することが示された (Adhikari et al. 2015)。本研究では、沖縄在住日本人の CT データを用いて、rs3827760 と耳介形態との関連が再現されるかを調べた。

材料と方法: 琉球大学医学部附属病院で PET 検査を受けた 689 名の患者をインフォームド Consent のもとで研究対象とした。患者の DICOM データを匿名化した後、画像解析ソフト Amira6.0.0 を用いてポリウムレンダリングを行って 3 次元画像にした上で、耳介形態を先行研究の評価方法に基づいて評価した。計測項目は、①耳たぶの付着、②耳たぶの大きさ、③対耳珠、④耳珠、⑤耳輪、⑥小結節である。rs3827760 の遺伝子型タイピングは、Taqman 法を用いて行った。耳介形態の各計測項目を目的変数とし、説明変数を SNP (rs3827760 の遺伝子型: 派生型アリルの数)、性別 (男性=1, 女性=2)、年齢、身長、体重として重回帰分析を行うことで、耳介形態と関連する因子を特定した。有意水準を  $P=0.05$  とした。

結果と考察: 耳たぶの付着は rs3827760、性別および年齢と、耳珠は rs3827760 および体重と有意な関連を示した。耳輪は性別と強く関連し、体重とも関連していた。耳たぶの大きさと対耳珠については年齢とのみ関連がみられた。小結節においては有意に関連する変数はみられなかった。本研究では、先行研究と同様、沖縄在住の日本人においても rs3827760 と耳介形態との関連が示された。

010

## 皮膚の特徴や状態と顔面ボルフィリン量との関連

川崎 亮 (学籍番号: 134133C)  
 指導教員: ○木村 亮介, 石田 肇  
 琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

目的: ニキビは原因菌であるアクネ菌などの増殖で引き起こされる。本研究では、アクネ菌の代謝物であるボルフィリンの量を指標として、皮膚の特徴や状態との関連を明らかにすることを目的とする。

方法: 2017 年 2 月 (冬) に沖縄在住の健康ボランティア 46 名に対して出身地などに関するアンケートを行い、肌計測 (油分量、水分量、皮膚色、ボルフィリン強度) を行った。得られたデータは過去夏に収集された 206 名分のデータと合わせて解析した。T 検定により、男女差および出身地の差を調べた。また、目的変数を鼻あるいは額のボルフィリン強度とし、説明変数を季節、性別、年齢、額の水分量、油分量、皮膚色として、ステップワイズ法による重回帰分析を行った。

結果と考察: 沖縄出身者と県外出身者では、額における油分量において有意な差が見られ、沖縄出身者のほうが値が大きかった。男女間では、額の油分量、鼻のボルフィリン強度、上腕と額の皮膚色において、いずれも男性のほうが有意に値が大きかった。

重回帰分析の結果、額のボルフィリン強度は、額の油分量が多いほど、また皮膚色が淡いほど有意に大きくなるが示された。鼻のボルフィリン強度に関しては、皮膚色および季節 (夏よりも冬で大きい) と強い関連が示された。先述の T 検定では性別間でボルフィリン強度 (鼻) に有意な差がみられたが、重回帰分析では性別は除外項目とされている。これは、性別が真の関連因子ではないことを示している。男女間では額の皮膚色に大きな違いがあり、皮膚色を介する形で男女間にボルフィリン強度の見せかけの違いが生まれたと考えられる。

皮膚色がボルフィリン強度 (鼻) と関連するメカニズムについては、①紫外線による殺菌効果あるいは②メラニンの抗菌効果が関与していることが考えられる。今後、更なる研究により、皮膚色とボルフィリン強度およびアクネ菌増殖との因果関係を明らかにする必要がある。

011

## 2010 年以降に報告されたアジアにおけるヒト化石

石田 浩太郎 (学籍番号: 134152K)  
 指導教員: ○石田 肇, 木村 亮介  
 琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

後期更新世における人類の拡散の歴史は、人類学の分野でさかんに議論されている課題のひとつである。なかでもアジアは、アフリカを出た人類が太平洋諸島やアメリカ大陸に拡散する際に通過する、人類の歴史を探る上で重要な地域であり、サピエンスを中心とするヒト化石が近年新たに発掘・報告されている。本研究では近年発表されたヒト化石の記録について紹介する。

日本 (1) 沖縄県石垣市白保竿根田原遺跡

2008 年から 2009 年にかけて、ヒトの右頭頂骨、右第 2 中足骨および右腓骨骨体が発掘された。年代は 15,751-20,416BP であった。2010 年の発掘ではさらに 400 以上の人骨片が発掘されている。

(2) 沖縄県南城市サキタリ洞遺跡

2009 年にヒト乳児の骨が発掘された。発掘された地層は 29,000 年前～31,000 年前であった。

フィリピン (1) ルソン島、カヤオ洞窟

2007 年に右第 3 中足骨が発掘された。年代は U-series で 66,700 年前であった。

中国 (1) 道県、フイヤン洞窟

2011 年に 47 本の歯の化石が発掘された。発掘された地層は 80,000 年前～120,000 年前であるが、この年代には疑問も出ている。形態的には後期更新世のヒトや現代人に類似している。

(2) 許昌市、灵井

2007 年から 2014 年にかけて、2 つの頭蓋骨が発掘された。年代は 105,000 年前～125,000 年前であった。

ラオス (1) タムパリン遺跡

2009 年に頭蓋骨が発掘された。発掘された地層は 46,000 年前 51,000 年前、骨の direct-Udating の結果は～63,000 年前であった。眼窩上の隆起がないなど現代人的な特徴を示している。2010 年には別の個体と思われる下顎骨と歯も発掘されている。

今後は沖縄県から出土した人骨の年代解析と形態解析、および中国南部フイヤン洞窟から出土した人骨の年代解析が重要になると考えられる。

012

## 沖縄県における地震に対する災害対策評価

中野 剛希 (学籍番号 134203H)  
 指導教員: ○久木田 一郎  
 琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

・初めに 2011 年の東日本大震災、2016 年の熊本地震など近年日本における大きな地震が続く中で沖縄県での地震に対する災害対策も必要であり今回アメリカの Hazard Vulnerability Analysis という災害評価システムを用いて検討した。

・方法 沖縄県における地震に対し、Probability を (3, 2, 1, 0) の 4 段階、Risk を (5, 4, 3, 2, 1) の 5 段階、Preparedness を (3, 2, 1) の 3 段階に分ける。この 3 種類の点数をそれぞれかけ合わせ点数とする。

・結果 Probability : 2  
 Risk : 5  
 Preparedness : 3  
 合計 : 30

・考察 Probability : 沖縄県で震度 5 以上の地震が起きたのは 1926 年が最後であるが 1880 年以降 (約 120 年間) では 4 回起こっており、沖縄県周辺には火山帯や複数のプレート及び断層が位置していることから、地震の可能性が低いと判断するのは危険である。

防災科学技術研究所の地震動予測地図によると、30 年間に沖縄本島で震度 6 弱以上の揺れに見舞われる確率は 4～18% となっており、これは全国平均より少し高い値である。

Risk : 建物被害、人的被害、交通施設被害など多様で甚大な被害が予想される。特に沖縄県はピロティ形式の建物が多く那覇市の非木造建物のうち約 30% を占めている。ピロティ形式の建築物の被害率は全鉄筋コンクリート造り建築物の被害率のほぼ 2 倍ととも危険である。

Preparedness : 沖縄県における地震保険は、付帯率が 51.5% と全国平均 60.2% に比べ低い。世帯加入率は 14.3% と年々徐々に増加しているものの全国平均 29.5% と倍以上の差があり 47 都道府県中 46 位と低い。

・結論 これらことから沖縄県に地震がもたらす被害は甚大であると予想されるため、今後その対策をより強固に進めていく必要がある。

013

BMP-1 およびカルレチニンの  
髄膜腫砂粒体での発現

亀浜 郁佳 (学籍番号: 144101K)

指導教員: ○加留部 謙之輔

琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

砂粒体は同心円状や層状の構造を示す石灰化物質であり、正常器官（くも膜顆粒など）や腫瘍組織（髄膜腫、腎癌など）で見られるが、その形成機序は未だ解明されていない。今回の研究では免疫染色を通して、髄膜腫における砂粒体形成に重要な蛋白の同定を試みた。

髄膜腫症例全 85 症例のうち、標本の組織面積が小さい 17 症例を除いた 68 症例における砂粒体の発現密度を（++）、（+）、（±）、（-）の 4 段階で分類したところ、それぞれ 17, 7, 17, 21 症例であった。また、2 例においては同一病変組織内で砂粒体の密度にムラが認められた。髄膜腫は多様な形態像からいくつもの病型に分かれているが、今回の解析では髄膜皮性、線維性、移行性、砂粒腫性、その他がそれぞれ 7, 15, 7, 8, 4 症例だった。砂粒体（++）の約 41% が砂粒腫性、約 29% が移行性、一方砂粒体（-）の約 48% が線維性、約 33% が髄膜皮性であり、組織型により砂粒体の密度に違いが認められた。

次に、砂粒体（++）、（-）の計 38 症例を抽出し、骨形成や細胞外マトリックス形成に関与すると考えられている BMP-1 と、カルシウム結合蛋白の一つであるカルレチニンの 2 種類の蛋白で免疫染色をし、砂粒体形成とこれらの蛋白の発現に関連があるか調べた。

興味深いことに、砂粒体は 16/17 症例（94.1%）において BMP-1 に陽性であったが、カルレチニンは全例で陰性であった。BMP-1 は砂粒腫性と移行性の腫瘍細胞の細胞質に有意に高頻度に発現していたが、髄膜腫全体としては、砂粒体（++）と砂粒体（-）間で BMP-1 とカルレチニンの腫瘍細胞における発現に有意差は見られず、また砂粒体密度にムラを認めた 2 症例において、高密度領域と低密度領域間での差も見られなかった。

今回の結果から、BMP-1 に関しては砂粒体形成への関与が否定できず、今後をさらなる検討が必要と考えられた。

015

## 沖縄県における DLBCL 症例の臨床解析

川木 護 (学籍番号: 144104D)

指導教員: ○加留部 謙之輔<sup>1)</sup>、森近 一穂<sup>2)</sup>、福島 卓也<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座、<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座、<sup>3)</sup> 琉球大学医学部保健学科血液免疫検査学講座

我が国の悪性リンパ腫の多くは非ホジキンリンパ腫（NHL）で、ホジキンリンパ腫は少ない。NHL のひとつであるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）は、我が国のリンパ系腫瘍の約 30%、NHL 全体の約 70% を占めるもっとも発生頻度の高い悪性リンパ腫である。

今回は、一般的に予後因子として知られている事項と、実際の患者の予後との関係を、臨床統計を用いて解析し検討した。その方法として、2002～2015 年のうちに、琉球大学病院、南部医療センター、ハートライフ病院にて DLBCL と診断・治療された 146 症例の患者の臨床データについてカルテを参照し収集した。これらのデータを基に、臨床解析ソフト Stata を用いて、生存曲線（カプランマイヤー法）の描出、単変量解析（log-rank 検定）などを行い、予後因子を解析した。

DLBCL 全症例の 5 年生存率は 55% であり、これまでの報告と大きな差はなかった。初診時の年齢で分けての生存分析をカプランマイヤー法で行ったところ、5 年生存率は、初診時 60 歳未満の症例で 89%、60 歳以上の症例で 40% であり、有意な差が認められた（ $p < 0.01$ ）。同様に、国際予後指標（IPI）、R-IPI についても解析を行い、共に有意差が認められた（ $p < 0.01$ ）。R-IPI は IPI に比較してより有用であると 2007 年に発表された予後指標で、3 段階に分けられる。治療にリツキサンを用いた症例のみを対象とした場合、その 5 年生存率について、Very Good 群が 100%、Good 群が 68%、Poor 群が 31% であった。その他、血清可溶性 IL-2 レセプター濃度について、2000U/mL 未満の症例は生存率が有意に上昇（ $p < 0.01$ ）することが明らかになった。

このように、予後指標以外の項目でも重要な因子が存在することが明らかとなった。今後も収集データを更に増やし、考察を進めていきたい。

014

糖尿病新薬と心血管イベント発生に関する  
ランダム化比較試験で報告された  
結果の妥当性について

伊田 幸平 (学籍番号: 144102H)

指導教員: ○植田 真一郎

琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

## 【背景】

Rosiglitazone が心血管イベントの発生を増加させるというメタアナリシスを受け、FDA は糖尿病新薬承認前に心血管イベントに関する安全性の報告を義務づけるようになった。近年登場した糖尿病治療薬に着目すると、心血管イベント発生の抑制について非劣性だけでなく優越性が示されたランダム化比較試験（RCT）も報告されている。

## 【目的】

糖尿病新薬と心血管イベント発生についての RCT（SAVOR-TIMI53, TECOS, SUSTAIN-6, LEADER, EMPA-REG）を題材として、患者群と研究方法を解析することで結果の解釈の妥当性について考察する。

## 【方法】

対象の RCT について、患者群の特徴や試験での心血管アウトカム、研究デザインを比較検討しつづ結果の解釈の妥当性について考察する。

## 【結果・考察】

組み入れ患者の重症度に着目すると、どの RCT も心血管イベントに関して高リスク集団が選択されている。たとえプラセボ群に対する優越性が示されたとしても、実臨床における糖尿病患者すべてに適用すべきでなく、「心血管イベント高リスク患者において」有効性があると限定的に解釈すべきである。また、RCT の期間中の血糖値についてはプラセボ群でのコントロール不良が目立った。安全性を比較するためには血糖値の差をなるべく小さくすべきであり、これら RCT における血糖コントロール不良がプラセボ群に不利な影響を与えた可能性を否定することはできない。EMPA-REG については RCT の研究モデルそのものが破綻している可能性がある。この RCT では 10mg と 25mg の二用量を合算させたものとプラセボ群を比較した結果、優越性があると報告している。しかし、Appendix で収録されているデータによると合算前比較では有意差がないことがわかる。あらかじめ承認された研究デザインであるものの、その結果には完全な妥当性があるとは言えない。

016

メラノーマ細胞における NLRP1 の  
Timozolomide 耐性の関与について

松本 侑子 (学籍番号: 144103F)

指導教員: ○藤田真由美<sup>1)</sup>、Zili Zhai<sup>1)</sup>、高橋健造<sup>2)</sup><sup>1)</sup> University of Colorado Department of Dermatology、<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科皮膚病態制御学講座

メラノーマ（黒色腫）は色素細胞由来の皮膚悪性腫瘍である。腫瘍周辺に生じる炎症反応は、メラノーマの病期により異なる作用を持ち、早期では腫瘍の抑制に、進行期では腫瘍の増殖に働く。この増殖促進に働く分子として、活性化 NF- $\kappa$ B と腫瘍が分泌する活性化 IL-1B がある。

進行期のメラノーマでは NLRP3 インフラソームの遺伝子変異により、NLRP3 の恒常的な活性化が生じ、次に NF- $\kappa$ B が持続的に活性化され、caspase-1 や IL-1B の活性化や分泌が生じることが知られている。この IL-1B は周辺の間質細胞の IL-1B 受容体を介し、間質細胞自身が IL-1B を放出することで、このパラクライン経路が持続的に維持される。

よって、インフラソームの活性化や IL-1B の放出を抑制することは、メラノーマの増殖を制御することができる重要な治療法となりうる。また、メラノーマ治療薬である Timozolomide (TMZ) (DNA アルキル化剤) は、NF- $\kappa$ B の活性化によって薬剤耐性が生じることが知られている。

今回、我々はヒトメラノーマ細胞（1205Lu 細胞）を 2 ヶ月以上 TMZ 添加の状態 で培養し、後天的に薬剤耐性を獲得させ、TMZ 負荷前後の 1205Lu 細胞の変化を検討した。さらに、TMZ に対する感受性を回復させる薬剤を見いだすために、*O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)、green tea Epigallocatechin gallate (EGCG) を投与した。

結果は、TMZ を添加したメラノーマ細胞では、NLRP1 の発現が上昇し、NF- $\kappa$ B と IL-1B が活性化されていた。しかし MGMT や EGCG の添加では薬剤耐性は改善しなかった。メラノーマ細胞において NLRP1 は腫瘍の生存率や増殖に限らず、薬物耐性にも関与していることが明らかになった。

017

## インフルエンザに対する麻黄湯の治療効果を対象としたシステマティックレビュー

知念 秀享 (学籍番号: 144105B)  
指導教員: 徳重 明央, ○植田 真一郎  
琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

背景: 近年, 抗インフルエンザウイルス薬であるオセルタミビルに対して耐性を持つインフルエンザウイルスが報告されている. そのような状況下において, インフルエンザに類似する感染症の治療に対して古来より日本で使われてきた漢方薬であり, オセルタミビルと異なる作用機序を持つ麻黄湯がオセルタミビルを上回るインフルエンザに対する選択薬となる可能性を秘めている.

目的: 麻黄湯の治療効果を改めて体系的に検証することによって, 麻黄湯の有効性を評価し, 今後の更なるインフルエンザ治療戦略の改善を目指す.

検索戦略: MEDLINE (2017/3/6), 医学中央雑誌 (2017/3/6) の両媒体を用いて文献を検索した.

選択基準: 麻黄湯を合併症の無いインフルエンザに対して通常用いられる抗ウイルス薬と比較したランダム化比較試験 (RCT).

主な結果: 33人を対象とした1試験が選択基準に適合した. しかしながら, その試験は方法的な質が低かった.

結論: 今回, 麻黄湯はインフルエンザ治療の上でザナミビルと同等の効果認め, さらにオセルタミビルよりも優れた結果を示した. しかし, 試験の方法論的な質に限界があったため, 現時点でのエビデンスは弱いままである. 参加者数が多く, 明確な報告がある質の高いランダム化比較試験の実施が求められる.

018

## 沖縄本島の洪水における HVA (Hazard Vulnerability Analysis) 評価

横田 広太郎 (学籍番号: 144107J)  
指導教員: ○久木田 一郎  
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

日本は世界的に見て災害の多い国である. 国土は世界の0.28%であるのにたいしてマグニチュード6以上の地震は20%を超えており世界の活火山の7%があるなどのデータからみても多いことは一目瞭然である. また海に囲まれているため台風などの水害も続いており, 2016年にも死者・行方不明者が23人にもなる災害が発生した. このように現代においても災害は脅威でありしっかりと対策をたてないといけない.

そこで私は今回の基礎配属で沖縄の洪水における HVA 評価について調べた. 上記でも述べたことに加え沖縄は台風が多く水害は自分が入学してからも度々報告されている. また去年の老人ホームの浸水などもあり沖縄の洪水を調べようと考えた.

HVAとは災害脆弱性の評価と和訳されているものであり災害が起こる以前の対策としてあらかじめ災害への脆弱性を評価しておくものである. 災害の種類は, 自然災害, 科学技術災害, 人為災害の3つに分けられる. それぞれ probability (可能性) を4段階, Risk (危険度) を5段階, Preparedness (準備) を3段階にわけ, それぞれで点数付けを行う. この点数を掛け合わせた数字が高ければ高いほどその地域の災害の脆弱性が高いことを意味するのである. この点数をつけることで地域ごとの脆弱性を視覚化することができて平常時における災害対策の優先度や災害時における被害の推察を効率的に行うことができる.

## 沖縄本島の洪水の評価

Probability3 Risk3 Preparedness2 合計 18

**Probability** 沖縄では平成に入ってからだけで68個の洪水被害が報告されておりその中で改修工事が完了しているのは4個だけである. さらに土地柄台風が多いことなどからも洪水が起こる可能性はかなり高いと考えられる.

**Risk** 平成に入ってから死者・行方不明者がひとり出ていることや高齢者が増えていることを考えると命の危険は高くはないが0ではないと考えられる. また平成に入ってから200戸以上の浸水被害は報告されており被害は縮小されているといえるだろう.

**Preparedness** 沖縄の県庁のホームページからもわかるようにハード面での対策は費用などの問題を含んでおりなかなか進んでいない. そこでソフト (避難意識など) 面での改善が提唱されているが現段階ではそれほど進んでおらずまだまだこれからである.

019

## ブタ腓 18 時間保存による腓島分離成績の比較

濱田 絵莉 (学籍番号: 144109E)  
指導教員: ○野口 洋文  
琉球大学大学院医学研究科再生医学講座

腓島分離はエドモントン法が発表されて以来劇的に進歩しているが, 現在の移植の現場でも一人のレシピエントに対し二つから四つの腓臓を用いることもあり, 更なる研究が必要である. 腓島分離は大きく臓器保存, 膨化, 消化, 洗浄, 純化の5つの段階に分けることができる. 我々は臓器摘出から移植までの時間の大部分を占める保存に着眼し, 保存液の比較を行った. 現在は University of Wisconsin 溶液 (UW 溶液) が広く使われているが, UW 溶液は保存液として様々な利点を持っている一方で不利な点も多い. この研究では ET-Kyoto 溶液にトリプシン阻害薬のウリナスタチンを加えた Modified-Kyoto 溶液 (MK 溶液) を作製し, UW 溶液と MK 溶液を保存液として用いた結果を比較した.

また今回は摘出後の腓臓を 18 時間, UW 溶液もしくは MK 溶液中で保存した後実験を開始している. 先行研究として, 2 時間保存では UW 溶液より MK 溶液で腓島収量が多いという報告があるが今回のような長時間保存のケースでは UW 溶液の方が優れている可能性が考えられた. 保存液には細胞内液型 (低 Na<sup>+</sup>, 高 K<sup>+</sup>) と細胞外液型 (高 Na<sup>+</sup>, 低 K<sup>+</sup>) があり, 内液型の保存液の方が長時間保存に向いているという報告があるためである. 実際の臨床腓島移植では腓保存時間が 6 時間から 12 時間であり, UW 溶液と MK 溶液での長時間保存の検討も必要であると我々は考えた.

実験の結果, UW 溶液より MK 溶液で腓島収量が多かった. 腓島細胞の質は両者とも変わらなかったが, 組織切片は UW 溶液で外分泌腺の自己融解が多く見られた. MK 溶液は細胞外液型の保存液であり長時間保存には向かないと考えていたが, MK 溶液のトリプシン阻害作用を持つことや UW 溶液よりコラゲナーゼ抑制が弱いことがより大きい影響をもっていたためこのような結果となったと考えている.

この研究によって, 実際のヒト腓島分離でも MK 溶液を使うことで一つの腓臓からより多くの腓島が分離できるようになり, 腓臓の保存可能時間が長くても一定の収量を維持できる可能性が示された.

020

## 脆弱性評価に基づく沖縄における干ばつ調査

波平 郁実 (学籍番号: 144110J)  
指導教員: ○久木田 一郎  
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

## 初めに

東日本大震災に代表されるように, 日本では昔から多くの自然災害, またはテクノロジーハザードなどの人的災害が頻発している. 個々の災害のリスクを管理・評価し, 対策していく事が平常時において個々の災害対策の優先順位や被害を減少させることに繋がる. そこで沖縄県における干ばつのリスクを評価するため, 災害評価基準である Hazard Vulnerability Analysis (以下 HVA) を用いて災害評価を行う.

HVAでは災害を naturally occurring events, technological events, human related events, events involving hazardous materials の4つに分けてそれぞれを probability で4段階評価, risk で5段階評価, preparedness で3段階評価の点数をつけ, それぞれを掛け合わせた点数により, その総合点が高いほどよりその地域における災害に対する脆弱性を意味する. 干ばつに対する定義は様々であるため, 今回は沖縄県における断水 (沖縄県渇水対策連絡協議会による) に対するリスクを評価した.

## 結果

Probability:2 Risk:2 Preparedness:2 合計:8

## 考察

**Probability**: 平成に入ってから平成元年, 3年, 5年に実施されたのみであり, 平成6年~29年において断水は実施されていない. だが沖縄独特の気候 (梅雨期の5~6月, 台風期の8月~9月に年平均降雨量の48%が集中しており, 年によってばらつきのある降雨量.) を考慮すれば再び断水の可能性も考えられる. Probability 2

**Risk**: 断水による不衛生化, 観光地としての甚大な financial impactなどを考慮. だが多くの新ダムが建設されているため, 長期的な断水の可能性は低いため risk 2 とした.

**Preparedness**: 昭和56-57年沖縄渇水以降, 辺野喜ダム, 羽地ダム, 漢那ダムが順次新設され, また福地ダム, 瑞慶覧ダムの再開発により現時点において安定した給水を行えるようになってきている. だが, まだ長く安定した供水を伴っていないため preparedness 2 とした.



021

## EBER と TCR の二重染色プロトコル構築により得られた節外性NK/T細胞リンパ腫の由来細胞系統の新たな知見

高山 卓也 (学籍番号: 144111G)

指導教員: ○ Young Hye Ko<sup>1)</sup>, 加留部 謙之輔<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Samsung Medical Center, Department of Pathology, Seoul, Korea.

<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

節外性NK/T細胞リンパ腫 (ENKTL: Extranodal NK/T-cell lymphoma) は比較的悪性度の高い悪性リンパ腫であり, アジアや中南米で罹患率が高いことが知られている。病理学的には Epstein-Barr-virus (EBV) に感染した腫瘍性リンパ球の増殖を特徴とする。ENKTLの多くはナチュラルキラー細胞 (NK細胞) を由来とするがん化であると考えられていたが, 指導教員であるKoらはENKTLの病変組織において, 免疫染色 (IHC) にて多数のT細胞受容体 (TCR) 発現細胞を同定し, また TCR の遺伝子解析を通して ENKTL の症例の多くはむしろT細胞を由来とするという説を提唱している<sup>1)</sup>。しかし, ENKTLの腫瘍細胞は非常に多彩な形態を呈し, また病変組織にネクロシスに伴う変化が見られることが多く, 形態学的に腫瘍細胞を同定することはしばしば困難である。したがって, IHCで同定されたTCR陽性細胞がENKTLの真の腫瘍細胞であるかは, 疑問が残っていた。私たちの研究チームは, EBVの感度の高い組織学的検索法であるEBER in-situ hybridization と TCR の二重染色による腫瘍細胞の細胞由来の同定を試みた。リンパ腫の診断において一般的に用いられる酵素抗体法を試みたが, 正確な評価が困難であった。次に私たちは蛍光染色法による二重染色を検討した。賦活薬の選定, 発色試薬濃度, 染色順序等の検討を行った結果, 共焦点顕微鏡で二重染色 (EBER陽性:核が緑色, TCR陽性:細胞膜が赤色) を観察可能なプロトコルを構築した。Samsung Medical CenterでENKTLと診断された症例のうち, IHCでTCRが陽性であった十八例全てに蛍光染色法による二重染色を行った結果, 全ての症例においてEBER陽性細胞にTCRが発現していることがわかった。今回の研究結果はENKTLの腫瘍細胞がT細胞由来であるという強力な証拠であり, 今後の病態解明に繋がるものである。

1) Mineui Hong et al. Modern Pathology 2016

023

## 喉頭乳頭腫における成長因子受容体遺伝子の発現

宮城 翔 (学籍番号: 144113C)

指導教員: ○池上 太郎, 鈴木 幹男

琉球大学大学院医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

喉頭乳頭腫は喉頭 (特に声帯) に多発する良性の腫瘍であり, ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 低リスク型 (HPV6, HPV11) が腫瘍形成に関わっている。喉頭乳頭腫に対する決定的な治療法はいまだ確立されておらず, 手術が標準治療とされている。実臨床の問題点としては, 喉頭乳頭腫は手術での治療例の約半数で再発を繰り返すことである (数十回から数百回の手術も多々ある)。最近, 喉頭乳頭腫において上皮成長因子受容体 (EGFR) が過剰発現することが数例報告され, 喉頭乳頭腫の形成に成長因子受容体に関わることが示唆された。そこで, 本研究では喉頭乳頭腫におけるEGFR遺伝子およびインスリン様成長因子1受容体 (IGF1-R) の発現を明らかにすることを目的とした。

喉頭乳頭腫に罹患した患者を含む検体からDNA抽出を行い, PCR法により, 感染しているHPVのサブタイプを同定した。つづいて, 低リスク型HPV (HPV6, HPV11) に感染している検体 (合計24検体) とHPV非感染の正常検体9検体 (声門3検体, 声門上3検体, 声門下3検体) からRNA抽出を行い, 逆転写反応によりcDNAを作製した。最後に, リアルタイムPCR法を用い, HPV6感染群, HPV11感染群および非感染群におけるEGFRおよびIGF1Rの遺伝子発現量を定量した。

EGFRおよびIGF1Rの両遺伝子においてHPV6感染群, HPV11感染群, 非感染群の3群において有意な差は見られなかった。以上より, 喉頭乳頭腫においてEGFRおよびIGF1Rの発現は直接関わっていないことが示唆された。しかし過去の文献では喉頭乳頭腫ではEGFRタンパク質が過剰発現している報告があることから, 今後, 免疫染色またはウエスタンブロッティング法などを用いてタンパク質レベルでの発現についても明らかにしていく予定である。

022

## 沖縄県における津波に対する災害脆弱性評価

喜瀬 真行 (学籍番号: 144112E)

指導教員: ○久木田 一郎

琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

目的: 沖縄県において津波による災害が起こった場合の被害やその対処を考慮し, 災害への脆弱性を評価する。

方法: 気象庁, 沖縄県防災危機管理課の資料をもとに, アメリカの保険会社により提唱された災害評価基準であるHVA (Hazard Vulnerability Analysis) を用いて災害評価を行う。HVAではProbability, Risk, Preparednessの3つの要素を考慮し, Probabilityを4段階, Riskを5段階, Preparednessを3段階で評価し点数をつけ, 最終的にそれらを掛け合わせた点数で災害への脆弱性を評価する。合計点数 (45点満点) が大きければ災害への脆弱性が大きいことを意味する。

結果: Probability: 1, Risk: 5, Preparedness: 2, Total: 10

考察:

**Probability**

沖縄県では平均して年間約1回津波が観測されているがほとんど10cm前後の津波であり, また平成23年に起きた東北地方太平洋沖地震の際には沖縄本島で60cm, 宮古・八重山地方では65cmの津波が観測されたが, いずれも災害の報告は出ていない。よってProbability: 1とした。

**Risk**

津波による災害が起こった際には多数の死者, 行方不明者が出ており, 加えて建築物への被害や交通機関への被害も報告されている。生命への脅威が非常に大きいことからRisk: 5とした。

**Preparedness**

沖縄県では毎年11月に地域ごとの広域地震・津波避難訓練を実施しているが, 地域住民の参加は任意である。

保険に関しては, 医療, 建物, 家財などを対象とする保険があるが, 住宅の津波被害を補償する地震保険への加入は任意である。

以上からPreparedness: 2とした。

024

## 結核菌の病原因子XによるCytokine A産生抑制機序の解明

劉 天誠 (学籍番号: 144115K)

指導教員: ○高江洲 義一, 松崎 吾朗

琉球大学大学院医学研究科生体防御学講座

【序論】

結核菌はマクロファージ (Mφ) に感染する細胞内寄生性細菌である。その排除にはMφからのCytokine Aの産生が重要である。一方, 結核菌が宿主免疫を回避する機構の一つとして, 病原因子Xを介したCytokine Aの産生抑制が知られている。しかしながら, その分子機序は未だ不明である。本研究では, 結核菌の病原因子XによるCytokine A産生抑制の分子機序の解明に取り組んだ。

【方法・結果】

① Xと結合する宿主タンパク質を同定するため, Xをbaitとしたyeast two-hybrid screeningを行い, マウスcDNAライブラリーを導入した約40万の形質転換酵母から97個の候補クローン (XBP1 ~ XBP97) を分離した。これらの候補の中で, Xとの結合が確認できたのはXBP1とXBP29の2種類であった。後者の方がより強くXと結合することが示唆されたため, 以後XBP29に着目して解析を行った。

② 免疫沈降法を用いて, ヒト由来培養細胞 (HEK293T細胞) 内でもXとXBP29が結合することを確認した。

③ Cytokine A産生におけるXBP29の役割を明らかにするために, RNA干渉法でXBP29をノックダウンしたJ774マウスMφ細胞株にPAMP刺激とDAMP刺激を与え, 培養上清中のCytokine Aの量をELISA法で測定した。その結果, XBP29をノックダウンするとPAMP+DAMPで誘導されるCytokine Aの産生が完全に消失した。さらに, 定量的PCR法を用いて, PAMP単独刺激で誘導されるCytokine AのmRNA量がXBP29のノックダウンによって正常の半分以下に減少することを見いだした。

(※ PAMP=pathogen-associated molecular pattern, DAMP=damage-associated molecular pattern)

【結論・考察】

本研究では, 結核菌の病原因子Xの宿主側標的分子の候補としてXBP29を新たに同定した。解析の結果, XBP29はMφにおいてCytokine Aの産生に必須の役割を果たしており, PAMP受容体の下流でCytokine Aの遺伝子発現を制御する分子であることが示唆された。これらのことから, XはXBP29を阻害することでCytokine Aの産生を抑制する可能性が考えられる。その具体的な機序と結核菌感染におけるXBP29の役割の解明が今後の課題である。本研究から得られる知見は, 結核の新たな治療法や予防法の開発に大きく寄与するであろう。

025

## 超高磁場 MRI を用いたマウス乳がんにおける造影剤集積の評価

河野 瑠子 (学籍番号: 144116H)

指導教員: ○山口 雅之<sup>1)</sup>, 藤井 博史<sup>1)</sup>, 岸本 英博<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 国立がん研究センター先端医療センター機能診断開発分野<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学講座

【背景と目的】生体 MRI の造影剤として利用される gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid (Gd-DTPA) は血流により病変に到達した後、血管外に漏出し、細胞外液腔に集積する。その集積性は、臓器や腫瘍ごとに異なる。また、マウス体内の微細な構造を MRI で撮影するためには、7tesla 以上の高磁場 MRI 装置が必要である。今回の実験では 9.4tesla MRI 装置を使ってマウスの乳がんに取り込まれた造影剤濃度を推定する手法の実行可能性を検討した。【方法】MRI の信号と T1 緩和時間は非線形の関係式で結ばれている。造影剤濃度は T1 緩和時間の逆数に比例する (R1 直線)。In vivo MRI においては、造影剤投与後の 1/T1 から投与前の 1/T1 を引き、先述の R1 直線の傾き  $r_1$  で割り、造影剤濃度を求める。MRI 装置は 9.4tesla 動物用装置 (BioSpec 94/20; Bruker) に 8-16 チャンネルアレイコイルを装着した。Phantom は 0, 0.06, 0.12, 0.24mM の Gd-DTPA を含有した血清を 4 本のシリンジに入れアクリル円筒に設置した。温度は 36.3-37.0℃ に保った。Rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) T1map を用い、TR は 250-6000ms の 6 段階、分解能 =  $0.1 \times 0.1\text{mm}^2$  に設定した。装置備え付けの画像解析ソフトウェア (Paravision 5.1; Bruker BioSpin) で得られた画素値から KaleidaGraph 4.1J を使い非線形曲線を描き、Excel2013 にて、上記の R1 直線を描出した。動物実験はマウス 3 匹 (BALB/c, 雌, がん細胞移植時 36 週齢) の左後背部の皮下に乳がん細胞 (EMT-6) を  $6.0 \times 10^6$  個ずつ移植した。移植後、12-14 日後に、マウスにガス麻酔を施し、Gd-DTPA はマウスの尾静脈からカテーテルにより投与し、投与前後 phantom 撮影と同様な RARE T1map の撮影を行った。腫瘍と筋肉 (対照) の T1 緩和時間から、上記の検量線を用いて腫瘍と筋肉の造影剤濃度を推定した。【結果】MRI 推定濃度は腫瘍で  $0.15 \pm 0.059\text{mM}$ 、筋肉で  $0.08 \pm 0.018\text{mM}$  であった。腫瘍の Gd-DTPA 濃度が筋肉よりも高かった。これは、腫瘍の方が血管が豊富で、細胞外液腔が多く、Gd-DTPA が貯留しやすいためと推察される。【結論】In vivo MRI で Gd-DTPA 造影剤濃度の推定は実行可能である。

026

## 2つの Multiplex PCR キットの比較

神元 繁信 (学籍番号: 144117F)

指導教員: 金城武士, Gretchen Parrott, Saifun Nahar, 藤田次郎  
琉球大学大学院医学研究科感染症・呼吸器・消化器内科学講座  
(第一内科)

呼吸器感染症の原因微生物には肺炎球菌やインフルエンザ桿菌などの一般細菌以外に、マイコプラズマに代表される非定型病原体やウイルスも重要である。これらの診断にはベットの診断にできる迅速抗原検出キットが利用できるものもあるが、対象病原体に限られており、また感度が高くはないなどの欠点がある。琉球大学医学部第一内科では、2012 年より複数の病原体を一度にスクリーニングできる、multiplex PCR 法を導入し、積極的に臨床現場に応用している。呼吸器感染症の診断には、Seegene 社が発売している 2 種類の multiplex PCR 診断キットを利用している。本発表では、この 2 種類の診断キットを様々な角度から比較検討する。具体的には、両者の原理の違いや診断性能の比較、またコストや所要時間、結果の判定方法の違いなどを比較する。所要時間は実際に発表者が検査したときに要した時間を計測した。まず両者の検査精度の比較では、両者に大きな差は認められなかった。コストは Anyplex の方が安かった。Seplex の短所としては結果判定を目視で行うため、検査を施行する者によって結果が異なり、偽陽性が生じ得る点である。Anyplex は Real-time PCR を原理とする診断キットであり、短所としてはコンピュータで自動判定を行うため、実際にはターゲット遺伝子の増幅があってもカットオフレベルに満たないサンプルは陰性となり、偽陰性が生じ得る点である。長所としては、Seplex に比べ操作が簡単で比較的短時間で行うことができる点と誰が行っても同じ結果が出る点である。以上の点から Seplex に比べ、Anyplex の方が優れていると考えられた。

027

## cMOS カメラと膜電位感受性色素を用いた摘出心房標本における興奮伝播の可視化と実験不整脈発現の解析

山里 雄飛 (144118D), 与那覇 健 (124201G)

指導教員: ○酒井 哲郎

琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

心房細動は最も頻度が高い不整脈であり、その発生機構は重要な問題である。我々は cMOS カメラと膜電位感受性色素を用いて興奮伝播の可視化を行い、実験不整脈を発現させてその興奮伝播パターンのマッピングを行い、その解析を行った。

イソフルランによって麻酔をかけたラットより心臓を摘出し、氷温 Ringer 液中で右心耳を切り出し、それをできるだけ伸展した状態でシリコンゴムを張ったチャンバーの底にタングステン製のピンで張り付けサイトカラシン D で筋収縮を抑制した。膜電位感受性色素 NK2761 を用いて標本を染色し、cMOS カメラに接続した大型顕微鏡のステージに置き、干渉フィルターによって得られた波長 700nm の光を下から照射した状態で標本に電気刺激を与え、光学的シグナルを観察した。得られたデータをアニメーション表示にするために、MATLAB を用いてフィルターをかけノイズを除去し、さらにより直感的に見ることができるよう ImageJ を用いて色付けを行った。まず、単発の電気刺激を与え波長 700nm で活動電位シグナルの伝播を記録した。このシグナルには筋収縮によるアーティファクトが重畳しているため、波長 620nm に切り替えてアーティファクトを確認した。次いで 3Hz の刺激を 5 分間かけた後、100msec 間隔で 10 発の刺激パルスを与えて不整脈を誘発し、その時の活動電位シグナルの伝播を記録した。

単発刺激に対しては活動電位シグナルの伝播とそれに付随する心収縮のアーティファクトがみられた。誘発された実験不整脈では興奮伝播を視覚的にわかりやすいアニメーション表示でマッピングすることができた。得られたマップから、今回の例では異常なペースメーカーが発現し、高頻度の興奮を起こしているということが明らかとなった。この異常ペースメーカーは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加により誘発されたものと考えられる。活動電位の伝播は時間的かつ空間的情報であるので、このマッピング法によるアニメーション表示は不整脈発現の解析に適していると考えられた。

028

## チャシコツ岬上遺跡より出土した 9-10 世紀のヒト歯の歯種の同定、および乳歯と永久歯による死亡時期推定

當山 武知 (学籍番号: 144119B)

指導教員: ○石田 肇, 木村 亮介

琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

チャシコツ岬上遺跡は北海道斜里町ウトロ市街地から斜里町市街地に約 2km 南西に進んだオホーツク海に突き出た海岸段丘上に立地している遺跡である。今回、当遺跡から出土された 9-10 世紀のヒト歯を各歯種に特徴的な解剖形態と照らし合わせて歯種の同定を行い、また同一個体のものと思われる乳歯、永久歯よりこの個体が死亡したと思われる時期を推定した。出土歯は完璧に形が保存されているものから形が崩れているものまで様々であった。後者に関してはアセトン (有機溶媒) とピュットバル (ビニル系合成樹脂) を用いて可能な限り修復した。その後、すべての歯を 99.5% エタノールで洗浄した。一般的な歯の解剖形態と出土歯を照らし合わせた結果、19 個の歯の歯種を同定した。

調査区 TR-5 の積石墓から出土した歯には同一個体のものと思われる乳歯と永久歯が出土した。永久歯の発生程度から乳児、小児の死亡時期を推定することが可能である。TR-5 の積石墓から出土された乳歯は下顎右側第二乳臼歯と下顎左側第二乳臼歯であった。また永久歯では下顎左側第一大臼歯と下顎右側第一大臼歯、下顎左側側切歯が存在した。この三つの永久歯に特徴的なのは、歯冠部が完全に形成されており、歯根部が 2~3mm 程度形成されている点であった。上記の永久歯の形成段階は一般的に 4 歳 (±1 歳) の幼児にみられるものであり、この個体は 4 歳程度で死亡したと推定することができる。

しかし、この乳歯と永久歯は同じ積石墓から出土したものではあるが、完璧に同一個体のものであると保証できるわけではない。もしも、この積石墓から幼児の大きき程の手足の骨や頭蓋骨と一緒に出土していたらこの死亡時期推定の確実性が高まっていたであろうと思われる。

029

## 日本国内におけるインフルエンザの疫学研究

齊藤 聡大 (学籍番号: 144120F)

指導教員: ○砂川 富正<sup>1)</sup>, トーマ・クラウディア<sup>2)</sup>, 仲宗根 昇<sup>2)</sup>  
高橋 琢理<sup>1)</sup>, 木下 一美<sup>1)</sup>, 有馬 雄三<sup>1)</sup>, 大石 和徳<sup>1)</sup>  
山城 哲<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 国立感染症研究所感染症疫学センター<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

**【背景】**日本においてインフルエンザは例年約1000万人を超える人が感染し、2000年以降の死者数は214(2001年)~1818(2005年)人を記録するなど私たちにとって身近な疾患であり、死亡のリスクも含んでいる。インフルエンザに関する国レベルの疫学情報は国立感染症研究所に集められ、社会に向け発信されている。

**【目的】**サーベイランスを用いて季節性インフルエンザについて解析し、また国立感染症研究所に対するメディアからの取材項目をインフルエンザの疫学的な記述とともに解析することで感染の予防や死亡等の重症化のリスクを減らすことに役立つ情報を得ることを試みる。

**【材料と方法】**季節性インフルエンザについて、患者発生動向、検出病原体、入院患者発生動向、学校臨時休業情報等をサーベイランスを通じて分析することで今シーズンの季節性インフルエンザ(2017年第6週まで)についてその特徴を疫学的に記述した。過去4シーズンのサーベイランス情報と今シーズンとを比較することで今シーズンの季節性インフルエンザの特徴を考察した。また国立感染症研究所感染症疫学センター2室に対する2016年第36週から2017年第6週までの取材項目を全てリストアップし、今シーズンのメディアからのインフルエンザに対する質問事項として分類し時系列にまとめた。

**【結果および考察】**今シーズンは病原体としてA(H3)が92%と優位に流行していた。今シーズンに加え過去4シーズンのサーベイランス情報も比較すると、A(H3)が隔年で優位に流行している状況が観察された。A(H3)が優位に流行しているシーズンでは流行入りと流行のピークが早く、高齢者の受診患者数、入院患者数、重症化患者数の割合が増加していることが示唆された。各メディアからの質問事項は流行の時期によって質問の内容が偏ることも分析の結果から見られたためその特徴について報告する。

031

## 腱鞘巨細胞腫の再発危険因子の検討

光安 幸奈 (学籍番号: 144121D)

指導教員: ○金城 政樹, 金谷 文則  
琉球大学大学院医学研究科整形外科学講座

**【はじめに】**腱鞘巨細胞腫は良性腫瘍で、再発例の多い疾患である。そのため治療が数回に及ぶ例も多い。再発危険因子がわかれば、治療成績が向上すると考えられる。今回手指に発生した腱鞘巨細胞腫の症例について調査し、再発例を用いて再発危険因子を検討したので報告する。

**【対象と方法】**対象は2000~2016年までに手術治療を行った手関節以遠の腱鞘巨細胞腫47例である。男性11例、女性36例、平均年齢56.6歳(10-85歳)、右手28例、左手19例であった。腫瘍の発生部位はDIP関節21例、PIP関節12例、IP関節2例、手関節4例であった。発生指は母指9例、示指12例、中指11例、環指5例、小指6例、手掌1例、手関節3例であった。再発危険因子の検討のために、型(局所型、びまん型)、腫瘍発生場所(腱鞘、関節)、放置期間(自覚から手術までの期間)、骨浸潤の有無を検討した。局所型は腫瘍が一つの被膜により覆われているものとし、びまん型は腫瘍が一つの被膜により覆われていないものとした。

**【結果】**再発例は47例中7例(14.9%)であった。再発は術後1年~5年5ヶ月の間に発生した。再発危険因子として型、腫瘍発生場所、放置期間、骨浸潤の有無を検討したが統計的有意差はなかった。

**【考察】**再発危険因子としては過去に骨浸潤、びまん型などが挙げられているが、今回の検討では再発と有意に関連する因子は認められなかった。再発率は14.9%となり過去に報告されている範囲内であった。腫瘍の骨内浸潤は1例と非常にまれであることがわかった。再発例の局所型の例はDIP及びPIP関節周囲発生であり、この部位の解剖が複雑なため腫瘍の取り残しが生じたと考えられた。再発は術後平均2年3ヶ月で発生したため、長期フォロー及び患者が腫瘍を自覚したらすぐ来院することが必要だと考える。

030

## 精神遅滞関連遺伝子 Ftsj1 による翻訳調節機構に関する研究

西田 ななこ (学籍番号: 144122B)

指導教員: ○魏 范研<sup>1)</sup>, 富澤 一仁<sup>1)</sup>, 松下 正之<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 熊本大学大学院生命科学研究部生体機能病態学講座分子生理学分野  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院分子・細胞生理学講座

メッセンジャーRNAに含まれる遺伝情報は転移RNA(tRNA)によって解読され、タンパク質へと翻訳される。最近、大量の化学修飾がtRNAを構成する塩基で発見され、また、修飾の破綻が様々な代謝疾患の発症につながることから、tRNA修飾による翻訳制御は生体機能制御に大きな役割を有することが明らかになってきた。配属先の研究室は最近、X染色体連鎖性精神遅滞の原因遺伝子であるFtsj1がtRNA修飾酵素をコードすることを同定した。Ftsj1はtRNAをメチル化修飾し、効率的なタンパク質翻訳に重要である。さらに、Ftsj1欠損マウスでは記憶学習能力が大きく低下していたから、Ftsj1はtRNA修飾による翻訳制御を介して神経機能に重要であることが示唆された。しかし、Ftsj1によって制御されるtRNAのうち、どのtRNAがタンパク質翻訳に重要であるかは不明であるため、Ftsj1欠損による精神遅滞の全貌はまだ分かっていない。

本研究はFtsj1による翻訳調節機構の解明を研究課題とした。具体的には、ウミシタケルシフェラーゼの前頭に5つの連続コドン挿入したレポーターを設計し、連続コドンがないウミシタケルシフェラーゼを対照として発光量を比較すること、各コドンにおける翻訳効率とした。停止コドン以外の61種類のコドンに対応するレポーターを作成し、ヒト由来のHeLa細胞でまず評価したところ、翻訳効率は同じアミノ酸でもコドン間で大きな差があり、同評価系が翻訳レポーターを用いて機能することがわかった。次に、Ftsj1欠損マウスおよび野生型マウスを用いた胎児線維芽細胞(MEF)に同レポーターを導入し、評価した結果、Phe, Leu, ArgとTyrに対応する5つのコドンにおいて翻訳効率が有意に低下していた。Phe, Leu, Argコドンに対応するtRNAは、Ftsj1によってメチル化修飾をうけるため、Ftsj1はこれらのコドンの効率的な翻訳に重要であることが分かった。今後は、Phe, Leu, ArgとTyrを多く含むタンパク質のうち、神経細胞に多いものを探索し、Ftsj1欠損による精神遅滞の分子機構に迫りたい。

032

## 人工股関節全置換術の患者満足度における他覚的評価法と主観的評価法の検討

桑田 涼香 (学籍番号: 144126E)

指導教員: ○仲宗根 哲<sup>1)</sup>, 神谷 武志<sup>2)</sup>, 東 千夏<sup>1)</sup>, 石原 昌人<sup>1)</sup>  
松田 英敏<sup>1)</sup>, 親川 知<sup>1)</sup>, 金谷 文則<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学附属病院整形外科, <sup>2)</sup> 琉球大学医学部附属病院リハビリテーション部, <sup>3)</sup> 琉球大学大学院医学研究科整形外科学講座

**【はじめに】**股関節疾患では、医療者側からの他覚的評価として日本整形外科学会股関節機能判定基準(JOAスコア)が存在し、広く利用されている。一方で、2012年より日本整形外科学会が患者側からの主観的評価法である股関節疾患評価質問票(JHEQスコア)が発表され、当科でも股関節疾患の手術前後の評価法として利用している。今回、股関節疾患で適応される人工股関節全置換術(THA)の前後のJOAスコアとJHEQスコアについて検討した。

**【対象】**2013年5月から2016年1月までにTHAを行い、術後3カ月以上経過した50人55関節を対象とした。男性16人、女性34人で平均年齢59歳であった。原疾患は、変形性股関節症41例、大腿骨頭壊死症15例であった。THA術前後のJOAスコア(項目:疼痛, 可動域, 歩行能力, 日常生活動作)およびJHEQスコア(項目:不満足度, 疼痛, 動作, メンタル)を用いた評価を行い、THA前後において、主観的評価である不満足度の改善率と不満足度とJOAスコアおよびJHEQスコアの各項目の相関関係について検討した。

**【結果】**不満足度は、術前は平均77.8から術後17.1点に改善した。また、JOAスコアは、平均52.3点から91.7点に、JHEQスコアは平均22.1点から58.7点に改善した。THAの術前後での不満足度とJHEQ、JOAの各項目は関連を認め、特にTHA術後ではJOA、JHEQ全ての項目が不満足度との関連が見られた。

**【考察】**本研究結果から、患者の不満足度はJOAスコアと相関を認めたことから、医療者側のTHA前後の評価も有用と思われた。一方で、JOAスコアとJHEQスコアに乖離がでる症例が散見された。これは、JOAスコアが客観的基準が一定であるために、術前は低値になりやすく、術後は高値になりやすい評価法であるが、JHEQスコアは患者毎の日常生活動作や精神的な面も評価するためにばらつきが出たためと思われた。

股関節疾患を有する患者の臨床評価は、医療者側だけでなく、患者側の主観的評価も必要と思われ、JOAスコアやJHEQスコアは有用な評価法と思われた。

033

線虫 *C. エレガンス* (*Caenorhabditis elegans*) の概日行動リズムの解析

藤田 朋宏 (学籍番号: 144127C)

指導教員: ○ Ichiro Maruyama<sup>1)</sup>, 荻谷 研一<sup>2)</sup><sup>1)</sup> OIST Research Internship: Information Processing Biology<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科医化学講座

本研究の目的は、体長 1mm、1,000 細胞未満のモデル生物 *C. エレガンス* の概日リズムを、マウスのように行動レベルで解析することである。線虫 *C. エレガンス* は、ヒトゲノム計画の前哨戦として最初にゲノムが解読された多細胞生物であり、哺乳動物時計遺伝子のホモログも持つが、それらは 3 日という短い発生過程との関連において名付けられていた。*C. エレガンス* は、約 300 の神経細胞が個別に同定でき、全シナプスが電顕レベルで解明済みで、丸山ユニットでは特定の神経細胞の人為的活動操作や行動中の活動可視化技術を用いて行動制御の研究に用いられている。

一方、*ras* 癌遺伝子は低分子量 G 蛋白質をコードするが、*C. エレガンス* *ras* 癌遺伝子の抑制遺伝子 (*suppressor of ras*) として発見された *sur-5* 遺伝子の転写が、約 24 時間のリズムに従って変動し、明暗や温度に影響されることが最近報告された (PNAS E7837-45, 2016)。しかし、マウスの走行のように個体の概日行動リズムを報告したものではない。

本研究では、まず想定外に短いリズム誘発の有無を検証するため、①明セッション 30 分: 暗セッション 30 分、②各 1 時間、③各 2 時間、④各 6 時間の明暗反復 3 セットからなる実験を設定し、60-mm シャーレ上での 10 個体 (N2 系統) の走行を高解像度または赤外線 (暗条件) カメラで同時記録した。誘発の検証には、明暗 3 セットの訓練のうち最終セットのみ後半も明セッションとした際に、それでもなお暗セッション様の特徴が出現するかを検討した。撮影した走行は、[Image J] ソフトでトレース、二次元上の移動データを [R] ソフトで処理して速度や積算距離等を算出した。結果としては、複数回の実験結果を総合的に処理しても①-④の短期リズムを誘発できたとは言えないが、24 時間リズムの解析のための技術的基盤を確立したと考える。

035

## コピー数多型の異常を原因とする自閉症スペクトラム障害に共通したメカニズムの同定

山崎 真実 (学籍番号: 144130C)

指導教員: ○内匠 透<sup>1)</sup>, 野村 淳<sup>1)</sup>, 高橋 健造<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 理化学研究所<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科皮膚病態制御学講座

自閉症は、自閉症スペクトラム障害 (ASD: Autism Spectrum Disorder) の 1 つと定義される。小児の代表的な精神行動異常疾患であり、遅くとも 3 歳までに発症する。ASD 発症には、環境要因・遺伝要因の関与が考えられているが機序は未だ不明である。

現在 100 種類以上のコピー数多型 (CNVs) 異常が ASD 患者で同定され、臨床症状の多様性と共通性から CNVs モデルの包括的な解析が重視され始めている。

我々は、CNV 異常による ASD に共通したメカニズム解明を目的とし、ASD 患者の CNVs をマウス ES 細胞で再現した CNVs ライブラリーを作製している。今回その中でも、ASD 患者のコホート研究で頻繁に用いられる CNVs の 8p23.2 に注目し、ヒト 8p23.2 と相同なマウスゲノム領域を同定し、合計 2.04Mb のコピー数 0 モデル ES 細胞を CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によって作製した。方法は、狙ったゲノム領域の両末端部分に設計した 2 種類の CRISPR ベクターと、両末端付近に相同領域を持つターゲティングベクターの合計 3 つのベクターを野生型マウス ES 細胞にエレクトロポレーション導入し、ネオマイシン選択後、ES 細胞コロニーを 200 個ピッキングし、PCR スクリーニングとサザンブロットングにより狙った領域の欠損を確認した。

今後は、作製したモデル ES 細胞を用いてマウスの行動解析や、モデル ES 細胞から分化させた神経細胞の転写産物・形態の解析により、ASD に共通するメカニズムの解明と創薬への応用を目指す。

034

## 糖蛋白 PTX の前立腺癌マーカーとしての評価

喜舎場 一貴 (学籍番号: 144128B)

指導教員: 仲西 昌太郎, 須田 哲司, ○齋藤 誠一

琉球大学大学院医学研究科腎泌尿器外科科学講座

近年、前立腺癌患者は増え続けており、癌の早期発見と迅速かつ精度の高い検査方法が求められている。現在前立腺のマーカーとして利用されている Prostate-specific antigen (PSA) は、癌の診断や術後の治療効果判定にも使用され、指標の一つとなっている。しかし、PSA 値は進行癌で上昇しない症例がある一方、前立腺炎や前立腺肥大症などの良性疾患において上昇が認められることも多々あり、癌に対する特異性が課題となっている。これまで、齋藤らによって樹立された糖鎖抗体 RM2 を用いた前立腺癌の免疫組織染色の結果、RM2 の発現は癌の悪性度を反映することが報告されている。そのため、RM2 抗体が認識する糖蛋白は PSA の弱点を補う新たな腫瘍マーカーとなる可能性がある。これまでの解析により、RM2 抗原を持つと考えられる複数の候補蛋白質が同定されており、今回はその中の 1 つである糖蛋白 PTX (仮称) に注目し、腫瘍マーカーとしての有用性の検討を目的とした。

2006 年 11 月から 2014 年 7 月の期間に、前立腺癌の手術を受けた 70 名 (最高齢 77 歳、最年少 51 歳) を対象とし、抗 PTX 抗体を用いて病理組織標本による免疫組織染色を行った。100 倍の顕微鏡視野で観察し、同一患者の癌細胞と正常腺管細胞とを比較した結果、悪性度の高い癌において染色強度が強い染色像が観察された。そこで、染色強度をスコア化し、染色グレード、年齢、PSA、グリーソンスコア、PSA 無再発生存期間等の臨床病理学的所見との関連性を解析した。その結果、癌細胞の PTX 染色強度とグリーソンスコアとの間に統計学的な有意差が認められ、PTX は癌の悪性度と相関することが明らかとなった。これは PTX が悪性度を反映するマーカーとなる可能性があり、その他の解析結果と合わせた検討について報告する。

036

## 運動習慣と骨強度の関係の検討

金城 舞 (学籍番号: 144131B)

指導教員: ○喜瀬 真雄, 花城 和彦, 青木 一雄

琉球大学大学院医学研究科衛生学・公衆衛生学講座

## 【目的】

総合型地域スポーツクラブで開催される運動教室の参加者を対象とした体力および骨強度測定や質問票等を用いた調査を行い、運動習慣の有無と骨強度の関連について検討することが目的である。

## 【方法】

対象は、2016 年に沖縄県の事業「沖縄県カラダいいことプロジェクト」の一環として開催された健康運動教室の参加者のうち、健康運動教室の初回と最終回に行われた体力測定に参加した 50 歳以上の女性 50 人である。健康運動教室の初回に運動習慣について自記式質問紙法により調査を実施した。また、初回と最終回に定量的超音波法 (quantitative ultrasound, QUS 法) による踵骨の骨強度測定を実施し骨強度の指標としてスティフネス値 (% young adult) を算出した。測定項目について、単純集計および正規性の検定、対応のある t 検定を用いた分析を行った。

## 【結果】

- 1) 50 歳代から 90 歳代に至る全年代において年代別のスティフネス値の平均値は、各年代の基準値を上回っていた。また、運動教室実施後では全年代でスティフネス値の平均値の増加がみられた。
- 2) スティフネス値の平均値は、運動教室参加前の定期的な運動習慣に関わらず参加後では増加が見られた。その増加率は、運動習慣あり群で高かった。
- 3) 運動教室での運動内容は教室毎に異なっていたが、4 つの教室のうち 3 つの教室においてスティフネス値の平均値の増加が見られた。(1 つの教室は対象者が一人であったため解析しなかった)

しかしながら、運動教室実施後のスティフネス値の平均値の増加は、いずれも統計学的に有意ではなかった。

## 【考察】

適切な運動量が骨強度を維持し、その低下を予防することを示唆する先行研究がある。本研究では、運動教室実施後にスティフネス値の平均値の上昇がみられたが、統計学的有意差は認められなかった。その理由としては、対象者の背景 (月経やホルモン治療の有無等) 要因の調査や運動強度の調査が不十分であったことなどが考えられる。

037

### 急性中耳炎の抗生物質使用に関する システマティックレビュー

原 宏彰 (学籍番号: 1441132K)

指導教員: ○植田 真一郎

琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

#### 研究の背景

日本耳科学会のガイドラインによると急性中耳炎 (AOM) の中等度以上の症例では抗菌薬 (もしくは抗菌薬と解熱鎮痛薬の併用)、軽症例では経過観察および、解熱鎮痛薬の投与が推奨されているが、その根拠は明確ではない。急性中耳炎は小児における感染症として Common な病気であり、安易に抗菌薬を投薬することは多剤耐性菌を発生させるという観点から考えても有効性に関する既存の臨床研究のレビューは重要である。

#### 研究の目的

実際の臨床の現場では服薬のアドヒアランスが十分に守られていない部分もあり、その原因として服薬の効果が十分にあるのかどうかを検証する必要がある。また、急性中耳炎は小児における感染症として Common な病気であり、安易に抗菌薬を投薬することは多剤耐性菌を発生させるという観点から考えても重要である。急性中耳炎の鎮痛薬及び抗生物質の有効性に関する臨床試験論文を検索し、システマティックレビューを行う。

#### 方法

小児の急性中耳炎患者を対象とし、NSAIDs またはアセトアミノフェンあるいは抗菌薬の使用、非使用を比較した論文を Pub Med 及び Google Scholar で検索し、該当する臨床研究のシステマティックレビューを行なった。アウトカムとしては痛みの軽減の評価、および副作用の評価を用いた。

#### 結果

NSAIDs またはアセトアミノフェンあるいは抗菌薬の使用、非使用例における痛みの軽減に違いにおける各論文のデータレビューをした結果、治療間に有意な差を認めなかった。

#### 考察

小児の急性中耳炎の痛みの評価は論文間で異なっており、より正確な痛みの軽減の評価のためには今後、統一された評価スケールの設定が必要である。また、患者のアドヒアランスのばらつきは今回の痛みの軽減の評価に影響を与えるため、できるだけ排除するべきである。

039

### 早期パーキンソン病における自律神経障害評価 としての心拍変動解析の有用性の検討

福山 芽祝 (学籍番号: 144136B)

指導教員: ○宮城 朋, 中村 卓人, 崎間 洋邦, 山里 正演,

大屋 祐輔

琉球大学医学部附属病院第三内科

背景: パーキンソン病 (PD) の症状には運動症状の他に自律神経障害などの非運動症状がある。PD 患者における quality of life には運動症状のみならず、自律神経症状も大きく関わっている。しかし、交感神経、副交感神経を同時に評価できる簡便な検査は少ない。心拍変動解析は心電図の解析により交感神経、副交感神経を同時に評価することができる比較的簡便な検査である。

目的: PD の自律神経障害評価として心拍変動解析が有用であるかを検討する。

対象: 疾患群は Hoehn-Yahr (H&Y) IV 度以下の PD 患者、対照群は 50-70 歳の健常ボランティアとした。認知症や高度の起立性低血圧で検査が困難な者、不整脈を有する者、自律神経障害を呈する疾患を有する者は除外した。

方法: 30 分安静後にヘッドアップティルト試験と並行してきりつ名人<sup>®</sup> (株式会社クロスウェル) による心拍変動解析を行った。低周波領域のパワー (LF) を交感神経活動、高周波領域のパワー (HF) を副交感神経活動、LF+HF を自律神経全体の指標として評価した。自律神経の評価として症状アンケート、<sup>[123]</sup>MIBG 心筋シンチグラフィ、Coefficient of Variation of R-R intervals (CVRR) を施行した。運動症状を Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) part2, part3, H&Y により評価した。

結果: PD 群 15 例、健常ボランティア群 9 例の測定を行った。LF+HF の最も低い第一四分位 6 例は全て PD 群であった。PD 群において LF と HF は正相関を認めた ( $R^2=0.63, p<0.05$ )。安静時 LF と <sup>[123]</sup>MIBG 心筋シンチグラフィの早期および後期心臓隔比 (H/M) にはそれぞれ有意な正の相関を認めた (早期:  $R^2=0.51, p<0.05$ , 後期:  $R^2=0.51, p<0.05$ )。安静時 HF と深呼吸時 CVRR は正相関を認めた ( $R^2=0.60, p<0.05$ )。LF, HF, LF+HF は運動症状 (H&Y, UPDRS part2,3) とは相関を認められなかった。

結論: 心拍変動解析で LF, HF を測定することは PD 患者の自律神経障害評価として有用である。今後、症例数を増やして検討する必要がある。

038

### 当科における口蓋裂患者の 鼻咽腔閉鎖機能の評価について

黒島 崇博 (学籍番号: 144133H)

指導教員: ○片岡 恵一<sup>1)</sup> 島袋 亜香里<sup>1)</sup>, 新崎 章<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科,<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科顎顔面口腔機能再建学講座

[目的] 口蓋裂患者の鼻咽腔閉鎖機能の評価は、初回手術後の軟口蓋の形態や動きが重要である。当科では、言語聴覚士の評価に加え、発声時の側面頭部 X 線規格写真を用いて診断している。今回われわれは、適切な言語評価を行うため、側面頭部 X 線規格写真による軟口蓋の位置、形態計測を行い検討したので報告する。

[方法] 琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科を受診し、口蓋裂言語検査法により鼻咽腔閉鎖機能良好群と不良群それぞれ 5 名に分類された患者 10 名 (男性 6 名, 女性 4 名, 平均年齢 8.1 歳, BCLP 4 名, UCL 4 名, SMCP 2 名) を対象とした。検討項目は、側面頭部 X 線規格写真 (安静時、/i/ 発声時、ブローイング時) を用い 1) McWilliams と Bradley の分類での軟口蓋の挙上の程度および 2) 口蓋平面と咽頭後壁との交点 (PPW) と口蓋垂先端 (u) までの距離とその変化率、ならびに口蓋咽頭最短距離 (PPW-u) の計測を行い、安静時をコントロールとして、/i/ 発声時、ブローイング時の軟口蓋の移動様相ならびに言語検査との関連を調べた。

[結果] 1) /i/ 発声時の良好群の軟口蓋は咽頭後壁に近接し、不良群で咽頭部から離れていた。また、ブローイング時の良好群では咽頭と軟口蓋は概ね融合し、不良群では近接あるいは開放が見られた。2) 良好群ではブローイング時よりも /i/ 発声時で u は PPW へ近接したが、不良群では PPW から離れる傾向が見られた。

[考察] 不良群では、安静時の PPW と u の実長が離れており、またブローイング時の u が /i/ 発声時より挙上しない傾向にあることが示唆された。また、/i/ 発声時とブローイング時で軟口蓋の動きに違いが見られ、それぞれの発声ごとに異なる動きをしていると考えられた。

040

### キメラ抗原受容体 T 細胞療法への利用を 目指した腫瘍抗原特異的な ラクダ科ドメイン抗体の単離

川妻 加奈 (学籍番号: 144137A)

指導教員: ○村上 明一, 吉田 麻衣子, 塚原 成俊, 岸本 英博

琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学講座

がんの三大療法は、手術療法、化学療法、放射線療法であるが、新たながん治療法が注目されている。その中で最も新しいキメラ抗原受容体 T 細胞療法 (CAR-T 細胞療法) は、腫瘍抗原に対する抗体の可変領域 (一本鎖抗体, scFv) と T 細胞受容体と鎖とを融合させたキメラ抗原受容体 (CAR) を患者由来の T 細胞に発現させて、患者体内に戻す免疫細胞療法である。この CAR-T 細胞は scFv 領域で腫瘍抗原を認識し、鎖を通してシグナルが伝達されることで活性化しがん細胞を攻撃する。抗体の主な作製方法はハイブリドーマ法であるが、今回、通常の抗体とは異なり単ドメイン ( $\leq 15kDa$ ) で抗原結合性を発揮でき、非常に安定な抗体として知られるラクダ科動物由来のドメイン抗体 (VHH) の phage display library から、腫瘍抗原特異的な VHH 抗体を単離し、CAR-T 細胞の構成要素として使用することを計画した。

腫瘍抗原は、細胞増殖や細胞分化に関与し、乳がんや脳のグリオーマなどで過剰発現が見られることがある human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) と epidermal growth factor receptor (EGFR) を用いた。まず、培養細胞由来の cDNA を鋳型として各遺伝子を調節し、各蛋白質のドメイン I を His タグ融合蛋白質として大腸菌で発現し精製した。さらに、エピトープを限定するため合成ペプチドも準備し、これらを標的抗原としたスクリーニングにより HER2 及び EGFR に特異的に結合する VHH 抗体クローンを複数得た。大腸菌発現系で作製した VHH 抗体蛋白質、及び、培養細胞発現系で作製した二量体化 VHH-Fc 融合蛋白質を用いた抗原結合解析により、各蛋白質に特異的なクローンだけでなく、HER2 と EGFR の共通配列を認識するクローンも含むことが分かった。今回得た VHH 抗体を治療用抗体として使用できる可能性もあるが、これらのクローンをを用いて CAR-T の作製を進めていく予定である。

041

## 樹状細胞を用いたペプチドワクチン候補のスクリーニング方法の樹立

平良 俊樹 (学籍番号: 144139G)

指導教員: ○藤猪 英樹<sup>1)</sup>, 田中 礼子<sup>1)</sup>, 宮城 拓也<sup>2)</sup>高橋 良明<sup>1)</sup>, 田中 勇悦<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科免疫学講座,<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科皮膚病態制御学講座

【目的】ペプチドワクチンを用いる腫瘍免疫治療の基盤は、樹状細胞 (DC) を腫瘍関連合成ペプチドで感作して、腫瘍特異的 CD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導することにある。しかし、腫瘍には多様性があり病態や HLA に応じて CTL を誘導することのできるペプチドを選択する必要がある。本研究では、*in vitro* での候補ペプチドの簡易なスクリーニング方法を確立することを目的とした。

【方法】HLA-A24 と HLA-A02 の健康人末梢血単核球 (PBMC) を用い、DC 分化サイトカインカクテルで成熟 DC を誘導した。ペプチドは、健康人の 70%-90% が感染しているサイトメガロウイルス (CMV) の HLA-A02 および A24 拘束性 CTL ペプチドを用いた。この DC と IL-2 で 2 日維持培養した PBMC と混合培養を行い、5 日後の T 細胞の反応を、ELISA による培養上清中の IFN- $\gamma$  の産生量測定と、HLA-A24 CMV peptide Tetramer、および HLA-A02 CMV peptide Tetramer 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメトリー (FCM) で調べることで検討した。

【結果と考察】FCM では、CMV 特異的な T 細胞の増殖はいずれのハプロタイプにおいても見られなかった。一方、培養上清中の IFN- $\gamma$  量は、DC/T 比 1/1 ~ 1/10 ではバックグラウンドの反応が高く、ペプチドパルスの有無による差が検出しにくかったが、DC/T 比 1/50 ~ 1/100 では、ペプチド濃度依存的に IFN- $\gamma$  量が増加することが確認された。

【結論】今回の結果により、抗腫瘍ペプチドワクチンの候補ペプチドのスクリーニング方法として、PBMC から誘導した DC と自家 T 細胞の混合培養比を 1/50 ~ 1/100 にしてペプチド感作し、混合培養 5 日後の培養上清中の IFN- $\gamma$  量を ELISA で測定することが最適であると分かった。

042

## AID システムを搭載したレトロウイルス型ベクターの構築

宮崎 廉人 (学籍番号 144140A)

指導教員: ○小川 道永<sup>1)</sup>, 大西 真<sup>1)</sup>, 比嘉 直美<sup>2)</sup>, 仲宗根 昇<sup>2)</sup>トーマ・クラウディア<sup>2)</sup>, 山城 哲<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 国立感染症研究所細菌第一部<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【背景】AID システムとは、細胞にイネ F-box タンパク質 TIR1 を発現させ、標的配列 AID タグを任意タンパク質に付加後オーキシンを添加する事により当該タンパク質の発現の制御が可能となる仕組みである。従来のノックアウトマウス由来細胞では機能が補完される事もあり、明瞭な表現型が得られない等の問題があった。そこで、KO MEF の標的遺伝子産物と AID タグとの融合タンパク質を TIR1 と共に KO MEF に相補型に発現させた細胞を本システムにより作成し、オーキシン添加により急速に標的タンパク質を急速に分解することで、これまで解析が困難であった KO MEF の表現型を解析することが可能となると考えた

【材料と方法】レトロウイルスベクターの pMXs-puro に、pMK106 由来の TIR1+9xMyc 及び AID タグ領域を In-Fusion 法を用いて導入し、106PMXs ベクターの作製を試みた。制限酵素 *XhoI* による作製ベクターの切断、293T 細胞にベクターをトランスフェクトし、Myc 抗原の発現をウエスタンブロットにて確認する事によりベクターの作製を確認した。作製したベクターをパッケージング細胞である PlatE にトランスフェクションして培養上清を回収し MEF 細胞に感染させ、ピューロマイシン存在下で目的プラスミド保有細胞の選択を試みた。

【結果と考察】作製した 106PMXs ベクターを *XhoI* で切断する事により、ベクターは想定された構造を持つ事が示唆された。作製したベクターをトランスフェクトした 293T 細胞は Myc 抗原の発現が認められ、TIR1 領域が機能していることが確認された。ピューロマイシン存在下で MEF 細胞の増殖が確認されたことにより、ウイルス粒子がパッケージングされている事が確認できた。以上より、想定された機能を有する 106PMXs ベクターが作成されたことが示唆された。今後、AID システムによりノックダウン目的のタンパク質遺伝子を導入するために、AID タグ領域下流にユニークな *EcoRI* サイトの導入を試みている。

043

## ゼブラフィッシュの脳形成における ErbB4 の機能解析

桑江 一希 (学籍番号: 144142G)

指導教員: ○仲嶺 三代美, 鳥原 英嗣, 山本 秀幸

琉球大学大学院医学研究科生化学講座

ErbB4 は ErbB 受容体ファミリーに属し、主に脳および心臓に発現している。脳では、神経細胞の分化やシナプス機能に関与しており、ErbB4 とそのリガンドであるニューレグリン 1 は統合失調症の責任遺伝子としても知られている。生化学講座では、マウス視床下部のゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) ニューロンの培養細胞株である GT1-7 細胞を用いて、ErbB4 の活性化機構について研究を行っている。GnRH 受容体は G 蛋白質共役型受容体に属し、GnRH ニューロンにも存在している。GnRH 刺激により ErbB4 が活性化され、MAP キナーゼの中の ERK が活性化されることが明らかになった。さらに、ErbB4 の活性化には、Fyn による PYK2 のリン酸化が関与することを見いだした。今回、GnRH 刺激後の Fyn と PYK2 の相互作用を解析した。さらに、個体レベルでの ErbB4 の生理機能を明らかにする目的で、ゼブラフィッシュを用いて、ErbB4 のノックダウンモデルの作製を行った。

ErbB4 に対するモルフォリノアンチセンスオリゴを受精卵に注入し、ErbB4 の発現を抑制したゼブラフィッシュ胚を作製した。野生胚と比べてノックダウン胚では受精後 24 時間に頭部の形態異常が認められた。すなわち、脳形成における ErbB4 の機能解析にゼブラフィッシュは有用であることが明らかになった。また、GT1-7 細胞を用いた実験から、Fyn と PYK2 の相互作用には、PYK2 の 402 番目と、579/580 番目のチロシン残基のリン酸化が重要であることが示唆された。そのため、これらのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体 (Y402F および Y579/580F) を作製した。作製した変異体は Fyn と PYK2 の相互作用を解析する上で極めて有用であると考えられる。

044

## 小青竜湯の臨床効果

親泊 京華 (学籍番号: 144143E)

指導教員: ○植田 真一郎

琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

【背景】小青竜湯は、アレルギー性鼻炎に対してよく用いられている漢方薬である。漢方薬は単独の成分ではなく複数の生薬の組み合わせであることから、作用機序が明確になっているものは少なく、不明な点が多いながらも、効果がある薬として現在も使われている。そこで、実際の臨床効果はあるのか、小青竜湯に関する論文を通して調べてみることにした。

【目的】アレルギー性鼻炎に対して小青竜湯の使用を推奨できるかどうかを判定する

【方法】コクランライブラリー、医学中央雑誌、Pub Med、耳鼻咽喉科臨床をツールとし、MESH を小青竜湯 アレルギー性鼻炎 ("allergic rhinitis" "sho-seiryu-to") で設定して論文を検索する。hit した論文の中から、アレルギー性鼻炎患者を対象とし、介入が小青竜湯である臨床研究を選び、各論文の研究手法や研究結果から小青竜湯の臨床効果を判断する。

【対象】比較対象のない介入試験の論文 11 本、二重盲検の論文 1 本

【結果】11 の比較がない介入試験は、アレルギー性鼻炎患者の定義が曖昧であったり、追跡期間がばらばらであったり、介入が小青竜湯のみでなかったりすることから、客観性・一貫性はともに低く、各論文の小青竜湯の有効率にも大きな差が出ていた。また、アウトカムが患者の主観に基づくことも客観性を低くしている。

【考察】客観性、一貫性ともに低いため、これら論文の結果からはアレルギー性鼻炎における小青竜湯の使用を推奨することはできない。

045

## 1946年に帰還日本兵より分離されたコレラ菌の次世代シークエンサーを用いた全ゲノム解析

緒方 誠 (学籍番号: 144144C)  
 指導教員: 比嘉 直美, 仲宗根 昇, トーマ・クラウディア  
 ○山城 哲  
 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【背景】ビブリオ属グラム陰性桿菌 *Vibrio cholerae* の内、O1 および O139 血清群に属するものがコレラ菌と呼ばれる。O1 コレラ菌はさらにクラシカルまたはエルトル生物型に分類される。人類はこれまで7回のコレラパンデミックを経験したが、最初の6回はクラシカル生物型が、また今後も続く第7次パンデミックはエルトル生物型が原因菌とされる。今回我々は、次世代シークエンサーで得たコレラ菌株全ゲノム情報をもとに、同株の遺伝的背景を解析した。

【材料と方法】琉球大学細菌学講座では、1946年に長崎で帰還兵より分離されたクラシカル生物型コレラ菌株 (Man9) の全ゲノム塩基配列を次世代シークエンサー PacBio RSII にて解析を試み、raw data として保有していた。今回その data を各種ソフトウェアを用いて系統的に解析し、全ゲノム配列の決定とアノテーションを試みた。レファレンス情報として *V. cholerae* O395 (1965年インド由来) のゲノム情報を用いた (GenBank CP001235, CP001236)。Man9 株の全ゲノム情報、および GenBank より入手した各地域より分離されたクラシカル生物型コレラ菌 20 株のゲノム情報をもとに、RAxML v8.2.4, ETE3 を用いて core gene 中の一塩基多型 (SNPs) を用いた系統樹を作成し、Man9 株の遺伝的背景を検討した。

【結果と考察】コレラ菌は2つの染色体を有するが、本研究により Man9 株の染色体1は3,004,716塩基対 (2,748遺伝子)、染色体2は1,079,349塩基対 (1,041遺伝子) を有することが判明した。系統樹解析の結果、Man9 株は1965年にインドで分離された O395 株に最も近縁である事、また両株遺伝子の挿入・欠失解析の結果、Man9 株は O395 株の祖先である事が示唆された。

047

## 先天性角化異常症: ダリエー病の治療薬の開発

玉那覇 朝雄 (学籍番号: 144146K)  
 指導教員: ○山口 さやか, 大平 葵, 高橋 健造  
 琉球大学大学院医学研究科皮膚病態制御学講座

背景: ヒト皮膚の表皮角化細胞は自己複製を行いながら、古い細胞は角質として剥がれ落ち、新たな細胞分裂によって基底層から有棘層を経て角層へと供給される。約30-40日に及ぶ皮膚の分化過程が角化であり、その制御因子が表皮角化細胞内のカルシウム濃度である。表皮細胞内のカルシウム濃度の上昇と共に、皮膚は有棘層から角層へと角化する。ダリエー病は難治性の遺伝性角化異常症で、表皮角化細胞内の小胞体カルシウムポンプである SERCA2 をコードする ATP2A2 遺伝子変異により、正常に機能する SERCA2 蛋白の発現量が若干低下し細胞内カルシウムの濃度が上昇、角化異常をきたす。先天性皮膚疾患ながら、思春期より顔面や頸部、頭部、体幹に角化性丘疹が多発する。夏季に増悪し悪臭を生じ、自殺企図も多いとされるが、未だ有効な治療法はない。

目的: ハプロ不全と言われる機序により優性に発症する疾患であり、ダリエー病患者が持つ、1本の正常な対立遺伝子の SERCA2 蛋白の発現量を増やすことで細胞内カルシウム量を正常に戻すことが可能であると考え、薬剤をスクリーニングし、これまでにカンナビノイド作用薬が ATP2A2 遺伝子の発現を亢進させることがわかった。今回、ヒト由来角化細胞に数種のカンナビノイド系薬剤を投与し、ATP2A2 の発現への影響を調べた。

方法: ヒト由来角化細胞 (NHEK 細胞) を培養し、カンナビノイド系薬剤を添加し、細胞より RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて ATP2A2 の mRNA 発現量を調べた。

結果: アナンダミド等を添加した群において ATP2A2 の mRNA 発現が上昇した。

考察: 今後は、薬剤の濃度依存性、またタンパク質レベルでの発現も確認する。カンナビノイド系薬剤で ATP2A2 発現が増加していれば、ヒト正常皮膚を用いた器官培養でのカンナビノイド系薬剤の効果について検討したい。

046

## 大腸癌に SGLT2 は発現しているのか。

仲山 由李 (学籍番号: 144145B)  
 指導教員: ○仲地 里織, 吉見 直己  
 琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

## 【背景】

肺癌や膵臓癌の腫瘍細胞にグルコース取り込みタンパクである SGLT2 が発現していることが報告されている。また腫瘍細胞においては、低酸素下での HIF1 (低酸素誘導因子) の作用によりミトコンドリアの機能が抑制されるため、ATP 産生を細胞質の解糖系に頼っていることが予想され (Warburg 効果)、解糖系を機能させるために癌細胞はグルコース取り込みタンパクを発現させていると考えられる。今回は大腸癌の腫瘍細胞に SGLT2 の発現を確認するとともに、SGLT2 が大腸癌のどのような因子と相関があるのかを検討した。

## 【方法】

琉球大学医学部附属病院で切除した大腸癌症例のうち、深達度は漿膜下層まで (pT3) の39例を対象とした。SGLT2 の免疫染色を行い染色強度により4段階で評価し、染色強度とリンパ節転移の有無、静脈侵襲の有無、予後、糖尿病の既往、腫瘍の大きさとの関係性を検討した。

## 【結果】

多くの大腸癌の腫瘍細胞において SGLT2 の発現が確認された (32/39 例)。SGLT2 の染色強度とリンパ節転移、静脈侵襲、予後、糖尿病の既往に相関はみられなかったが、腫瘍の大きさについては小さな腫瘍ほど SGLT2 の染色強度が強い傾向にあった。

## 【考察】

小さな腫瘍においては、新生血管が未発達なため ATP 産生を嫌気的な解糖系に頼っていると考えられる。大きな腫瘍は、腫瘍の成長に伴い新生血管が発達するため、好気的なミトコンドリア系の代謝も働くと予想される。嫌気的代謝経路である解糖系は小さい腫瘍でより機能しており、それに伴い SGLT2 の発現も増えていると考えられる。先行研究によって、SGLT1 も肺癌・大腸癌等の腫瘍細胞に発現しており、また SGLT1 は成長因子受容体である EGFR と相互作用していることが明らかになっている。今後の課題として、SGLT2 の発現とこれらの成長因子との関連性について検討する必要があると考える。

048

ゼブラフィッシュを用いた  $Ca^{2+}$ /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の機能解析

安次嶺 僚哉 (学籍番号: 144147H)  
 指導教員: 仲嶺 三代美, 鳥原 英嗣, ○山本 秀幸  
 琉球大学大学院医学研究科生化学講座

ゼブラフィッシュは、コイ目コイ科に属し、学名は *Danio rerio* である。受精卵の直径は1mmと大きく、卵殻は柔らかい。受精後24時間で脊椎動物の基本的な形態が出来上がる。胚は透明で、発生過程の観察、操作が容易であることから、遺伝子機能阻害実験が可能な脊椎動物として広く使用されている。

$Ca^{2+}$ /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II) は、細胞内に増加した  $Ca^{2+}$  とカルモデュリン複合体により活性化される。CaM キナーゼ II は、タンパク質のセリン残基とトレオニン残基をリン酸化する酵素である。特に神経細胞に豊富に存在し、シナプス可塑性や遺伝子発現などに関与している。

今回、まず、ゼブラフィッシュでの CaM キナーゼ II サブタイプの発現をウエスタンブロット法と RT-PCR 法により検討した。次に、ゼブラフィッシュの受精直後の胚 (1細胞期) にモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を注入し、CaM キナーゼ II をノックダウンさせて、その後の形態変化を観察した。

CaM キナーゼ II に対する抗体を用いたウエスタンブロットにより、少なくとも3種類のサブタイプの発現が確認できた。さらに、RT-PCR 法により  $\alpha$  と  $\delta 1$  と  $\delta 2$  の mRNA が検出された。今回は、 $\alpha$  と  $\beta 2$  の MO を注入して、ノックダウン実験を行った。 $\beta 2$  のノックダウン実験では、報告のように、発生の遅れと心形成異常が認められた。さらに、今回初めて、それぞれのサブタイプのノックダウンにより、異なる尾部の形成異常が観察された。

これらの結果から、ゼブラフィッシュが CaM キナーゼ II の機能解析に極めて有用であることが明らかになった。今後は、 $\alpha$  のノックダウンによる運動機能の障害を観察するとともに、レスキュー実験として、マウスの  $\alpha$  と  $\beta 2$  の発現により、形態や器官の形成障害や運動機能障害が回復されるかを検討する必要がある。

049

## 2型志賀毒素B鎖5量体分子安定化技術の確立 —B鎖5量体結束分子の配位の違いがもたらす 抗毒素ワクチン機能への影響検証—

岡 伊作 (学籍番号: 144148F)

指導教員: 玉城 志博, 〇村山 歩, 安谷屋 沙織, 新川 武  
琉球大学大学院医学研究科感染免疫制御学講座

【背景】志賀毒素 (Stx) は、腸管出血性大腸菌が産生するタンパク質性の毒素であり、激しい腹痛と鮮血を伴う下痢を誘発する。Stx は A 鎖単量体と B 鎖 5 量体から構成される典型的な AB<sub>5</sub> 型エンテロトキシンであり、血清学的には 1 型 (Stx1) と 2 型 (Stx2) に分類される。これらの B 鎖は、N-グリコシダーゼ活性をもつ A 鎖を標的細胞へ輸送するため、抗毒素ワクチンの標的として極めて重要である。当講座の研究で Stx2B は Stx1B に比べ不安定な 5 量体しか形成できず、抗毒素ワクチン効果が不十分であることが示されている。そこで当講座独自のエンテロトキシン B 鎖安定化技術 (“Five-to-five technology”) を Stx2B へ応用し、結束分子 (cartilage oligomeric matrix protein (COMP) : 5 量体形成コイルドコイル分子) を Stx2B と融合させた。この融合分子 Stx2B-COMP は高い 5 量体安定性を示し、Stx2 に対し高いワクチン効果を示した。この技術は既に豚の Stx2e 産生性大腸菌感染症 (浮腫病) ワクチン開発に応用され、実用化を目前にしている。

【目的】哺乳動物種間で高く保存されている内在性の COMP タンパク質は、ヒト用志賀毒素ワクチンとして応用することが難しく、他の B 鎖 5 量体結束分子を採用する必要がある。その際、Stx2B が N, C 末端の何れ側からでも結束可能か検証する必要がある。今回、COMP を Stx2B の N 末端側に融合させた COMP-Stx2B を構築し、その性状解析を進めることにした。

【方法】初めに、大腸菌を用いて COMP-Stx2B を発現誘導し、不溶性凝集体となった目的タンパク質を 6 M グアニジン塩酸で可溶化後、Ni<sup>2+</sup>カラムで精製し、段階透析法で天然型高次構造に巻き戻した。最後に、5 量体画分をゲル濾過カラム精製した。また、COMP-Stx2B の比較対象として COMP-Stx1B を用いて同様の実験を行った。

【結果】ゲル濾過カラム精製後の COMP-Stx2B 5 量体回収量は 35mg/l culture であった (COMP-Stx1B: 30mg/l culture)。この結果から、Stx2B (および Stx1B) は N, C 末端の何れ側からでも結束可能であることがわかった。今後、COMP-Stx2B の抗毒素ワクチン効果を検証し、先の逆配位融合分子 Stx2B-COMP と比べてワクチン的な優位性を示すか否かを検証する。

051

## カルニチン-アシルカルニチントランスロカーゼ (SLC25A20 遺伝子) を標的とした 抗腫瘍効果の基礎的検討

伊志嶺 賢人 (学籍番号: 144150H)

指導教員: 〇山本 浩平<sup>1)</sup>, 北川 昌伸<sup>1)</sup>, 加留部 謙之輔<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科先端医療開発学講座包括病理学分野, <sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学分野

今までがん細胞は Warburg の提唱している解糖系を主体としたエネルギー産生を行っているものと考えられていたが、近年の論文において白血病細胞などのがん細胞において脂肪酸のβ酸化によるエネルギー産生が細胞増殖や細胞死の回避などの影響を与えていることがわかった。この経路を阻害することはがん細胞の増殖を抑制することが期待され、脂肪酸β酸化が行われるミトコンドリアの酵素である CPT1 阻害剤の開発が進んだが、心筋細胞に重篤な副作用がみられた。本実験は同じく脂肪酸β酸化に関わる SLC25A20 遺伝子からコードされるカルニチン-アシルカルニチントランスロカーゼを標的とした 3 つの実験を行った。

1 つ目はリアルタイム PCR およびデータベース OncoPrint にて SLC25A20 遺伝子がどのがん細胞に多く発現しているかを確認したところ、Tリンパ球系のリンパ腫や形質細胞腫にて特異的に強く発現していた。

2 つ目は shRNA を用いて血球系細胞である LCL-K 細胞中の SLC25A20 遺伝子をノックダウンし細胞の増殖の程度を観察するために細胞数を数えた。ノックダウン細胞はコントロール細胞にくらべ、細胞増殖が有意に抑制されていた。

3 つ目は SLC25A20 遺伝子および CPT1 を発現する CPT1A 遺伝子をクローニングし、それを血球系細胞の Raji 細胞にトランスフェクションして過剰発現したのちに細胞の増殖を解析した。その結果 SLC25A20 や CPT1A を過剰発現した細胞は何も過剰発現していないコントロールの細胞よりも細胞増殖が有意に促進されていた。また、SLC25A20 や CPT1A の両者における増殖の差はなかった。

以上より SLC25A20 は血液細胞のがんで特異的に発現するだけでなく、CPT1 と同様な細胞増殖を亢進させる効果があるものだと考えられる。本研究は脂肪酸のβ酸化を標的とした抗腫瘍薬開発の端緒となるものである。

050

## コレラ菌溶血毒 (Vhly) 分泌を阻止する 植物の探求

神山 治木 (学籍番号: 144149D)

指導教員: 〇仲宗根 昇, トーマ・クラウディア, 山城 哲  
琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【背景と目的】コレラ菌は、コレラ毒素以外に血液を溶かす溶血毒を産生する。この毒素は、動物実験モデルにおいて血管透過性を亢進させたり、炎症を促進することが知られている。また、O1, O139 以外のコレラ菌 (通称 NAG) による下痢症では、この溶血毒が病原性に大きく関与していることも知られている。この溶血毒の分泌を阻止することは、このような発症を抑えることにつながる。

本研究は、コレラ菌の溶血毒の分泌を阻止する植物を見つけることを目的とする。

【方法】①植物を採取する。②植物を細かく切り、乾燥させる。③ 50% エタノールに植物を溶かし、50℃、1 時間加温抽出した。④植物抽出液を含む LB (Luria Bertani) 培地と含まない培地でコレラ菌 N16961 株 (ElTor, 稲葉) を 37℃、20 時間、振盪培養する。⑤培養上清に分泌された Vhly を抗 Vhly 抗体を用いたウエスタンブロットで調べることで、Vhly の分泌の有無を確認した。

【結果】109 種類の植物を調べた結果、*Podocarpus macrophyllus* (和名: イヌマキ, チャーギ) と *Morella rubra* (和名: ヤマモモ) が Vhly の分泌を阻止した。*P. macrophyllus* については、兼城が報告している (演題 No.91)、ここでは *M. rubra* について報告する。*M. rubra* を 5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍と希釈してコレラ菌とともに培養した結果、菌数は *M. rubra* の希釈とともに増加していることがわかった。また、その時の溶血活性を羊血液寒天培地と羊血球液を用いて測定した所、*M. rubra* の希釈と共に溶血活性が出現した。さらに、*Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, NAG についても増殖阻害効果が見られた。

【考察】*M. rubra* (和名: ヤマモモ) は、コレラ菌 N16961 株の発育を阻止することで、Vhly の産生を抑えていることが考えられた。山桃の発育阻作用のメカニズムは不明だが、今後さらに検討し、これらの治療、予防に大きく貢献できるものと考えられる。

052

## 肺腺癌と診断された症例における臨床病理検討

宮国 祥平 (学籍番号: 144151F)

指導教員: 〇小山 寛文, 吉見 直己  
琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

病理解剖では、実際に臓器を摘出するとともに各臓器を肉眼的に観察する。その後、ホルマリン固定後に切り出しを行い、標本を作成し、HE 染色標本や免疫染色標本を顕微鏡で観察し、組織学的所見を確認する。肉眼的所見や組織学的所見を総合的に評価して、死因等の解明を行う。

今回は 80 代男性の原発性肺癌の病理解剖症例について、肉眼的所見や組織学的所見を観察し、考察を行った。

右肺下葉の胸膜の一部に不整な胞巣を形成し、浸潤・増殖する癌腫を認められたが、免疫組織学的に NapsinA, TTF-1, CK5/6, p40 では染色されなかったため現在精査中であり原発性肺癌の組織型に関しては特定できなかった。背景の肺には、肺腔内への高度な好中球浸潤が左右とも全肺野に確認され、肺胞構造が破壊されていることから気管支肺炎、肺膿瘍が示唆された。以上より、本症例の直接死因は、両側の気管支肺炎、肺膿瘍により呼吸不全に陥り、死亡に至ったと考える。肺癌の胸膜浸潤による癌性胸膜炎があり、肺の予備能低下が推察される。

発表時には、精査中である肺組織や他の所見も含め、具体的な所見を提示する予定である。



053

## 光学的計測法によるモルモットの聴覚野における 上行および下行 FM 音刺激に対する 興奮パターンの分析

都丸 翔 (学籍番号: 144152D)

指導教員: ○細川 浩

琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

モルモットの聴覚野における上行および下行 FM 音刺激に対する応答を光学的計測法で可視化した。以前の試験でモルモットは種特異的なコミュニケーション音として倍音や FM 音に近いものを用いていることがわかっている。これらを背景として、モルモット聴覚野を用い、様々な周波数をもつ音や FM 音に対する聴覚皮質活動を電位感受性色素により可視化し、時空間的に分析することでどのような特性が見られるのかを調べた。

モルモットの聴覚野にあたる大脳皮質を露出させ、電位感受性色素を用いて染色した。周波数バンドを測定するための純音刺激として、刺激時間で 0.5, 1, 2, 4, 8, 16kHz の純音を用いた。上行 FM 音は、刺激時間 100ms で 0.5kHz の高さから FM 変調の傾きを 0.2kHz/ms から 2.0kHz/ms まで 0.2kHz/ms ずつ増やしたものをを用いた。下行 FM 音は、刺激時間 100ms で上記の上行 FM を逆再生したものをを用いた。

その結果、上行 FM では音刺激の FM 変調の傾きが大きくなるほど、興奮開始から 10ms までの間 (0 ~ 10ms) では、大脳皮質に興奮が広がる速さが速くなった。一方で興奮開始から 10ms ~ 20ms の間には、遅くなった。下行 FM では音刺激の FM 変調の傾きの絶対値が大きくなるほど、興奮開始から 10ms までの間、興奮開始から 10ms ~ 20ms の間ともに、大脳皮質に興奮が広がる速さが速くなる傾向がみられた。

今回の研究では、上行 FM 音及び下行 FM 音の大脳皮質への広がり方の傾向を掴むことができた。このことから上行 FM, 下行 FM ともに音刺激の傾きの絶対値が大きいほど、処理の速さが速い、すなわちその刺激に対して感度が高いことが示唆された。これは種特異的なコミュニケーション音の処理についても関係があると考えられる。この関連性についてはこれからの課題としていきたい。

055

## CLARITY を用いたマウス全脳の透明化、 および全脳の 3 次元イメージングによる HBO や RT が海馬に及ぼす影響についての検討

砂川 昌隆 (学籍番号: 144154A)

指導教員: 片桐 千秋, 西村 正彦, 土田 幸男, ○石内 勝吾

琉球大学大学院医学研究科脳神経外科講座

### I 目的

多数の神経細胞によってネットワークが構築される脳の働きを理解するためには、脳の切片化ではその切断面レベルでしか観察・解析できないため、全脳を 3 次元で視る技術が必要である。脳組織を透明化する技術 CLARITY (Clear, Lipid exchange, Acrylamide-hybridized Rigid, Imaging/immunostaining compatible, Tissue hydrogel), およびライトシート顕微鏡の登場により全脳の 3 次元イメージングが可能となった。今回の研究では、これらの技術を用いて、HBO (Hyperbaric oxygen therapy) や RT (radiation therapy) が海馬に及ぼす影響について検討する。

### II 方法

C57BL/6 (Thy1/YFP 導入) マウス 11 ~ 13 週齢 7 頭を HBO 群 2 頭, RT 群 2 頭, HBO+RT 群 2 頭, control 群 1 頭に分け、5 日間施行した。その後実験マウスを灌流固定し、全脳を摘出した。摘出されたサンプルは simple CLARITY 法を用いて 8 週間かけて透明化した。透明化したサンプルをライトシート顕微鏡を用いて 2 次元・3 次元的に観察した。

### III 結果

コントロール群と比較して、RT 群および HBO+RT 群では海馬における神経細胞の蛍光発現が低下した。HBO 群ではコントロール群との有意差は認められなかった。RT 群と HBO+RT 群を比較すると、HBO+RT 群では海馬周辺の血管が比較的維持されていた。

### IV 考察

CLARITY による脳の透明化およびライトシート顕微鏡による観察は放射線による脳の傷害を評価するのに有用であると考えられた。また、RT と HBO を併用することにより、海馬への血管走行が維持され、放射線による傷害からの保護効果が期待される。今後、血管や神経細胞の定量化による比較検討も進める。

054

## ビタミン C による細胞死誘導

饒波 涼子 (学籍番号: 144153B)

指導教員: ○田中 勇悦, 田中 礼子, 高橋 良明, 藤猪 英樹

琉球大学大学院医学研究科免疫学講座

【目的】ビタミン C (アスコルビン酸) はコラーゲン生成に不可欠な栄養素であるが、ある種のガン細胞の増殖を抑制する働きがある。そこで今回の研究ではビタミン C の細胞死誘導能に着目し、HTLV-I 感染 T 細胞株を含めた種々の細胞株について、ビタミン C 感受性を検討することを目的とした。

【方法】ATL 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株、他の T 細胞白血病株、前赤芽球株 (K-562)、EB ウイルス感染 B 細胞株、正常人末梢血単核球 (PBMC) を使った。培養には、10%FCS 添加 RPMI-1640 培地と組換え IL-2 を使用した。アスコルビン酸 (Sigma) は超純水で濃度 1M とした。添加培養後、検鏡およびフローサイトメトリーを用いて HTLV-I Tax 抗原や種々の T 細胞活性化マーカーの発現を解析した。HTLV-I ウイルス p24 およびヒトサイトカインは ELISA で定量した。

【結果, 考察】ビタミン C は HTLV-I 感染 T 細胞株を濃度依存的に死滅させた。細胞死が誘導される条件下では、HTLV-Ip24 の産生と gp46 の発現が抑えられたが Tax 抗原の発現は逆に亢進した。ビタミン C は、他の HTLV-I 非感染 T, B, 前赤芽球細胞株に対しても濃度依存的に細胞死を誘導し、PHA 刺激 PMBC では INF- $\gamma$  と IL-10 の産生を抑制した。アネキシン V 染色により、ビタミン C による細胞死はアポトーシスが先行することが確認された。細胞死は、還元剤 n-アセチルシステインの添加により完全に抑制された。ビタミン C は活性化している細胞に対しては共存する酸化型ビタミン C が細胞内に取り込まれ、その酸化作用により細胞の酸化還元環境を破壊し、アポトーシスを引き起こすことが考えられた。

【結論】ビタミン C は、HTLV-I 感染 T 細胞株や種々の細胞株、および活性化 T 細胞に対して濃度依存的にアポトーシスを誘導する。

056

## 海馬 MRI 撮像の T2 強調像における 至適エコー時間の検討

島袋 真人 (学籍番号: 144155J)

指導教員: ○與儀 彰, 村山 貞之

琉球大学大学院医学研究科放射線診断治療学講座

目的 海馬はアンモン角 (cornu ammonis: CA) と歯状回 (dentate gyrus: DG) から構成され、認知症やてんかん疾患で障害される。病変の検出には MRI が使用され、重要なバイオマーカーであるが、CA や DG の明瞭な描出は健常者でも比較的難しい。T2 強調像斜冠状断で、海馬は低信号の浅髄板 (superior medullary lamina: SML) に録取られる CA の渦巻き構造を呈するが、これを明瞭に描出するには CA と SML のコントラストが強い画像が必要である。そこで我々は、T2WI においてエコー時間 (echo time: TE) の変化がコントラストに与える変化を調べ、海馬を明瞭に描出し得る TE 値を検討した。

対象と方法 健常者 8 名 (年齢 27-55 歳; 中央値 35.6 歳) に対し、TE を 90, 110, 130, 150 msec と変化させて海馬の T2 強調像斜冠状断を撮影した。撮影機器は Discovery750 (GE 社製)、撮影条件は TR=3500, matrix size = 346 \* 346, Field of view = 16 \* 16 cm, バンド幅 = 8.93 である。各 TE で得られた画像で、2 名の検者が合議で CA, SML に各 9 個の円形 ROI を設置し、信号強度 (signal intensity: SI) を計測した。両者の信号強度の平均値を求め、CA-SML コントラストを  $((SICA) - (SISML)) / ((SICA) + (SISML))$  の計算式で算出した。また、1 名の検者が DG の描出の程度を 3 段階 (class 1 = 描出されていない, class 2 = 一部描出されている, class 3 = 明瞭に描出されている) で評価した。得られた変数は Friedman 検定, Steel-Dwass 法にて比較した。

結果 海馬 T2 強調像斜冠状断にて、TE90, 110, 130, 150 での CA-SML コントラストの平均値は右側で 0.05, 0.07, 0.07, 0.12, 左側で 0.04, 0.05, 0.07, 0.10 と、両側とも TE 間でコントラスト平均値に有意差を認めた (右側:  $p=0.002$ , 左側:  $p=0.01$ )。また DG の視覚評価において TE90, 110, 130, 150 での評価点の平均値は、右側でそれぞれ 1.2, 1.9, 1.9, 2.9, 左側でそれぞれ 1.2, 1.9, 2.0, 2.4 で、両側とも TE 間で評価点に有意差を認めた (右側:  $p=0.002$ , 左側:  $p=0.005$ )。

結論 T2 強調像斜冠状断で海馬を最も明瞭に描出する TE は 150 であった。TE150 では DG も明瞭に描出されたが、過去に DG を描出する至適パラメーターの報告はない。今後は安定した DG の描出、その臨床的意義の検討を行う予定である。

057

## Lynch 症候群の原因遺伝子解明について

中村 早希 (学籍番号: 144156G)

指導教員: ○森岡 孝満<sup>1)</sup>, 菅 智<sup>1)</sup>, 柿沼 志津子<sup>1)</sup>  
吉見 直己<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 放射線総合医学研究所<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

背景: リンチ症候群は常染色体優性遺伝で大腸がんや子宮内膜がん等の発症リスクが高まる疾患であり, DNA 修復遺伝子の欠損により高確率で癌になりやすいと考えられている。今回, リンチ症候群モデルマウスにおいての放射線や炎症などの刺激を受けることにより発がんに関連する遺伝子の変化を検討されるモデルでの, 微量組織標本からの DNA 定量を試みられた。方法: リンチ症候群のモデルマウスである MLH1 欠損マウスを用いた, Laser Micro Dissection (LMD) 法で放射線暴露されたマウスの腫瘍と正常組織から DNA 抽出を行った。DNA 定量は Qubit® 2.0 Fluorometer と次世代型超微量分光光度計 (Nano Drop One) を使い, 両者の DNA 抽出量を検討した。

結果: (1) Nano Drop One による DNA 抽出量測定の結果は 4 つの腫瘍は  $456 \pm 250$ , 2 つの正常組織は  $376,1556$  となった。単位は ng である。また, A260/280 の比率は 4 つの腫瘍が  $1.87 \pm 0.04$ , 2 つの正常組織が  $1.99, 1.90$  となった。

(2) Qubit® 2.0 Fluorometer による DNA 濃度は 4 つの腫瘍が  $118 \pm 61.2$ , 2 つの正常組織が  $126,688$  となった。単位は ng である。

考察: 吸光度を利用する Nano Drop One と比べ, Qubit による値は低いものの, Qubit による測定では直接蛍光色素が DNA のらせん構造に付着するため, 精度が高いと考えられる。LMD による採集量がごく微量なため, 吸光度の DNA 定量が少なく測定結果の誤差が出やすくなったためと考えられる。今回のような微量サンプルの DNA 濃度を測定する際には, 蛍光定量による測定法が適している。

058

## 日本とベルギーにおける非アルコール性脂肪性肝障害の臨床病理学的検討

赤嶺 智基 (学籍番号: 144157E)

指導教員: ○小無田 美菜<sup>1)</sup>, Nicolas Lanthier<sup>2)</sup>, 新垣 伸吾<sup>3)</sup>  
前城 達次<sup>3)</sup>, 加留部 謙之輔<sup>4)</sup><sup>1)</sup> Hepato-Biliary-Pancreas pathology Service d'Anatomie pathologique Cliniques universitaires Saint-Luc<sup>2)</sup> Hépatogastroentérologie Cliniques universitaires Saint-Luc<sup>3)</sup> 琉球大学大学院医学研究科感染症・呼吸器・消化器内科学講座<sup>4)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

背景: NAFLD (非アルコール性脂肪性肝障害) の中でも, NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) は, 肝硬変, 肝細胞癌に進行する可能性がある疾患で, その臨床病理学的重症度の判別, 及び非 NASH-NAFLD との鑑別は重要である。本研究では, 日本とベルギーにおける NAFLD の臨床病理学的所見の検討を通して病態の把握を行った。

方法: NASH 症例群は日本, ベルギーそれぞれ 45, 75 症例, 非 NASH-NAFLD 症例群は日本, ベルギーそれぞれ 8, 2 症例を対象とし, それぞれ臨床所見, 組織学的所見を検討した。組織学的所見の評価には, 脂肪化, 炎症, 線維化に関する既存の指標を用いた。また, CD68 に対する免疫染色を行い, 小葉, 門脈域のマクロファージ及びマクロファージのクラスターの数を評価した。統計解析には t 検定,  $\chi^2$  乗検定を用いた。

結果: ベルギーの症例群は日本の症例群と比較して, 臨床的には BMI 値及び男性の比率が, 組織学的には進行例の比率が有意に高かった。

今回の症例全体としては, 病理学的に炎症と線維化の程度は有意に相関しており, 既報と同様の結果が得られた。更に, 免疫染色の評価により, 門脈域の炎症や全体の線維化が軽度な NASH 症例群は非 NASH-NAFLD 症例群よりも有意にマクロファージの浸潤が強くと (P<0.05)。また, NASH 症例においては, 炎症, 線維化, 脂肪化の程度とマクロファージの浸潤の強さに正の相関が見られた (P<0.05)。

考察: 今回の両国の症例の臨床病理学的違いが生じた原因として, ベルギーでは重症例でも生検の対象となるなど, 生検の適応に日本と違いがあることが挙げられる。

また, CD68 の免疫染色を行うことにより, NASH と非 NASH-NAFLD の鑑別ができ, 更に, NASH の重症度がある程度把握できるため, 今後の NAFLD 診断において免疫染色を用いたより客観的な診断基準を確立できる可能性がある。

059

## ローヤルゼリーの認知機能障害の予防効果に関する研究

與那覇 智貴 (学籍番号: 144159B)

指導教員: ○片桐 千秋, 西村 正彦, 土田 幸男, 藤原 京子  
石内 勝吾

琉球大学医学部医学研究科脳神経外科学講座

社会構造の高齢化に伴い急激に増加している認知症。その対策は大きな課題である。認知症の診断・治療においては早期発見・早期治療の重要性が指摘されているが我々の研究室では更に踏み込み, 認知症をいかに予防するかといった観点からも研究を促進している。ローヤルゼリーは働きバチが作る女王バチを育むための食物で古くから機能的食品として知られている。ローヤルゼリーには抗腫瘍・抗酸化・抗炎症・抗菌・抗アレルギー作用などがあり, 近年では NGF, BDNF の発現増強による海馬神経細胞保護作用やアミロイド  $\beta$  の蓄積抑制などの抗認知症作用もあると示唆されている。そこで今回, ローヤルゼリーの含有量の異なる飼料 (0%, 1%, 5%) を 1 年間与えて飼育したマウスを用いて行動解析 (回転ケージ, Open field, 高架式十字迷路, 新規物体認識テスト, 恐怖条件付け) を行った。

結果, 各試験とも数値自体の改善は全ての実験においてみられたが, 特に回転ケージの回転数や十字迷路での closed arm の滞留時間で有意な改善が見られた。

次に行動解析を行ったマウスのうち 0% 群 2 匹, 1% 群 2 匹, 5% 群 3 匹を選び, 組織学的解析 (iba-1 染色によるミクログリアの算定) を行った。結果, 高濃度のローヤルゼリーを投与した群ほどミクログリアの数が優位に減少していることが分かった。ミクログリアは炎症時に機能する単球系細胞であるので, 海馬内の炎症が優位に抑制されている可能性が示唆された。

今回の研究結果を踏まえると, ローヤルゼリーは認知機能障害の予防効果があり, 投与量と相関して上がる事が推論された。しかし総摂取量の 5% 重量という数値は動物実験であるがゆえの摂取量であることは否めなく, ヒトを対象とした効果については言及できないが, 総摂取量の 1% 重量という数値は, 特に食が細くなりがちな高齢者の食生活において摂取可能な範囲で臨床応用も可能と思われた。

060

Alzheimer 病患者における  
コリンエステラーゼ阻害薬単独療法と  
コリンエステラーゼ阻害薬/NMDA 阻害薬の  
併用療法の比較論文の検証

樺沢 森 (学籍番号: 144160E)

指導教員: ○植田 真一郎

琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学教授

琉球大学医学部附属病院臨床研究支援センター長

研究の背景と目的: 現在, Alzheimer 型認知症の治療薬としてコリンエステラーゼ阻害薬 (ChEI) と NMDA 受容体阻害薬という 2 種類の薬剤が使用されている。両剤の併用療法を ChEI の単剤療法と比較するとその有効性と副作用には不明確な点が多く, 双方の治療の間にはいかなる差異が存在するのかを明らかにすることは Alzheimer 型認知症の治療指針の決定に有用である。そこで Alzheimer 型認知症に対する両方の治療を比較した論文を集め, それらのシステマティックレビューができないか検討した。

方法: PubMed, Cochrane Library, NICE Evidence Search で薬剤名と "combination therapy" などの単語を含んだ検索式で検索を行った。題名または抄録の内容から判断し, Alzheimer 型認知症の患者に「ChEI 単独療法」と「ChEI と NMDA 阻害薬の併用療法」を使用して治療効果を比較した二重盲検 RCT の論文を検索結果から抽出した。抽出した論文を読み, 被験者の情報 (P), 介入方法 (E) とその対照群の条件 (C), アウトカムの評価方法 (O), 結果, 出資元, 副作用の情報をもとめ, システマティックレビューを行う際の問題点を明らかにした。

結果と考察: 検索結果を総合すると 86 論文が集まり, うち 5 論文が条件を満たした。5 論文の内容から判断し, 以下の理由で 5 論文を用いてシステマティックレビューを行うことは困難と結論付けた。P については, どの論文も NINCDS-ADRD の診断基準を採用したものの, 被験者の MMSE スコアの幅は論文間で異なっていた。O については, どの論文も認知症の評価スケールをアウトカムの評価項目に設定していたが, 5 論文全てに共通する項目はなくアウトカム評価の方法には統一性が見られなかった。併用療法と単剤療法の結果の間に統計学的な有意差が存在すると結論付けた論文は 5 本中 2 本であった。また, 5 本中 3 本が Forest Laboratories, Inc. からの出資を受けており, うち 2 本が前述の 2 論文であった。そのうちの 1 本である Grossberg らの論文で, 結果のグラフ表示の方法に問題が認められた。副作用について治療群間で有害事象の発生率に統計学的有意差が存在すると結論付けた論文はなかった。

061

## 細胞株と JAK 阻害剤を用いた DLBCL における JAK-STAT 経路の活性化状態の解析

渡辺 理紗 (学籍番号: 144161C)

指導教員: ○加留部 謙之輔<sup>1)</sup>, 森近 一穂<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座,<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座

DLBCL (びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫) は最も頻度の高い悪性リンパ腫である。JAK-STAT 経路は我々の身体の中に存在している造血細胞の増殖・分化に重要な役割を果たす分子経路であるが、DLBCL におけるその活性化の意義は十分にわかっていない。その点を明らかにするために、今回、細胞株を用いて解析した。

DLBCL で JAK-STAT 経路の一部に異常をもつ細胞株である、Pfeiffer (STAT3 遺伝子活性化型変異), SUDHL8 (SOCS1 遺伝子不活性化型変異), HBL-1 (MYD88 遺伝子活性化型変異) を選んだ。ウエスタンブロット法により、Pfeiffer, HBL-1 は JAK-STAT の活性化を示すリン酸化 STAT3 (pSTAT3) が発現したが、SUDHL8 は発現が認められなかった。次に、JAK inhibitor I (JAK 阻害剤) を加えて JAK-STAT 経路を阻害したところ、Pfeiffer, HBL-1 は SUDHL8 に比べて細胞増殖が抑制されており、投与により pSTAT3 の発現は抑制されていたが、STAT3 の発現に変化はなかった。SUDHL8 は投与前後に関わらず STAT3, pSTAT3 とともに発現が認められなかった。

以上の結果より、Pfeiffer, HBL-1 は JAK-STAT 経路が活性化しており、さらにその増殖、生存が同経路に依存していることが明らかになった。一方、SUDHL8 は JAK-STAT 経路を抑制する SOCS1 遺伝子の不活性化型変異を認めるにも関わらず、JAK-STAT 経路の活性化は認められなかった。将来的に JAK-STAT 経路阻害剤が臨床応用された際、STAT3, MYD88 の異常は有効な標的になりうる可能性がある。また、リンパ腫における SOCS1 の異常が JAK-STAT 経路に与える影響に関しては、今後さらなる検討が必要と考える。

062

## シンガポールにて線虫と共に

新崎 直輝 (学籍番号: 144162B)

指導教員: ○佐伯 恭範<sup>1)</sup>, Darshini Jeyasimman<sup>1)</sup>Chek Mei Bok<sup>1)</sup>, 片桐千秋<sup>2)</sup>, 圓谷智之<sup>2)</sup>, 松下正之<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Cell Biology and Molecular Neuroscience Laboratory Lee Kong Chian School of Medicine<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科分子・細胞生理学講座

神経細胞膜における脂質恒常性は、脳活動に重要な役割を果たしている。アルツハイマー病およびハンチントン病などの神経学的疾患は、神経細胞膜における脂質組成の調節の異常と深く関係する。最近の研究から、小胞体と細胞膜との接着部位で働く、脂質輸送タンパク質 (LTP) が細胞内脂質輸送において重要な役割を果たすことがわかってきている。しかし、神経細胞における脂質恒常性を維持する LTP の制御機構は依然として分かっていない。

今回のプロジェクトでは、線虫 (*C. elegans*) における LTP の細胞内局在を視覚化することを目指した。LTP に、GFP などの蛍光タンパク質を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集によって内因性にタグ付けした。そのために、目的の遺伝子の相同腕 (ホモロジーアーム) を有する Cas9-sgRNA および蛍光タンパク質-自己切断選択カセット (FP-SEC) ベクターを設計した。次に、これらのプラスミドを大腸菌 (*E. coli*) に形質転換し、生成したコロニーを液体培地で増殖させた。さらに、プラスミドを大腸菌から単離し、DNA 配列の分析を行った。そして、正しい配列を有するプラスミドを野生型線虫 (N2) にマイクロインジェクションした。成功した遺伝子組み換え線虫を、Leica DMI8 倒立顕微鏡を用いて画像化した。

我々は、LTP が、神経細胞のシナプスに富む領域に局在することを確認した。これは、LTP が線虫の神経活動において重要な役割を果たしていることを示唆する。また、LTP は体壁筋および産卵時に使われる陰門筋にも発現していた。興味深いことに、種々の LTP は様々な局在を示すことが分かった。

神経細胞における LTP の機構をさらに理解するために、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子ノックアウトアプローチによって、これらの LTP の機能を喪失した表現型を潜在的に調べることができると考えている。

063

## 慢性腎臓病患者における腎内小細動脈病変へのプリン体摂取量の影響の検討

與西 涼 (学籍番号: 144164H)

指導教員: ○宮城 剛志<sup>1)</sup>, 古波蔵 健太郎<sup>2)</sup>, 大屋 祐輔<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科循環器・腎臓・神経内科学講座<sup>2)</sup> 琉球大学医学部附属病院血液浄化療法部

**【背景】** 高尿酸血症は、慢性腎臓病 (CKD) の発症や進展に関連していることが報告されている。しかし、食事や飲酒で摂取する外因性のプリン体と CKD の進展に関連する腎内小細動脈病変との関連は明らかではない。

**【目的】** 腎内小細動脈病変とプリン体摂取との関連を明らかにする。

**【方法】** 琉球大学医学部附属病院での腎生検症例のうちプリン体摂取量に関するアンケート (スコア) を実施した CKD 患者。小動脈病変は線維性内膜肥厚の程度を指標とし、細動脈病変は硝子化の程度を各々 grade 0 ~ 3 に分けて半定量的に評価し、その平均値を算出した (平均小/細動脈グレード (G))。スコアの平均値以上をプリン体過剰摂取群、尿酸排泄率の平均以下を尿酸排泄低下群とし対象をそれらの有無によって 4 つのサブグループに分けて解析を行った。

**【結果】** 症例数は 23 名 (男性 5 名) であり、年齢、BMI、血圧、eGFR、血清尿酸値、尿酸排泄率、スコアの平均はそれぞれ 46 ± 17 歳、23 ± 5 kg/m<sup>2</sup>、123 ± 14/78 ± 9 mmHg、71 ± 30 ml/分/1.73 m<sup>2</sup>、5.4 ± 1.1 mg/dl、9 ± 8%、6 ± 3 点であった。hsCRP、尿蛋白、平均小動脈 G、平均細動脈 G の中央値はそれぞれ 0.13 (0.02-0.40) mg/dl、0.7 (0.5-2.5) g/gCr、1.00 (0.33-1.33)、0.31 (0.08-0.93) であった。サブグループの検討では、尿酸排泄低下群間で有意な臨床パラメータの差は認めなかった。男性においてスコアは、尿蛋白 (r=0.92, p=0.02)、hsCRP (r=0.87, p=0.04) では有意な正の相関、平均小動脈 G (r=0.89, p=0.1) では強い正の相関を認めた。

**【考察】** 高尿酸血症に対する外因性プリン体摂取の影響は少ない可能性がある。しかしながら、男性においてプリン体摂取と動脈硬化には関連性が示唆された。

064

## ヒトパピローマウイルス (HPV) 関連頭頸部癌における HPV のホストゲノムへの組み込み位置同定

富山 嘉月 (学籍番号: 144165F)

指導教員: ○池上 太郎, 鈴木 幹男

琉球大学大学院医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

ヒトパピローマウイルス (HPV) は子宮頸癌の発癌ウイルスとして知られており、悪性腫瘍を形成するものをハイリスク型 HPV と分類している。ハイリスク型 HPV はホストゲノムに組み込まれ、ウイルスタンパク質である E6・E7 が過剰発現し、がん抑制遺伝子 P53/pRB を阻害し細胞不死化や癌化が生じる。最近、中咽頭癌においても 50% 以上でハイリスク型 HPV が検出され、E6・E7 が過剰発現することから、ハイリスク型 HPV が中咽頭癌の癌化に関与していると考えられている。しかし、子宮頸がんでは HPV がウイルスゲノムとホストゲノムの間で似た配列の箇所を組み込まれることが報告されているが、中咽頭癌ではよくわかっていない。

そこで本研究では、中咽頭癌を含めた 46 例の頭頸部腫瘍において PCR 法により HPV のスクリーニングを行った。ハイリスク型に感染していたサンプルでは E6・E7 の発現を Half-nested RT PCR 法で確認した。さらに、Amplification of Papilloma Virus Oncogene Transcripts-assay (APOT assay) を行い、ハイリスク型 HPV のホストゲノムへの組み込み箇所の同定を行った。

頭頸部腫瘍 46 例のうち、30 検体でハイリスク型 HPV (HPV16 または HPV18) が検出された。Half-nested RT PCR の結果、30 検体中 26 検体で E6・E7 が発現していた。この 26 検体について APOT assay を行った結果、8 検体について HPV のゲノムへの組み込み位置が同定できた。今回、APOT assay では組み込み位置の同定率は 3 割と低かったことから、Inverse PCR 法などを用いることにより同定率を上げることができると考えた。

065

## 沖縄県における飛行機事故に対する 災害脆弱性評価

坂東 美樹 (学籍番号: 144167B)  
指導教員: ○久木田 一朗  
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

【目的】 沖縄県における災害時の脆弱性について、定量的に評価する。沖縄県では、これまでも米軍を含む飛行機事故が数件起きているうえ、基地を抱えるゆえに他県よりもリスクは高いと考えられる。また那覇空港は国際線を含むハブ空港であり、周辺離島をつなぐ小型機も飛行しているため飛行機が多く、事故を想定し備える必要がある。これらの状況を踏まえて、過去の事故の被害と今後の対策を考え評価した。

【方法】 今回用いた評価方法は、Hazard Vulnerability Analysis (以下HVA)である。HVAは、災害時のリスクマネジメントとして事前に脆弱性を評価することで防災対策に役立てる指標となる。評価項目としては、Probability (可能性)を4段階、Risk (危険度)を5段階、Preparedness (準備)を3段階で点数化し、これらを掛け合わせその値が大きいくほど災害に対する脆弱性が高いと判断する。

【結果】 Probability: 2 Risk: 4 Preparedness: 2 合計: 16

【考察】 Probabilityについて、一般的に飛行機事故が起こる可能性はあまり高くないが、沖縄県では米軍小型機の飛行があることや那覇空港での飛行機が多いことを考え2とした。また、これまでの県内の発生件数は防衛省のデータを見ると米軍小型機の事故は返還後29件発生しており、明らかに他県よりも可能性は高いと考えられる。

Riskについて、飛行機事故が発生すると搭乗者、事故現場の環境によって多数の死傷者が出ることが考えられる。大型旅客機の場合ではさらに重大である。しかし地震や洪水ほど大多数を巻き込むわけではなく発生現場は限られるためRiskは4とした。

Preparednessについて、那覇空港では航空機事故を想定し2年に1度大規模な訓練を行っている。消防や自衛隊、医療機関が連携して救出からトリアージ、災害派遣医療チーム(Disaster Medical Assistance Team 通称DMAT)による応急処置と搬送の過程を確認している。米軍小型機の事故に関しては、墜落を想定した自衛隊との海上共同訓練や普天間小学校での児童の避難訓練が行われている。しかし、県内の飛行範囲は広く民家などへの墜落も十分に考えられ、その対策はまだ進んでいないことから2とした。

067

## 成人T細胞白血病における CCR7とRHOA異常の解析

眞栄城 明里 (学籍番号: 144170B)  
指導教員: ○加留部 謙之輔  
琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

ATL (adult T-cell leukemia: 成人T細胞白血病)はHTLV-1 (human T-cell leukemia virus type-1)を原因とする極めて予後不良なT細胞性腫瘍であり、特に日本に多い疾患である。ATLには多彩な遺伝子異常があり、発がんに関与していると考えられている。CCR7、RHOAは細胞の分化や遊走に関わる遺伝子であり、ATLでの変異が報告されているが、その臨床病理学的意義は明らかではない。今回ATLにおけるそれら2遺伝子の変異を解析し、臨床所見と比較した。

まず、細胞株HBL1およびFFPEブロックから抽出したDNAに対しmultiplex primerを用いて100-600bpのアンプリコンをPCR法で増幅させた。HBL1の場合、600bpのバンドまで増幅できたがFFPEブロック切片では100-200bpまでしか増幅されなかった。このことはFFPEブロックにおいて、DNAが高度に分解されていることを示す。次にCCR7とRHOAそれぞれ4通りのプライマーでDNAを増幅させ、その結果なるべくアンプリコンサイズが小さくかつバンドが明瞭なものを選んだ。各症例のアンプリコンを精製後、サンガー法で解析した。

実験した症例の病型はリンパ腫型38例、急性型43例、皮膚型6例、慢性型1例、くすぶり型1例、不明19例の合計108例である。結果はCCR7遺伝子では107例中2例変異を認め、リンパ腫型と急性型であった。RHOA遺伝子では105例中5例変異を認め、リンパ腫型1例、急性型4例であった。比較的経過が緩徐な皮膚型、慢性型、くすぶり型は変異を示す症例が全くなかったことから、両遺伝子の変異がより急激な臨床経過と関連している可能性はある。また、既報ではCCR7の変異頻度は約10%であり、今回の結果と大きく異なっており、今後症例を増やして検討する必要があるだろう。

066

## 琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科を受診した 骨格性開咬症例の特徴について

金山 琢磨 (学籍番号: 144168A)  
指導教員: ○片岡 恵一<sup>1)</sup>、島袋 亜香里<sup>1)</sup>、新崎 章<sup>1,2)</sup>  
<sup>1)</sup> 琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科、  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科顎顔面口腔機能再建学講座

【目的】 骨格性開咬症例は、術式の選択、術後の保定に苦慮することが多い。今回われわれは、予後の安定した治療法の確立を目的とし、当科を受診した骨格性開咬症例の特徴について調査したので報告する。

【方法】 骨格性開咬症例31人(男性13名、女性18名、平均年齢20.2歳)の初診時側面セファログラム、パノラマX線写真および歯列模型を用いて、1)前歯部被蓋関係2)大白歯の状態3)セファログラム分析について調査した。overjet、セファログラム分析の評価については、Skeletal patternを3タイプに分類し比較検討を行った。

【結果】 1) Overbiteの平均は-5.7mm、Overjetの平均はClass I+4.8mm、II+7.0mm、III-2.8mmであった。2) 大白歯の齲蝕、喪失を認めないものが8名、上顎のみに認めるもの3名、下顎のみに認めるもの1名、上下ともに認めるもの19名であった。3) Skeletal patternでは、Class I 6名、II 3名、III 22名であった。Class I、III症例のMandibular plane angleは平均34.0°であるのに対し、Class II症例では42.0°と著しく大きい値となっていた。また、SNA、SNB、上下顎歯軸傾斜角は各タイプとも平均して±1S.D.以内の値であったが、Gonial angleは+2S.D.以上大きい値を取っていた。

【考察】 75%の症例に白歯部の齲蝕、喪失を認め、白歯部のみでの咬合による負荷が歯の寿命を短くしていることが示唆された。またGonial angleが大きいことから、顎矯正手術の際にanti-clockwiseな下顎骨の移動を起こしやすく、術後の安定性に影響をおよぼす可能性があると思われる。

068

## モルモット聴覚野における 2倍音・3倍音に対する応答パターンの分析

大城 碩輝 (学籍番号: 144172J)  
指導教員: ○細川 浩  
琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

モルモット聴覚野を用いて、特定の周波数のみの純音やその2倍音、3倍音に対する聴覚皮質活動を光学的計測法により分析した。モルモットの聴覚野を露出し、電位感受性色素で染色して、皮質ニューロンの活動を可視化した。0.5、1、2、4、8、16kHzの純音と2倍音(0.5+1、+2、+4、+8、+16kHz)、3倍音(0.5+1+2kHz、1+2+4kHz、2+4+8kHz、4+8+16kHz)を用いた。純音を与えると、各周波数の音に対して著明に応答を示す領域がバンド状に確認された。また4kHzの音に対して最もよく応答が見られた。2倍音について、+1kHz、+2kHz刺激では純音刺激よりも大きい応答を示したが、他の2倍音では純音0.5kHz刺激時よりは大きい、その組み合わせの音のみの刺激時よりも小さい応答を示した。3倍音について、0.5+1+2kHz刺激では純音刺激よりも大きい応答を示したが、他の3倍音刺激時の応答は、4kHz純音刺激時の応答よりも小さいが、4kHz純音以外での刺激時の応答よりは大きくなった。0.5+1kHz、0.5+2kHz、0.5+1+2kHz刺激時について、純音よりも応答が大きくなったのは各応答領域が互いに側刺激し合うことにより上記の結果となったと考えられる。0.5+A(A=4、8、16kHz)刺激時について、純音A刺激時の応答よりも小さくなったのは0.5kHz領域の方がより早く応答することでA領域の側抑制となっていると考えられる。1+2+4kHz、2+4+8kHz、4+8+16kHz刺激時について、純音4kHz刺激時の応答よりも小さくなったのも同様と考えられる。つまり2倍音、3倍音刺激時の応答パターンは各領域の反応開始速度の違いに依存する。

069

### ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) エンVELOP 蛋白 gp46 に対する新規中和抗体作製の試み

大濱 千夏 (学籍番号: 144174E)

指導教員: ○高橋 良明, 田中 礼子, 藤猪 英樹, 田中 勇悦  
琉球大学大学院医学研究科免疫学講座

**【目的】** ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) は, T リンパ球に感染し成人 T 細胞白血病 (ATL) などの原因となる。しかし, 未だに感染予防ワクチンや根治療法は開発されていない。本研究では, 将来, 抗体医薬として役立つと期待される新規の抗 HTLV-I 中和抗体を作製することを試みた。

**【方法】** HTLV-I エンVELOP 蛋白発現組換えワクシニアウイルス (rVV/HTLV-Ienv) を感染させた Balb/c マウス由来 SV-T2 細胞 (SVT2/HTLV-Ienv 細胞) を可溶化し, フロイント完全アジュバントと混ぜた後, 3 匹の Balb/c マウスに皮下免疫した。血清中の抗体誘導を確認した後, 組換えセンダイウイルス法により脾細胞と Sp2/O ミエロマ細胞と融合しハイブリドーマを作製した。HAT 選択培養後, 培養上清の抗体スクリーニングを行った。

**【結果, 考察】** フローサイトメトリーにより, 免疫に使用した SVT2/HTLV-Ienv 細胞が gp46 を発現することを確認した。また, 免疫マウス全てで, HTLV-I エンVELOP に対する抗体が誘導され, 血清中の抗 gp46 抗体の濃度は, 125 ~ 428  $\mu\text{g/ml}$  と推定された。ウエスタンブロットでは, gp46 に相当する 44 k Da のバンドが検出された。しかし, 合体形成阻止試験の結果, 血清中の中和抗体は陰性であった。また, 得られたハイブリドーマ (481 ウェル) を調べたが, gp46 に反応するものはなかった。しかし, 免疫の回数を増やすことなどにより, 抗 gp46 中和抗体産生ハイブリドーマを作製することは不可能ではないと考える。

**【結論】** Balb/c マウスを SVT2/HTLV-Ienv 細胞で免疫することにより gp46 に対する抗体が誘導されるが, 今回の免疫スケジュールでは, マウス脾臓中の HTLV-I 中和抗体産生 B 細胞の頻度は低く, ハイブリドーマが作出されるまでには達しないことが明らかとなった。

071

### ゼブラフィッシュにおけるダイヤモンド・ブラックファン貧血モデルの作成と赤血球造血機能の解析

渡名喜 健 (学籍番号: 144176B)

指導教員: ○鳥原 英嗣, 仲嶺 三代美, 山本 秀幸  
琉球大学大学院医学研究科生化学講座

ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) は, 主に乳幼児期に発症し, 特に赤血球造血が障害される遺伝性疾患である。患者の半数以上においてリボソームタンパク質 (RP) 遺伝子の変異が確認されている。中でも RPS19 に, 最も多くの異常が見られ, 52 番目から 62 番目のアミノ酸配列領域に高頻度に変異があることも報告されている。以前に生化学講座では, *in vitro* および培養細胞系において, この領域内の 59 番目のセリン (Ser59) がリン酸化を受けやすいことを報告している。今回, ゼブラフィッシュを用い, RPS19 の機能の個体レベルでの解析を試みた。

まず, モルフォリンアンチセンスオリゴ (MO) をゼブラフィッシュの受精卵に微量注入し, *rps19* 発現抑制モデルを作成した。野生型 (WT) 胚および発現抑制 (KD) 胚から RNA を抽出し, RT-PCR を行った結果, mRNA レベルにおいて, KD 胚での *rps19* 発現量低下を確認した。また, ウエスタンブロットングにより, タンパク質レベルにおいても KD 胚での *rps19* 発現量低下を確認した。そこで, MO と同時に *in vitro* 合成した *rps19* mRNA を注入するレスキュー実験を行ったところ, 注入胚において発現量の回復が見られた。KD 胚では, 受精後 24 時間 (24hpf) までに頭部や尾部に異常な表現型を示し, 48hpf までに赤血球が著しく減少した。これらの異常は, レスキュー胚では回復が確認された。以上より, ゼブラフィッシュにおいて *rps19* が赤血球造血に関与していることが示唆され, 疾患モデルとしても有用であると考えられた。そこで, さらに Ser59 のリン酸化の役割を解析するため, *rps19* cDNA を組み込んだプラスミドの Ser59 部位に変異を導入した。今後はこのプラスミドから変異型 mRNA を *in vitro* 合成し, レスキュー実験を行う予定である。

070

### 新規デコイ受容体発現 T 細胞療法を見据えた抗免疫チェックポイント関連分子抗体の作製

小渡 由葉 (学籍番号: 144175C)

指導教員: ○村上 明一, 吉田 麻衣子, 塚原 成俊, 岸本 英博  
琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学講座

標準治療で難治の進行がんに対し, 優れた治療効果を示すが免疫療法が注目されている。その一つに免疫チェックポイント阻害剤がある。がん細胞は免疫細胞上の免疫チェックポイント分子に対するリガンドをしばしば高発現しており, これら分子間の結合により制御性シグナルを伝達することで免疫応答を不活化し回避する。免疫チェックポイント阻害剤として働く抗体は免疫チェックポイント関連分子に結合してこの経路を阻害し, がんに対する免疫を高めて治療効果を発揮する。しかし, この治療法は全身での免疫制御を解除するため約 10% の患者が自己免疫や炎症性疾患の副作用を呈するという問題がある。そこで免疫チェックポイント関連分子に競合的に拮抗する抗体を「デコイ」として細胞表面に発現させた T 細胞の作製を計画した。すなわち, 免疫チェックポイント分子よりも強くがん細胞上の免疫チェックポイント関連分子と結合するが, 制御性シグナルは伝達しないデコイ分子を用いて T 細胞の活性化を維持し, 抗がん効果を発揮させようと考えた。本法は腫瘍局所的な T 細胞の不活化を抑制できると考えられ, 副作用の軽減が期待できる。

今回, 免疫チェックポイント分子 Programmed Death-1 (PD-1) のリガンドとして働く Programmed Death Ligand-1, 2 (PD-L1, L2) を標的とし, 各細胞外ドメインを融合蛋白質として発現・精製した。これらを抗原として  $2 \times 10^{10}$  の多様性を持つ半人工合成ラクダドメイン (VHH) 抗体 phage display library からパニングを行った。その結果, PD-L1 結合性ファージを 3 クローン, PD-L2 結合性ファージを 2 クローン得た。それぞれ 2 クローンずつを大腸菌発現系で VHH 抗体蛋白質, 培養細胞発現系で二量体化 VHH-Fc 融合蛋白質として発現・精製し, 高い特異性を有することを確認した。現在, これら VHH 抗体が PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2 間の結合阻害活性を有するかなど取得抗体の詳細な解析を進めている。

072

### 完全体外循環時における酸素消費量と鼓膜温 (体温) の関係に関する検討

比屋根 涼太 (学籍番号: 144177K)

指導教員: 喜瀬 勇也<sup>1)</sup>, 兼城 悠司<sup>2)</sup>, ○國吉 幸男<sup>1)</sup>  
琉球大学大学院医学研究科胸部心臓血管外科学講座<sup>1)</sup> 琉球大学医学部附属病院 第 2 外科<sup>2)</sup> 琉球大学医学部附属病院 ME センター)**【目的】**

開心手術の完全体外循環時の人体における鼓膜温 (体温) と酸素消費量の関係について検討した。

**【対象と方法】**

対象は 16 症例。症例の術式内訳は, 大動脈瘤切除術: 4 例, 弁置換術: 9 例, 弁形成術: 1 例, 冠動脈再建術: 2 例である。鼓膜温を 20℃ 近傍まで下げた症例を I 群, 32℃ 近傍まで下げた症例を II 群とする。I 群は大動脈瘤切除術: 4 例, 弁置換術: 2 例の 6 例, II 群は弁置換術: 7 例, 弁形成術: 1 例, 冠動脈再建術: 2 例の 10 例と分類する。完全体外循環は人体の心肺機能を完全に代用した状態で, 1 つの閉鎖回路であり, 多くの循環動態に関するパラメーターを測定することができる。この完全体外循環時に下記の項目を測定し, 下記の (A) 式により各鼓膜温に応じた酸素消費量を算出した。

① 鼓膜温  $^{\circ}\text{C}$ 

② 灌流量 (L/min)

③ 血中ヘモグロビン濃度 g/dl (HGB)

④ 動脈血中ヘモグロビン酸素飽和度 % ( $\text{SaO}_2$ )⑤ 静脈血中ヘモグロビン酸素飽和度 % ( $\text{SvO}_2$ )

酸素消費量 (ml/min)

$$= 1.34 (\text{ml/g}) \cdot \text{HGB} (\text{g/dl}) \cdot (\text{SaO}_2 - \text{SvO}_2) \cdot \text{灌流量} (\text{L/min}) \cdots \cdots (\text{A})$$
**【結果と結論】**

I 群での完全体外循環の持続時間の平均は 188.5 分。鼓膜温が 1℃ 上昇した時の酸素消費量の上昇率の平均は 6.26 ml/min/ $^{\circ}\text{C}$  であった。II 群での完全体外循環の持続時間の平均は 135.1 分。鼓膜温が 1℃ 上昇した時の酸素消費量の上昇率の平均は 14.9 ml/min/ $^{\circ}\text{C}$  であった。

いずれの群も鼓膜温 (体温) が上昇すると伴に酸素消費量も上昇していることが確認された。

073

## 淋菌のディスク法の新基準

小俣 大輔 (学籍番号: 144178H)

指導教員: ○志牟田 健<sup>1)</sup>, 大西 真<sup>1)</sup>, 山城 哲<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 国立感染症研究所細菌第一部

<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

### 【背景】

2009年に日本でセフトリアキソン(CRO)耐性淋菌株が報告されて以来、海外からもCRO耐性淋菌の報告が見られた。これらのCRO耐性淋菌は、ナイセリア属細菌由来の耐性遺伝子を取り込んだために発生したとされているが、この耐性遺伝子のやり取りが淋菌間で起きると一気にCRO耐性淋菌が広がる恐れがある。そのため、全国規模の淋菌のCRO感受性調査が必要となるが、標準法の寒天平板希釈法では大規模な施設でないと難しく、簡便なディスク法が注目されている。しかし、CRO感受性に対する適切なディスク法の基準がなく、その新基準が求められている。今回は形質転換させて様々なMICのCRO耐性淋菌を作り出し、それに関してディスク法を行い導き出した新基準を臨床検体に適用してその妥当性を検討した。

### 【方法】

臨床由来淋菌株をGC寒天培地とチョコレート寒天培地上に37℃、5%CO<sub>2</sub>下で20時間培養した。それらの株を生理食塩水を用いて懸濁後McFarland #0.5に調整し、上記寒天培地に接種後、CRO 30 μgまたはセフィキシム(CFM) 5 μg含有ディスクを置き、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で20時間培養して阻止円の直径を測定した。それに対して新基準を適用した結果と寒天平板希釈法によるMICで感受性判定したものと的一致性をエクセルによりκ係数を用いて検討した。

### 【結果と考察】

臨床検体163株を用いて検討した結果、GC寒天培地ではκ=0.66、チョコレート寒天培地ではκ=0.80と高い一致性を示した。対象として現在使われているCLSIの基準を用いて検討した結果、GC寒天培地で一致性はκ=0.49とだいぶ一致するものの、CRO耐性菌を感受性としてしまう瑕疵がみられた。以上より、今回検討したディスク法の新基準は従来法と比較してより有用であると思われる。

074

## 頭部CTを用いた側頭骨乳突部の形成に関する研究

— 沖縄における生年の影響について —

新崎 準一 (学籍番号 144179F)

指導教員: ○山城 恒雄, 村山 貞之

琉球大学大学院医学研究科放射線診断治療学講座

**目的:** 側頭骨乳突部の形成は、小児期～学童期における中耳炎など中耳疾患の罹患と関係があるとされる。今回我々は、頭部CTを用いて沖縄での側頭骨乳突部の形成と生年や体格との関連を検討した。

**方法:** この後ろ向き研究は琉球大学臨床研究倫理審査委員会の承認を受けている。2016年の下半期に、琉球大学附属病院救急科の依頼で頭部CTを撮影した361人の患者(全例18歳以上で平均年齢59歳。男性187人、女性174人)を解析対象とした(外国人、乳突部手術歴のある症例等は除外した)。画像解析用workstationを用いて、外側半規管のレベルで、頭部CTにおける側頭骨乳突部の断面積を計測した(閾値を用いて乳突部の気腔および蜂巣構造を抽出)。側頭骨乳突部の断面積と、生年や体格の相関関係を、Spearman検定を用いて解析した。乳突部断面積の予測因子に関する多変量解析は最小二乗法を用いて行った。

**結果:** 側頭骨乳突部の断面積と生年の間には有意な正の相関が見られた(右, 相関係数 $\rho=0.438$ , 左,  $\rho=0.465$ , 左右平均,  $\rho=0.474$ , 全て $P<0.0001$ )。乳突部断面積は男女別に身長とも弱い有意相関が見られたが( $\rho=0.251-0.364$ ,  $P<0.01$ )、生年と身長を含む多変量解析では、乳突部断面積に関して、男女共に身長より生年がより強い予測因子であると判定された(男性 $P<0.01$ , 女性 $P<0.05$ )。

**結論:** 沖縄では側頭骨乳突部の形成と生年との間に有意な相関があり、高齢者より若年者で乳突部が大きい傾向がある。その背景としては第二次世界大戦後の医療状況や栄養状態の改善が影響した可能性があると思われる。

075

## アルツハイマーモデルマウスを用いた高気圧酸素療法(HBO)による認知機能への影響

具志堅 結 (学籍番号: 144180K)

指導教員: ○片桐 千秋, 西村 正彦, 土田 幸男, 藤原 京子

石内 勝吾

琉球大学院医学研究科脳神経外科学講座

現在、日本国内に250万人以上もの認知症患者があり、その数は増え続けている。認知症の主なリスク因子は老化である。しかし65歳以上の高齢者の割合も増加していることを考えると、認知機能の低下を改善する必要がある。脳神経外科では高気圧酸素療法(HBO)を併用した放射線治療を行う中で、HBOに神経保護作用がある可能性を見出している。本研究ではアルツハイマー病モデルマウスを用いたHBOによる認知機能への影響を検討した。アミロイドβペプチド(Aβ; APPタンパクが切断されてできるペプチド)蓄積は、アルツハイマー病(AD)の重要な特徴である。実験にはヒトAPP遺伝子に家族性AD変異を3カ所加えたヒトADトランスジェニックマウス、APP-NL-G-FをADモデルとし、1カ所加えたAPP-NLをコントロールとして使用した。このADマウスは、内因性APPレベルを有し、ヒト家族性変異によってAβペプチドが発生しシナプス変性および記憶障害を誘発する強固なAβアミロイド症を発症する。このマウスを使って、HBO群(オス: 3匹, メス: 4匹)、コントロール群(オス: 2匹, メス: 3匹)で実験を行った。HBO群にHBOを4週間、週に5回行い、そのあとにHBO群とコントロール群とで行動解析を行った。行動解析では、Open field, Elevated plus maze, Y maze, Nobel object recognition test (NOR), Fear conditioning testを行い、このあとに灌流固定と脳の切り出し、組織染色(Tau protein, Amyloid beta)を行った。

行動解析の結果、Open fieldとY mazeではHBO群とコントロール群との間に有意差はなかった。Elevated plus mazeはOpen armでの滞留時間、またNORではNew objectへの滞留時間がHBO群の方が短かった。また、Fear conditioning testではHBO群がコントロール群と比べて顕著にfreezing timeが長かった。組織染色を行った結果では、抗Tau抗体positiveの細胞数および抗アミロイドβ抗体positiveの面積はHBO群のほうが少なかった。

これらの結果から、HBOは認知機能を向上させる可能性があることが示唆されたが、HBOの認知機能への影響の詳細を解明するためには実験に用いるマウス個体数を増やす必要があると考えられた。

076

## 体幹部定位放射線治療(SBRT; stereotactic body radiotherapy)後の放射線肺臓炎発生のリスクファクターに関する検討

大村 朝泰 (学籍番号: 144181H)

指導教員: ○有賀 拓郎, 石川 和樹, 戸板 孝文, 村山 貞之

琉球大学大学院医学研究科放射線診断治療学講座

**背景・目的:** 早期非小細胞肺癌の治療において、SBRTは治療選択肢として考慮されるようになってきたが、SBRT後の放射線肺臓炎(RP; radiation pneumonitis)のリスクファクターはいまだ定まったものはない。本研究では、琉球大学医学部附属病院で行われたSBRT後のRP発生のリスクファクターについて検討した。

**対象・方法:** 対象は2013年3月から2016年12月までに琉球大学医学部附属病院でSBRTを行った56例で、年齢の中央値は82歳、原発性肺癌が48例、転移性肺腫瘍が8例であった。本研究では、CTCAE ver.4で定義されるGrade2以上の肺炎発生のリスクファクター同定を主たる解析とした。また本研究では、ある線量が照射される肺野体積の全肺野における割合をV<sub>xx</sub>(例: 30Gy被ばくする肺野が全肺野に対して15%の割合であればV<sub>30</sub>=15%と表記)と定義し、5Gy~40Gyまでの各肺野体積とRP発生とに相関があるか検討した。また、照射した各線量の体積を5Gyごとに求め、各照射体積とRP発生とに相関があるか検討した。その他年齢、性別、PS、腫瘍サイズ、病変の存在する肺葉、間質性肺炎(IP; interstitial pneumonia)の有無、KL-6でも相関を検討した。

**結果:** 観察期間の中央値は8カ月であり、56例中Grade2以上のRPは8例(14%)であった。単変量解析の結果、V<sub>30</sub>が2%以上でRPの発生率に有意差を認めた(36% vs 12%,  $p=0.036$ )。同様に、V<sub>35</sub>も2%以上でRP発生率に有意差を認めた(44% vs 15%,  $p=0.04$ )。IPの有無でRPの発生率を比較すると、有意傾向を認めた(有; 40% vs 無; 17%,  $p=0.074$ )。多変量解析を含め、その他の因子ではRP発生に関して有意差を認めなかった。

**結論:** V<sub>30</sub>とV<sub>35</sub>が肺全体の2%以上であることは、SBRT後のGrade2以上のRPのリスクファクターであった。また、IPの有無はRP発生と有意傾向を認めた。本研究より、RPの発生率を低下させるために、V<sub>30</sub>、V<sub>35</sub>を肺全体の2%以下にすることが重要であると考えられた。

077

ゲノムワイド関連解析による  
日本人大腸・直腸癌の疾患関連遺伝子座の探索

一瀬 克久 (学籍番号: 144182F)  
指導教員: ○今村 美菜子, 前田 士郎  
琉球大学大学院医学研究科先進ゲノム検査医学講座

【背景と目的】大腸・直腸癌 (CRC) は世界、日本の癌による死因のそれぞれ第3位を占める。Family-basedの研究でCRCの罹患率を上昇させる遺伝子変異が複数同定されているが、これらはCRC患者の5%未満しか説明できない。そこで、遺伝的に罹患率を上昇させる因子の発見に強力な手法であり40を超える関連遺伝子座を同定しているゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、日本人CRCの疾患関連遺伝子座の探索を行った。

【方法】国立研究開発法人科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) が公開している「NBDC Research ID: hum0014.v4」(遺伝型解析: Perlgen Sciences 社 high-density oligonucleotide arrays) を使用した。Quality control (QC) として、CRCを含む34疾患を合算したデータ (合算群) において、1) 20以上の疾患でアレルカウントデータがない SNP、2) ハーディーワインベルグ平衡試験において  $p < 1 \times 10^{-6}$  の SNP 及び、合算群からCRCを除いたもの (対照群) においてマイナーアレル頻度  $< 0.05$  の SNP を除外した。QC後のSNP数は176,576、CRC群は195名、対照群は6,418名であった。関連解析にはCochran-Armitage検定を用いた。さらに公共データベース (GTEx) を用いて Expression quantitative trait loci (eQTL) 解析を行った。

【結果】日本人CRCとゲノムワイド水準 ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) の関連を示すSNPは同定されなかったが、 $p < 1 \times 10^{-4}$  を満たすSNPを含む領域が20領域存在した。最も関連の強かったSNPは7番染色体のrs2888807 ( $p = 1.26 \times 10^{-6}$ , オッズ比=1.93, 95%信頼区間=1.47-2.53) であった。eQTL解析の結果、rs2888807のリスクアレルとGTPBP10の発現量は横行結腸及びS状結腸において正の相関 (それぞれ、 $p = 0.0089, 0.021$ ) を示した。

【結論】CRC疾患関連遺伝子座候補を複数同定した。いずれもゲノムワイド水準を満たしていないため独立したCRC集団を用いて、更なる検証を行う必要がある。

079

## 前立腺癌患者における糖蛋白 P18 発現の検討

金城 大智 (学籍番号: 144184B)  
指導教員: 仲西 昌太郎, 須田 哲司, ○齋藤 誠一  
琉球大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学講座

前立腺癌の腫瘍マーカーとして prostate-specific antigen (PSA) が広く用いられている。しかし、PSAは前立腺肥大症などの良性疾患でも上昇するため特異性に問題がある。また、腫瘍の悪性度とPSA値は必ずしも相関しないことが明らかになっている。そのため、PSAの欠点を補う新たな前立腺癌の腫瘍マーカーが必要とされている。

多くの腫瘍では、細胞表面を構築する蛋白の異常なグリコシル化 (蛋白質への糖付加) が起きており、その発現パターンや癌に特異的な糖鎖中のエピトープは多くの癌の診断に利用されている。齋藤らはこれまで、糖鎖抗原  $\beta 1,4$ -GalNAc-disialyl-Lc<sub>4</sub> を認識する糖鎖抗体 RM2 を単離している。このRM2抗体を用いた前立腺癌における免疫組織学的解析から、RM2の発現は癌の悪性度を示すグリーソンスコアと相関することが明らかとなっている。つまり、RM2認識糖蛋白が前立腺癌の新たなマーカーになり得ると考えられる。RM2糖鎖抗体を用いたこれまでのマーカー蛋白の探索によって、幾つかの候補蛋白が明らかにされており、その一つとして糖蛋白 P18 (仮称) が同定されている。そこで、このP18の発現と臨床病理学的所見との関連を明らかにし、腫瘍マーカーとしての有用性の検討を目的とした。

前立腺癌におけるP18の発現解析は、琉球大学医学部附属病院において摘出された69症例の前立腺癌患者組織を対象とし、抗P18抗体による免疫組織染色により行った。顕微鏡下での観察の結果、P18蛋白発現は正常な前立腺の腺上皮細胞、および、グリーソンスコア4の組織のうち、篩状構造を形成する腫瘍細胞の多くが陰性であった。一方、グリーソンスコア5の組織では柵状配列を形成する腫瘍細胞において陽性の頻度が高かった。さらに、PT18染色強度と陽性細胞率からPT18発現レベルを明らかにし、患者の臨床所見および臨床病理学的所見とP18発現レベルとの関連性解析から、腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。

078

マウス化モノクローナル抗体の  
ノロウイルスに対する中和活性の検証

一木 康司 (学籍番号: 144183D)  
指導教員: ○小野寺 大志<sup>1)</sup>, 高橋 宜聖<sup>1)</sup>, 岸本 英博<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup> 国立感染症研究所免疫部第四室,  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学講座

ノロウイルスは冬季に流行する集団食中毒の主要な原因ウイルスで、下痢や嘔吐を主な症状とし、高齢者や乳幼児では死に至ることもある。ノロウイルスが最初に発見されてから30年経つが、培養系や動物実験系が確立されていないことから、このウイルスの研究は進んでいない。一方で感染実験が可能なマウスノロウイルスのような近縁のウイルスの研究は進んでいるため、ヒトノロウイルス、マウスノロウイルスいずれにも反応できる交差反応性抗体に着目し、マウスで実験系を組んだ。ノロウイルスのワクチンを作るのが難しい理由として、その種類の多さ、変異の頻度の高さが挙げられる。また、ウイルスのタイプに特異的なエピトープや、交差反応性を示すエピトープの位置などは解明されていない部分が多い。しかしこれらを解明できればノロウイルス感染に対する免疫応答の追究に有用であるばかりか、抗ウイルス薬のターゲットとなる部位の同定にも役立つかもしれない。実験のはじめに、まずヒト由来の抗ノロウイルスモノクローナル抗体に、*in vitro* において中和活性があるかを検証した。中和活性が見られたものについて遺伝子工学的手法を用いてその重鎖および軽鎖の定常領域をマウス由来IgG2a, IgA, IgMに組み替えて発現ベクターを作成した。これらを293F細胞に遺伝子導入して抗体を産生させ、得られた抗体を精製した。次にマウスノロウイルスS7をマウスに感染させ感染条件を決定し、この感染条件のもとS7を感染させ、同時に作成した抗体を投与し、*in vivo* でも防御効果がみられるかを検証した。コントロール群と比較してIgG2a投与群、IgA投与群とも感染力価が低下した。このことから本実験において作成した抗体は*in vivo* でも防御効果を発揮できることが示された。今回得られた知見から抗体のノロウイルスに対する中和活性部位を明らかにできれば、広範なウイルス株にまたがって有効なワクチン開発の一助となるかもしれない。

080

沖縄県在住の小学生の  
野菜摂取についての断面調査

比嘉 リキ (学籍番号: 144185A)  
指導教員: ○崎間 敦<sup>1)</sup>, 大屋 祐輔<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup> 琉球大学保健管理センター  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科循環器・腎臓・神経内科学講座

【背景】琉球大学では、沖縄県の早世予防と健康寿命の延伸を図ることを目的とした健康行動実践モデル実証事業を展開している。今回、モデル事業に参加している県内在住の小中学生 (男子5014人、女子5144人) を対象とした栄養調査に興味を持ち、性別、学年、体格と野菜摂取量の関係について検討した。

【方法】モデル事業で活用されている簡易型自記式食事履歴質問票 (BDHQ) の体験学習、事業報告会・ワークショップへの参加、文献検索による食育の情報収集を行なった。次に小学生が回答したBDHQの栄養価計算を行い、野菜と栄養素の摂取状況について性別、学年別、体格別に分析した。P値0.05未満を有意水準とした。

【結果】エネルギー未調整の野菜摂取量は女子よりも男子が多く、低学年よりも高学年が多かった。男子の肥満度と野菜摂取量に有意な関係はなかったが、女子において肥満気味・肥満、標準、やせ気味・やせの順に野菜摂取量取量が低値であった。エネルギー摂取量自体が野菜摂取量に影響している可能性があるため、エネルギー調整後の野菜摂取量について群間比較を行った。学年とエネルギー調整後の野菜摂取量、肥満度とエネルギー調整後の野菜摂取量の関係に差はなかった。次に、肥満度と目標野菜摂取量 (300g/日以上) の達成率について検討した。日比肥満度を用いた検討では、男子に差はなかったが、女子では肥満気味・肥満、標準、やせ気味・やせの順に目標野菜摂取量の達成率が低値であった。ローレル指数を用いた検討では、男女ともに肥満気味・肥満、標準、やせ気味・やせの順に目標野菜摂取量の達成率が低値であった。

【結論】男女とも全ての学年において野菜摂取量が不足しており、目標野菜摂取量の達成率は低値に留まっていた。また、肥満気味・肥満の児童において野菜不足がより目立った。これより、就学前の幼少期から食育を始めることが必要である。

081

ゲノムワイド関連解析による  
バセドウ病の疾患感受性遺伝子領域の探索

濱崎 希和子 (学籍番号: 144186J)  
指導教員: ○今村 美葉子, 前田 士郎  
琉球大学大学院医学系研究科先進ゲノム検査医学講座

**【背景と目的】**バセドウ病 (Graves' disease: GD) は若年女性に多い自己免疫疾患であり, 双生児研究により GD 発症の 79% に遺伝要因が関与しているとの報告もある。そこで日本人 GD 疾患感受性遺伝子領域を探索するためにゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行った。

**【方法】**国立研究開発法人科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) が公開している NBDC Research ID: hum0014.v4 のデータを使用し, GD 患者を疾患群, それ以外を対照群として解析を行った。ジェノタイプングには Perlegen Sciences 社の high-density oligonucleotide arrays が使用されていた。ハーディーワインベルグ平衡試験の P-value が  $1.0 \times 10^{-6}$  未満, 対照群においてマイナーアレル頻度が 0.05 未満の一塩基多型 (SNP) を除外した。Quality Control 後の SNP 数は 194,380。サンプル数は疾患群 195 名, 対照群 6,418 名であった。Cochran-Armitage 検定による関連解析, 公共データベース (GTEx) を用いた Expression quantitative trait loci (eQTL) 解析を実施した。

**【結果】**関連解析の結果, ゲノムワイド水準 ( $p < 5.0 \times 10^{-8}$ ) に達した SNP は同定されなかった。P-value が  $1.0 \times 10^{-4}$  未満の候補領域が 31 領域 (56SNPs), うち 2 領域 (4SNPs) は既報 (*HLA*, *PHLDB2*) であった。最も関連が強かった SNP は既報の 6 番染色体 *HLA* 領域に存在する rs6937034 [ $p = 1.14 \times 10^{-7}$ , オッズ比 (OR) = 1.72, 95% 信頼区間 (95%CI): 1.41-2.11] であった。次に関連が強い 17 番染色体の rs3816120 ( $p = 8.53 \times 10^{-7}$ , OR = 2.11, 95%CI: 1.56-2.86) の近傍遺伝子に関して eQTL 解析を実施した結果, rs3816120 のリスクアレルと *NT5C3B* が正の相関 (全血:  $p = 3.50 \times 10^{-4}$ , リンパ球:  $p = 2.3 \times 10^{-6}$ ), *KLHL10* と負の相関 (甲状腺:  $p = 3.60 \times 10^{-7}$ ) が認められた。

**【統括】**GWAS により日本人 GD 感受性遺伝子領域候補が複数同定された。いずれもゲノムワイド水準に達しておらず, 独立した集団を用いて検証する必要がある。

082

二日酔い医療介入に関する  
システマティックレビュー

佐久本 政彬 (学籍番号: 144187G)  
指導教員: ○植田 真一郎  
琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

## 目的

二日酔いは成人であれば誰もが経験したことがあるであろう。多くの予防薬や治療法が提唱あるいは販売されており, それらの医学的根拠は確立していない。この研究では二日酔いに関する臨床試験論文を検索し, システマティックレビューを行うことで最適な医療介入は何かを調べることを目的とする。

## 方法

二日酔いの予防や治療に対する医療介入の有効性に関する臨床試験論文の批判的吟味を行う。データソースは Medline (Pubmed) で hang over などを MeSH として検索をかけて選出した。選出された論文はすべて二日酔いの予防や治療に対する医療介入のプラセボ対照ランダム化二重盲検比較試験 (RCT) による有効性評価である。これらの選出された論文の結果の一貫性, バイアスのリスクなどを評価した。

## 結果

これらの研究からほとんどの治療法が二日酔いのすべての症状を著しく緩和するわけではないことがわかった。一部のものは頭痛や嘔吐のような限られた症状には効果があるが, 眠気や倦怠感など他の一般的な二日酔いの症状には効果はなかった。このような効果が見られたものはプロスタグランジン合成阻害薬やアルコール代謝を促進するものであった。

## 考察

医療介入がアルコールの二日酔いの一部の症状を緩和するものはあったものの, 決定的に予防または治療するのに有効であることを示唆する説得的な証拠は存在しなかった。今回はダブルブラインドのランダム化比較試験 (RCT) であり, 尚且つ対照群をプラセボに局限したので, 選出された論文数も少なく, このような結果になったと考えられる。

083

沖縄の成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者の  
予後因子の解析

内野 周太 (学籍番号: 144188E)  
指導教員: ○加留部 謙之輔<sup>1)</sup>, 森近 一穂<sup>2)</sup>  
福島 卓也<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座

<sup>3)</sup> 琉球大学医学部保健学科血液免疫検査学講座

成人 T 細胞白血病 (ATL) は, HTLV-1 ウイルスに感染することで起きる CD4 陽性リンパ球の腫瘍で, 沖縄, 九州を始めとする西日本に多い。ATL は, 臨床的にくすぶり型, 慢性型, 急性型, リンパ腫型, 皮膚型の 5 つの病型に分類され, リンパ腫型と急性型は特に予後不良である (生存の中央値: リンパ腫型 10 か月, 急性型 6 か月)。今回の研究では, 2000 年から 2016 年の期間に琉球大学病院, 南部医療センターにて, ATL として診断, 治療された患者 110 名を対象としてデータ収集, 解析を行い, 予後や臨床所見に相関する因子を解析した。

方法として, 対象となる患者の初診時の臨床所見, 病理組織学的分類, 治療経過, 転帰に関する情報を調べ, 統計ソフト stata を用いて Kaplan-Meier の生存曲線や log-rank-test による単変量解析を通して, 予後不良群である急性型, リンパ腫型を中心に, 予後予測因子の同定を行った。

現在, 実地臨床では Performance status (PS), 年齢, アルブミン値, 病期分類, siL2R 値の五つの項目を組み合わせた総合予後指標スコア ATL-PI を用いているが, 今回の症例ではそのうち病期分類 ( $p = 0.0341$ ), siL2R 値 ( $p = 0.0185$ ) が予後と有意な関連性があり, PS ( $p = 0.0526$ ) も予後との関連の傾向があることがわかった。ATL-PI としては  $p = 0.0263$  となり, 有意差が認められた。ATL-PI の項目に含まれていない項目では, LDH ( $p = 0.0449$ ) が有意差があることがわかった。このように同じ HTLV-1 が引き起こす疾患であるにも関わらず, 病型や検査所見によって予後に大きな差が出ることがわかった。

今後としては, ATL 患者のデータを更に集めて解析を進め, 予後に違いを与える因子としてどのようなものがあるか病理学的, 分子生物学的に解析をしたいと思う。

084

百日咳診断における multiplex PCR 法の  
有用性について

前川 泰輝 (学籍番号: 144189C)  
指導教員: ○金城 武士, Gretchen Parrott, Saifun Nahar  
藤田 次郎  
琉球大学大学院医学研究科感染症・呼吸器・消化器内科学講座  
(第一内科)

百日咳は, グラム陰性桿菌である百日咳菌によって引き起こされ, 2 週間以上の咳嗽に加えて, 発作性の咳嗽・吸気性笛声・咳き込み後の嘔吐などが特徴的な症状である。百日咳菌は新生児においては肺炎, 成人においては慢性咳嗽の主要な原因菌であり, 近年, その罹患率の増加が懸念されている。百日咳の診断方法として, 培養検査, 血清学的検査, 遺伝子学的検査があり, ゴールドスタンダードは培養検査である。しかし培養検査には高価で使用期限が短い特殊培地が必要なこと, 培養に時間を要すること, さらに発症早期しか菌を検出できないなどの欠点があり, 実際, 臨床現場では広く利用されていない。血清検査は, 生後 3 ヶ月未満の新生児では免疫機構が未熟なため抗体価上昇が期待できず利用できない。また成人においても過去の感染を反映したり, また発症早期には抗体が十分産生されないことから偽陽性, 偽陰性の問題が常につきまとう。Polymerase Chain Reaction (PCR) 法は専用機器さえあれば, 年齢によらず治療開始後でも検出率が高く, 数時間で結果がわかる。PCR 法は DNA のある特定の領域を選択的に増幅させ, 検出する方法であるが, multiplex PCR とは一回のアッセイで複数のターゲット遺伝子を同時に検出するものである。琉球大学第一内科では multiplex PCR 法を積極的に臨床応用しており, 本発表では, multiplex PCR 法の百日咳診断における有用性について報告する。

第一内科ではこれまで 10 例の百日咳症例を経験していた。内訳は新生児肺炎症例 5 例と成人の慢性咳嗽症例 5 例であった。新生児肺炎の 5 症例では抗体価の測定は行われておらず, すべて臨床的判断で百日咳が疑われていた。また成人百日咳症例のうち, 血清抗体価を測定していた症例をみると初診時の血清抗体価は上昇しておらず, 3 ~ 4 週間後に上昇がみられた。以上から, PCR 法は百日咳診断において有用であると考えられる。



085

## 側弯症治療の改善度と術後満足度の関連性についての検討

前森 新大 (学籍番号: 144190G)  
 指導教員: 六角 高祥<sup>1)</sup>, 金城 英雄<sup>1)</sup>, 比嘉 勝一郎<sup>1)</sup>  
 ○金谷 文則<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 琉球大学付属病院整形外科

<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科整形外科科学講座

[はじめに]

側弯症は思春期の女性に多い疾患であり、進行するものは矯正手術が必要である。2014年から琉球大学付属病院にハイブリッド手術室が設置され、スクリー刺入方向や長さを確認することができ、安全に側弯症の手術が可能となった。今回、側弯症に対する脊柱変形矯正固定術の手術成績と術後満足度の関連性を検討した。

[対象と方法]

2014-16年、当科で、Hybrid ORで脊柱側弯矯正固定術を施行した24例、男性:女性年齢(15-27歳 平均17.2歳)、特発性側弯(Lenke type1; 11例 type2 4例 type5 8例)、そのうち症候性側弯;(NF1; 1例, Arnold-Chiari; 1例, OI; 1例, ADD; 1例, 先天性側弯; 1例)、観察期間3ヵ月-3年術前のMain curveにおける反対方向への屈曲(Bend)時と牽引時のMain curveの改善が大きい方の角度をFlexibility (%)として計測する。術前の最大Cobb角と術後の最大Cobb角からCR(矯正率)を計測する。これらとSRS-22, SRS-24の術後改善度の関連性をLenke typeごとに検討する。

[結果]

全体を通して術後満足度は高くLenke typeによる優位さは認められなかった。症例の多いLenke type1とLenke type3ではFlexibility (%)とCR(矯正率)に関連性が見られFlexibility (%)が大きいほどCR(矯正率)も大きかった。Lenke type1,2,5それぞれの平均CR (%)は、63.8 (%), 60.5 (%), 59.2 (%)であった。

[考察]

Flexibility (%)は脊椎変形の構築度の指標であり、これが大きいほど脊椎が柔軟であることを示唆しており、柔軟であるほど術後矯正率が良好であることが認められた。このことから、手術時年齢が若く構築性が低い方がFlexibilityが高く矯正率が高く、側弯症治療においては手術を行う時期をよく検討し見極めることが重要であることが分かった。

087

## 血液透析患者における脈波解析指標の変化

宮本 春花 (学籍番号: 144192C)  
 指導教員: ○石田 明夫, 大屋 祐輔  
 琉球大学医学部附属病院第3内科

[背景] 心収縮により生じた駆出波が、脈波伝播速度(PWV)の速度で血管壁を末梢へ伝わり、主に小細動脈で反射し、駆出波と合成される。PWVは血圧の規定因子の1つである。動脈が硬くなると、PWVが上昇し、駆出波の増高、反射波の増高、反射波の戻りタイミングが早まり合成波が増高し、収縮期血圧が上昇する。PWVや心臓に近い中心血圧など、中心血行動態は動脈の硬さの評価法として利用されてきている。最近、上腕血圧測定と同時に脈波解析により中心血行動態に関連した指標を評価できるようになった。透析患者では、高血圧の有病率や血管病発症のリスクが高い。血液透析では体液量変化が大きく、血行動態がダイナミックに変化する。

[目的] 透析患者(HD)と非透析患者(non-HD)の脈波解析で得られる指標を比較し、透析前後の変化を解析する。

[方法] 当院血液浄化療法部で維持透析中患者(13名)を対象とし、第三内科病棟入院患者(73名)と第三内科外来通院患者(6名)を比較対象とした。mobil-O-graph®で上腕血圧、中心血圧、末梢血管抵抗、一回拍出量、PWV、Augmentation index (AI@75)、reflection magnitude (RM)を評価した。AI@75は反射波の大きさと戻りタイミングの両方を、RMは反射波の大きさを反映するとされている。

[結果] HDとnon-HDの平均年齢は、それぞれ69.5歳と64.4歳。女性が38%と42%で有意差はなかった。HDでは上腕血圧と中心血圧のいずれもnon-HDより高かった。一回拍出量(HD 75ml vs. non-HD 72 ml)は差がなかったが、末梢血管抵抗(1812dyn\*s/cm<sup>5</sup> vs. 1565dyn\*s/cm<sup>5</sup>)はHDが高かった。PWV(11 m/s vs. 9.0 m/s)とAI@75(25 vs 17)ではHDが高値だったが、RM(60 vs. 67)は差がなかった。透析により、収縮期血圧とPWVは低下し、心拍数が増加した。しかし、AI@75、RMは有意な変化を示さなかった。

[結論] HDでは、PWVとAI@75は高値だったが、RMはnon-HDと有意差がなく、血圧上昇の主な要因は動脈硬化によるPWVの上昇と反射波の戻りタイミングが早まったことと考えられた。透析前後の変化では、除水による体液量の減少が血圧およびPWVの低下に寄与したと考えられる。

086

## CTデータを用いた眼球サイズの計測と関連因子の同定

上原 輝 (学籍番号: 144191E)  
 指導教員: ○木村 亮介, 石田 肇  
 琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

目的:本研究では、CTデータを対象として眼球のサイズおよび形態を計測し、性別、年齢、身長、体重との関連を明らかにする。また、先行研究において、眼軸長に関わる遺伝子多型のゲノムワイド関連解析が行われ、有意に眼軸長に関わる8つの遺伝子座が同定されていることから、その中のSNPのひとつ(rs994767)との関連がみられるかを調べる。

材料と方法:インフォームド Consentのもと、琉球大学医学部附属病院でPET検査を受けた患者689名の匿名化されたDICOMデータを用いた。画像解析ソフトAmira6.0.0を使用して、患者の左目についてのみ眼球の幅、高さ、眼軸長(奥行)について計測を行った。眼球の幅、高さ、眼軸長の幾何平均をもとめ、眼球の大きさの指標とした。また、眼軸長/幅の比を算出した。rs994767は1番染色体ZC3H11B遺伝子の7kb上流にあるSNPであり、タイピングはTaqMan法を用いておこなった。眼軸長、眼球の大きさ、眼軸長/幅をそれぞれ目的変数とし、説明変数をSNP(rs994767)、性別、年齢、身長、体重として重回帰分析をおこなった。

結果と考察:眼軸長と眼球の大きさについては、年齢および身長との相関がみられ、SNP、性別、体重とは相関がみられなかった。眼軸長/幅についてはどの項目とも相関がみられなかった。今回、rs994767と眼軸長との相関は観察されなかったが、先行研究(約2万人規模)に比べサンプル数が少なかったこと、あるいはCTデータを用いて計測したことによる計測誤差がその一因であると考えられる。

本研究では、20代~80代の範囲について年齢が上がるにつれて眼球の大きさが小さくなるという結果が得られた。年齢とともに眼球の大きさが小さくなることも老眼の一因と考え得るかもしれない。また、先行研究において、身長が高くなるにつれて近視のリスクが高まるという報告があるが、本研究で示された身長が高くなるにつれて眼球の大きさが大きくなるという結果は、眼球の大きさが近視のリスクと関連している可能性を示唆する。

088

## 飲酒に寛容な沖縄のアルコール使用障害者の気質・性格特性とは?

大山 達也 (学籍番号: 144193B)  
 指導教員: ○甲田 宗良, 近藤 毅  
 琉球大学大学院医学研究科精神病学講座

[問題と目的] アルコール使用障害(alcohol use disorder: AUD)とは、アルコールの精神・身体的薬理作用に囚われ、能動的制御を失い、慢性・持続的に飲酒を反復し(DSM-5: APA, 2013)、やがては渴望、耐性上昇、離脱症状を惹起する行動・身体的障害である。沖縄は、宮古島の「オトーリ」に代表される飲酒に寛容な地域特性を有し、対人交流の媒介として独自の飲酒文化を醸成してきた側面があり、これらは沖縄におけるAUD者の気質・性格にも色濃く反映されている可能性がある。そこで本研究では、沖縄在住のAUD者の気質・性格傾向について、一般健康人である対照群との比較を試みた。

[方法] 1. 対象者 AUD患者16名(44.8±10.2歳、男性13名)および年齢・性別を適合させて抽出した対照群を対象とした。AUDの診断はDSM-IV-TR (APA, 2000)に基づいた。

2. 指標 気質・性格の測定にはTemperament and Character Inventory (TCI: 木島ら, 1996)およびTemperament Evaluation of Memphis, Pisa, Paris and San Diego-autoquestionnaire version (TEMPA-A: Koda & Kondo, 2010)を用いた。

3. 手続き・倫理的配慮 対象者より書面による同意を得て、質問紙を配布し、口頭および紙面にて説明を行った。

[結果と考察] 分散分析の結果、AUD群は対照群と比較して、損害回避および循環・抑うつ気質の得点が高く、新奇性追求や自己志向の得点は低かった。すなわち、AUD者は不安定な感情気質を元来有し、失敗や喪失の回避に迫られて自身の社会的能動性を発揮できず、内面にストレスを溜めやすい傾向を有すると推察される。本研究におけるAUD者の新奇性追求の低さは従来にない新しい所見だが、新奇性追求の高い違法薬物嗜癖と異なり、アルコール摂取には刺激希求よりもむしろストレス緩和のためのself-medicationとしての意味合いが高い可能性も示唆された。

089

ウチナンチュの腸内フローラを探索する  
予備検討

山下 将平 (学籍番号: 144194K)

指導教員: ○難波 豊隆, 益崎 裕章

琉球大学大学院医学研究科内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座  
(第二内科)

背景: 2006年に腸内フローラのバランス異常と肥満感受性との関連性が指摘され、様々な疾患のリスクや原因となっていることが続々と明らかになっている。本研究ではウチナンチュの腸内フローラを解析し、日本人の研究成果と比較し、沖縄における生活習慣病の増加との関連性を探索するための予備検討を行った。

方法: 第二内科の腸内フローラ研究(承認番号966)に準拠し、健康成人2名と2型糖尿病患者2名から新鮮便を採取し凍結保存した。第二内科研究室で凍結便検体から細菌由来ジェノミックDNAを抽出し、1<sup>st</sup>PCRにて細菌が持つ16SrRNAをコードする遺伝子のV3-V4領域を含む特定領域を増幅した。PCR産物を精製し、2<sup>nd</sup>PCRでindex配列を付与した。外部委託し、次世代シーケンサーを用いてV3-V4領域の塩基配列を決定し、これらの塩基配列をデータベースで解析することで各々の検体に含まれる細菌のパターンを推定した。

結果: 日本人における報告<sup>1)</sup>と比較して、肥満者に多いとされるFirmicutes門(以下F門)の細菌が、健康成人および2型糖尿病患者いずれにおいても多い結果であった。この報告では日本人の平均が約60%であったのに対して、本研究での平均は74%であった。F門の増加は肥満病態と関連するが、全4例でF門の比率が高かったことは注目に値する。また、草食動物の腸に多く生息し、セルロースを分解できるRuminococcus属の比率が、4名中2名の肉食中心の被験者に対し、残り2名の野菜食中心の被験者で高い傾向が観察された。

考察: 少数例ながらウチナンチュの腸内フローラにおいて肥満病態と関連する傾向が観察された。また、食習慣が腸内フローラに影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、多数例の検討でウチナンチュの腸内フローラの特性を解析することは、沖縄における肥満・生活習慣病診療の質的向上に資すると考える。また、食習慣は腸内フローラを解析するうえで重要な因子であり、食習慣を定量的に評価する重要性が認識できた。

参考文献:

1) Suguru Nishijima, et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. DNA Research 2016; 23 (2), 125-133.

091

コレラ菌毒素(CT)の分泌を阻止する  
植物の探求

兼城 さやか (学籍番号: 144196F)

指導教員: ○仲宗根 昇, トーマ・クラウディア, 山城 哲

琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

目的

コレラはコレラ菌の産生するコレラ毒素(cholera toxin: CT)によって起こる、下痢や脱水を症状とした感染症である。治療せずに放置すると一日で死に至る疾患であり、現在世界では第七次パンデミックを起こしている。CTの分泌を阻止することは発症を抑えることにつながる。またCTは細菌のII型分泌装置で分泌されることから、同じ分泌装置で分泌される他の菌の毒素を抑えることにもなると予想される。今回の研究の目的はCTの分泌を阻止する植物を見つけることである。

材料と方法

沖縄県に自生する植物を採取し、水洗いした後乾燥させる。乾燥重量を計測して50%エタノールに溶かし、50℃で一時間加熱抽出した。CTの分泌阻止は、植物抽出液を含む培地と含まない培地でコレラ菌N16961株(ElTor, 稲葉)を37℃で20時間振盪培養し、培養上清に分泌されたCTをウエスタンブロットで調べることで確認した。

結果

植物約70種を調べたところ、いくつかの植物抽出液がCTの分泌を阻止した。そのうちの一つに学名: *Podocarpus macrophyllus* (方言名: チャーギ)があった。*P. macrophyllus*のCT分泌阻止を確認するため、*P. macrophyllus*による菌の発育阻害性を調べた。その結果、*P. macrophyllus*はコレラ菌の増殖をおよそ1/2000に抑えるということが分かった。さらにコレラ菌以外の細菌(腸管病原性大腸菌、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、エルシニア)の発育阻害性も調べた結果、チャーギの抽出液はコレラ菌以外の細菌の発育はほとんど阻止しないことがわかった。

考察

*P. macrophyllus*はコレラ菌N16961株の発育を阻止することによってCTの産生を抑えていることがわかった。また他の細菌の発育はほとんど抑えないことからコレラ菌に特異的に作用し、発育を阻止していると考えられる。発育阻止のメカニズムはまだわかっていないが、今後さらに検討して解明していきたい。

090

## ローヤルゼリー長期摂取による脳機能への影響

小宮山 紗代 (学籍番号: 144195H)

指導教員: ○片桐 千秋, 西村 正彦, 土田 幸男, 石内 勝吾

琉球大学大学院医学研究科脳神経外科学講座

女王蜂はローヤルゼリー(RJ)を長期間大量に食べることで、働き蜂と遺伝子の背景が同じにも関わらず、体形が大型になり多量に産卵出来ることから、RJは古くから自然の機能性食品として注目されている。脳神経外科では昨年2月からローヤルゼリー1%及び5%添加試料でマウスを飼育しており、RJの短期摂取した若齢期では運動機能、代謝の亢進がみられた。本研究はこの結果を踏まえて、長期摂取したマウスにおける脳機能及び運動機能への影響を検討した。

行動量及び概日リズム解析のため回転ケージで2週間飼育した後、情動行動への影響をオープンフィールド試験と高架式十字迷路、物体認識記憶テストとして新規物体認知試験を行い、文脈記憶テストとして恐怖条件付け学習試験を行った。行動解析後のマウス脳を取り出し還流固定後パラフィン切片を免疫染色し、組織学的に解析を行った。

回転ケージでは、1日回転量および、2週間の積算回転数が対照群に比べ、1% RJおよび5% RJ群で増加していた。高架式十字迷路では、オープンアームでの平均滞留時間が対照群と比べ、1% RJおよび5% RJ群で増加傾向にあった。しかしながら、オープンフィールド試験、新規物体認知試験、恐怖条件付け学習試験はどの群においても有意差は見られなかった。海馬歯状回におけるミクログリアの数は対象群と比べ、1% RJおよび5% RJ群で優位に減少していた。

RJ短期間摂取マウスと比べると老齢のため、運動量は減少しているものの同様にRJ長期摂取は老齢マウスの活動性を亢進させると考えられる。一方、情動行動、記憶への影響は今回の解析ではあまり見受けられなかった。ミクログリアが減少していることから、脳神経細胞の炎症もしくは変性が対照群と比べてRJ摂取群で少なかったと考えられる。

092

レプトスピラ症の迅速診断のための  
特異的抗原(3-HADH)の検討

島袋 晃一 (学籍番号: 144198B)

指導教員: ○トーマ・クラウディア, 仲宗根 昇, 山城 哲

琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

目的

レプトスピラ症は世界中に広く分布する人獣共通感染症で、重症型は黄疸、肺出血、腎障害の三主要徴候が出現し、主に肺出血や腎不全により死亡することもある。黄疸を伴わない軽症型のレプトスピラ症は非特異的な臨床症状であり、誤診につながる恐れがある。抗生物質の治療は、早期に開始されるときに有効であるため、レプトスピラ症の早期診断は重症化を防ぐために重要である。現在、ベッドサイドで簡便かつ迅速に診断できるキットがない。本研究では、レプトスピラ症のハムスターモデルにおいて、感染初期に尿から検出される菌由来の3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase(3-HADH)という脂肪酸のβ酸化に関わる酵素に着目し、レプトスピラ患者においても本酵素が尿中に排出されるかどうかを調べた。

材料と方法

沖縄衛生環境研究所から提供して頂いたレプトスピラ患者の尿11検体をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により泳動し、PDVF膜に転写後、抗3-HADH抗血清を用いてウエスタンブロットングを行った。抗原・抗体反応は、HRP標識二次抗体を用いて化学発光により検出した。また、検出感度を上げるために、尿を限外濾過遠心分離法により10倍濃縮し、同様に調べた。最後に、尿中の3HADHが天然状態で検出されるかを検証するためにドットブロット法を用いて調べた。

結果

レプトスピラ症患者の尿11検体をウエスタンブロットで調べたところ、原尿では5検体から、濃縮尿では新たに2検体から3HADHが検出された。ドットブロット法においても3HADHが反応することが分かった。

考察

3HADHはヒトの尿からも検出されることが分かった。また、煮沸などの加熱処理をせずとも反応することが分かり、迅速診断キットの尿中抗原に適すると考えられる。今後は検体数を増やすとともに、検出法の改善を行うことで陽性率をあげていきたい。

093

レプトスピラ症の迅速診断に利用できる  
特異的抗原 (LipL32) の検討

當山 清士郎 (学籍番号: 144200H)

指導教員: ○トーマ・クラウディア, 仲宗根 昇, 山城 哲  
琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

## 【目的】

レプトスピラ症は世界中に広く分布し、人獣共通感染するスピロヘータである。重傷化すると黄疸、肺出血、腎障害といった三主要徴候が出現し、抗生剤投与などの治療を行わないまま放置すると死に至ることもある。また軽症型のレプトスピラ症は非特異的な臨床症状を示すために、誤診を招くこともあるが、現在、ベッドサイドで簡便かつ迅速に診断できるキットは存在しない。そこで、尿中抗原を用いた迅速診断キットを開発する為、病原性レプトスピラ (*Leptospira interrogans*) の外膜タンパク質である LipL32 が診断標的因子として有用であるかを評価した。

## 【方法】

抗-LipL32抗体を含むIgG分画はプロテインGカラムを用いて精製し、LipL32に対する特異性を*L. interrogans*の野生株および*lipL32*の欠損株を用いてウエスタンブロット及び、蛍光免疫染色を行い評価した。また、レプトスピラ症患者の尿検体(n:9)のLipL32の有無はウエスタンブロットにて調べた。

## 【結果】

プロテインGカラムを用いて得られたIgG分画をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により泳動し、Commassie Blue染色を行った結果、H鎖とL鎖に相当する約50kDaと約25kDaの位置にバンドが確認できた。このIgG分画でレプトスピラ菌体におけるウエスタンブロットでは分子量約32kDaの位置にバンドを確認することができた。また、蛍光免疫染色にて、野生株が反応するのに対し、*lipL32*の欠損株は反応しないことを確認した。精製分画がLipL32を特異的に認識していることが確認できたため、次にレプトスピラ症患者の尿を用いてウエスタンブロットを行ったが、全ての検体においてLipL32は検出されなかった。

## 【考察】

LipL32が検出されなかった原因としては、尿中にLipL32に排出されないことや、尿中の他の物質との反応によりLipL32が分解されたことが考えられる。今後の課題としてウエスタンブロットの改善や引き続き抗体の評価が求められる。

095

Simple CLARITY 法及び ZEISS Lightsheet Z1  
を用いた 3D イメージングによる RT の  
神経細胞への影響と HBO による  
神経保護効果の検討

宮城 基 (学籍番号: 144202D)

指導教員: 片桐 千秋, 西村 正彦, 土田 幸男, ○石内 勝吾  
琉球大学大学院医学研究科脳神経外科学講座

## 1. 目的と方法

脳透明化は神経軸索の走行やその分子的特徴を解明するための革新的な技術で、脳透明化により多くの脳疾患の組織病変の解析が可能になる。今回我々は2012年Chungらにより開発されたCLARITY (Clear, Lipid-exchanged, Acrylamide-hybridized Rigid, Imaging/immunostaining compatible, Tissue hYdrogel) を改変し独自に開発したSimple CLARITY法によりHBOの脳組織への影響を開発した。

## 2. 結果

YFPマウス7匹HBO(Hyperbaric Oxygen Therapy)群2匹、RT(Radiation Therapy)群2匹、HBO+RT群2匹、Control1匹の群に分け、Simple CLARITYを施行した。後、ZEISS Lightsheet Z1(顕微鏡の名称)を用いて観察した結果、RT群の神経細胞数は顕著に減少していた。HBO群では目立った減少は見られなかった。HBO+RT群ではRT群と比較し、神経細胞数の減少が抑制され、HBOによる一定の神経保護作用を確認することができた。

## 3. まとめ

脳透明化の技術を用いること、そしてZEISS Lightsheet Z1のような高性能な顕微鏡の開発により、従来では観察が難しいとされた深層部の神経細胞まで観察が可能になった。脳透明化の技術は臨床現場での応用に直結する革新的なものであることをこの実習において知れた。

094

## 新規パルミチン酸誘導体の抗がん効果の検証

三好 翔輝 (学籍番号: 144201F)

指導教員: ○酒々井 眞澄<sup>1)</sup>, 吉見 直己<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 名古屋市立大学大学院医学研究科分子毒性学教室,<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

先行研究で、私たちが独自に開発したパルミチン酸誘導体である新規抗がん物質のパルミトイルピペリジノピペリジン(以下PPI)はヒト大腸がん細胞に対して増殖抑制効果をもつことがわかっている。構造活性相関解析から、PPIのN室窒素原子の求核性が高いほど増殖抑制効果が強いことを突き止めた。この情報を分子設計に生かし求核性をさらに高めた新規物質を合成し、本研究では得られた新規化合物1112,1121のヒト大腸がん細胞株(HT29)および鶏卵漿尿膜を用いて抗がん効果とその機序を解析した。

1) コロニーアッセイで、化合物1112,1121がHT29の増殖を抑制するかを検討した。その結果、化合物1112,1121のIC50値はそれぞれ0.08mM, 0.05mMであった。

2) フローサイトメトリーによる細胞動態解析では、化合物1112,1121が細胞周期の停止作用やアポトーシスの誘導能をもつかを検討した。その結果、1121,1112をばく露したHT29において、G1が最大で3%と15%それぞれ増加した。

3) 鶏卵漿尿膜法で、化合物1121に血管新生の抑制作用があるかを検討した。その結果、血管数、血管分岐数、血管長がそれぞれ抑制する傾向がみられた。

4) インシリコ解析を用いたドッキングシミュレーションで、化合物1112,1121はともに転写因子であるSTAT3のSH2ドメインに結合することがわかったため、ウエスタンブロットにより、化合物1112,1121によるHT29における転写因子STAT3に制御される分子発現への影響はあるかを検討した。その結果、2.5mMの化合物1112,1121はともにSTAT3の発現に影響を与えることなく、pSTAT3の発現を減らした。

また化合物1112,1121がSTAT3下流の分子の発現に影響を与えるかを検討した。その結果、両化合物はcyclinD1, Bcl-xL, VEGFの発現を減らした。これらの実験により以下のことがわかった。

新規物質は細胞増殖抑制効果をもつ。機序のひとつとしてリン酸化STAT3発現抑制とSTAT3下流分子の発現を抑制することで効果を発揮している可能性がある。細胞周期停止、アポトーシス誘導、血管新生抑制への効果が期待されるが現在実験データの再現性を検証している。

096

院内感染対策における  
multiplex PCRの有用性

池田 素代香 (学籍番号: 144203B)

指導教員: ○金城 武士, Gretchen Parrott, Saifun Nahar

藤田 次郎

琉球大学大学院医学研究科、感染症・呼吸器・消化器内科学講座  
(第一内科)

適切な感染制御を行うためには、感染症の原因微生物を迅速に特定することが重要である。感染症アウトブレイクが発生した場合、有症状者を隔離する(コホーティング)のが基本である。2012年から琉球大学第一内科では、複数の病原体遺伝子を同時に検査することのできるmultiplex PCRを導入し、臨床現場で使用している。海外ではすでに臨床現場で使用され、感染対策のツールとして使用されているが、本邦ではこの方法による感染症診断は保険収載されていない。今回、琉大病院で発生した感染症アウトブレイクにおいてmultiplex PCRを使用し、適切な感染対策を行うことができたので報告する。multiplex PCRでは従来のPCRと比べて一回のアッセイで複数の病原体遺伝子を検出することができる。Anyplex RV16ではInfluenza virusなどの呼吸器ウイルスを検出し、RB5ではマイコプラズマなどの呼吸器細菌を検出することができる。今回はAnyplex™ II RV16 Detection, Anyplex™ II RB5 Detectionのキットを使って病原体遺伝子を検出した。

琉大病院内で発生した感染症アウトブレイクにおいて、似たような症状を示す患者、職員が16人いた。しかしmultiplex PCR法を使うことでRS virus, Influenza virus B, Rhinovirusという3種類のウイルスを検出した。この結果、検出ウイルス別の患者隔離、病棟の全患者、全職員に対してのオセルタミビル投与、面会制限など適切な感染対策をすることができ、早期にアウトブレイクを収束させることができた。

院内アウトブレイク対策において、その原因微生物を特定することが基本である。現在日本では呼吸器ウイルスをスクリーニングする検査システムは確立していない。今回のアウトブレイクは単一の病原体によるアウトブレイクと思われたが、multiplex PCRで検査したところ、3種類のウイルスが検出され、従来法ではできない先進的な感染対策を講じることができた。multiplex PCRはこのように有用であるが、手技が難しく、費用もかかり、施行できる施設も限られていることが課題である。

097

## 高圧酸素療法 (HBO) がアルツハイマーモデルマウスの認知機能に与える影響

与那城 遥 (学籍番号: 144204A)

指導教員: ○片桐 千秋, 西村 正彦, 土田 幸男, 藤原 京子  
石内 勝吾  
琉球大学大学院医学研究科脳神経外科学講座

大気圧よりも高い気圧環境を人工的に作成し、その中で高濃度の酸素の吸入を続けると、血液中の溶解酸素が増加する。これを利用し、生体の種々の組織に生じた低酸素症を迅速に改善する治療法を高気圧酸素療法 (HBO) という。減圧症・末梢循環不全・損傷組織の創傷不全・感染症等に対して有効な治療法である。本研究では、アルツハイマー病モデルマウスを用いて HBO がもたらすアルツハイマー病 (AD) への影響を調べた。用いたマウスは、理化学研究所が開発した次世代型 AD モデルマウスで、既存の AD モデルマウスよりもアルツハイマー病患者脳内のアミロイドの蓄積を忠実に表す。アミロイド前駆体たんぱく質 (APP) を過剰発現させない新規 AD モデルマウスとして、APP 家族性変異の Swedish 変異 (NL) と Iberian Arctic 変異 (G), 変異 (L) をノックイン手法 (knock-in; KI) により導入した、App NL-G-F KI マウスを用いた。Control 群 5 匹 (雄 2 匹, 雌 3 匹) と HBO 群 7 匹 (雄 3 匹, 雌 4 匹) に分け、それぞれ行動解析・組織作製を行った。① HBO4 週間 (週に 5 回) ② 行動解析 (Open field, Elevated plus maze, Y maze, Nobel object recognition test (NOR), Fear conditioning test) ③ 灌流固定と脳の切り出し④パラフィン切片作製⑤組織染色 (Tau protein, Amyloid beta) の順に実施した。Control 群・HBO 群とで結果を比較した。Open field では結果に差異はなかった。Elevated plus maze では open arm での滞留時間が HBO 群の方が短く、Y maze では辛うじて重複数が HBO 群の方が少なかった。NOR では new object の滞在時間が HBO 群の方が短く、Fear conditioning test では明らかに freezing time が HBO 群の方が長かった。組織染色後、大脳皮質を顕微鏡の視野で写真を撮り、Tau protein と Amyloid beta それぞれ組織に沈着した数を数えた結果、どちらも HBO 群の方が少なかった。以上の結果を総合的に判断すると、HBO はアルツハイマー病による認知機能低下を抑制する可能性が示唆された。

098

## 幼若海馬における神経ステロイドのてんかん発作への影響

上原 里依 (学籍番号: 144205J)

指導教員: ○Werner Kilb<sup>1)</sup>, 岡部 明仁<sup>2)</sup>, Heiko J. Luhmann<sup>1)</sup>  
高山 千利<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Institut für Physiologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科分子解剖学講座

てんかんは脳内の興奮系と抑制系のバランスの破綻により、脳全体の神経活動が同期することにより生じ、 $\gamma$ -アミノ酪酸受容体 (GABA<sub>A</sub>R) と塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>) の恒常性の異常が病因の一つであると考えられている。GABA<sub>A</sub>R はシナプス後膜及びシナプス外に存在することが知られており、てんかん治療の主な標的となっている。今回実験に用いた神経ステロイドの一種である Allopregnanolon (Allo) は、生体内で GABA<sub>A</sub>R に作用し、抑制系を増強する作用を持つため、てんかんの治療に用いられてきた。しかしながら、これまでの研究により幼若海馬において GABA は興奮性の作用を持つことが知られている。そこで、幼若海馬で生じてるてんかん発作に対する Allo の効果を調べるのが本研究の目的である。実験方法は以下の通りである。まず、生後 4~7 日の幼若期マウス脳から海馬体を摘出し、人工脳脊髄液 (ACSF: Artificial Cerebrospinal Fluid) 中に浸漬し、CA3 領域にタンクステン電極を刺入した。続いて、てんかん様発作を生じさせる様々な灌流液を用いて発作を生じさせ、安定したところで Allo を加え、発作の発生頻度、継続時間、スパイク数、振幅の変化について検討した。1. マグネシウムイオンを除いた ACSF (0Mg-ACSF) に Allo を加えたところ、わずかに興奮性の傾向が認められたが、有意な差はなかった。2. シナプス性 GABA<sub>A</sub>R のみを遮断する Gabazine (GBZ), 3. シナプス性とシナプス外性を両方遮断する Picrotoxin (PTX) 加えた 0Mg-ACSF にそれぞれ Allo を加えたところ、どちらも変化は認められなかった。そこで発作そのものへの Allo の影響を検討した。0Mg-ACSF に 4-Aminopyridine (4AP) を加えて更に強い発作を誘導させ、Allo を加えたところ、発作の発生頻度に有意な増加が認められた。先行研究と合わせると、幼若海馬におけるてんかん発作に対する Allo の作用は、シナプス性 GABA<sub>A</sub>R を介して興奮性に働き、増悪される可能性が示唆された。

099

## 沖縄県における不発弾に対する災害脆弱性評価

石川 裕太郎 (学籍番号: 144206G)

指導教員: ○久木田 一郎  
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

**[目的]** 沖縄において不発弾による災害への脆弱性を評価することで、その地域の災害の脆弱性を定量化し、平常時における災害対策の優先順位や災害時における被害の推察を効率的に行うことができる。

**[方法]** 沖縄県防災危機管理課の資料などをもとに、American society of healthcare engineering より提唱された災害評価基準である Hazard Vulnerability Analysis を用いて災害評価を行う。Probability を 4 段階、Risk を 5 段階、Preparedness を 3 段階に分け、それぞれ点数付けを行い、この 3 種類の点数を掛け合わせた総得点が高いほど、その地域の災害の脆弱性が大きいと評価する。

**[結果]** Probability: 3 (これまでに報告された事例が多く、将来的に発生する可能性が高い。) Risk: 5 Preparedness: 2 合計: 30

**[考察]** Probability: 1. 不発弾の既知のリスク: 那覇>浦添>糸満の順で不発弾が多く、沖縄には約 2100 トンの不発弾が存在する。

2. 歴史的データ: 死者 710 人, 負傷者 1281 人 (1946 年から 2009 年) 最近では 2009 年 1 月 14 日に死者 1 人, 負傷者 2 人 1989 年に 1 人死亡, 1987 年に 1 人死亡, 1974 年に 4 人の子供死亡というデータがある。

以上より Probability 3 とした。

**Risk:** 死または重篤な症例が報告されていることより生命および健康への脅威は非常に大きい。加えて災害発生時の建築物の損害や交通被害など甚大な被害が予測される。

以上より Risk 5 とした。

**Preparedness:** 1. 現在の計画の現状: 現在, 毎年 20~30 トン (ノ 2100 トン) の不発弾が処分されている。

2. 訓練状況: 危険性はメディアによってよく報告されており, 不発弾を処理するチームが設立されているため沖縄ではある程度の準備は整っている。しかしながら, 医療施設でのトレーニングや準備は施設間で標準化されていないので十分であるとは言えない。

3. 保険: 建物や車は通常の保険の対象である。日本の医療保険は日本のすべての標準的な診療をカバーしている。

以上より Preparedness 2 とした。

100

## 正常胃粘膜の地域差, 胃癌における E-cadherin の発現についての検討

奥村 ひかり (学籍番号: 144207E)

指導教員: ○仲地 里織, 吉見 直己  
琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

背景

項目 1: 沖縄県における胃癌の死亡率は日本本土に比して低い。一方で MUC6 は  $\alpha$ GlcNAc という糖鎖を含んでおり、この糖鎖が H.pylori に対して抗菌的に働くという報告がある。また、胃底腺は幽門腺に比べて固有線が厚く、MUC6 の分泌量も多く、H.pylori が感染しにくいことが予想される。沖縄県の胃粘膜は、胃底腺領域が広いと仮説を立て、県内外での正常剖検胃の前庭部胃粘膜を比較した。

項目 2: E-cadherin は細胞間接着分子として上皮細胞の膜に発現している。悪性腫瘍細胞では浸潤、転移の際にこれらが減弱すると言われている。胃癌症例で E-cadherin の発現を調べ、臨床病理学的特性への影響の有無を検討した。

方法

項目 1: 沖縄県の正常剖検胃 32 例と神奈川県正常剖検胃 9 例を用いて pepsinogen I, MUC5ac, MUC6 の免疫染色を行った。幽門輪から 25mm の位置で染色強度を評価した。

項目 2: 胃切除検体 19 例を用いて、E-cadherin の免疫染色を行った。

結果・考察

項目 1: Pepsinogen I については県内の検体において染色強度がより弱い傾向にあり、前述した仮説とは合致しなかった。腺窩上皮の粘液に特異的な MUC5ac および深部の胃底腺に特異的な MUC6 については、県内外の検体いずれにも様々な染色強度がみられ、地域による差は明らかではなかった。本研究の結果では、宿主側の前庭部胃粘膜の性質のみでは沖縄での胃癌死亡率が低い事は指摘できないと考えられる。今後は、H.pylori の感染や胃癌症例での粘膜の性質等を更に検討する必要があると考える。

項目 2: E-cadherin については、多くの胃癌で陽性で、検討ができた臨床病理学的因子の中で組織型やリンパ節転移の有無への関与は明らかでなかった。1例のみで減弱していたが、これは化学療法による影響と考えられた。

101

### 北部ベトナム農村地区における 下痢病原性原虫 *Giardia duodenalis* の 疫学的研究

坂野 孝裕 (学籍番号: 144208C)

指導教員: ○岩下 華子<sup>1)</sup>, 比嘉 直美<sup>2)</sup>, トーマ・クラウディア<sup>2)</sup>  
仲宗根 昇<sup>2)</sup>, ○山城 哲<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup> 長崎大学熱帯医学研究所<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【背景】 ジアルジア症は *Giardia duodenalis* の嚢子が経口的に感染し下痢を呈する疾患である。同原虫は遺伝的背景により 8 assemblage に分類され、ヒトには主に A, B 型が感染するとされる。

【目的】 北部ベトナム農村地区におけるヒト下痢症において、*G. duodenalis* が検出される割合を決め、assemblage を決定し他地域の *G. duodenalis* との類似性を解析する。

【材料と方法】 長崎大学熱帯医学研究所では、北部ベトナムナムディン省ヒエンカイン村に下痢症疫学研究コホートを展開している。本研究はその一環で集積された下痢検体 458 検体を用いて実施した。MGL 法にて便中の嚢子を濃縮し、*G. duodenalis* 特異蛍光抗体 (ARK Fluor Ab C/G) で染色後、蛍光顕微鏡で蛍光を発する嚢子が存在する検体をスクリーニング陽性とした。さらに PCR 法により *G. duodenalis* に特異的な  $\beta$ -giardine (bg) および glutamate dehydrogenase (gdh) 両遺伝子の増幅を試み、蛍光抗体法および PCR 法の双方で陽性を示した検体を *G. duodenalis* 陽性とした。PCR で bg および gdh 遺伝子が大量に増幅された 2 検体の同遺伝子領域アンプリコンを抽出し、RFLP 法にて assemblage を決定した。同時に塩基配列を決定し、データベース上の同領域情報 10 サンプルと合わせて系統樹解析を行った。

【結果および考察】 全検体中 16 検体より *G. duodenalis* が検出された (3.5%: 16/458)。東南アジアを含む開発途上国での多くの研究では小児の 8-30% から検出されており、本研究ではそれらの研究よりも検出率は小さかった。RFLP の結果、解析した 2 検体とも assemblage B であった。系統樹解析の結果、2 検体はインド・パレスチナなどのものと近縁である事が示唆された。

103

### 活性型ビタミン D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) による HTLV-I Tax 抗原の発現抑制

杉野 亮人 (学籍番号: 144210E)

指導教員: ○田中 勇悦, 田中 礼子, 高橋 良明, 藤猪 英樹  
琉球大学大学院医学研究科免疫学講座

【目的】 成人 T 細胞白血病 (ATL) は、HTLV-I ウイルス感染が引きがねとなって CD4<sup>+</sup>T 細胞が腫瘍化する悪性の白血病であるが、未だに効果的な治療法は開発されていない。近年、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> がカルシウム・骨代謝の調整だけでなく、自然および獲得免疫応答の調節にも関与し、過剰な免疫応答をフィードバックし、炎症や自己免疫疾患の抑制に働くことが明らかにされた。そこで本研究では、不死化した HTLV-I 感染 T 細胞株に対して 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> がどのような効果を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】 HTLV-I 感染 IL-2 依存性 T 細胞株 (ATL 患者、HAM 患者および正常ドナー由来)、正常人の末梢血単核球の培養には 10%FCS 添加 RPMI-1640 培地と組換え IL-2 を使用した。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Sigma) はエタノールで 1mM に調製した。フローサイトメトリーで HTLV-I Tax 抗原や種々の T 細胞活性化マーカーの発現を解析し、ELISA で HTLV-I p24 やヒト INF- $\gamma$  や IL-10 等のサイトカインを定量した。

【結果・考察】 IL-2 依存性 HTLV-I 感染細胞株に 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を添加して 1 ~ 3 日間培養すると細胞の増殖が止まり、Tax 抗原の発現とウイルス産生が濃度依存的に減少した。正常人末梢血単核球を PHA で 3 日間活性化すると、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を添加すると、INF- $\gamma$  と IL-10 の産生が著明に抑制された。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 受容体は T 細胞が活性化することにより誘導されるが、HTLV-I 感染 T 細胞にはその受容体が誘導されており、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が結合することにより HTLV-I 抗原発現と細胞増殖が抑制されたと考えられる。

【結論】 今回の研究により活性型ビタミン D<sub>3</sub> は、持続して増殖する HTLV-I 感染 T 細胞株や活性化正常 T 細胞に対して抑制的に働くことが分かった。

102

### Transcriptional inhibition is a potential therapeutic strategy for multiple myeloma

Mariko Shimada (学籍番号: 144209B)

指導教員: ○ Robert Albero<sup>1)</sup>, Cristina Capdevila<sup>1)</sup>  
Morihiro Higashi<sup>1)</sup>, Pedro Jares<sup>1)</sup>  
Eliás Campo<sup>1)</sup>, and Kenosuke Karube<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain.<sup>2)</sup> Department of Cell Pathology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan.

Multiple myeloma (MM) is an aggressive non-Hodgkin lymphoma with a low survival rate. Although several genetic and chromosomal abnormalities have been reported, the pathogenesis of the disease is still unknown. It has been shown that approximately 30-40% of MM patients overexpress cyclin D1 although it is normally not expressed in B cells nor plasma cells. In addition to its role as a cell cycle protein, cyclin D1 has been recently related to transcriptional regulation related to oncogenesis. In this study, we investigated the effect of the transcriptional inhibitor, 5,6-Dichlorobenzimidazole 1- $\beta$ -D-ribofuranoside (DRB), in MM cell lines with Cyclin D1 overexpression, U266 and KMS-12-PE, and without cyclin D1 expression, KMM1 and JNN3. MM cells were treated with DRB at different concentrations (20  $\mu$ M and 40  $\mu$ M), for 48 hours. DRB-induced apoptosis was determined by flow cytometry (FC) with Annexin V-FITC staining. Furthermore, cell cycle changes were analyzed by FC with PI staining and the expression of cell cycle genes (cyclin D1, CDK4 and pRb) was evaluated by western blot. Among MM cell lines with cyclin D1 overexpression, U266 displayed constant protein levels regardless of DRB treatment, whereas KMS-12-PE showed increased cyclin D1 expression after DRB treatment. In cyclin D1 negative MM cell lines, DRB treatment produced a pRb upregulation and CDK4 downmodulation that was proportional to drug concentration. Moreover, DRB induced apoptosis in both cyclin D1 positive cell lines, while it also induced apoptosis in one of the two cyclin D1 negative cell lines, KMM1. Cell cycle assay is currently in progress. In conclusion, transcription is a druggable process that may be targeted to design new treatments for MM patients, especially in those with cyclin D1 overexpression.

104

### GRIA2 knockout mouse を用いた 海馬幹細胞培養株の作成

加藤 健 (学籍番号: 144211C)

指導教員: 都筑 馨介<sup>1)</sup>, 片桐 千秋<sup>2)</sup>, 西村 正彦<sup>2)</sup>  
土田 幸男<sup>2)</sup>, ○石内 勝吾<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 文教大学健康栄養学部管理栄養学科<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科脳神経外科学講座

AMPA 受容体は中枢神経系においてグルタミン酸をリガンドとするイオンチャンネル型受容体で、GluA1 ~ 4 までの 4 種のサブユニットから構成されるテトラマーである。GluA2 (遺伝子名 GRIA2) には第 2 膜親和性領域にグルタミンからアルギニンへ変換が生じている部位がある。アルギニンへの変換を受けた編集型 GluA2 サブユニットを構成成分に含む AMPA 受容体はほとんどカルシウム透過性を持たないが、構成成分に含まない AMPA 受容体は高いカルシウム透過性を示す。神経膠芽腫は前頭葉と側頭葉の白質内に好発し、高い浸潤性増殖を示す予後不良の悪性腫瘍である。神経膠芽腫にはカルシウム透過性 AMPA 受容体を発現するものが多数存在する。近年これらの腫瘍細胞の増殖や運動能の制御に GluA2 が重要な役割を果たすことが判ってきている。Ca 透過性のグルタミン酸受容体は神経膠芽腫の治療ターゲットになる可能性があるため、神経膠芽腫の発生母地となる脳室周囲細胞の培養細胞を用いた実験系の樹立が必要とされている。今回は生後 4 ~ 5 日の GRIA2 knockout, hetero, wild mouse から海馬を取り出して培養した。knockout mouse の neurosphere は小型 (約 50um) で非常に数が多かったのに対し、hetero, wild の neurosphere は大型 (約 130-150um) の球形を呈し数は少なかった。継代後 knockout mouse の neurosphere は大型化し多数の遊離細胞がみられた。wild の neurosphere の表面は滑らかで、遊離細胞はほとんど見られなかった。hetero の neurosphere は knockout mouse と wild の中間の形態を示していた。これらの細胞塊の形態の相違は Ca 透過性の違いが細胞の形態に加え増殖能や遊離、運動能に関与している可能性を示唆している。

105

市中肺炎診療における喀痰グラム染色の  
有用性の検討

江尻 郁 (学籍番号: 144212 B)

指導教員: ○植田 真一郎

琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

**目的:** 沖縄では県立中部病院を中心に感染症診療で喀痰グラム染色が頻繁に行なわれているが、その有用性、特に患者の予後改善作用については否定的な意見もある。本研究では市中肺炎における喀痰グラム染色の臨床的有用性について文献を系統的に検索し、ナラティブレビューを行った。

**方法:** PubMed 及び Google Scholar を用い sputum, gram stain, community acquired pneumonia (以降 CAP と表記), usefulness という検索ワードで文献を検索した。それらの文献から肺炎球菌性肺炎におけるグラム染色の感度・特異度、抗生物質の使用比較、臨床的アウトカムにおけるナラティブレビューを行った。

**結果:** 感度・特異度の対象は CAP としており、感度は 50 ~ 88%, 特異度は 63 ~ 85% と研究間でばらつきが認められた。臨床的アウトカムについては喀痰のグラム染色を行なって抗生物質を選択した群で経験的治療を行なった群よりもペニシリン使用率が高く、入院期間は短く、初期治療成功率は高く、抗生物質の副作用発現の頻度は低い死亡率は両群間で差を認めなかった。

**考察:** 感度・特異度については研究間のばらつきが多いが、これは喀痰の採取についての巧拙や患者の状態の差、医師・検査技師の習熟度、医療環境や施設間の差などが関与すると考えられる。臨床的アウトカムについては検討した論文はそもそもわずかであり、重要な差は認められていない。今後複数の施設において多くの患者を登録したデータベースを作成し、入院期間、再入院の有無、死亡率、抗生物質の選択、耐性菌の発生など臨床的に重要なアウトカムについての解析が必要である。

