

琉球大学学術リポジトリ

平成29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: 2019-11-29 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	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016907

平成 29 年度

医学科 医科学研究ポスター発表会
抄 録 集

2018 年 4 月 16 日（月）～ 4 月 17 日（火）

琉球大学医学部
医学科 3 年次

001

モルモット聴覚野における FM 音刺激に対する 応答の光学的計測

下地 朗 (学籍番号: 154105G)

指導教員: ○細川 浩, 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

光学計測法の発達により脳神経活動パターンを画像化することが可能になった。しかし、聴覚皮質について光学的な研究を行った例は少ないため、今回はモルモットに純音、FM 音を付加して、聴覚皮質ニューロンの活動を光学的に計測し、その時空間的応答パターンを分析した。モルモットに全身麻酔を施し、手術で大脳皮質を露出させ、電位感受性色素により染色を行った。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 200ms で 0.5, 1, 2, 4, 8, 16kHz の純音を用いた。上行及び下行 FM は刺激時間 400ms で 1kHz-6kHz を用いた。その結果、FM 音の刺激が加わると、上行、下行 FM 音ともに、全体に興奮が発生し、その後二つ目の興奮が現れた。この二つ目の波は最初の興奮にともなう神経活動の抑制が切れた後に音刺激に対して発生した物、または、変化する周波数の波の相互作用によって生じた物であると考えられる。上行 FM 音では下行 FM 音よりも二つ目のピークが早い時間に現れた。また、最初の興奮のピークに対しての二つ目のピークの高さは、上行 FM 音でより大きくなっていった。さらに、最初の活動電位の立ち上がりから消失までの時間は下行 FM が上行 FM より短かった。これにより、下行 FM 音の方がより興奮後の抑制が強いことが示唆された。A1 における 1kHz, 4kHz, 6kHz のバンド上での二つ目のピークの高さを比較すると、上行 FM 音では次第に大きく、下行 FM 音では次第に小さくなっていることが観察された。下行 FM 音は上行 FM 音と比較して追隨する周波数の音に反応しづらいたことがわかった。その理由として、一度活動電位の発生した領域がその周辺の領域の興奮を抑制する作用が下降 FM ではより強いからであると考えられる。下行 FM 音刺激と上行 FM 音刺激への応答の抑制や増強などの差異は他の種においても現れるのか今後検証したい。

003

摘出心房標本におけるプレピスタチンによる 不整脈の誘発とその興奮伝播パターンの 動画化による解析

藤原 大樹 (学籍番号: 154131F)

村上 肇 (学籍番号: 154109K)

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、その発生機構の解明のためには活動電位の伝播パターンを時間的・空間的に把握する必要がある。我々は膜電位感受性色素を用いて cMOS カメラと 16×16 素子フォトダイオードアレイ (PDA) により興奮伝播の可視化を行い、その解析を行った。さらにミオシン II 阻害薬であるプレピスタチンを用いて不整脈を引き起こし、その興奮波の伝播パターンを観察した。

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、右心耳を切り出し、標本を伸展した状態でチェンバーの底にタンガステン製のピンで貼り付けた。膜電位感受性色素 NK2761 を用いて標本を染色し、cMOS カメラ及び PDA を装着した大型顕微鏡のステージに置いた。その後干渉フィルターを用いて波長 700nm または 620nm の光を照射した状態で標本に電気刺激を与え、光学的シグナルを得た。得られたデータを PC で処理し、興奮伝播パターンを動画として視覚的に観察した。

まず標本に波長 700nm の光を照射し、PDA により活動電位シグナルと筋収縮によるアーティファクトを記録した後、波長 620nm の光を照射し、筋収縮によるアーティファクト成分を確認した。これにより活動電位シグナルと筋収縮によるアーティファクトを区別した。さらに cMOS カメラを受光素子として利用することにより活動電位シグナルの伝播パターンの可視化・動画化を行なった。

次に、プレピスタチン 100 μM を投与した後テタヌス刺激を与えたところ、活動電位が高頻度で発現する不整脈が誘発された。その様子を cMOS カメラで記録し、興奮波が旋回している様子を動画で観察した。これはプレピスタチンが細胞内 Ca 動態を乱したことにより、re-entry 性の不整脈が誘発されたものと考えられる。

002

モルモットの聴覚分野が音刺激に対する 応答の光学的計測

高江洲 真 (学籍番号: 154177D)

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

ヒトにおける音刺激の情報は脳皮質聴覚野で処理される。しかし聴覚野の皮質ニューロンにおける抑制の反応に着目した研究成果が少ないので、今回の実験では抑制の反応が上行音の途中でどの程度抑制されるのか調べた。

モルモットを Ketamin (80mg/kg), Xylazine (40mg/kg) で麻酔し大脳皮質聴覚野を露出し、電位感受性色素 RH795 で染色を施す。実験中は Ketamin と Xylazine による麻酔を施す。周波数宝蔵を調べるため純音刺激 (刺激時間 200ms, 立ち上がり下がり時間 5ms, 周波数 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0kHz) を用いた。

上行 FM 音 (刺激時間 400ms, 立ち上がり下がり時間 5ms, 周波数 1.0-4.0, 1.0-6.0, 1.0-16.0kHz), 下降 FM 音 (4.0-1.0, 6.0-1.0, 16.0-1.0kHz) を用いた。

その結果、① 周波数の異なる純音を聴かせた所、聴覚野にバンド構造が見られ、1 次聴覚野では前方から後方に、低周波から高周波のバンド構造が、2 次聴覚野では、後方から前方にかけ、低周波から高周波のバンド構造が見られた。

上行音・下行音を聴かせると周波数に従ってバンド上を移動していくのが観察された。1-4kHz を聴かせたときの 1kHz バンドに対する 4kHz バンドの神経活動の大きさの割合 (0.691912) よりも、1-6, 1-16kHz を聴かせたときの割合の方が大きい。右聴覚野も同様の結果が得られた。

以上の結果より、モルモットの聴覚野には周波数に対応するバンド構造が見られた。また、1 次聴覚野では上行音・下行音ともに神経活動の色がバンド上を移動していくのが見られた。2 次聴覚野では明確なバンドごとの移行はみられなかった。さらに、上行音途中の 4Hz バンド上の反応をみると、1-4Hz の上行音を使用したときの 4Hz バンド上の応答よりも 1-6Hz, 1-16Hz の途中での 4Hz バンド上の活動の方が高かった。理由としては音刺激に対する興奮の神経活動後に起こる抑制の反応が起こることによって活動電位の高さが抑えられるのではないかと結論付けた。

004

光学的計測法における モルモット聴覚領域のパターン分析

都築 海人 (学籍番号: 14411A)

指導教員: ○細川 浩, 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

近年開発された光学的計測法によって大脳皮質の神経活動を画像化することができるようになった。モルモットの聴覚領域は、中心核である一次聴覚領域後側野と周辺野の各領域に分かれることが報告された。しかし、モルモットのコミュニケーション音を構成する FM 音などの応答様式についてはよくわかっていない。そこで、一次聴覚野、二次聴覚野、後部領域における純音と FM 音に対する神経活動様式を調べ、その高次領域の機能を考察した。0.5Hz-16kHz の純音刺激を与えると、皮質は一過性の興奮を生じた後抑制が観察された。光学的計測の結果からそれぞれの音に対する皮質の活動をマップにすると、一次聴覚領域ではバンド状になったが後部領域では観察されなかった。後部領域において 4kHz の純音刺激を与えた場合とそれに近い振動数の FM 音刺激を与えた場合を比較すると、応答までの潜時やピークについては目立った違いは観察されなかった。また純音と FM 音のどちらの刺激を与えた場合においても、一次、二次聴覚野に比べ後部領域は応答潜時、反応のピークも小さかった。これは一次、二次聴覚野は刺激に対しての閾値が低い、後部領域がより上位の聴覚野であると考えられる。また応答潜時はばらつきがあるが、どの領域においてもピークを迎えた後の興奮の低下速度はかわらなかった。後部領域における純音応答と上行 FM 音応答については、純音応答との応答時間の差や反応の大きさについて明確な差は確認できなかった。また波形や神経活動画像の経時的な変化についても差異は見られなかった。ただ下行 FM 音については、純音や上行 FM 音に比べ応答のピークを迎えたあとの抑制が強くなること示された。これまでの研究で FM 音については種特異的なコミュニケーションにかかわっていることが示唆されており、A1, DC などでは反応の違いが見られる例が示されてきた。今回観察された下行 FM 音についてのこの特徴もその一端を担っていることを示唆している。

005

摘出心房標本における興奮伝播イメージングとギャップ結合阻害剤の効果の解析

村上 肇 (学籍番号: 154109K)
藤原 大樹 (学籍番号: 154131F)
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

心房細胞は最も頻度が高い不整脈であり、その発生機構の解明のためには、活動電位の伝播パターンを時間的・空間的に把握する必要がある。我々は膜電位感受性色素を用いて cMOS カメラと 16×16 素子フォトダイオードアレイ (PDA) により興奮伝播の可視化を行い、その解析を行った。さらに、ギャップジャンクション阻害剤としてヘプタノールを用い、ヘプタノールの持つ伝播抑制作用を観察した。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貼り付けサイトカラシ 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 カメラ及び PDA を装着した大型顕微鏡のステージに置いた。得られたデータは PC で処理して表示した。cMOS カメラのデータはアニメーションとして表示し、活動電位伝播の可視化をおこなった。まず、干渉フィルターによって得られた波長 700nm または 620nm の光を下から照射した状態で標本に電気刺激を与え、PDA および cMOS カメラにより光学的シグナルを記録した。波長の切り替えにより、活動電位によるシグナルと筋収縮由来のアーチファクトを見分けることが出来た。さらに cMOS カメラを受光素子として利用することは活動電位シグナルの伝播パターンの観察で有効な手段であることが明らかとなった。次に、ヘプタノールを投与した後、波長 700nm で単発刺激を加えた時の活動電位シグナルを観察した。投与後、時間経過とともにシグナルの大きさ、伝播速度共に小さくなり、20 分で消失した。ヘプタノール除去後、時間経過とともにシグナルは回復した。これらは、ヘプタノールのギャップジャンクション阻害効果によるものであり、この効果は可逆性があると考えられる。

007

摂食行動に関する視床下部の神経核における GABA ニューロンの発生

松田 留佳 (学籍番号: 154123E)
指導教員: ○小林 しおり, 清水 千草, 高山 千利
琉球大学大学院医学研究科分子解剖学講座

成熟動物の中脳神経系において主要な抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) は、摂食行動の中脳である視床下部において摂食行動の調節に重要であることが報告された。これまで本講座では、成熟動物の視床下部全体に GABA 作動性神経終末が分布することを示してきた。しかし、視床下部の GABA ニューロンの発生については不明な点が多い。本研究では、GABA の生合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 遺伝子に Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を挿入した遺伝子改変マウス (GAD67-GFP (+/-) knock-in マウス) の脳冠状切片を作成し、抗 GFP 抗体を用いて GABA ニューロンを染色した。その結果、胎齢 10 日に神経管外側と第三脳室脳底側に認められた GFP 陽性細胞は、胎齢 12 日で第三脳室方向へと移動した。その後 (1) 摂食中枢である外側野 (LH) では、胎齢 13 日で GFP 陽性細胞が LH 全体に広がった。(2) 摂食行動の調節に関与する背内側核 (DMH) に、胎齢 13 日で GFP 陽性細胞を認め、胎齢 14 日では DMH 全体に分布した。(3) 摂食行動の出力を担う室傍核 (PVH) 及び満腹中枢である腹内側核 (VMH) の周囲に、胎齢 14 日で GFP 陽性細胞を認めたが、出生後においても神経核内に GFP 陽性細胞はほとんど認められなかった。(4) 摂食行動制御の中心である弓状核 (Arc) に、胎齢 13 日で GFP 陽性細胞を認め、胎齢 15 日では Arc 全体に GFP 陽性細胞が広がった。これらの結果から、①視床下部の GABA ニューロンは、神経管外側と第三脳室脳底側で発生し脳室側へ移動すること、②摂食中枢である LH で最も早く完成し、Arc, DMH が次に発達すること、③ GABA ニューロンが局在しない VMH, PVH は、他の神経核から GABA 作動性神経の投射を受けることが示唆された。

006

海馬における GABA ニューロンの発生について

山里 優 (学籍番号: 104161E)
指導教員: ○小林 しおり, 清水 千草, 高山 千利
琉球大学大学院医学研究科分子解剖学講座

GABA (γ -amino butyric acid; γ -アミノ酪酸) は主要な抑制性神経伝達物質である。GABA は中枢神経系において広く分布していることが知られているが、GABA ニューロンの発生過程はすべての部位において明らかにされているわけではない。本研究では海馬における GABA ニューロンの発生を追跡した。海馬は記憶の入口で、新しい事柄を記憶するときに経由すると考えられており、GABA ニューロンは記憶の形成に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで胎児期において海馬の GABA ニューロンがいつ頃、どのように形成されるのかを明らかにするため、グルタミン酸から GABA を合成する酵素である GAD (グルタミン酸脱炭酸酵素) 遺伝子に蛍光標識 GFP (Green fluorescent protein) 遺伝子を挿入した遺伝子改変マウス (GAD67-GFP (+/-) knock-in mouse) を用い、抗 GFP 抗体を用いて染色し GABA ニューロンを光学顕微鏡で観察した。その結果、海馬の錐体細胞は胎生 14 日頃には認められるが、まだ GABA ニューロンは見られない。GABA ニューロンは胎生 16 日頃以下以下の 2 つの経路により移動することがわかった。(1) 大脳皮質の最も外側に位置する外套を接線方向に移動し海馬の網状層及び放射層に入る経路、(2) 大脳皮質の深層より海馬の上昇層に移動してくる経路である。(1) 及び (2) のいずれの経路も錐体細胞層を挟むように移動し、胎生 16 日頃には CA1 の領域に認められ、胎生 18 日には CA3 の領域に認められた。加えて胎生 17 日頃には錐体細胞層を横断する放射方向の移動も見られた。以上の結果から錐体細胞の形成後、GABA ニューロンは、錐体細胞を挟むように胎生 16-18 日の限られた期間にダイナミックに移動することが示唆された。

008

脊髄における抑制性伝達物質の除去システムの胎児期の発達

平安山 貴江 (学籍番号: 144141J)
指導教員: ○清水 千草, 小林 しおり, 高山 千利
琉球大学大学院医学研究科分子解剖学講座

脊髄における主要な抑制性神経伝達物質は、グリシン及び γ -アミノ酪酸 (GABA) である。シナプス前終末から放出されたグリシンや GABA は、アストロサイトに局在するグリシントランスポーター 1 (GlyT1) 及び GABA トランスポーター 3 (GAT-3) によって除去される。脊髄において、抑制性神経伝達物質の除去システムがどのように形成されていくのか不明な点が多い。そこで胎児期における GlyT1 及び GAT-3 の発現変化を免疫組織化学法により形態学的に検討した。運動情報の出力を担う脊髄前角において、胎齢 12 日より GlyT1 及び GAT-3 の発現が僅かに認められた。胎齢 14 日には、中心管から軟膜へと伸びる線維状の放射状グリアに GlyT1 及び GAT-3 の発現が認められた。胎齢 18 日には、GlyT1 及び GAT-3 の発現は、放射状グリアからアストロサイトへの分化に従って、形態を変化させ、前角全体に発現が広がっていった。感覚情報が入力する脊髄後角における GlyT1 及び GAT-3 の発現は、前角より遅れて、胎齢 14 日に後角へ広がっていた。胎齢 16 日には、軟膜へと伸びる線維状の放射状グリアに、GlyT1 及び GAT-3 の発現が認められた。胎齢 18 日には、GlyT1 は I・II 層には発現では発現が少なく、一方で、GAT-3 は脊髄後角全体に発現が認められた。これらの結果から、脊髄における抑制性神経伝達物質のグリシン及び GABA の除去システムについて以下のことが示唆された。(1) はじめに、グリシン及び GABA は、前角の放射状グリアによって除去される。(2) その後、グリシン及び GABA の除去システムは後角において形成されるが、I 及び II 層では主に GABA が取り込まれる。(3) 出生時には、脊髄全体において、シナプス周囲を囲むアストロサイトが、グリシン及び GABA を除去する。

009

マウス iPS 細胞の神経分化誘導

岡野 聖都 (学籍番号: 144108G)

指導教員: ○早川 朋子¹⁾, 片桐 千秋²⁾, 高松 岳矢¹⁾, 中村 真理子¹⁾, 松下 正之¹⁾,¹⁾ 琉球大学大学院医科学研究科分子細胞生理学講座²⁾ 琉球大学大学院医科学研究科脳神経外科学講座

【背景と目的】我々は以下の方法①, ②によるマウス iPS 細胞を用いた神経分化誘導培養を行った。

方法①はニューロソフィア (NS) を介した神経分化誘導法である。方法①では神経分化誘導と、プレシナプスとポストシナプスの相互作用の観察が容易であるが、特異的な神経分化が困難である。それに対して、方法②は神経幹細胞への分化誘導を介して行う。方法②の優位な点は、均一な神経分化誘導が可能であること、神経幹細胞は維持培養、凍結保存が可能なことである。しかし方法②は当研究室においてプロトコルは確立されていない。そこで我々は上記の2つの方法によりマウス iPS 細胞を用いた神経分化誘導を行い、特異的な神経分化誘導系確立と神経幹細胞作製を目指した。

【方法】マウス iPS 細胞は iPS-MEF-Ng-492B-4 株を用いた。マウス iPS 細胞の未分化維持培養はフィーダー細胞との共培養により行った。方法①はフィーダー細胞を除去した後、N2B27 培地を用い NS を作成し、神経分化誘導を行った。

方法②はフィーダー細胞を除去した後、未分化維持培地である GMEM 培地 (iPS 細胞培地の基礎培地を GMEM に変えた培地) を用いて継代し、次に N2B27 培地を用いて、神経分化誘導を行った。その後神経分化誘導培地 (それぞれ 20ng/ml の EGF と FGF-2 を含む) を用いて継代し、神経幹細胞を作製した。

【結果】方法①により NS の形成と神経突起伸長が観察された。方法②においてロゼッタフォーメーションと神経突起伸長、さらに神経幹細胞の分化が観察された。ついで神経分化マーカーである Tuj1 特異的抗体を用いて蛍光免疫染色とウエスタンブロット法を行った。その結果、蛍光免疫染色により神経突起を詳細に観察することができた。またウエスタンブロット法によりコントロール群に比し神経突起伸長細胞群で優位な Tuj1 発現上昇が認められた。

【参考文献】

Marco Onorati. Neuropotent self-renewing neural stem (NS) cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. *cells. Molecular and Cellular Neuroscience* 43 (2010) 287-295

011

ミトコンドリアの鉄トランスポーター SFXN2 の機能解析

池田 愛恵 (学籍番号: 154103A)

指導教員: ○魏 范研¹⁾, 松下 正之²⁾, 富澤 一仁¹⁾¹⁾ 熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野,²⁾ 琉球大学大学院医学研究科分子・細胞生理学講座

背景と目的: 鉄はヘモグロビンの酸素運搬やミトコンドリアでの電子伝達などに関わり、生体機能にとって不可欠な元素である。鉄は、細胞表面上の鉄トランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、その一部がさらにミトコンドリアに取り込まれる。細胞表面上の鉄トランスポーターはすでに解明されているものが多いが、ミトコンドリアに局在する鉄トランスポーターは同定されていないものが多く、鉄代謝研究において大きな課題である。分子生理学分野では、ミトコンドリアに局在すると予想されるタンパク質である SFXN2 を発見している。SFXN2 は細菌がもつ鉄トランスポーターとある程度相同性をもつことから、SFXN2 がこれまで未知であったミトコンドリア鉄トランスポーターである可能性がある。本研究は SFXN2 が新規ミトコンドリア鉄トランスポーターであることを実証することを目的とする。

方法:

① ヒト SFXN2 と蛍光タンパク mCherry の融合遺伝子を有するプラスミドベクターを作製した。その後、HeLa 細胞にプラスミドを導入し、蛍光顕微鏡を用いて SFXN2-mCherry の細胞内局在を観察した。

② SFXN2 の各ドメインを PCR で増幅し、mCherry との融合遺伝子を作成した。その後、各プラスミドベクターを HeLa 細胞に導入し、蛍光顕微鏡を用いて SFXN2 に含まれるミトコンドリア移行シグナルがどのドメインにあるかについて検討した。

③ HeLa 細胞に SFXN2 に対する siRNA をトランスフェクションした後、細胞を硝酸で溶かし、細胞内の鉄含量を ICP-MS (誘導結合プラズマ質量分析計) で測定した。

結果と考察: SFXN2 はミトコンドリアに局在しており、シグナルペプチドは N 末端、C 末端には存在しておらず、膜貫通ドメインに位置していた。また、SFXN2 をノックダウンした細胞では鉄含量が減少していた。これらのことから、SFXN2 は新規ミトコンドリア鉄トランスポーターであることが示唆された。

010

Tet On システムによるテスカルシン発現マウス iPS 細胞株の構築

佐久川 佳伶 (学籍番号: 154145F)

指導教員: ○高松 岳矢¹⁾, 早川 朋子¹⁾, 李 俊錫¹⁾, 片桐 千秋²⁾, 松下 正之¹⁾¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科分子・細胞生理学講座²⁾ 琉球大学大学院医学研究科脳神経外科学講座

【背景】テスカルシン (Tesc) はカルシウム結合タンパク質の1つで、細胞の分化や細胞周期に関与していると言われ、特に心臓や脳の発生に関与していると考えられているが、詳細は不明である。一方人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS 細胞) は、細胞の分化の研究に有用であるが、iPS 細胞を用いた Tesc の働きについての検証はまだ行われていない。そこで Tesc の機能解析の材料として、Tet-On システムにより Tesc 遺伝子の発現を制御できるマウス iPS 細胞株の樹立を目的に実験を行った。

【方法】Tet On システムを持つレトロウイルスベクター (pRetroX-TetOn-Puro Vector) にマウス Tesc 遺伝子を挿入し、配列をサンガー法で確認した。パッケージング細胞を用いてレトロウイルスを作成し、マウス iPS 細胞に感染させ、Puromycin Selection の後、細胞を回収した。その後ドキシサイクリン (Dox) を添加することで Tet On システムを働かせ、Tesc を強制的に発現させた。Tesc 発現量はリアルタイム PCR (qRT-PCR) 法により確認した。

【結果】サンガー法により今回作成した Tesc 挿入ベクターの配列は正しいことがわかった。qRT-PCR では、Dox を添加したマウス iPS 細胞は非添加マウス iPS 細胞に比べ、Tesc の発現量が 1.5 ~ 1.7 倍上昇した。

【考察】今回の実験の目的である、Tet-On システムにより Tesc 遺伝子の発現を制御できるマウス iPS 細胞株の樹立は成功した可能性はあるが、qRT-PCR で見られた Tesc 発現量の上昇が予想よりも小さかったことから、完全に成功したとは言い切れない。この原因については、ウイルスに感染しなかった細胞を除くために行った Puromycin Selection が不十分だった可能性が考えられる。今後詳細な検証が必要である。

012

下垂体前葉細胞、副腎髄質細胞及びゼブラフィッシュを用いた Pyk2 の活性化と機能の解析

嘉陽 宗亨 (学籍番号: 154135J)

指導教員: 澳津 志帆, 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

Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) は非受容体型チロシンキナーゼであり、中枢神経系や造血系に発現し、シナプス機能や細胞増殖に関与することが報告されている。これらの Pyk2 の機能には mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの中の extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化が関与することも報告されている。今回、まず培養下垂体前葉細胞 (α T3-1 細胞) を用いて、 $G_{q/11}$ と供役するゴナトトロピン放出ホルモン (GnRH) 受容体刺激による Pyk2 の活性化反応と ERK の活性化反応について検討した。GnRH により Pyk2 と ERK の活性化が認められた。これらの活性化は、Pyk2 阻害薬である PF431396 の添加により強く抑制された。すなわち、GnRH 受容体刺激後の Pyk2 の活性化には自己リン酸化が重要であること、および Pyk2 が ERK の活性化に関与することが示唆された。次に、培養ラット副腎髄質細胞 (PC-12 細胞) の Pyk2 について検討した。PC-12 細胞では Pyk2 は刺激前にも活性化されていた。さらに、 $G_{q/11}$ と供役するブラジキニン (BK) 受容体刺激により弱く活性化された。この活性化も PF431396 により強く抑制された。一方、ERK は刺激前にはほとんど活性化されておらず、BK により強く活性化された。すなわち、Pyk2 と ERK の活性化反応の違いが認められた。最後に、ゼブラフィッシュ *Pyk2* を標的配列とするモルフォリノアンチセンスオリゴを受精卵に微量注入し、*Pyk2* の発現を抑制したノックダウン胚を作製した。作製したノックダウン胚では形態形成に異常が認められた。これらの結果は Pyk2 が種を超えて、様々な組織で様々な機能に関与していることを示唆している。

013

培養視床下部神経細胞における GnRH 受容体刺激後の Pyk2 の 活性化機構の解明

金城 渉 (学籍番号: 144123A)

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

非受容体型チロシンキナーゼである Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) は主に中枢神経系で発現しており、海馬での LTP などのシナプス可塑性に関与することが知られている。Pyk2 は $G_{\alpha 11}$ と共役する受容体刺激によって 402 番目のチロシン残基 (Y402) がリン酸化されて活性化されるが、その活性化機構は不明である。生化学講座では、マウス視床下部の培養神経細胞である GT1-7 細胞を用いて、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 受容体刺激によって ERK (extracellular signal-regulated kinase) が活性化される過程に、Pyk2 が関与することを見出した。今回、Pyk2 の活性化機構について検討した。

まず、Pyk2 の阻害タンパク質として見出された FIP200 が、不活性型 Pyk2 では結合しており、GnRH 受容体刺激により解離することで、Pyk2 が活性化されるという仮説を検討した。免疫沈降実験を行ったところ、GnRH 受容体刺激後も FIP200 と Pyk2 は結合していることが明らかになり、解離ではなく構造変化が起こっている可能性が示唆された。次に Pyk2 の阻害剤である PF431396 (PF) の存在下で GnRH 受容体刺激を行い、活性化の変化をウエスタンブロット法により検討した。その結果、PF により活性化が阻害され、GnRH 受容体刺激後の Pyk2 の活性化には、Y402 の自己リン酸化が必須であることが示唆された。さらに、Pyk2 の機能を個体レベルで調べるため、ゼブラフィッシュの Pyk2 ノックダウン胚を作成した。ノックダウン胚では体軸の曲がりに加え、後脳発達の遅れや心膜の膨らみが見られた。すなわち、Pyk2 が形態形成や器官形成に関与することが示唆された。これらの結果は、Pyk2 の活性化機構と生理機能を解明する手がかりになると期待される。

014

ゼブラフィッシュを用いた rps19 リン酸化酵素による 赤血球造血制御の解析

仲村 匡史 (学籍番号: 154127H)

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は、主に乳幼児期に発症し、特に赤血球造血が障害される先天性疾患である。患者の半数以上でリボソームタンパク質 (RP) 遺伝子に変異があり、その中でも特に RPS19 の変異が約 25% に見いだされている。さらに、RPS19 の 52 番目から 62 番目のアミノ酸配列領域には高頻度に変異があることが報告されている。生化学講座では、*in vitro* での RPS19 のリン酸化反応の解析により 59 番目のセリン残基 (Ser59) がリン酸化されやすいことを見出した。さらに、ゼブラフィッシュ *rps19* の発現を抑制した後のレスキュー実験により、Ser59 の可逆的なリン酸化が造血に重要であることが示唆された。今回、RPS19 のリン酸化酵素の一つである PIM-1 が赤血球造血におよぼす影響について検討した。まず、ゼブラフィッシュ *pim-1* を標的配列とするモルフォリノアンチセンスオリゴを受精卵に微量注入し、*pim-1* 発現抑制胚を作成した。受精後 24 時間までに脳構造や卵黄伸長部に異常が見られ、受精後 48 時間までに赤血球数の減少が認められた。次に、*in vitro* 合成した *pim-1* mRNA によるレスキュー実験を行ったところ、脳構造および赤血球数の回復を確認し、*pim-1* が赤血球造血に関与していることが示唆された。次に、ゲノム編集による *pim-1* ノックアウトモデルの作成を試みた。まず *pim-1* 標的 CRISPR/Cas9 RNP を 1 細胞期胚に微量注入し、受精後 24 時間胚のゲノム DNA を抽出した。さらに *pim-1* ゲノム DNA の標的箇所を含む領域を PCR で増幅しヘテロ二本鎖移動度分析 (HMA) を行った結果、欠失を持つ個体が得られたことが示唆された。今後は CRISPR/Cas9 法を用いて、*pim-1* による *rps19* のリン酸化と赤血球造血への影響について検討する予定である。

015

Development of an *in-vitro* 3D cell culture system for cancer immunotherapy

Haruka Morikawa (学籍番号: 154146D)

指導教員: ○ Olga Elisseeva¹⁾, Tadashi Yamamoto¹⁾,Ken-ichi Kariya²⁾¹⁾ Cell Signal Unit, Okinawa Institute of Science and Technology
Graduate University²⁾ Department of Medical Biochemistry, Graduate School of
Medicine, University of the Ryukyus

Cancer immunotherapy is an emerging new therapy that improves survival and quality of life for many patients. There is a growing need to better understand anti-cancer immune responses to different types of solid tumors and to develop efficient assays to assess them. Cell culture in 3D had been shown to mimic *in-vivo* conditions of the tumor much better than conventional 2D cell culture, however studies on anti-cancer immunity in 3D are still limited. Aim of my research was to establish an *in-vitro* 3D cell culture system for cancer immunity that will allow monitoring immune responses to human breast cancer (MCF7) and glioblastoma (U87) cell lines.

We tested different techniques of cancer cells and lymphocytes in 3D culture, including several methods in Matrigel® (an extracellular matrix based natural hydrogel) and on Ultra Low Attachment Plate. The most successful was Matrigel® overlay technique in which single cells were seeded on solidified layer of Matrigel with replaceable 1-2% gel on the top of the cancer cells. Cancer cells formed 3D tumorspheres and were successfully killed by lymphocytes in this system.

Our data showed, in our system, cancer cells downregulated HLA class I and expressed high levels of FasL which are attributes of aggressive malignant cancers. We are analyzing the details of immune responses that had been elicited in this study. Our results set a framework for further studies of human immunity in cancer.

016

ストレス条件下での群居行動が検討可能な マウスモデルの確立

井上 巴月 (学籍番号: 154161H)

指導教員: ○福光 甘齋¹⁾, 黒田 公美¹⁾, 菊谷 研一²⁾¹⁾ 理化学研究所脳科学総合研究センター,²⁾ 琉球大学大学院医学研究科医化学講座

社会性動物は、捕食者の脅威など不安を惹起する刺激が与えられた際に、体を寄せ合い接触する。これは群居行動とよばれ、身を守る手段として動物が群れを成す本能とも関係する (Defensive Huddle)。

しかし、群居行動を引き起こす際に、具体的に不安刺激がどのような神経回路を伝わるかは明らかでない。また、従来の研究では、主にラットが使用されてきたが、マウスではより多彩な解析技術が駆使できる。そこで本研究では、群居行動に関わる神経回路を明らかにするためのマウスモデルの確立を試みた。

マウスには多くの系統があり、それぞれ不安に対する感受性や活動量変化などの応答性が異なる。今回は、二つの系統の雌マウスを用い、明暗条件下で新奇ケージテストを行って群居行動を比較した。その結果、A 系統では、光刺激により群居行動が促進されることが明らかになったが、B 系統では有意な差がみられなかった。また、A 系統では光刺激下でストレス応答の指標となる脱糞量の増加がみられた。さらに、マウスなどの齧歯類は外界の情報獲得を主に嗅覚に頼っていることから、A 系統で嗅球切除の影響も検討した。実験数が不足しているが、切除により群居や脱糞が減少する傾向を認めており、嗅球が不安応答行動の神経回路に関与するか否かの解明が待たれる。

以上より、マウス A 系統はストレス条件下で惹起される群居行動とその神経回路の解析に有用な優れたモデルであることが明らかとなった。

017

肝細胞癌細胞株における SIRT7 発現の意義、特に脂肪酸取り込み遺伝子発現と細胞増殖に及ぼす影響について

伊波 博登 (学籍番号: 154119G)

指導教員: ○山本 浩平¹⁾, 北川 昌伸¹⁾, 加留部 謙之輔²⁾¹⁾ 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,²⁾ 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

背景

先行研究において、肝細胞癌は30%の症例でSIRT7タンパクが過剰発現し、予後不良因子候補であることが分かっている。マウスの肝臓では、SIRT7は転写因子TR4を安定化し、その下流因子であるCD36を正に制御することで細胞外の脂質の取り込みを促進する。本研究では、肝細胞癌においてSIRT7の発現がTR4およびCD36を制御し、さらには細胞外の脂質の取り込みに影響を及ぼしているかどうかについて、実験を行った。

方法

ヒト肝癌由来であるHepG2細胞を用いて、SIRT7ノックアウト(KO)株と対照群としてHPRT KO株を作成し、この2つの細胞株についてウエスタンブロット法(WB)やreal-time PCRによりSIRT7、SIRT7の下流因子であるTR4及びCD36の発現を調べ、さらに、それぞれの細胞増殖能の差を細胞数カウントにより計測した。また、HPRT-KO株とSIRT7-KO株の細胞外脂質の取り込みを、C16-BODIPY標識脂質を用いてその取り込み能の差を波長計測器にて比較した。

結果

SIRT7-KO株において、TR4のタンパクレベルでの発現低下及びCD36のmRNAの発現低下が確認された。細胞増殖比較実験では、HPRT-KO株がSIRT7-KO株に比べて増殖能が高い結果を得た。脂質取り込み実験では、今回の実験系では正しく計測することが困難であった。

考察

SIRT7-KO株では、CD36のmRNAの発現低下が確認されたため、タンパクレベルでの発現量も低下していると推測された。脂質取り込み実験については、コントロールの細胞での波長計測に実験間で誤差があり、他の方法を用いるなど、実験系の確立が望まれる。今回、肝細胞癌組織におけるSIRT7の悪性形質への関与のメカニズムに関する仮説の一部を裏付ける結果が得たが、今後、更なる分子学的な検討が必要と考えられる。

019

成人T細胞白血病におけるSTAT3活性化とIFN- α による細胞増殖抑制効果との相関

嘉陽 広菜 (学籍番号: 154107C)

指導教員: ○加留部 謙之輔¹⁾, 森近 一穂²⁾¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座,²⁾ 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

背景

成人T細胞白血病(Adult T-cell leukemia, ATL)はHuman T-cell leukemia virus type Iを原因とする予後不良なT細胞腫瘍であり、急性型、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型の4つに分類される。ATLにおいてIFN- α が有効との報告があるが、リンパ腫型だけは有効率が低い。またリンパ腫型はそれ以外の病型に比べてリン酸化STAT3(pSTAT3)タンパクの発現率が有意に低いことがこれまでの実験により明らかになった。これらの結果からIFN- α の効果とpSTAT3の関連性が強く疑われたため、ATL細胞株を用いたIFN- α 投与実験を通してATLにおけるpSTAT3発現の意義を考察した。

方法

ATL細胞株7株におけるpSTAT3発現強度をウエスタンブロット法(WB法)で確認した。また、これらの細胞株にIFN- α を投与し、非投与株との細胞増殖の違い及び投与前後におけるpSTAT3発現の変化をWB法で確認した。

結果

3株ではpSTAT3発現が高く、残り4株では発現が低かった。pSTAT3高発現株は低発現株に比べIFN- α 1万単位/mL投与で有意に細胞増殖が抑制された($P < 0.01$)。IFN- α 投与のpSTAT3発現自体に対する影響に関しては、pSTAT3高発現株および低発現株いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

考察

pSTAT3高発現株ではIFN- α 投与による細胞増殖の抑制効果を認めたが、投与によってpSTAT3が直接影響を受けるわけではなかった。IFN- α の作用点は多彩であり、pSTAT3経路によって影響を受ける別の分子経路が増殖抑制効果に関わっていると考えられる。一方、pSTAT3低発現株ではpSTAT3非依存性の病態を有すると考えられる。以上から、pSTAT3発現強度がIFN- α 治療を選択する指標の1つとなる可能性が考えられる。

018

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の細胞株に対するSOCS1遺伝子導入の試み

伊波 菜緒子 (学籍番号: 154191K)

指導教員: ○加留部 謙之輔¹⁾, 森近 一穂²⁾¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座,²⁾ 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

目的

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)は、本邦においてもっとも高頻度に発生する悪性リンパ腫である。SOCS1はDLBCLの約20%の症例で遺伝子変異が認められるがん抑制遺伝子であるが、この変異が細胞に与える影響については十分に解明されていない。そこで今回はDLBCLの細胞株のうちSUDHL-8に注目し、人工的にSOCS1を細胞株に導入する方法を検証した。

方法

大腸菌を用いてSOCS1および蛍光分子のGFPを含むプラスミドの作製を行った。遺伝子導入については、電気的に細胞膜に穴を開けて遺伝子を挿入するエレクトロポレーション法に決定し、電圧、溶媒などの条件を複数検討した。それらの条件のもとSOCS1を含むプラスミドの最適な挿入量を検討した。

結果

エレクトロポレーション法であるNucleofection法とNeon法によりSUDHL-8にプラスミドを導入し、フローサイトメトリーでGFP発現細胞の割合を定量したところ、最大約15%の効率で遺伝子導入に成功した。遺伝子導入による細胞の性質の変化を検出するため、ウエスタンブロットを行なった。細胞骨格であるチューブリンが検出されたことから細胞のタンパク化に成功したことが確認できた。

考察

遺伝子導入による実験が可能かは、細胞株の性質に依存する。SUDHL-8は過去の実験例が少なく、様々な条件を試す必要があったが、最終的に遺伝子を導入する最適な方法と条件を決定できた。今後はSOCS1遺伝子が細胞内で蛋白を合成しうるか、そしてその影響の有無などを検討したい。

020

シンガポール国立大学留学から考えた琉球大学における教育・基礎・臨床の連携への提言

石渡 奈菜 (学籍番号: 154118J)

指導教員: ○三田 貴臣^{1,2)}, 加留部 謙之輔³⁾¹⁾ Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore,²⁾ Department of Medicine, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore³⁾ 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

シンガポールはアジア、そして世界の医学研究を牽引する国のひとつである。今回、3ヶ月の基礎研究配属でシンガポール国立大学(National University of Singapore, NUS)のがん科学研究所(Cancer Science Institute of Singapore)に留学した。研究や医学部の授業、現地での生活などを通して考えた、シンガポールという国の地理的・文化的・政治的特徴、またイギリスのTimes higher education社によるアジア大学ランキングで1位に評価されたNUSの特徴を紹介する。所属した研究室では「スーパーエンハンサーの技術を用いた成人T細胞白血病(ATL)のがん遺伝子の特定と機能分析」に取り組んだが、この経験を通してシンガポールにおける研究がなぜ近年飛躍的に発展したかを述べたいと思う。沖縄県は地理的・文化的にもシンガポールと類似する点も多い。また、琉球大学はその地域における唯一の国立大学である点でNUSと共通している。NUSにおけるシステム、環境を参考に、琉球大学における教育・基礎研究・臨床の連携の今後のあり方について提言したい。

021

皮膚症状を有する成人 T 細胞白血病患者の臨床・病理・肉眼所見の相関について

村上 嘉哉 (学籍番号: 154104J)

指導教員: ○加留部 謙之輔¹⁾, 森近 一穂²⁾, 宮城 拓也³⁾¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座²⁾ 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³⁾ 琉球大学大学院医学研究科皮膚病態制御学講座

(背景) 成人 T 細胞白血病 (ATL) は, HTLV-1 ウイルス感染が原因で起きる CD4 陽性リンパ球の腫瘍で, 半数以上で皮膚に病変がある。皮膚病変の肉眼像, 組織像についてはいくつかの報告があるものの, お互いの相関や臨床所見に与える影響は十分に解明されていない。

(方法) 琉球大学病院と南部医療センターにて皮膚に病変を伴う ATL 患者 81 名 (94 検体) の初診時の臨床病型を 5 つ, 病理組織学的な浸潤タイプを 3 つ, 肉眼所見を 6 つに分類・集計し, 各項目の相関を Fisher の正確検定などを用いて調べた。

(結果) 臨床病型については初診時で smoldering 型 5 例, chronic 型 9 例, acute 型 14 例, lymphoma 型 10 例, cutaneous 型 43 例あった。病理組織学的な腫瘍細胞の浸潤タイプは nodular 型 51 検体, perivascular 型 31 検体, diffuse 型 12 検体であった。また, 94 検体中表皮浸潤を 58 検体に認めた。肉眼所見では patch 型 7 例, plaque 型 19 例, nodulotumoral 型 24 例, erythrodermic 型 4 例, multipapular 型 15 例, purpuric 型 1 例であり, その中で経過中に肉眼所見に変化があったものが 3 例あった。

これら各所見の相関を解析したところ, lymphoma 型と smoldering 型の臨床病型を示す症例では表皮浸潤が有意に多かった ($p=0.0206$)。また組織像で diffuse 型を示す症例は, 肉眼的には nodulotumoral 型が有意に多い ($p=0.0016$) という相関も見られた。

(考察) 今回の解析の結果, ATL 皮膚病変の病理学的所見の多様性が明らかになり, 臨床所見と強い相関が認められるものも存在した。今後は, 時間経過による病状の変化に伴う病理肉眼像の変化を調べ, より詳細な病態メカニズムの解明につなげたいと思う。

022

HTLV-1 感染者における Dermatopathic lymphadenopathy 症例の臨床病理学的解析

知念 重希 (学籍番号: 154133B)

指導教員: ○加留部 謙之輔¹⁾, 森近 一穂²⁾¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座,²⁾ 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

(背景) Dermatopathic lymphadenopathy (DL) は全身性の慢性皮膚病変に伴い, リンパ節腫脹をきたす反応性病変と定義されているが, 成人 T 細胞白血病 (ATL) などの皮膚 T 細胞性腫瘍を合併する場合は, 良悪の鑑別はしばしば困難である。今回 HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type-1) 感染者が DL になった場合の臨床経過について調査した。

(方法) 琉球大学付属病院, 南部医療センターにおける HTLV-1 陽性患者のリンパ節標本を見直し, DL と判断した 14 例を抽出した。これらのリンパ節検体を用いて, 免疫染色とフローサイトメトリーを併用し T 細胞マーカーである CD3, CD5, CD7, CD25, CD30 の評価を行った。さらに DNA の抽出を行い T 細胞のクローナリティ解析を行った。これらと, 臨床データを照らし合わせて比較した。

(結果) リンパ節において T 細胞マーカーの発現状態に異常を認めるものは 2 例のみであった。CD25 陽性の大型リンパ球は全ての症例で増加していた一方, CD30 陽性細胞の数は症例によりばらつきがあった。解析が可能であった 12 例中 2 例において, クローナリティが証明された。同時に存在する皮膚病変において病理組織学的に腫瘍を証明しえたのは 8 例であった。予後としては, 14 例中 3 例が ATL の進行によって死亡しており, このうちクローナリティが証明されたものが 1 例, Soluble-Interleukin-2-Receptor (sIL-2R) が 5000 を超えるものが 1 例, 表面マーカー解析で異常を示していたものが 2 例であった。その他 11 例は aggressive な ATL に進行した証拠は無かった。

(考察) HTLV-1 感染者の DL 症例においては, 表面マーカー, sIL-2R をはじめ, 各所見を総合的に評価することで ATL の進行の予測できる可能性が示された。

023

インフルエンザのサーベイランスについて

吉富 勇太 (学籍番号: 144135D)

指導教員: ○砂川 富正¹⁾, 山城 哲²⁾¹⁾ 国立感染症研究所疫学センター第二室²⁾ 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

(背景と目的) インフルエンザウイルスは変異しやすく, 流行しやすい。よって, 各地域の行政機関や自治体などに対して, 常に情報を提供また還元できるようにすること, 日頃から比較できる情報を把握しておくこと, という 2 点の重要性より, インフルエンザのサーベイランスを行う意義があると考えた。2017/18 シーズンは 1999 年 4 月からの感染症法施行以降の記録上では最高値である定点あたり報告数 (54.33) を記録するなど, 特徴的なインフルエンザシーズンとなったことから, 今シーズンのサーベイランスに着目した。

(方法) 季節性インフルエンザの代表的なサーベイランスとしては, 定点当たり報告数推移 (感染症発生動向調査) などがある。各定点からの患者情報は, NESID (感染症発生動向調査) をベースとして, 定点医療機関から県や保健所設置市の保健所に報告され, 最終的には厚生労働省・国立感染症研究所のレベルに集まるという流れである。

(結果) インフルエンザウイルスの検出状況の割合では, 2017 年第 36 週から 2018 年第 6 週までの累積のウイルス型の割合では A 型が多かった。2018 年第 6 週の直近の 5 週間でのウイルス検出割合では B 型が多かった。

(考察) 今シーズンの流行開始は第 47 週また, 定点あたり報告数のピークの時期は, 例年と同じぐらいであった。流行したウイルス型は A (H1N1) 型と B 型であり, B 型は, ピーク前から増加し続けた。患者の年齢群別は, 昨シーズンの流行と比較して大きな差はなかった。以上のことより, 例年の A 型 [今シーズン前半は A (H1N1)] の流行に加えて, B 型が例年とは異なる増加を早期より見せたことが, 大流行の原因であると考えた。

024

CIAP1, CIAP2, XIAP の機能について

後藤 健太 (学籍番号: 154132D)

指導教員: ○鈴木 志穂¹⁾, 鈴木 敏彦¹⁾, 山城 哲²⁾¹⁾ 東京医科歯科大学細菌感染制御学講座²⁾ 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

(背景) *Salmonella Typhimurium* は下痢を主徴とする細菌性の感染症を引き起こす。

CIAP1, CIAP2 という遺伝子はインフラマソームの活性抑制を介して, 宿主の自然免疫と異物応答に関わる。また, XIAP はアポトーシス抑制活性を行うタンパク質である。

(目的) 今回の実験ではネズミのワイルドタイプのマクロファージと CIAP1 をノックアウト (KO) したマクロファージ, CIAP2, CIAP1 と 2, XIAP をそれぞれノックアウトしたマクロファージに *S. Typhimurium* を感染させ, 菌の増殖を見ることで, その感染とそれぞれの遺伝子の関係性を調べた。

(方法) 今回の実験ではネズミの今回の実験ではネズミ由来のワイルドタイプ, CIAP1KO, CIAP2KO, CIAP1 と 2KO, XIAPKO のマクロファージと *S. Typhimurium* を使用した。

今回の実験では CRISPR/CAS9 SYSTEM によって遺伝子のノックアウトを行った。

そして感染実験はそれぞれのマクロファージにバクテリアを滴下し, 5 分間 400G で遠心をかけ, それぞれ 1 時間後, 2 時間後, 3 時間後に上清を取り除きトライトン X を滴下し 1000 倍希釈し, それぞれ 2 μ l と 5 μ l ずつ 1 日培養しコロニーカウントを行った。

(結果と考察) コロニーカウントの結果はワイルドタイプでのバクテリアの増殖数に比べて, CIAP1, 2 をノックアウトした細胞ではバクテリアの増殖数は少なかった。

またワイルドタイプの細胞と XIAP をノックアウトした細胞では細菌の増殖数に違いは見られなかった。

この結果から CIAP1, 2 をノックアウトしたマクロファージでは免疫応答に関わるインフラマソームの活性が抑制されなかったため, バクテリアの増殖抑制が起こらず *S. Typhimurium* の増殖数が少なかったと考えられる。

025

淋菌の *penA* 遺伝子の形質転換による 薬剤耐性の獲得

山城 享平 (学籍番号: 154181B)

指導教員: ○志牟田 健¹⁾, 大西 真¹⁾, 山城 哲²⁾¹⁾ 国立感染症研究所 細菌第一部²⁾ 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【背景・目的】 淋菌は1990年ごろから徐々に抗菌薬治療に抵抗性を示し、現在用いられている抗菌薬のセフトリアキソン (CRO) についても2011年に耐性株が世界に先駆けて分離された。本研究では淋菌のCRO耐性獲得について *penA* との関連を確認した。

【方法】 CRO感受性株 (Recipient: HI001) に10種類のCRO耐性非病原性 *Neisseria* 属株 (Donor: SI68-3, SI77-2, SI48, NLA_1, SH43-3, SI60-1, SH43-1, AM1601, SI94-3, NSU_1) の *pen* 遺伝子をPCRにより増幅し加え、形質転換させ、CRO 0.064mg/L含有GCプレートに生えたコロニー (Transformant) のみを分離し、寒天平板希釈法にてCROの最小発育阻止濃度 (MIC) 値の測定を行った。形質転換前と比べ、MIC値の上昇した株の導入した *penA* の存在を確認した。

【結果】 得られた Transformant の MIC 値は10株中8株 (SI68-3, SI77-2, SI48, NLA_1, SH43-3, SI60-1, SH43-1, AM1601) において上昇した。2株については Transformant を得ることができなかった。MICの上昇した8株についてシーケンス決定することのできた2株 (SH43-1, AM1601) を用いた Transformant を donor 間, Recipient 間でシーケンス比較を行ったところ HI001 SH43-1 transformant は約550bpsからの3'末端 HI001 AM1601 transformant は約600bpsからの3'末端に donor の *penA* 遺伝子が形質転換により組換わっていた。つまり、淋菌のCRO耐性獲得は、非病原性 *Neisseria* 属 *penA* 遺伝子の形質転換によりもたらされるものであることが示された。

【考察】 CRO MIC高値の非病原性 *Neisseria* 属菌の出現機構については不明であるが、淋菌感染症のみならず他の細菌感染症に対する抗菌薬治療が副次的に非病原性 *Neisseria* 属菌の薬剤抵抗性を形成している可能性がある。非病原性 *Neisseria* 属菌のCRO以外の薬剤の感受性をモニタリングしていくことが重要である。

026

レプトスピラ症迅速診断キットの開発

上原 知也 (学籍番号: 154115D)

指導教員: ○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】 病原性レプトスピラによるレプトスピラ症の臨床症状は発熱を伴い他の感染症と似ているため臨床診断が難しい。重症化すると黄疸、腎不全等が見られることもあり、それを防ぐためには早期診断・治療が重要であるが、現在簡易迅速診断キットがないため、その開発が必要である。本研究では、感染7日目から実験動物の尿中に検出された特異的抗原である脂質代謝酵素 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-HADH) を標的抗原とした簡易迅速診断キットの開発に取り組んだ。

【方法】 組換え His タグ 3-HADH は、大腸菌タンパク質発現系を利用して産生、TALON (Cobalt) カラムを使用して精製した。3-HADHの有無はウエスタンブロット (WB) 法及びイムノクロマト (IC) 法にて次の検体を用いて確認した: 1) 11種類の血清型の病原性レプトスピラの菌体、2) 臨床症状からレプトスピラ症と疑われた患者の尿検体、3) 健常者の尿検体。また、IC試験紙の感度、保存安定性を評価した。

【結果と考察】 WB法にて11種類全ての血清型で菌体から3-HADHが検出できたことから、3-HADHが標的抗原として有用であるということが示唆された。一方で、健常者の尿からは検出されず、感染疑い患者の尿からは30検体中6検体で検出できた。検出出来なかった感染疑い患者の尿は抗原の量が少ない、あるいは尿中に抗原が排出されていない等の原因が考えられた。IC試験紙の検出感度を経時的に調べた結果、感度が低下すること、固相化抗体に対して抗原が過剰である時に起きるプロゾン現象が確認できた。IC法にて患者尿の3-HADHを調べたところ、陽性は1検体のみであったため、尿中に抗原抗体反応を阻害する因子がないか調べたが、尿の有無による感度の違いは認められなかった。今後の課題として抗体の反応性の向上が求められる。

027

赤痢菌が分泌する effector タンパク OspD3 の解明

上野 理佐子 (学籍番号: 154172C)

指導教員: ○芦田 浩¹⁾, 鈴木 志徳¹⁾, 鈴木 敏彦¹⁾, 山城 哲²⁾¹⁾ 東京医科歯科大学細菌感染制御学講座²⁾ 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【背景と目的】 世界では発展途上国を中心に年間100万人以上が赤痢により死亡している。この細菌性赤痢の起原菌となっているのが赤痢菌であり、未だ赤痢の安全なワクチンの開発は行われていない。

赤痢菌はヒトとサルのみに感染することがわかっており、ヒトではその腸内に感染し病原性を発揮する。赤痢菌の腸内感染機構として、赤痢菌はⅢ型分泌装置という菌体外へタンパク質を分泌させるための分泌装置を持ち、感染過程でこのⅢ型分泌装置を用いて毒性のある effector タンパクを宿主細胞に送り込み、これにより定着を促進するとともに宿主の免疫応答を抑制している。effector タンパクは未だ機能が不明のものが3分の2ほども存在し、この effector タンパクの機能解析を行うことが赤痢菌の感染機構の解明に役立つと考えられる。

今回の研究では、赤痢菌の放出する effector タンパクの一種である OspD3 に注目し実験と研究を行った。

【方法】 まず研究で用いるための TRIF 遺伝子のクローニングを行った。PCRにより増幅した TRIF 遺伝子を制限酵素により切断し、同じ制限酵素により切断したプラスミドにつなぎ合わせるライゲーションという作業を行った。これにより、プラスミドに TRIF 遺伝子をライゲーションしたものを大腸菌に形質転換させることができた。

次に、大腸菌から empty ベクター, OspD3, OspD3-CS (OspD3 のプロテアーゼ活性を失くさせた変異酵素), TRIF に関してプラスミドを取り出した。この取り出したプラスミドに対して transfection を行い、SDS-PAGE 電気泳動, transfer, blocking という作業を行い、抗体を当て、発色・発光を行うことで観察できるバンドを調べた。バンドが観察できたか否かで、TRIF 遺伝子が OspD3 によって分解されたか否かを調べる事ができる。

【結果と考察】 結果として、OspD3 と TRIF 遺伝子を transfection したレーンのみバンドが検出されなかった。また、TRIF 遺伝子の、分解されると思われる箇所に変異を起こした場合、OspD3 と transfection したレーンでバンドは検出された。

以上のことより、OspD3 は TRIF 遺伝子を分解することが証明され、TRIF 遺伝子の RHIM ドメインにあたる箇所が分解されるということまで特定することができた。

028

PCR 法によるマラリア原虫 DNA の検出

真喜志 依里佳 (学籍番号: 154166J)

指導教員: ○安田 (駒木) 加奈子¹⁾, 狩野 繁之¹⁾, 山城 哲²⁾¹⁾ 国立国際医療研究センター研究所 マラリア・熱帯医学研究部,²⁾ 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【背景と目的】 寄生虫感染症であるマラリアは、現在も世界で毎年二億人の感染者を出し、その死亡者数は40万人にも及ぶ。ヒトに感染するマラリア原虫の種は多数あり、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*, Pf) は急速に高寄生率の原虫血症と重症マラリアを引き起こし、患者を死に至らせる可能性がある。マラリア原虫種を臨床現場で迅速に特定し治療に当たることは、患者の生命に非常に重要なことである。

本研究では、実際に国立国際医療研究センター (NCGM) で実際に運用されている nested PCR 法を用いて、患者検体からの Pf DNA 検出を行った。

【方法】 1st PCR ではマラリア原虫種の SSU rRNA 遺伝子配列の共通部分に設計したユニバーサルプライマーを使って PCR による遺伝子増幅を行った。2nd PCR では、Pf に特異的なプライマーを設計し、1st PCR 産物を用いて特異的な遺伝子増幅を行った。

【結果と考察】 1st PCR において、二名の患者血液より抽出した DNA サンプルのうち、Sample1 からポジティブコントロールと同じ泳動度のバンドが検出された。Sample2 にもバンドが認められたものの、泳動度がポジコンとはズレており、ヒト DNA 由来の非特異的増幅産物だと考えた。2nd PCR では、Sample1 からポジコンと同じ泳動度のバンドが検出され、Sample2 はバンドが出現しなかった。この実験から、Sample1 は Pf の DNA が陽性、Sample2 は陰性であることがわかったが、患者が他種マラリアに感染している可能性は探れなかった。

今後、使用した Pf に特異的なプライマーを他の原虫種特異的のプライマーに変えて実験を行えば、異なる種のマラリア原虫 DNA を検出が可能である。また今回、ハイチ共和国マラリア流行地で採取したる紙血のうち、Maxwell[®]RSC 自動核酸抽出機と FFPekit を用いて 420sample の DNA 抽出を行った。これらを用いて nested PCR 法を行えば、ハイチでの原虫種分布疫学的調査を行うことができる。

029

病原性レプトスピラの尿細管上皮細胞への付着機構の解明

瀬底 翼 (学籍番号: 154179A)

指導教員: ○トーマ・クラウドリア, 山城 哲
琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

目的

病原性レプトスピラとはレプトスピラ科の細菌である。げっ歯類を中心とした多くの哺乳動物の腎臓に定着し、尿中へと排出される。ヒトがこの尿に直接的に接触あるいは尿に汚染された水や土壌と接触することにより感染する。沖縄県では散発、集発事例が他の地域に比べて多く報告されている。これまでの研究により、感染マウスの腎臓の近位尿細管にレプトスピラ(高病原性)が局在していたため今回は低病原性(Avirulent)レプトスピラと高病原性(Virulent)レプトスピラの尿細管上皮細胞(近位尿細管, HK-2細胞)への付着の比較を行った。

方法

蛍光免疫染色, 定量PCR, EMJH培地でレプトスピラの培養の三種類の的方法を用いた。実験の流れとしてはレプトスピラをEMJH培地(30℃)で対数期まで培養し, 暗視野顕微鏡で培養の純度, 運動性などを確認した。一方, 尿細管上皮細胞であるHK-2細胞は, マイクロプレートの各ウェルで 10^6 になるように一晩5%CO₂, 37℃で培養した。その後培養したレプトスピラに, 熱処理(56℃10分), UV照射(30分), 冷凍解凍処理(-80℃ON)の各処理を行い, HK-2細胞に接種し, 30分・1時間・3時間後に細胞への付着効率を評価した。具体的には各々の時間でカバーガラスを取り出し定量PCR用のカバーガラスでは古い培地を吸い, ガラスに付着していない菌を洗い流しDNAを抽出し定量PCRを行った。また蛍光免疫染色用のカバーガラスではガラスに付着していない菌を洗い流し2%PFA液で固定し蛍光免疫染色を行った。

結果・考察

AvirulentとVirulentの間で細胞に対する付着の差はないことが分かった。また死菌では細胞には付着しないこと, 菌の運動性や, タンパクが細胞への付着に関与している事が示唆された。

030

熱帯熱マラリア原虫のK13遺伝子のシーケンス解析

島袋 清乃 (学籍番号: e154121)

指導教員: ○中津 雅美¹⁾, 狩野 繁之¹⁾, 山城 哲²⁾
1) 国立国際医療研究センター・研究所 熱帯医学・マラリア研究部
2) 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

[背景] アルテミシニン耐性マラリア原虫の拡散制御には, 現在どこまで耐性原虫が分布しているのかのマッピングと, その耐性獲得の原因遺伝子の解析が必要となってくる。今日では, 熱帯熱マラリア原虫の13番染色体上にあるkelch-propeller遺伝子(K13)の塩基配列の変異が, アルテミシニン耐性の主要な決定要因であるということが明らかになっている。本研究では, 熱帯熱マラリア原虫培養株からDNAを抽出し, 分子生物学的な手法により, 原因遺伝子K13のシーケンス解析を行った。また, 1996から1998年に採取したタイ・ミャンマー国境地域の解析を見学し, 培養株との遺伝的な差異を比較検討した。

[対象] 培養熱帯熱マラリア原虫(FCR-3株)・タイ, ミャンマーの国境地域の患者血液より抽出した原虫サンプルのDNA

[方法] (1) DNA extraction (2) PCR (K13 primary PCR, K13 nested PCR) (3) PCR productの電気泳動 (4) PCR productの精製 (5) サイクルシーケンス反応 (6) 反応物の精製 (7) キャピラリー電気泳動 (8) シークエンス解析

[結果] FCR-3株でもタイ・ミャンマーの患者のサンプルでもK13領域の変異は見つからなかった。[考察] 今回の実験に使用したサンプルは, シークエンスの結果により熱帯熱マラリア原虫3D7株のK13領域と比較しても変異がみられず野生株と判定した。このサンプルはK13変異によるアルテミシニン耐性原虫の出現が報告されるより以前に採取された血液であるため妥当性は取れたと考えられる。また, 以前の国立国際医療研究センター研究所のシーケンス結果である野生株という判定の再現性が示唆された。また, FCR-3株はアルテミシニン感受性原虫の培養株であるので, シークエンス結果と100%の相同性が認められた。

031

Legionella pneumophila 血清群1の Sequence-based typing (SBT) 法による 型別と病原性遺伝子 *lvh*, *rtxA* についての関係性

内間 耕 (学籍番号: 154183J)

指導教員: ○前川 純子¹⁾, 大西 真¹⁾, 山城 哲²⁾

1) 国立感染症研究所細菌第一部

2) 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

[背景・目的] グラム陰性桿菌である *Legionella pneumophila* は, レジオネラ症(レジオネラ肺炎, ポンティアック熱)の主な起原因菌である。自然界では土壌や淡水中に生息し, アメーバなどに寄生することで増殖している。衛生管理が不適切な浴槽, 冷却塔などで増殖することもあり, そこから発生するエアロゾルの吸いが感染のリスクとなる。

Sequence-based typing (SBT) 法によって分類された *L.pneumophila* 血清群1型の遺伝子型は minimum spanning tree (MST) 法による類縁関係図を用いると生息場所によってグループが形成される。今回の実験は2つの病原性遺伝子 *lvh* と *rtxA* にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて型別し, SBTによる型別との関係性を明らかにするために行った。

[材料・方法] *L.pneumophila* 血清群1環境由来株46株, 臨床由来株19株をBCYE α 培地で培養し, DNAサンプル抽出した。*lvh* 遺伝子は4領域をターゲットとしたプライマー, *rtxA* 遺伝子は2領域をターゲットとしたプライマーを用い, ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。6つの領域のPCR産物を電気泳動によって有無を確認し, 増幅箇所のパターンに基づいて型別した。MST法によって得られたSBT法の遺伝子型同士の類縁関係を解析した樹形図に本実験で得られた菌株の型別を色分けすることで比較した。

[結論] SBT法による型別をMST法の図にすると, 主に冷却塔由来のGroup-C1, C2, 浴槽水由来のGroup-B1, B2, B3や土壌由来のGroup-S1, S2, S3の計8グループが形成された。Group-C1, C2, B3の菌株は *lvh*, *rtxA* が両方とも陽性のため, 他より人に対するリスクが高いグループである可能性が考えられた。

同グループ内だけでなく同一のST番号でも実験による *lvh* や *rtxA* による型別にばらつきが見られたため, 実験で用いたこの2つの病原性遺伝子による型別とSBT法による型別に強い相関性があるとはいえない。この結果から臨床分離株と感染源と思わしき環境から分離した株をSBT法の7つの遺伝子座と今回ターゲットとした6つの領域を組み合わせることでその2つの株が同一であるかをより高精度に判断できることが分かった。

032

安謝川より分離されたコレラ菌の毒素産生能の検討および現在の安謝川の病原性コレラ菌の分布に関する研究

白髭 浩之 (学籍番号: 154140E)

指導教員: 比嘉 直美, ○山城 哲

琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

[背景・目的] 1980年に安謝川から *Vibrio cholerae* O1 (O1コレラ菌) が分離されたが, 当時の検討ではコレラ毒素(CT)非産生株と結論付けられた。我々の解析でそのうち2株がCT関連遺伝子を有すること, 全ゲノム解析による系統樹を作成すると, バングラデシュでコレラ患者より分離された株と同じクラスターに入ることがわかった。安謝川分離株(AJ1, AJ3)のCT産生能について, 後に開発されたCT至適誘導培養法(AKI-SW法)を用いて検討する。また, 現在の安謝川における病原性O1コレラ菌の分布を調査する。

[方法] AKI-SW法でAJ1, AJ3のCT産生を試みた。逆受身ラテックス凝集反応(VET-RPLA)法とWestern blotting(WB)法にてCT検出を試みた。CTの転写過程を検証するため, 毒素遺伝子mRNAの検出をRT-PCR法で試みた。陽性コントロールとしてN16961, A14260, 陰性コントロールとしてA59を用いた。安謝川下流域より汚泥, 藻, 河川水合計60試料を採取し, 得られたコレラ菌様コロニーを対象とし, PCR法で主要病原遺伝子 *ctxA-B*, *tcpA* の検出を試みた。

[結果と考察] AKI-SW法による培養でAJ3は培養上清中にCT抗原がVET-RPLA法とWB法で検出され, CTの分泌が確認された。この結果は1980年の安謝川にCT産生O1コレラ菌が棲息していたことを意味する。一方, AJ1はWB法で培養上清中及び菌体中にもCT抗原が検出されなかった。しかし, CTのmRNAが検出されたことより, CT遺伝子転写後の翻訳機構に障害がある可能性が推定された。また, 今回安謝川より分離したコレラ菌様1006コロニーからは主要病原遺伝子を有するO1コレラ菌は分離されなかった。浚渫, 護岸工事等環境整備が奏功した可能性が示唆された。

033 北部ベトナム農村地域における下痢原性腸管寄生原虫 *Cryptosporidium* spp. の検出と疫学的背景について

櫻井 優輝 (学籍番号: 154155C)
指導教員: ○岩下 華子, 山城 哲
琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

[背景・目的]

腸管寄生原虫 *Cryptosporidium* spp. は人で非血性水様下痢を引き起こし、免疫不全者では致死性である。20世紀後半以降、日本を含む世界中で水系汚染による集団感染例が報告され、現在でも水系感染症・下痢症の原因として重要である。そこで本研究では、下痢症が社会問題となっているベトナムにおいて、*Cryptosporidium* spp. の分子系統樹解析を行うと共にその疫学的背景を調べることを目的とした。

[方法]

ベトナム北部ナムディン省の農村での臨床疫学研究で得られた下痢便 2120 検体・正常便 470 検体を濃縮し、蛍光抗体染色による顕微鏡観察を行った。シストが観察され陽性となった検体について凍結融解によりオーシスト壁を破壊し DNA 抽出後、2 種類のプライマーセットを用いて PCR 法を試みた。陽性となった検体についてはシーケンス解析を行い塩基配列決定後、BLAST 検索を行い、近隣結合法 (NJ) 法にて系統樹を作成した。さらに先の調査で得られた結果等を利用して *Cryptosporidium* spp. が得られた検体の疫学的背景を比較した。

[結果・考察]

全検体の内、顕微鏡観察で陽性となったものは下痢便で 79 検体 (3.7%, 79/2120)、正常便で 11 検体 (2.3%, 11/470) であった。このうち PCR 法で陽性となったのは、下痢便で 8 検体 (10.1%, 8/79)、正常便では 2 検体 (18.1%, 2/11) であった。これらについてシーケンス解析した結果、下痢便において 4 検体はヒトを宿主とする *Cryptosporidium hominis* と近縁であり、残りの 4 検体及び正常便 2 検体はイヌを宿主とする *Cryptosporidium canis* と近縁であることが確認された。これらの疫学的背景を調べると *C. canis* は正常便からも検出され、得られた位置も広範囲である一方で *C. hominis* は下痢便からのみ確認され、その得られた位置も近くまた同時期で下痢の原因として関与している可能性が示唆された。

035 心筋梗塞発症モデル (2/3 腎摘トリプル NO 合成酵素欠損マウス) の生存率および冠危険因子に対する酢酸長期投与の作用

宮城 左京 (学籍番号: 154197J)
指導教員: 平良 雄司, ○坂梨 まゆ子, 松崎 俊博, 筒井 正人
琉球大学大学院医学研究科薬理学講座

腸内細菌叢は、体の様々な機能や病気に影響している。善玉菌は短鎖脂肪酸 (SCFA) を産生し、悪玉菌の増殖抑制や、感染の予防、発がんの抑制に寄与する。最近、腸内で産生された SCFA が、脂肪の蓄積抑制や糖代謝の促進に関与することが報告された。また、小腸に存在するアルカリホスファターゼ (ALP) についても、脂質の摂取によりその活性が上昇し、腸管で腸内細菌叢を多様化させ脂質吸収を抑制することが報告されている。これらの背景を踏まえ本研究では、SCFA の一つである酢酸が、心筋梗塞発症モデル (2/3 腎摘トリプル NO 合成酵素欠損マウス) における生存率および冠危険因子を改善させるか否かを検討した。

一酸化窒素合成酵素完全欠損 (n/i/eNOS KO) マウスの腎臓の 2/3 を摘出し、心筋梗塞発症モデルを作製した。腎摘から 1 週間後に、水または酢酸 (0.02%: 低用量 or 0.2%: 高用量) の飲水投与を開始した。酢酸投与量は、飲水量の測定結果から算出した。生存率と体重を経時的に測定し、投与開始後 4 週間目に血圧測定と尾静脈採血を行い、血漿総コレステロール、中性脂肪および ALP 活性を測定した。

マウスの 1 日あたりの酢酸摂取量は、0.02% 酢酸投与群が 50mg/kg、0.2% 酢酸投与群が 500mg/kg であった。酢酸投与は、実験期間中の生存率および体重と投与 4 週間後の血中脂質レベルに有意な変化をおよぼさなかった。ところが高用量の酢酸投与は、収縮期血圧の有意な上昇と、空腹時血糖の増加を引き起こした。一方、酢酸投与により血中 ALP 活性が有意に上昇したが、上昇の程度は、酢酸の投与量に依存しなかった。

本研究で用いた酢酸の投与量では、心筋梗塞モデルマウスの冠危険因子の改善を認めず、むしろ高用量投与により悪化傾向を認めた。本研究の結果より、より低用量の酢酸投与による検討が必要であることが示唆された。

034 2/3 腎摘 一酸化窒素合成酵素完全欠損マウスの突然死におけるテストステロンの有害な作用

久保 史弥 (学籍番号: 154165A)
指導教員: ○坂梨 まゆ子, 平良 雄司, 松崎 俊博, 筒井 正人
琉球大学大学院医学研究科薬理学講座

急性心筋梗塞 (AMI) をはじめとする虚血性心疾患の発症には性差があり、男性で早期かつ高率に発症する。薬理学講座は、一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) を完全欠損した triple NOS knockout (n/i/eNOS KO) マウスに 2/3 腎臓摘出術 (NX) を施すと、AMI による突然死を引き起こすことを報告した (JMCC 2014)。この突然死は、精巣摘出により抑制されることから (未公表)、この機序への男性ホルモンの関与が予測された。そこで本研究では、この点をさらに解明するため、精巣摘出した 2/3NX n/i/eNOS KO マウスにおけるテストステロン投与の影響を検討した。

2/3 腎臓摘出した n/i/eNOS KO マウスに精巣摘出術 (ORX) を施し、一部マウスには徐放性テストステロンチューブを皮下埋込 (ORX+TEST) した。術後 4 週間の生存率と体重、血圧変化を測定し、4 週間目に空腹時血糖と血漿中の総コレステロールおよび中性脂肪を測定後、摘出胸部大動脈の血管反応性の検討を行った。

ORX 群に比して ORX+TEST 群では、生存率が低い傾向を示し、収縮期血圧の有意な上昇と空腹時血糖の増加傾向を認めた。体重と血漿脂質は、両群間で有意な差を認めなかった。血管反応性試験では、両群の標本ともに、フェニレプリンの累積投与により濃度依存性の収縮反応を認め、収縮レベルは ORX 群に比して ORX+TEST 群で有意に増大していた。

以上の結果から 2/3NX n/i/eNOS KO マウスの突然死には、テストステロンの有害作用が関与することが示唆された。高齢男性の冠動脈疾患患者では、テストステロン補充療法による心血管死の増加が報告されている (JAMA 2013)。高齢男性では NO 産生が低下していることから、本研究の結果はこの機序を一部説明しうると考えられた。

036 マウス中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルの作製とその問題点の検討

城間 恵介 (学籍番号: 154136G)
指導教員: 下地み ゆき, 久保田 陽秋, 野口 克彦, ○筒井 正人
琉球大学大学院医学研究科薬理学講座

[目的] 脳梗塞は、我が国における主要な死因の一つである。平成 27 年度の統計では、日本人の死因の第 4 位が脳血管疾患であり、その約半数を脳梗塞が占めている。マウス中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルは、脳梗塞の病態モデルとして実験に広く使用されている。しかし、気管内挿管、人工呼吸器装着、microsurgery などの高度な手技を必要とし、その作製は容易ではない。本研究では、人工呼吸器を使用しない自発呼吸下での MCAO モデルの作製を試み、その問題点を検討した。

[方法] 8 週齢オス野生型 C57BL/6J マウスを実験に使用した。イソフルランによる全身麻酔下でマウスの頸部を切開し総頸動脈を露出させ、実顕微鏡下で総頸動脈を半切開して塞栓糸 (径 0.19mm) を挿入し中大脳動脈を閉塞した。ドップラー血流計で中大脳動脈領域の脳血流量をモニターしながら、血流低下の確認により閉塞を確認した。閉塞 1 時間後に塞栓糸を抜き半切開部位を結紮・止血した後、1 時間の再灌流を行った。MCAO を行ったマウスは 24 時間後に脳を取り出し、TTC 染色により脳梗塞サイズを計測した。

[結果・考察] 医科学研究期間中に 27 匹のマウスに MCAO 手術を行った。最初の 7 匹ほどは手術に慣れず失敗を繰り返したが、徐々に上達し、医科学研究終了時には 1 人で MCAO モデルを作製できるようになった。今回、人工呼吸器を使用しない自発呼吸下で MCAO モデルの作製を試みたが、以下の 3 つの問題点が見出された。

(問題点)

問題①: 術中にマウスが死亡する

問題②: 中大脳動脈に加えて前大脳動脈まで閉塞させてしまう

問題③: 塞栓糸抜去による血流増加 (再灌流) が見られない (対策と結果)

問題①の術中死については、なるべく少ない麻酔量を使用し、手術時間を短縮することにより回避できた。問題②の前大脳動脈まで閉塞させてしまう点については、慎重な塞栓糸の操作により防ぐことが出来た。問題③の再灌流が見られない点については、原因として考えた再灌流中血圧低下に対して麻酔・呼吸管理、テイルカフ法による血圧測定などを行った。

[結論] 問題①・②に関しては手術手技の上達により改善されたが、問題③に関しては血圧測定結果から再灌流中血圧低下は見られなかったため、今後の検討課題である。

037

亜鉛投与により導入遺伝子発現が誘導される トランスジェニックマウスの 亜鉛投与中止時期の検討

仲村 昭吾 (学籍番号: 154201A)

指導教員: ○松崎 俊博, 坂梨 まゆ子, 筒井 正人
琉球大学大学院医学研究科薬理学講座

[背景と目的]

ガス状シグナル伝達分子である H₂S の合成酵素として, cystathionine β-synthase (CBS) が知られている. この CBS に関する研究を行うために, mouse CBS (mCBS) ノックアウトマウスが開発されているが, mCBS 完全ノックアウトマウスは, 胎生致死や成長障害が見られることが報告されている. これらの改善法として, 亜鉛投与の有無により human CBS (hCBS) 遺伝子発現を制御できるマウスが開発された. 亜鉛投与により誘導発現された hCBS は mCBS の欠失を機能的に補完する.

今回用いた mCBS ノックアウト (mCBS-KO) マウスでは, 組み込んだ hCBS が消失せずに残る可能性が示唆されており, hCBS の発現抑制に適した亜鉛投与中止時期について検討する必要がある. 亜鉛投与の中止時期は, 早すぎると成長障害を起こし, 遅すぎても実験使用時に hCBS が残る可能性がある.

そこで, 今回はその適した時期を調べることを目的として実験した.

[方法]

動物は, mCBS-KO マウスに亜鉛誘導型遺伝子と hCBS を組み込んだマウスを使用した. 亜鉛投与を中止する時期として, 出生後 4 週の子離乳の時期から亜鉛投与を中止し (i) 4 週経過 (ii) 6 週経過 (iii) 9 週経過したマウス, および (iv) 親の mating 時から亜鉛投与を中止し, 生後 13 週経過したマウスの合計 4 群で検討した.

hCBS の発現確認法としては, 4 群のマウスの肝臓をホモジエートし, 上清を用いてウエスタンブロッティング法により確認した.

[結果と結論]

hCBS の発現抑制は, (i) 5 検体中 3 検体 (60%), (ii) 4 検体中 3 検体 (75%), (iii) 5 検体中 3 検体 (60%), (iv) 6 検体中 5 検体 (83%) で見られた.

以上より, 4 群中で最も発現が抑制されたものは (iv) であった. 今回の実験より (iv) が亜鉛投与を中止する時期として最も適していると考えられる. (iv) は亜鉛投与を中止するのが一番早い群なので, 4 群中でも成長障害が出やすいことが考えられる. 今後は, mating 時から亜鉛投与中止群の出生率や成長変化を検討する必要がある.

038

胎盤で特異的に発現する ヒト内在性レトロウイルスの タンパク翻訳能の検証

伊波 絵里奈 (学籍番号: 154186C)

指導教員: ○小田 高也
琉球大学大学院医学研究科ゲノム医科学講座

遙か昔人類の祖先に感染しそのゲノムに取り込まれたレトロウイルス由来の反復配列 (ヒト内在性レトロウイルス: Human Endogenous RetroVirus) の一つである HERV-HML6-c14 は, 胎盤で特異的に発現している. 今回, その転写物が翻訳能を保持しているかを検証するため, この転写物上に予測された Open Reading Frame (ORF) のうち, 100 アミノ酸以上の 3 箇所 (164aa, 113aa, 109aa) を解析した.

本研究では, PCR で増幅した各 ORF 領域の 3' 端に FLAG tag 配列を付加したコンストラクトを作製し, HeLa 細胞にトランスフェクションした後, 抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットでタンパクの発現の有無を確認した. ポジティブコントロールとして C 末に FLAG tag を挿入した GFP (Green Fluorescent Protein) と hRluc (synthetic Renilla luciferase) を用いた.

その結果, GFP と hRluc では予想サイズのシグナルが検出されたが, 解析対象全てで予想サイズを含めたいずれのシグナルも検出されなかった.

このことから今回解析した 3 つの ORF は全てタンパク翻訳能を保持している可能性は低いと考えた. しかし, *in situ hybridization* の結果より非スプライス型の完全長 RNA は核内に局在する事が示唆されていることから, 今回作製したコンストラクト由来の転写物の細胞内挙動は検証する必要がある. さらに, その結果によっては非細胞系の *in vitro* transcription/translation 解析も必要になりうる. また, 今回解析対象としなかった 100 アミノ酸未満の Short ORF のタンパク翻訳能についても別途解析すべきであるとする.

039

双生児法を用いた三次元顔面形態の遺伝率推定

金城 優奈 (学籍番号: 154147B)

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: 顔面形態は, 親子や一卵性双生児を見ると明らかなように遺伝する形質である. 本研究では, 一卵性双生児および二卵性双生児を対象に三次元画像を用いて顔面における特徴点間の距離や角度を計測し, その遺伝率を求めることを目的とした.

方法: 一卵性双生児 43 組 (男性 5 組, 女性 38 組), 二卵性双生児 27 組 (男性 2 組, 女性 25 組) を研究対象とした. 顔面の三次元画像データは三次元デジタルスキャナを用いて取得した. 画像解析ソフトウェア Geomagic Qualify 11 を用いて顔面における特徴点を手動で点打ちし, その座標を求めた. 座標値から特徴点間の距離と角度を 28 項目算出した. 一卵性双生児間および二卵性双生児間それぞれにおいて相関係数を求め, フェルコナーの式を用いて遺伝率を算出した.

結果と考察: 28 項目の遺伝率の平均値は 0.579 であった. 遺伝率が 0.4 以下の項目が 6 個, 0.4 ~ 0.6 の項目が 8 個, 0.6 ~ 0.8 の項目が 12 個, 0.8 ~ 1.0 の項目が 2 個あった. 遺伝率が低かった項目には鼻底点と下顎頭点の距離や内眼角点と外眼角点の距離などがあつた. 鼻底点と下顎頭点間の距離に関しては, 頬には脂肪がつきやすいために環境要因の影響を受けやすいと考えられる. 一方で, 内眼角点と外眼角点の距離に関しては, 目を閉じた画像において眼角点の点打ちに計測誤差が大きいことが原因と考えられた. 二卵性双生児における相関係数が一卵性双生児における相関係数の 1/2 を大きく下回った項目として鼻底点間や内眼角点間の距離などがあげられるが, この理由は, 遺伝要因の効果相加的ではなく, 実際は優性効果や遺伝子座間の相互作用があるためだと考えられた. 本研究では特徴点間の距離と角度について解析を行ったが, 複雑な顔面形態を表現するには十分ではない. 今後, 幾何学的形態測定などの手法を用いてさらなる解析を行う必要がある.

040

試料保存方法と DNA 抽出キットの比較検討

松尾 友記 (学籍番号: 154138C)

指導教員: ○木村 亮介, 石田 肇
琉球大学大学院研究科人体解剖学講座

目的: DNA 試料から細菌叢の解析をする際, 現在我々が用いているプロトコルでは試料採取後直ちに冷凍で保存する必要があるが, 施設に依存しない試料採取を可能にするために, 細菌叢を変化させずに試料を常温保存する方法を検討した.

方法: バッファーを浸した綿棒で顔全体をこすり試料を採取した. 試料保存方法は① Enzymatic lysis Buffer (ELBuffer) で -80℃ 保存, ② DNA/RNA Shield (Shield) で常温保存, ③ Isohelix BuccalFix Buffer (IBBuffer) で常温保存の 3 つ. DNA 抽出方法は① Invitrogen PureLink Genomic DNA mini kit (Invitrogen), ② ZymoBIOMICS DNA Mini Kit (Zymo), ③ Isohelix BuccalFix Plus DNA Isolation Kit (Isohelix) の 3 つを組み合わせて実験を行い, 細菌叢を比較した. DNA 試料を用いてメタ 16S rRNA 解析を行い, 属レベルで細菌の割合を判定した. DNA sequencing は MiSeq を使用した.

結果と考察: どの試料保存方法においても, 1 時間後と 2 週間後を比較した際, 観察された細菌叢の割合に差は見られなかった. このことから, 従来の ELBuffer で -80℃ で保存する方法だけでなく, Shield や IBBuffer を用いた常温での試料の保存は可能である. また, IBBuffer × Isohelix (保存方法 × DNA 抽出法) や Shield × Invitrogen においては, ELBuffer (-80℃) × Invitrogen と比べて大きな違いはなく, 個体間の細菌叢の差と比べても微々たるものであった. しかし, 従来の DNA 抽出方法である Invitrogen と比較して, Zymo を用いた DNA 抽出では細菌叢の多様性が減少していた. このことから, Zymo を用いた DNA 抽出では, ①抽出しやすい細菌の種類が異なる可能性, あるいは②少量の細菌種を取りこぼす可能性があると考えられた. 本実験から, 試料を常温保存するには IBBuffer × Isohelix と Shield × Invitrogen の組み合わせが適していることが分かった.

041

ホヤ卵における精子誘引開始時期の特定と pH の役割

平良 克哉 (学籍番号: 154208H)
 指導教員: ○泉水 奏, 石田 肇
 琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

ヒトを含め様々な生物で受精時に卵が精子を誘引する現象が知られている。その中でも、ホヤは精子誘引物質が同定されるなど、卵への精子誘引機構が最も解明されている系の1つである。しかし、卵が卵巣から海水中に出されるどの時点で精子誘引能を獲得するかは明らかとなっていない。そこで、卵が貯蔵されている輸卵管内の卵の精子誘引能を調べた。

ホヤ *Phallusia philippinensis* を用い、暗視野顕微鏡により卵周囲の精子の行動を録画しその誘引能を評価した。輸卵管から海水中に取り出された卵では0.5-1時間の間、精子は誘引されず、その後、徐々に誘引が始まり2~3時間後では、ほとんどの卵に精子は誘引された。このことから、輸卵管内に貯蔵されている卵は精子誘引能を持たず、海水中に放出されることにより誘引能を獲得すると思われる。

また輸卵管内の pH は 5.7 と著しく低く、pH の高い海水中 (pH8.2) に放出され、pH が上昇することが精子誘引の引き金となっている可能性が考えられる。そこで、輸卵管内と同じ pH5.7 の人工海水中と通常の pH8.2 の人工海水中卵をインキュベートされた場合の精子誘引能を比較した。輸卵管内と同じ pH5.7 に置かれていた卵の場合、通常の海水中に置いた直後、精子は誘引されなかった。このことから輸卵管内の低い pH 下で卵の精子誘引は抑えられており海水中に出され pH が上昇することにより誘引が開始すると考えられる。

また pH5.7 の海水中に置かれていた卵は、輸卵管から取り出された場合よりも急速に精子誘引能を獲得することから、輸卵管中には低い pH 以外にも精子誘引能を抑えている要因が存在すると思われる。

042

半自動的な幾何学的形態測定による頭蓋形態の解析：沖縄と本土日本の地域差

本坊 美喜子 (学籍番号: 154120A)
 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】先行研究において、沖縄と本土日本との間に、頭蓋骨形態や顔の表面形状について地域差があることが知られている。そこで、本研究では、PET-CT 画像を用いて半自動的な幾何学的形態測定を行うことで、出身地域と頭蓋顔面の形態との関連について、より詳細な研究を行った。

【試料と方法】琉球大学医学部附属病院で撮影された 780 人の PET-CT 画像を用い、半自動的な幾何学的形態測定法を用いて解析を行った。まず、ランダムに選んだ 50 人の PET-CT 画像を用いて重ね合わせとトランスフォームの繰り返しにより、鮮明な頭部平均形状を作成し、その平均形状に 3093 点のランドマークを設定した。そして、平均形状を各サンプル画像へトランスフォームし、そのトランスフォーム関数を基に、ランドマークを転写した。これによって、各サンプル画像にランドマークを発生させた。さらに、屈曲エネルギー最小化法によって、ランドマーク配置の歪み補正を行った。プロクラステス解析により、重心サイズに基づいたサイズ補正および位置合わせを行い、位置合わせ後のランドマークの xyz 座標を用いて主成分分析を行うことによって、形状を表す成分を得た。上位 23 成分が形状の分散の 90% を説明したため、重心サイズと形状成分の 24 項目について、性別、年齢、身長、出身地域を説明変数として重回帰分析を行った。

【結果と考察】重回帰分析において、性別、年齢、身長を共変数として補正しながら、出身地域と有意に関連する形状成分が 5 つ観察された。沖縄出身者は、本土日本出身者と比べ、1) 頬骨の大きさが小さい、2) 眼窩幅が大きい、3) 眼窩高が小さいなどの特徴があることが分かった。本研究では、医用画像を用いて半自動的な幾何学的形態測定を行うことで、大規模かつ詳細な形状の解析を実現し、これまで骨形態研究者が感覚的に抱いていた地域差を視覚的に表すことに成功した。

043

履物の違いによる足の皮膚細菌叢への影響

當眞 直人 (学籍番号: 154207K)
 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・背景: ヒトの、消化器、皮膚、膣などの体内生息環境に常在する微生物は、個人間や部位間で、異なることがわかっている。特に皮膚において乾燥している部位や湿っている部位などでも異なることが知られている。足は普段靴を履いている時、蒸れやすい環境にある。今回、靴とサンダルを履いて過ごした時の細菌叢の違いを検証した。

材料と方法: 健康ボランティア 5 人 (男性 3 人, 女性 2 人) を 2 つのグループに分け、5 日間の実験を 2 回行った。1 日目に 70% エタノール消毒をした後、靴またはサンダルを履き 2 日間過ごした。3 日目にサンプリングをして再び消毒をした後、靴またはサンダルを履き、2 日間過ごした。5 日目にサンプリングを行なった。被験者には、日常的な生活をしてもらい、履き物以外の制限は設けなかった。足指の間 (第一趾, 第二趾)、かかとの 2 部位を Buffer を浸した綿棒でスワブし細菌叢サンプルを得た。DNA 抽出は PureLink Genomic DNA Mini Kit を用いた。16srRNA を PCR で増幅し、アンプリコンライブラリを作成した。Sequencing には Miseq を用いた。細菌は属レベルで判定し、割合を算出した。

結果・考察: 足指、かかとの細菌叢の割合を見ると *Staphylococcus* が大多数を占めていた。靴とサンダルで細菌叢の多様度に有意な差はないことがわかった。検体ごとのリード数は細菌の総数の大まかな指標となるが、靴とサンダル間で有意な差はなかった。同一個体から得たサンプル間よりも異個体のサンプル間での違いが大きいこと、処理間 (靴 or サンダル) の違いは異個体間の違いよりも有意に小さいことがわかった。個々の細菌に注目すると、サンダルの時に有意に GpI (シアノバクテリア) が多くなっていた。以上より、靴を履いて過ごした時とサンダルを履いて過ごした時では、皮膚常在菌の割合に影響を及ぼしはしないが、サンダルだと土壌の細菌が付着した可能性があることがわかった。

044

沖縄県における高齢者施設を対象とした救急車利用に関する調査

平松 直樹 (学籍番号: 154215A)
 指導教員: ○花城 和彦, 喜瀬 真雄, 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

背景 本邦における救急出動件数は年々増加傾向にあり、高齢急病者の増加が一因である。人口の高齢化は今後も進み救急搬送の需要も増えていくことが予想される。一方、人口の高齢化、核家族化の進行に伴い高齢者施設利用が増加している。今後の救急車利用増加への対策として、医療機関・高齢者施設・消防の三者間における有効な救急搬送体制の構築が必要と思われる。しかしながら、同種施設における救急車利用や緊急時の対応状況等に関する詳細な調査はみられない。

目的 沖縄県における高齢者施設の救急車利用状況を明らかにすることで、施設職員の基礎的な医療知識や行政サービスに関する知識向上への啓蒙に役立てることを目的とする。さらには、救急車適正利用の促進や救急医療崩壊の防止策の提言へと繋がることを期待される。

対象と手法 琉球大学の「人を対象とする医学系研究倫理審査委員会」の承認を得て実施された。沖縄県公式ホームページに公表されている在沖高齢者施設 (713 件) 情報を基に質問票調査を郵送法で行った。調査期間は平成 30 年 2 月 28 日から同 3 月 19 日までとし、返送された質問票の回答内容を統計解析した。

結果 305 件の回答 (回収率 42.8%) が得られた。その内訳は、有料老人ホーム 169 件、グループホーム 51 件、高齢者向け住宅 31 件、ケアハウス 3 件、特別養護老人ホーム 26 件、介護老人保健施設 15 件、介護療養型医療施設 6 件、養護老人ホーム 3 件であった。過去一年以内に救急要請された全件数 (1,488 件) のうち入院となった件数は 1,183 件 (79.5%) であった。

考察 対象高齢者施設のうち、過去一年以内に救急車の利用経験のある施設が 93.1% と非常に高い割合を占め、入院率も 79.5% と高値を示したことから、高齢者施設では救急車への依存度が高いことが明らかとなった。さらに医療スタッフの常駐は救急搬送の低減には必ずしも繋がらないことが分かった。

045 Pattern Recognition Receptor リガンドによる ヒト樹状細胞の分化成熟

伊東 泰輝 (学籍番号: 154106E)

指導教員: 田中 礼子, 高橋 良明, 水口 真理子, 〇田中 勇悦
琉球大学大学院医学研究科免疫学講座

【目的】 外来異物に対する免疫応答において, 自然免疫系細胞群による Pathogen associated molecular pattern (PAMP) の認識は重要である. PAMP を認識する受容体は PRR と呼ばれる. 獲得免疫応答にはプロフェッショナル抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) が関与する. 末梢組織において未熟状態の DC が高い抗原提示能を発揮するためには PRR 刺激を介する活性化/成熟が必要である. 本研究では種々の PAMP 構造をもつリガンド分子についてヒト DC の分化成熟誘導能を比較検討することを目的とした.

【方法】 正常ヒト末梢血単核球 (PBMC) からマグネット法で単球を分離し, 自家血漿と IL-4 および GM-CSF を添加した無血清培地で 5 日間培養し未熟 DC (iDC) に分化させた. iDC に PRR リガンド (Sigma 社) を添加し 2 日間培養後, DC の成熟度を IL-12 と MIP-1 α の産生, CD83 の発現, アロ CD8+T 細胞からの IFN- γ 産生, HLA-A24 拘束性 peptide 感作による抗原特異的 CD8+T 細胞の誘導能で調べた.

【結果と考察】 本研究で調べた 10 種類の PRR リガンドの中で著明な DC 成熟作用を示したのは, TLR3, TLR7/8, および TLR2/NOD2 リガンドの 3 種類であった. TLR2/NOD2 リガンドで成熟させた DC を HLA-A24 拘束性サイトメガロウイルス (CMV) 抗原ペプチドで感作し同じドナーの CD8+T 細胞と混合培養することにより, ペプチド非感作に比べて有意な IFN- γ 産生が観察された.

【結論】 ヒト未熟 DC の成熟には PRR は TLR3, TLR7/8, または TLR2/NOD2 が関与することが示唆された. これらを刺激するリガンドは, 細胞性免疫誘導アジュバントとして効果が期待される.

047 ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 抗原 および FoxP3 抗原の発現に影響を与える 因子の検討

赤嶺 希 (学籍番号: 154101D)

指導教員: 田中 礼子, 高橋 良明, 水口 真理子, 〇田中 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 1 型 (HTLV-1) は, ATL や HAM の原因ウイルスである. HTLV-1 がコードするがん抗原である Tax 蛋白は細胞の増殖に重要な役割を果たす. 一部の ATL 患者では制御性 T リンパ球 (Treg) への HTLV-1 感染が見られる. 本研究は, HTLV-1 感染 T 細胞株において種々の添加物や培養条件が, HTLV-1 gp46 抗原, Tax 抗原, および FoxP3 抗原の発現にどのような影響を与えるのかを解析することを目的とした.

【方法】 ATL 患者由来 CD4+T 細胞株 (ATL-026i, ATL-056i), および HTLV-1 非感染ドナー由来の Treg 細胞に HTLV-1 を感染させた CD4+T 細胞株 (YT#1) を使用し, RPMI-1640 培地に 10% 牛胎児血清, 20U/ml IL-2 を添加した培地で培養した. 種々の刺激を与え培養した細胞をパラホルムアルデヒドで固定し, 細胞膜透過処理を行った後に蛍光色素標識抗体と反応させ, FACS キャリバーで解析した.

【結果・考察】 培養温度を 37°C より下げて培養すると細胞増殖が抑制されたが, gp46, Tax, FoxP3 の発現率は高まった. IL-2 を除くと上記 3 種の抗原の発現率は低下した. 培地グルコース濃度を 10 あるいは 1/10 倍量にするか, プロスタグランジン E2 を添加培養すると, gp46, Tax の発現が顕著に増加したが, FoxP3 抗原の発現は影響を受けなかった. 弱い超音波処理では gp46, Tax の発現率がわずかに増加した. これらの実験結果から, HTLV-1 抗原 (gp46, Tax) および FoxP3 抗原の発現は培養条件の影響を受けることが明らかとなった.

【結論】 HTLV-1 感染細胞株において, 細胞増殖や生存に抑制がかかる培養条件では, HTLV-1 の活性化が誘発されることが示唆された.

046 TNF 受容体スーパーファミリー OX40 に対する アゴニスト抗体選別法の確立

今田 早香 (学籍番号: 154214B)

指導教員: 田中 礼子, 高橋 良明, 水口 真理子, 〇田中 勇悦
琉球大学大学院医学研究科免疫学講座

【目的】 OX40 は, 活性化した T リンパ球に誘導される TNF 受容体スーパーファミリー抗原であり, T 細胞の延命やサイトカイン産生を促進するなどの機能を持つ. OX40 が関連する疾病は, 自己免疫疾患や炎症性疾患等であるが, 近年, OX40 刺激を介する新たながん免疫療法の研究が進んでいる. 本研究では, 新たな免疫療法の開発研究の一旦として, OX40 アゴニスト抗体の選別法を確立することを目的とした.

【方法】 T 細胞白血病患者由来 CD4+T 細胞株 CEM, OX40 導入 CEM (CEM/OX40), 正常人の末梢血単核球 (PBMC) を使用した. 培養には RPMI-1640 培地を使用し, PBMC の培養には IL-2 を添加した. PBMC からの Th1, Th2 様細胞群の誘導には, 固相化 CD3 抗体 (OKT-3) と IL-12 や IL-4 を使用した. 細胞のプレート底面接着や同種凝集は倒立顕微鏡で観察した. 活性化 PBMC への影響は IFN- γ や IL-4 の産生を ELISA 定量で推定した.

【結果・考察】 OX40 抗体ライブラリーの抗体を塗布したプレートで 37°C, 30 分以上静置培養すると CEM/OX40 細胞にプレート底面への接着と形態変化を誘導するアゴニスト抗体が 2 クローン観察された. CEM では変化が見られなかった. OX40 アゴニスト抗体を可溶性の状態では活性化 PBMC に加えると, Th1 様 PBMC 群では IFN- γ , Th2 様 PBMC 群では IL-4 の産生が促進された. OX40 抗体で誘導される細胞の底面接着は EDTA 添加や低温培養で完全に阻害された. OX40 アゴニスト抗体処理により Ca²⁺ 依存性インテグリンによる細胞接着が短時間で誘発されることが示唆された.

【結論】 CEM/OX40 細胞を利用して OX40 アゴニスト抗体をスクリーニングできる簡便な方法を確立した. 既存ライブラリーの中から選択された OX40 アゴニスト抗体は今後の免疫研究に役立つと期待される.

048 マウス MHC H-2^b タイプの C57BL/6 マウスを 宿主としたヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 エンベロープに対する新規中和単クローン抗体 作製の試み

平安 美和 (学籍番号: 154209F)

指導教員: 〇高橋 良明, 田中 礼子, 水口 真理子, 田中 勇悦
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) の原因ウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染者は九州・沖縄を中心におよそ 100 万人と推定されている. HTLV-1 キャリアの約 5% が ATL を発症するが, 未だ有効な予防ワクチンや治療法はない. 本研究では, MHC 背景により抗原に対する免疫応答性が異なることから, BALB/c マウスとは異なる系の C57BL/6 マウスを宿主として, 新規の HTLV-1 中和単クローン抗体を作製することを目的とした.

【方法】 C57BL/6 マウスに Env 発現型組換えワクシニアウイルスを接種して 2 か月後, マウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させハイブリドーマを作製し, HAT 培地中で選択培養した. 抗血清と得られたハイブリドーマの培養上清を用い, スクリーニングや合胞体形成阻止試験を行った. 感染細胞株として MT-2 細胞を用いた.

【結果】 C57BL/6 マウス免疫血清は, ELISA で高い抗体価を示し, ウェスタンブロットでは MT-2 細胞に特異的で, gp46 抗原を検出した. ハイブリドーマの培養上清の ELISA による一次スクリーニングでは, 1009 ウェル中 20 ウェルが MT-2 細胞に反応した. 続くフローサイトメトリーによる二次スクリーニングでは, 20 ウェル中 3 ウェルが MT-2 細胞との反応が陽性であったが, これらの培養上清を用いて合胞体形成阻止試験を行ったところ, 中和活性を示すものは無かった.

【考察】 今回, C57BL/6 マウス免疫血清には HTLV-1 中和活性が確認できなかった. 免疫脾臓細胞からモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製を行ったが, HTLV-1 感染細胞に特異的に反応する抗体は幾つか得られたものの, 中和活性は陰性であった. 今後は, この系のマウスで HTLV-1 中和抗体を得るには, 抗原の選択や免疫の回数を増やす等の工夫が必要と思われる.

049

マウス MHC H-2^d タイプの BALB/c マウスを宿主としたヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型

高江洲 紗良 (学籍番号: 154211H)

指導教員: ○高橋 良明, 田中 礼子, 水口 真理子, 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 1 型 (HTLV-1) は, 成人 T 細胞白血病 (ATL) など極めて予後不良疾患の原因であるが, 未だ有効な予防ワクチンや効果的治療法は開発されていない。本研究では, 抗体医薬として将来期待される HTLV-1 中和抗体を新規に作製する目的で, 一般に単クローン抗体作製に用いられている BALB/c マウスを宿主として中和単クローン抗体の作製を試みた。

【方法】HTLV-1 Env 発現型組換えワクシニアウイルスを BALB/c マウスに接種し, 2 か月後, 脾細胞と SP2/O ミエローマ細胞を HVJ 蛋白法で融合させて HAT 培地でハイブリドーマを選択培養した。抗体の同定には ELISA 法, フローサイトメトリー法やウエスタンブロット (WB), および HTLV-1 合胞体形成阻止試験 (中和試験) で行った。

【結果】免疫 BALB/c マウスの血清中には, ELISA 法で HTLV-1 Env 抗原に対する抗体と WB による Env gp46 抗体が確認された。しかし, 中和能は陰性であった。選択されたハイブリドーマ 927 個について ELISA スクリーニングをしたところ, 35 ウェルが陽性であった。フローサイトメトリーで二次スクリーニングを行ったところ, HTLV-1 感染細胞株 MT-2 細胞に特異的に反応する抗体が 4 つあった。しかし, これら全ては有意な HTLV-1 感染中和活性を持たなかった。

【考察】今回組換えワクシニアウイルスを接種することにより, BALB/c マウスにおいて Env 抗原に対する特異抗体を誘導できたが, 抗血清には中和活性はなかった。また, 免疫マウス脾臓細胞から HTLV-1 感染細胞に反応するモノクローナル抗体をいくつか樹立することができたが, それらはすべて中和活性が陰性であった。今後, BALB/c マウスで中和抗体を誘導するためには, 免疫抗原の選択や免疫法の工夫が必要であろう。

050

Zmp1 遺伝子欠損 BCG 接種による T 細胞免疫応答への影響の検討

岩橋 晃平 (学籍番号: 154117A)

指導教員: ○梅村 正幸, 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

【背景・目的】結核菌の感染症である結核は, 化学療法により治療可能な疾患になりつつあるが, 一方では多剤耐性結核菌が世界各地で検出されており, 化学療法が困難な症例が増えている。こういった現状を解決するためには, より有効なワクチンならびに免疫療法の開発が急務である。Zmp1 は結核菌の病原細菌が産生する Zn²⁺メタロプロテアーゼであり, 自然免疫応答に重要な IL-1 β の産生を抑制することが知られている。本研究では, 感染肺での Th1/Th17 免疫応答に対する Zmp1 の影響を調べることを目的に, Zmp1 遺伝子を欠損させた *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) 株を用いて経時的な解析を試みた。

【方法】C57BL/6 マウスに 5 \times 10⁶ cfu の Zmp1 遺伝子欠損 (KO) -BCG あるいは野生型 (WT) -BCG を経気道接種し, 7 日目, 15 日目および 30 日目に肺を採取した。肺懸濁液中の IFN- γ および IL-17A 量は ELISA 法で定量し, 肺リンパ球は細胞内サイトカイン染色法により検討した。また肺組織病理学標本のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い, 肉芽腫の成熟を指標に結核の病態形成を検討した。

【結果】感染肺懸濁液中の IL-17A と IFN- γ は, WT-BCG 群では感染 15 日に有意な上昇を示したのに対し, KO-BCG 群は感染 7 日目から高値を示し, 感染 30 日目まで維持されていた。細胞内サイトカイン染色法では IL-17A 産生細胞を CD3⁺CD4⁺ (Th17) 細胞と CD3⁺TCR $\gamma\delta^+$ ($\gamma\delta$ 17) 細胞と区別し比較したところ, Th17 は WT-BCG 群と KO-BCG 群間において有意差が認められなかったが, $\gamma\delta$ 17 細胞は KO-BCG 群では有意に高頻度であった。この 2 群間では組織病理学解析における顕著な違いは認められなかった。

【考察】今回の研究から, Zmp1 を欠損菌に対して, 感染早期に IFN- γ と IL-17A の産生が高い傾向にあり, 特に $\gamma\delta$ 17 細胞の有意な増加が認められた。以上の結果から, Zmp1 欠損により免疫応答が増強すると考えられ, Zmp1 が結核治療における標的の一つと考えられた。

051

結核菌の分泌タンパク質によるインターロイキン -1 β 産生阻害機序の解明

平安座 啓 (学籍番号: 154142B)

指導教員: ○高江洲 義一, 梅村 正幸, 松崎 吾朗
琉球大学大学院医学研究科生体防御学講座

マクロファージ (M ϕ) が産生する炎症性サイトカインの一つインターロイキン -1 β (IL-1 β) は, 自然免疫レベルにおける結核菌の排除に重要な役割を果たす。一方, 結核菌は zinc metalloprotease 1 (Zmp1) という分泌タンパク質を介して M ϕ からの IL-1 β の産生を阻害し, 殺菌を回避する。しかし, Zmp1 による IL-1 β 産生阻害の分子メカニズムは未解明である。最近, 当研究室において新規の Zmp1 会合分子として, 宿主ゲノムにコードされるミトコンドリアタンパク質 [以下, essential regulator of inflammation in M ϕ (ERIM) と呼ぶ] が同定された。本研究では, Zmp1 による IL-1 β 産生阻害機序の解明を目的として, ERIM の機能解析を行った。

まず, CRISPR/Cas9 法を用いて, マウス M ϕ 細胞株 J774.1 から ERIM 欠損細胞を樹立した。具体的には, J774.1 細胞に ERIM を標的とする gRNA と組み換え Cas9 タンパク質を導入し, 限界希釈法で 22 個のクローンを得た。各クローンにおける ERIM の発現を Western blot 法で調べ, 2 個のクローン (1B7, 3D1) で ERIM の発現消失を認めた。次に, ELISA 法と lactate dehydrogenase (LDH) release assay を用いて IL-1 β 産生における ERIM の役割を調べた。J774.1 の元株 (WT) と 1B7 を LPS で 4 時間前処理した後に ATP で 1 時間刺激をして, それぞれの培養上清中の IL-1 β と LDH の量を測定した結果, 1B7 では WT に比べて IL-1 β と LDH の放出量がともに著明に減少していた。Western blot 法で詳しく調べた結果, LPS 刺激で誘導される前駆体型 IL-1 β は, WT, 1B7, 3D1 で同程度に発現していた。一方, LPS+ATP 刺激で誘導される p10 断片 (Caspase-1 活性化の指標) は WT で強く検出されたのに対し, 1B7 と 3D1 では全くあるいはほとんど検出されなかった。さらに, フローサイトメトリーでミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の状態と活性酸素種 (ROS) の産生を調べたところ, 1B7 は WT よりも有意に $\Delta\Psi_m$ が低く ROS 産生が高いことがわかった。

以上より, ERIM は Caspase-1 の活性化に必要不可欠であり, Zmp1 は ERIM の機能を阻害することで IL-1 β 産生を抑制すると考えられる。また, Caspase-1 の活性化には $\Delta\Psi_m$ の維持または ROS 産生が関与すると考えられていることから, ERIM による Caspase-1 の活性化には $\Delta\Psi_m$ が関与する可能性が示唆される。

052

結核菌感染における Zmp1 遺伝子欠損 BCG 接種による自然免疫応答への影響

木村 倫和 (学籍番号: 154122G)

指導教員: ○梅村 正幸, 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

【背景・目的】感染初期の病原体認識ならびにそれにより誘導される好中球浸潤をはじめとする自然免疫応答がその後に引き続く獲得免疫応答に重要な役割を担う。IL-1 β は炎症性カスパーゼ活性化タンパク質複合体であるインフラマソームで活性化されたカスパーゼ 1 により活性化される。菌体から産生される Zmp1 がカスパーゼ -1 依存性 IL-1 β 産生を低下させることが知られており, 好中球の浸潤を伴う感染早期の防御応答が抑えられる。本研究では, Zmp1 遺伝子を欠損させた *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) 株 (KO-BCG) を用いて, *in vitro*, *in vivo* 感染系における IL-1 β 産生能, ならびに感染肺での好中球誘導能を調べることを目的に検討を行った。

【方法】*in vitro* 感染系: 骨髄由来マクロファージ (BM-M ϕ) に KO-BCG および野生型 (WT) -BCG を感染させ, 培養上清中の IL-1 β を ELISA 法で定量した。*in vivo* 感染系: C57BL/6 マウスに 5 \times 10⁶ CFU の WT-BCG および KO-BCG を接種した後, 経時的 (7, 15 及び 30 日) に肺ホモジネート上清中の IL-1 β と TNF- α を定量した。同時に, 感染肺への好中球浸潤はフローサイトメトリー法を用いて調べた。

【結果】BM-M ϕ への KO-BCG 感染で誘導される IL-1 β は WT-BCG 感染に比べ有意に高かった。これに一致して, BCG 感染肺ホモジネート上清中の IL-1 β は, 感染 7 日および 30 日で KO-BCG 感染群が顕著に高い値を示した。一方, TNF- α は両群間に有意な差が認められなかったことから, Zmp1 が IL-1 β 産生を特異的に抑制すると考えられた。しかしながら, 好中球の浸潤に両群間の有意な差は認められなかった。

【考察】自然免疫レベルでの IL-1 β 産生制御に関与する Zmp1 を欠損させることにより, 活性化型 IL-1 β の産生が増強することが, 初めて感染肺でも確認された。しかし, それにより惹起される好中球浸潤誘導が低かったことから, 好中球の遊走に拮抗する何らかの因子も Zmp1 欠損により誘導される可能性が示唆された。

053

2型志賀毒素 (Stx2)・易熱性腸管毒素 (LT) に対するワクチン研究

江波戸 大悟 (学籍番号: 154195B)
 指導教員: ○玉城 志博, 新川 武
 琉球大学大学院医学研究科感染免疫制御学講座

病原性大腸菌の中でも腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) と腸管毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic E. coli*: ETEC) は、コレラ毒素の仲間である AB₅ 型の毒素を産生し、それが主な病原因子として出血性の下痢や水溶性の下痢を誘発する。一般的に O-157 の名で良く知られている EHEC は志賀毒素 (Shiga toxin: Stx) を産生し、腸管粘膜上皮細胞に作用して出血性大腸炎を誘発する。重篤な場合は、溶血性尿毒症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) の原因ともなる。Stx は血清学的に 1 型 (Stx1) と 2 型 (Stx2) に分類され、その毒性は Stx2 の方が Stx1 と比較し格段高いことが知られている。また、ETEC は腸管粘膜上皮に定着し、易熱性腸管毒素 (heat-labile enterotoxin: LT) を産生することで、水様性の下痢症状を引き起こす。これは途上国への旅行者によく見られるもので、渡航者下痢 (traveler's diarrhea) と呼ばれることがある。上述のとおり、Stx や LT は、A 鎖 1 分子と B 鎖 5 分子 (5 量体) から構成される典型的な AB₅ 型毒素であり、A 鎖は毒性に直接関与する特異的な酵素活性を有し (Stx: RNA グリコシダーゼ; LT: ADP リポシルトランスフェラーゼ)、B 鎖は細胞膜上の受容体 (Stx: Gb3; LT: GM1) を介して、A 鎖を標的細胞内へと輸送する。当該講座では、これらの腸管毒素の B 鎖を標的としたワクチン開発を進めており、特に本研究では、Stx2 および LT の B 鎖に独自の分子改変を施すことでワクチンの開発を進めている。

054

感染症ワクチン開発のためのウイルス様粒子 (VLP) 発現技術開発

上原 綾音 (学籍番号: 154156B)
 指導教員: 玉城 志博, ○新川 武
 琉球大学大学院医学研究科感染免疫制御学講座

ワクチン開発において、投与抗原量、投与回数、投与経路依存的免疫誘導はもとより、その他のワクチンの剤形にかかわる重要要素には、(1) 分子模倣、(2) アジュバント、(3) 抗原反復整列化、そして、(4) 抗原提示細胞標的化等が含まれる。この中でも特に分子模倣は絶対的に重要であり、いかに免疫原性の高い抗原でも、それが病原微生物由来の防御抗原と比較し、構造的類似性を欠く場合、ワクチンとして機能しない場合がほとんどである。この分子模倣については、従来の弱毒化ワクチンや不活化ワクチン (不活化法に特段問題ないという前提) ではほとんど問題とならず、組換えタンパク質性のワクチン開発において重要であることはよく知られている。特にウイルスに対する組換えタンパク質性ワクチンを開発する場合、エンベロープウイルスとノンエンベロープウイルスの防御抗原の特徴を見極め、天然のウイルス構造を模倣することが重要である。さらに、ノンエンベロープウイルスに対するワクチン開発では、近年、ウイルス様粒子 (virus-like particles: VLPs) が注目されているが、その多くがバキュロウイルス・昆虫細胞由来である。その理由は、VLP などの高難度タンパク質を大腸菌等の発現系で構築することが一般的に困難だからである。しかし、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系は、作業工程が比較的煩雑になる傾向があるうえ、コスト面での優位性も大腸菌発現系を凌駕することは難しい。よって、簡便かつ安価な大腸菌発現系で VLP 等の高難度タンパク質を天然の高次構造を保持した抗原として産生する技術は、ワクチン開発において極めて有用である。本研究では、大腸菌での VLP 構築技術を確立するため、VLP の構成因子であるキャプソマータンパク質の分子改変を試みたのでその成果を報告する。

055

ハブ毒素に対するモノクロナル抗体医薬開発研究

赤嶺 佑介 (学籍番号: 144169J)
 指導教員: ○玉城 志博, 新川 武
 琉球大学大学院医学研究科感染免疫制御学講座

沖縄・奄美地方のハブ類咬症者数は年間約 100 人である。ハブ咬傷によってその毒が筋膜下に達すると、筋浮腫を経て筋壊死を起こす。この過程で指や手足の関節の痛み等が後遺症として残り、咬症患者の QOL (Quality of Life) は著しく低下する危険性をはらんでいる。ハブ咬傷には、「乾燥はぶウマ抗血清」の投与による毒素中和が有効な治療法として挙げられるが、この抗毒素はウマ抗血清を原料としているため、ヒトに対して重篤な副作用 (アナフィラキシー症状等) を誘発する危険性がある。よって、ウマ抗毒素の使用にあたっては、事前にアレルギーテストを実施することが使用上の注意として添付文書に明記されている。しかし、アレルギーテストが陰性であっても、皮膚発赤、そう痒感、発熱、関節痛等の遅延性の血清病が 20% 程度の投与患者に現れるといわれている。よって、生命に危険があると判断されない限り、医療機関ではこの抗毒素の使用をやむをえず見送るのが通例であり、咬症患者は毒による長引く苦痛に耐えなければならぬ場合もある。すなわち、ウマ抗毒素の使用は、皮肉にも患者の生命を逆に脅かしかねず、また同時に対処療法にのみ依存することも危険性が高いため、ハブ咬症は医療機関にとってその対応が難しい厄介なものである。事実、ハブに左脚を噛まれた男性が沖縄県内の病院に搬送されたが、担当医師が血清病のリスクを懸念したため、抗血清の投与が遅れ、左脚関節屈折機能障害の後遺症を負ったという事例がある (2016 年 11 月)。このような状況を打破するには、現行のウマ抗毒素を効果的かつ安全性の高いモノクロナル抗体医薬へ置き換えることが必要であり、本研究ではその目的を達成するため、①ハブ毒素中和抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、②選抜したハイブリドーマからモノクロナル抗体を精製することで、新しいハブ毒抗毒素医薬の開発を進めている。

056

志賀毒素に対するワクチン研究

銘苅 康太郎 (学籍番号: 154157K)
 指導教員: ○玉城 志博, 新川 武
 琉球大学大学院医学研究科感染免疫制御学講座

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC) 感染症は、ウシの大腸に生息する STEC (血清型は主に O-157 (約 70%) で、その他に O-26 や O-111 が存在する) が産生する志賀毒素 (Stx) が原因で発症する。STEC 感染は、無症状から軽い腹痛や下痢症状に留まるものもあるが、出血性大腸炎を引き起こし、激しい腹痛や血便を呈するもの。さらに、重症合併症 (溶血性尿毒症候群 (HUS) や急性脳症) を引き起こし、時に死に至る場合もある。Stx の血清型には 1 型 (Stx1) と 2 型 (Stx2) があるが、これらの Stx は、赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*) が産生する Stx と構造および作用機序が酷似しており、特に Stx1 (大腸菌由来) と Stx (赤痢菌由来) は全く同じ分子である。Stx はリポソームを不活性化し、タンパク質合成を阻害するため、Stx の受容体である Gb3 が多く発現している神経細胞や血管内皮細胞が主な標的細胞である。よって、STEC 感染では小腸粘膜組織に加え、神経系や循環器系への毒性が顕著に現れる。また、Stx1 と Stx2 の毒性を比較すると、Stx2 の方が Stx1 より数十倍から数百倍高いという報告が多くある。さらに、重症化した患者から分離された STEC のほとんどが Stx2 産生株であることが報告されている。よって、抗 Stx ワクチンを開発するには、特に Stx2 を標的にする必要があるが、Stx2 は構造的安定性が低いため、これまでワクチン開発が困難だと考えられてきた。しかし、本研究では、Stx2 に分子改変を施すことで、その構造的安定性を格段高めることに成功した。その結果として、天然型 Stx2 と比較し、改変型 Stx2 のマウスへの免疫・毒素攻撃試験において、高いワクチン機能が示された。

057

子宮内膜癌の研究における
使用標本の選定方法について

嘉手苺 桃子 (学籍番号: 154175H)
指導教員: ○玉城 智子, 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

子宮内膜癌は発生背景により I 型と II 型に分けられ、予後良好な I 型には類内腺癌 (以下 EC)、予後不良な II 型には漿液性癌 (以下 SC) などがある。これらは組織形態や免疫染色によって総合的に診断されるが、I 型と診断された症例の中に II 型の症例が含まれている可能性や、II 型症例の観察者間での診断再現性については議論があり、様々な研究が行われている。関連論文において使用標本の選定基準が異なっており、今回 2 つの論文の標本選定基準について再現性と相違を検討した。

材料・方法

2016 年に琉大病院で診断された子宮体部悪性腫瘍の手術材料 20 例 (EC: 18 例, SC: 1 例, その他: 1 例) を用いた。各症例において 2 つの論文に記載されている標本選定基準 (①深達度, ②代表的な組織形態) の各基準に該当する標本を、学生と病理専門医 (以下専門医) が各自で選定した。1) 再現性を検討するために、基準①、②について選定した標本の観察者間での一致率を算出した。2) 基準①と②により同一標本が選定された症例の割合を学生、専門医ごとに算出した。

結果

- 1) 観察者間での基準①、②の一致率はそれぞれ 65%、50% となった。
- 2) 基準①と②で同一標本を選定した症例の割合は、学生では 55%、専門医では 75% であった。

考察

1) の結果は、学生と専門医で標本の評価に差が生じると考えられた。これは、知識量や経験の差が原因として考えられる。このため標本選定においては、基準①が観察者間の差異を反映しにくい指標と考えられた。一方 2) の結果では、専門医においては基準①、②のいずれの基準でもある程度同一の標本を選ぶことが可能であると示唆された。以上より、形態学的臨床研究において症例における組織標本の選定の重要性は自明ではあるものの一定の方式はみられないが、今回の結果からは、こうした研究には病変形態学の専門家である病理専門医の関与が望ましいと考えられた。

058

胃生検標本を対象とした光学顕微鏡と
各社 WSI (Whole Slide Imaging)
との診断能の比較

大門 勇太 (学籍番号: 154150B)
指導教員: ○青山 肇, 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: Whole Slide Imaging (WSI) を用いた診断は光学顕微鏡での診断に劣らないとされているが、スキャナー間の差異についての報告は少ない。また WSI の診断能の検討は腫瘍性疾患を対象としたものが主であった。そこで実際の外科病理で最も多く提出される非腫瘍性病変である胃炎を対象とし、炎症の評価やピロリ菌 (*Hp*) 感染の有無についてスキャナー間の機能を比較し、WSI の炎症性病変への適応と各機種間の機能を比較した。方法: 内視鏡検査にて採取された胃生検 268 例に対し HE、ギムザ、さらに抗 *Hp* 抗体を用いた免疫染色標本を作製した。それらをスキャナー 3 機種 (A, B, C) を用いて 40 倍モードでスキャンした。顕微鏡及び各機種 WSI データでシドニー分類に準じた 4 項目 (腸上皮化生、リンパ球浸潤、好中球浸潤、*Hp* 感染) を評価・比較した。

結果: 顕微鏡での評価を対照として 4 項目における感度、特異度を算出した。腸上皮化生については感度・特異度とも高かった (感度 89.1%、特異度 89.0%、3 機種平均、以下同様) のもの、リンパ球浸潤の特異度は低く (98.4%、53.1%)、好中球浸潤の感度は低かった (59.6%、96.5%)。上記については機種間の差はみられなかった。一方で *Hp* 感染では免疫染色における機種 B と C の 2 種は感度、特異度とも高かった (81.6%、92.3%) が、ギムザ染色における機種 B の感度が低かった (60.7%、92.5%)。

考察: WSI は腸上皮化生といった細胞レベルの形態の評価は顕微鏡と遜色ないものの、リンパ球、好中球など核形の判別や細菌の有無といったより微小な形態の評価では顕微鏡に劣ると考えられた。またギムザによるピロリ菌感染の評価では機種差がみられた。WSI を炎症性病変の診断に用いる際には免疫染色標本の併用や顕微鏡での再確認などに留意すべきだと思われる。

059

胃癌における組織型の
経時的変化についての検討

長嶺 さつき (学籍番号: 154125B)
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】胃癌検診や内視鏡治療の発達により、日本における胃癌の死亡率は低下している。しかし、臓器部位別罹患率は男性では第一位、女性では第三位と高い罹患率を有したままである。Helicobacter pylori の除菌により全国での胃癌の罹患率が減少している一方で、沖縄では罹患率は横ばいの傾向にある。沖縄県の胃癌症例において、Helicobacter pylori 除菌治療による影響が組織学的に確認できるか調べた。

【目的】Helicobacter pylori が同定されていなかった 1975 年の胃癌と、除菌治療が一般的となった 2015 年の胃癌の病理組織標本を比較し Helicobacter pylori の除菌による影響が胃癌の組織型に変化をもたらしているかを検討した。

【方法】1975 年と 2015 年に琉球大学附属病院で施行された組織診で、胃癌と診断された病理組織標本を、胃癌取扱規程第 15 版に準じて診断した後、組織型の評価法には Lauren 分類を用いた。1975 年の組織標本は、劣化が著しく診断が困難なものを除いた 66 例 (男女比 48:18) を用いた。2015 年の組織標本は 40 例 (男女比 30:10) を用いた。

【結果】胃癌の罹患率について男女比の動向に変化は見られなかった。1975 年では、Intestinal type、Diffuse type、Mixed type の割合が各々 48%、41%、11%、2015 年では各々 45%、35%、20% であり、組織型の割合に年代別での変化は見られなかった。1975 年の性別での比較では、男性は各々 52%、35%、13% であり、Intestinal type が過半数を占めたのに対し、女性では各々 39%、56%、5% と Diffuse type が過半数を占めていた。これは、2015 年でも同様の傾向にあった。

【考察】Helicobacter pylori 感染による遺伝子異常で引き起こされる胃癌では Intestinal type の組織型であることが多いという報告がある。本研究では、Intestinal type と Diffuse type の割合はほぼ同等であり、1975 年と 2015 年では組織型の割合に差は見られなかった。しかし、女性では男性と比較して Diffuse type が多い傾向がみられ、女性では Helicobacter pylori 感染による胃癌が比較的に少ないことが示唆される。今後は、Helicobacter pylori 感染の有無を加えて検討する必要がある。また、沖縄県は胃癌の罹患率が低い地域であり、県外の胃癌症例の検討を行うことで、この理由についても調べる必要がある。

060

筋上皮細胞の形質発現の変化と
非浸潤性乳管癌の進行との関連について

林 七菜 (学籍番号: 154134A)
指導教員: ○松本 裕文, 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:

非浸潤性乳管癌 (DCIS) 症例の中には外科的治療を要さないあるいは治療を待てる症例が少なくとも存在する。そこで DCIS については、治療を含む病変の取扱いについて議論の余地が残されており、特に浸潤癌に移行する可能性の評価が求められているが、未だ不十分である。本研究では、DCIS において癌の進行を抑える機能を持つ筋上皮細胞 (MEC) について、MEC の核の染色強度と DCIS の浸潤癌への移行との関係を検討する。

方法:

2014-16 年に中頭病院で切除された連続する pT1a-c 乳癌術前治療非施行例のうち、浸潤癌内外にそれぞれ DCIS 成分を認める 16 例を対象とした。HE 標本で浸潤癌内の DCIS 成分 (Di)、浸潤癌外の DCIS 成分 (Dd)、正常乳管・小葉 (N) を同定し、対応部分をパラフィンブロックから 1 症例につきそれぞれの成分 1-4core ずつ採取して組織マイクロアレイ (TMA) を作製した。MEC の核を染める p63 免疫染色を施行した TMA スライドはバーチャルスライドスキャナ (NanoZoomer-XR) でデジタル化し、①目視と②画像解析ソフト (HALO™) により、Dd と Di について DCIS 周囲の MEC における p63 の染色強度を Hscore [1× (% cells 1+) + 2× (% cells 2+) + 3× (% cells 3+)] を用いて比較した。

結果:

①②いずれの解析法でも p63 発現程度について Dd-Di 間に有意差はなかった。ただし、正常乳管・小葉部に比しては Di、Dd いずれも H-score が有意に低かった

結論:

MEC の p63 発現について、DCIS から浸潤癌への移行との有意な関連は検出できなかったが、正常乳管・小葉から DCIS への移行との関連が示唆された。

061

天然バクテリオファージを用いた 多剤耐性緑膿菌に対する殺菌薬の開発

下地 ななほ (学籍番号: 154111B)

指導教員: ○村上 明一, 末成 由美, 與那嶺 周平, 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

バクテリオファージは特定の菌にのみ感染し、その多くが溶菌活性を有することから殺菌薬として機能し、第二次世界大戦時には感染症治療を目的としたファージセラピーが行われた。しかし、広範な細菌に有効な抗生物質が開発されたことでファージセラピーは衰退した。一方、抗生物質の不適切な使用による薬剤耐性菌問題が生じ、薬剤耐性菌に対処する代替治療の一つとしてファージセラピーが改めて注目されている。

緑膿菌は自然界に広く分布し、毒性は弱く健常者への感染は少ないが、新生児や免疫力の低下した患者へ感染し、創感染や肺炎などを引き起こす。元来、多くの消毒薬や抗生物質に抵抗性を有し、薬剤耐性を獲得しやすい性質を持つことから、多剤耐性緑膿菌の出現が世界的な問題となっており、新たな緑膿菌感染治療薬や殺菌剤の開発が求められている。

そこで本研究では、ファージを用いた緑膿菌に対する抗菌薬の開発を目指し、天然に存在する緑膿菌ファージの採集、及び、その宿主域や溶菌力の解析を試みた。まず、ファージ採集のベイトとなる緑膿菌株を自然界から単離した。NAC 選択培地を用いてコロニーを分離し、形態、色素産生、16S 遺伝子解析によって 15 株の緑膿菌を得た。さらに複数の臨床分離株を入手し、各株に溶菌活性を持つファージを分離した。また、より有用なファージを効率よく分離する戦略として、緑膿菌にファージを感染させた後、人為的にファージ耐性緑膿菌を生み出し、このファージ耐性緑膿菌を溶菌する新たなファージを分離することを繰り返すことにより、55 株のファージの単離に成功した。宿主域解析の結果、広範な緑膿菌株に対して溶菌活性を持つ株も得られた。今後、ファージ耐性菌の出現を最小限に抑えるファージカクテル化の構成要素株を選別・遺伝子解析した後、殺菌薬としての評価を行う計画である。

063

セラノスティクスを目指した新規 VHH 抗体 -細胞侵入性ペプチド融合抗がん剤の開発研究

赤嶺 日菜 (学籍番号: 154126K)

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

がん細胞には正常細胞と比べ高発現もしくは特異的に発現する分子が存在し、それらの分子を標的とした分子標的薬が特に注目されている。しかし、大きな課題はその高価な薬価である。当研究室では、安価に大量生産が可能な VHH 抗体を作製する技術を有し、既に HER2 や EGFR などのがん細胞特異的 VHH を作製している。VHH とはラクダ科 H 鎖抗体の変種領域部約 12KDa の小さな単鎖抗体である。近年、分子標的薬の登場とともに、診断・治療が同時に行える、効率的ながん治療であるセラノスティクス製剤の開発に大きな期待が寄せられて来た。セラノスティクス製剤を開発するためには、抗がん剤を効果的にがん患部に集積させるのと同時に画像診断可能なシグナルを持つことが必要とされる。そこで、がん患部に薬剤を集積させることを目的として抗がん VHH と細胞侵入性ペプチド (CPP) の利用を考えた。すなわち VHH と CPP とを融合することで、がん細胞特異性と細胞侵入性を組み合わせ、抗がん物質を細胞内へと効果的に導入する分子の設計を試みた。

まず、VHH-CPP 発現ベクターを構築した。プロモーター下流にシグナル配列、3xFLAG 配列、VHH 遺伝子挿入部、3xFLAG 配列、精製用 6xHis タグを配置した。VHH 遺伝子挿入部には任意の VHH クローン遺伝子を、VHH 挿入部の N 末および C 末の 3xFLAG 配列はそれぞれ任意の CPP と容易に変換できるように設計した。このベクターを検証すべく、HER2 に対する 3 クローンの VHH、CPP として R5、R8、BR2 の 3 種をそれぞれ VHH の N 末と C 末に融合した計 18 種類の発現ベクターを構築し、その発現と HER2 への結合を調べた。その結果、全てで発現と結合が確認できた。現在、これら VHH-CPP 融合タンパク質を蛍光標識し、がん細胞特異的な侵入性の評価により、最適な VHH と CPP の融合形態の確立を進めている。

062

マウスノロウイルス感染モデルを用いた 液性免疫機構の解析

高田 圭 (学籍番号: 144158C)

指導教員: ○小野寺 大志¹⁾, 高橋 宜聖¹⁾, 岸本 英博²⁾

¹⁾ 国立感染症研究所免疫部第四室,

²⁾ 琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学

(1) 背景と目的

ノロウイルス感染症は毎年世界で 7 億人もの感染者を出しており、感染力が強く、熱やアルコールに抵抗性をもち、集団感染の事例が多発している。現在予防は食品の加熱や手洗いなどしかなく、ワクチンの開発が求められている。本研究では、マウスノロウイルスを用いて、マウスノロウイルスに対する抗体による液性免疫の効果について調べた。

(2) 方法

G2D4KmIgA、6-24mgA (Control 抗体) の二種類の抗体を作成し、それぞれマウスに 4 匹ずつ静注し、その直後にマウスノロウイルス (MNV1-S7 株) を経口感染させた。感染させた日を day0 とし、day0 から day14 まで毎日全てのマウスの糞便を回収し、糞便中のウイルスを、TCID50 を用いて測定した。

平底 96well プレートにマウス由来のマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 4×10^4 個/well ずつ撒く。その well にウイルス液を 10 μ l/well ずつ撒いて、そのプレートを 37°C で 72 時間培養し、固定して染色した。死細胞の割合から TCID50 を計算した。また、ELISA 法を用いて G2D4KmIgA がノロウイルスと反応するのか調べた。

(3) 結果

ELISA の結果、G2D4KmIgA はノロウイルスと結合することが判明した。G2D4K と Control 抗体投与群の糞便中のウイルス量の有意差を測定したところ、どの日においても有意差は認められなかった。

(4) 考察

交差反応性抗ノロウイルスモノクローナル抗体である G2D4KmIgA は感染を予防することも、ウイルスの増殖を抑制する効果も無い。先行実験では IgG2a 型抗体を使用して今回と同様の実験行なっているが、IgG2a 型抗体はウイルスの増殖を抑制する効果を示した。IgA 型と IgG2a 型抗体のウイルスに対する作用機序が異なることによって、感染に対する防御効果が異なるのだと推測される。

064

試験管内改変法を用いた VHH 抗体の 親和性成熟および特異性の改良技術開発

千葉 俊彦 (学籍番号: 154153G)

指導教員: ○村上 明一, 塚原 成俊, 吉田 麻衣子, 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

抗体とは体内に侵入した異物に特異的に結合し、異物を排除するタンパク質であり、結合の強さを表す「親和性」と特定の抗原に結合する「特異性」によって評価され、これらの性質を応用して医薬品や検査薬に利用されている。

抗体は主にハイブリドーマ法で作製されるが、近年、ライブラリー法による作製法が盛んになり、完全ヒト抗体の作製等に利用されている。当研究室では 200 億以上の多様性を有する VHH 抗体ライブラリーを構築し、多種多様な標的抗原に対して迅速に抗体を作製できるシステムを開発している。本法により、インフルエンザ HA タンパク質に対する抗体を単離してウイルス中和活性を調べたところ、H1N1 株に対して高い中和活性を有するクローンが得られた。しかしこのクローンは H5 や H7 など他の亜型に対しては中和活性を有さない。本研究では、このクローンを他の亜型に結合し、かつ、高い親和性を有するクローンに試験管内で進化させることを目的とし、2 種の異なる試験管内改変法を用いて検討した。一つは VHH 遺伝子にランダムな変異を導入したライブラリーを作製する「ランダム変異法」、もう一つは VHH の CDR3 領域遺伝子を温存し、元と異なる CDR1 と CDR2 を含む VHH 遺伝子断片ライブラリーと新たにペアを創生したライブラリーを作製する「CDR3 温存法」である。H5 を標的としたスクリーニングの結果、ランダム変異ライブラリーからのみ H5 に結合能を獲得したクローンを得ることができた。このクローンは CDR3 に変異が挿入されていたことから、特異性変換には CDR3 が重要であることが示唆される。一方、親和性の向上には CDR3 温存法がより適していた。以上、二つの改変法を連続して行うことでより有用な抗体を迅速に作製できることが明らかになった。これらの結果は、システムの提供のみならず、今後の抗体薬開発に大きな進歩を与えると考える。

065

2種のファージ提示法を融合した ワクチン候補抗原の迅速同定法の開発

北出 希 (学籍番号: 154182A)

指導教員: ○村上 明一, 興那嶺 周平, 塚原 成俊, 岸本 英博
琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病病態学

ファージ提示法はバクテリオファージ粒子の表面にペプチドやタンパク質などの外来分子を提示する技術であり, 抗体作製や機能性ペプチドの同定に広く利用されている。一般的に外来分子は, 繊維状ファージの g3p または g8p と融合して提示させる。g3p 融合法は抗体の Fab など比較的高分子のタンパク質の提示が可能なことや, ファージ 1 粒子あたり 1 ~ 5 分子と低価数の提示であることから高い親和性を有する分子の同定に有用であることが利点である。一方, g8p 融合法は低分子の提示のみ可能であるが, ファージ 1 粒子あたり最大で約 3000 分子の提示が可能であり, 粗ワクチン候補としてより多くの抗原分子を提示できる利点がある。

現行のワクチン開発には, 候補分子の同定や調整, ワクチン効果の検証などに長期間を要し, 莫大なコストが掛かる。そこで本研究では, 異なる 2 つのファージ提示法を融合し, g3p 融合法によるワクチン候補ペプチドの分離から, g8p 融合法によるワクチン効果の検証に至る一連のスクリーニングを, 迅速かつ安価に遂行できるシステムの構築を目的とした。

まず始めに, 候補ペプチドの分離を行う g3p 融合法から粗ワクチン候補として有効な g8p 融合法へと迅速かつ容易に変更出来るベクターを構築した。本ベクターに 3xFLAG ペプチドを挿入して検証した結果, ファージ粒子表面に g3p 融合として 3xFLAG が提示され, さらに容易に g8p 融合として提示法を変換できることが確認できた。そこで, このベクターを用いて 12 アミノ酸残基のランダムペプチドライブラリーを構築し, ワクチン候補抗原開発のモデルとして OVA 免疫マウスの抗血清を用いてスクリーニングした結果, 数種のワクチン候補ペプチドが同定できた。本システムを最適化し, 新規ワクチン候補抗原開発のプラットフォームとして活用できると期待している。

066

膵島純化における IU 溶液と IHN1 溶液の比較

岳原 吾倫 (学籍番号: 154167G)

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

膵島移植や膵臓移植は, 低血糖による意識障害に陥る 1 型糖尿病患者において, 厳密なグルコース制御を達成することが可能となる。特に膵島移植は点滴の要領で移植が可能であり, 患者の身体的負担が少ない治療法である。膵島分離プロセスは, コラゲナーゼ注入, 膵臓消化, および膵島純化からなり, 膵島純化は重要なプロセスの 1 つである。

膵島純化の最も一般的な方法は, 膵島と腺房組織の間の異なる比重を利用した, 連続比重勾配法を用いた遠心分離である。われわれはこれまで, iodixanol と改変 Kyoto 溶液 (MK 溶液) またはウィスコンシン大学溶液 (UW 溶液) を用いて作製した比重勾配が, 膵島の回収率を改善することを報告している。しかし, プタの膵臓を用いた膵島分離における臓器保存の研究では, HN1 溶液が UW 溶液よりも良好な組織保存能力を有することが報告されている。この HN1 溶液は, 高ナトリウム・低カリウム含量を有している。一方で, UW 溶液は, 高粘度, 高カリウム含量および低い緩衝能力を有する。今回我々は HN1 溶液に iodixanol を加えた IHN1 溶液を純化溶液として作成し, UW 溶液に iodixanol を加えた IU 溶液との比較を行った。2 つの純化溶液において, 膵島収量, 純度, 細胞生存率, スコアおよびグルコース負荷試験の結果に有意差は認められなかった。これらの結果により, IHN1 溶液は IU 溶液と同様に純化溶液として使用可能であると考えられた。

067

膵島細胞純化における使用溶液の比較

株木 優 (学籍番号: 154196A)

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

膵島移植や膵臓移植は, 低血糖による意識障害に陥る 1 型糖尿病患者において, 厳密なグルコース制御を達成することが可能となる。特に膵島移植は点滴の要領で移植が可能であり, 患者の身体的負担が少ない治療法である。膵島分離プロセスは, コラゲナーゼ注入, 膵臓消化, および膵島純化からなり, 膵島純化は重要なプロセスの 1 つである。

膵島純化の最も一般的な方法は, 膵島と腺房組織の間の異なる比重を利用した, 連続比重勾配法を用いた遠心分離である。われわれはこれまで, iodixanol と改変 Kyoto 溶液 (MK 溶液) またはウィスコンシン大学溶液 (UW 溶液) を用いて作製した比重勾配が, 膵島の回収率を改善することを報告している。しかし, 膵臓のみならず, 他の臓器 (例えば, 心臓, 肝臓) を用いた臓器保存の研究では, Na-ラクトビオン酸およびヒスチジン (HL) 溶液が UW 溶液よりも良好な組織保存能力を有することが報告されている。この HL 溶液は, 高いナトリウム含量および低いカリウム含量を有している。一方で, UW 溶液は, 高粘度, 高カリウム含量および低い緩衝能力を有する。今回我々は HL 溶液に iodixanol を加えた IHL 溶液を純化溶液として作成し, UW 溶液に iodixanol を加えた IU 溶液との比較を行った。量純化溶液において, 膵島収量, 純度, 細胞生存率, スコアおよびグルコース負荷試験の結果に有意差は認められなかった。これらの結果により, IHL 溶液は IU 溶液と同様に純化溶液として使用可能であると考えられた。

068

膵島純化における IU 溶液と IK 溶液の比較

津嘉山 真由 (学籍番号: 154162F)

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

膵島移植や膵臓移植は, 低血糖による意識障害に陥る 1 型糖尿病患者において, 厳密なグルコース制御を達成することが可能となる。特に膵島移植は点滴の要領で移植が可能であり, 患者の身体的負担が少ない治療法である。膵島分離は, コラゲナーゼ注入, 膵臓消化, および膵島純化からなり, 膵島純化は重要なプロセスの 1 つである。

膵島純化の最も一般的な方法は, 膵島と腺房組織の間の異なる比重を利用した, 連続比重勾配法を用いた遠心分離である。今回われわれは, iodixanol と改変 Kyoto 溶液 (MK 溶液) またはウィスコンシン大学溶液 (UW 溶液) を用いて作製した比重勾配溶液の比較検討を行った。MK 溶液は 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ものであり, 高ナトリウム・低カリウム含量の細胞外液型の溶液である。一方で UW 溶液は高粘度, 低ナトリウム・高カリウム含量で, 低い緩衝能力を有する細胞内液型の溶液である。UW 溶液は臓器保存において様々な利点を持っている反面, 不利な点も多い。それは高粘度のため十分な流量が得られない, 高カリウム含量のため膵島 β 細胞からインスリンを流出させてしまうなどである。MK 溶液に iodixanol を加えた IK 溶液と, UW 溶液に iodixanol を加えた IU 溶液を作製した比較を行ったところ, 膵島収量, 純度, 細胞生存率, スコアおよびグルコース負荷試験の結果に有意差は認められなかった。これらの結果により, IK 溶液は IU 溶液と同様に純化溶液として使用可能であると考えられた。

069

臍島純化における連続密度勾配作成前後での組織投与の影響

比嘉 奈津貴 (学籍番号: 154205C)
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

臍島移植において、純化のステップは臍島分離における最も重要かつ難しい手順の1つである。臨床での臍島分離において、臍島純化は COBE 2991 cell processor を用いた連続比重勾配法によって行われるケースがほとんどであるが、shearing stress による臍島細胞への障害が問題点として指摘されている。また COBE の不具合により、別の純化法を選択しなければならないケースも散見される。代替の純化法としては 500mL ボトルを用いた「ボトル純化法」があるが、われわれは以前に、500mL ボトルを用いて純化を行うと、豚の臍臓から効率的に臍島を得ることができていることを報告した。今回の研究では、500mL ボトルを用いた臍島純化において組織投与のタイミングの影響を検討した。連続密度勾配を作成した後に、消化組織を投与する TAG (Tissue After Gradient) 法と、連続密度勾配を作成する前に、消化組織を投与する TBG (Tissue Before Gradient) 法との比較を行った。TAG と TBG では、臍島収量、細胞生存率、純度、スコアおよびグルコース負荷試験において、有意差は認められなかった。さらに、移植後の血糖正常化においても 2 群間に有意差は認められなかった。これらの結果により、TAG 法と TBG 法は同等の純化法であると考えられ、組織投与のタイミングの影響は少ないと考えられた。

071

アミノ酸置換が及ぼすウエストナイルウイルス E タンパク質の性質への影響について

金子 甲弥 (学籍番号: 154169C)
指導教員: ○大野 真治
琉球大学大学院医学研究科ウイルス学講座

〔背景と目的〕 ウエストナイルウイルス (WNV) は日本脳炎ウイルスやデングウイルスと同じフラビウイルス科に分類される。ウイルス粒子上の E タンパク質は膜貫通領域を 2 つ持ち、ウイルスの侵入や粒子形成に関わる。我々は細胞内領域のアミノ酸配列を比較し、フラビウイルス間で保存性の高いセリン残基があることを見出した。ウイルス粒子の形成にはユビキチン化やリン酸化などの翻訳後修飾が関与する可能性がある。予測プログラムでは、このセリン残基がリン酸化されている可能性が高いことが示された。本研究では、このセリン残基が WNV の E タンパク質機能に関わるかを明らかにすることを目的とする。

〔材料と方法〕 WNV の M 及び E タンパク質を発現する細胞からは VLP (Virus-like Particle) が産生される。WNV (NY99 株) の M および E タンパク質を同時に発現するプラスミドと、同一したセリン残基をアラニンに置換した変異 E タンパク質を発現するプラスミドを作成し、E タンパク質の細胞内局在、細胞内での E タンパク質発現量、培養上清中の E タンパク質量 (VLP 量)、リン酸化の 4 点について検討した。

〔結果と考察〕 野生型と変異体の細胞内局在に明らかな変化は無かった。タンパク質発現では、細胞内の野生型と変異体の発現量は同様であったが、上清での野生型の発現が無かった。リン酸化については、Phos-tag を用いた電気泳動で野生型と変異体の移動度には差が無かった。以上から、セリン残基は E タンパク質の局在に影響を与えず、リン酸化を受けないことが強く示唆された。今回は野生型 E タンパク質が上清中に認められなかったが、予備実験ではきちんと検出されていたので手技的な問題の可能性が高い。これらのことから、検討したセリン残基は E タンパク質がもつ粒子形成能には関わっていないと考えられる。この結論を裏付けるためには再現実験を繰り返す必要がある。

070

リツキシマブ誘発性インフュージョンリアクションに関連する遺伝子多型の同定を目的としたファーマコゲノミクス研究

安藤 泰樹 (学籍番号: 154185E)
指導教員: ○庭田 泰誠¹⁾, 中村 克徳²⁾
¹⁾ 理化学研究所 統合生命医科学研究センター ファーマコゲノミクス研究グループ
²⁾ 琉球大学大学院医学研究科薬物治療学講座

〔背景と目的〕

インフュージョンリアクション (IR) は CD20 陽性の B 細胞性非ホジキンリンパ腫などの治療薬であるリツキシマブによって誘発される重要な副作用である。リツキシマブの薬物動態に影響していると考えられる FcRn (neonatal Fc receptor) をコードする FCGRT 遺伝子について、リツキシマブ誘発性 IR を発症した患者のゲノム DNA サンプルを用いたケース-コントロール関連解析を行い、その発症リスクと関連する遺伝的要因を明らかにした。

〔方法〕

リツキシマブ投与後にグレード 2 以上の IR を起こした日本人患者 34 例 (ケース)、グレード 1 または IR を発症しなかった 29 例 (コントロール) を対象にケース-コントロール関連解析を行った。(琉球大学医学部附属病院 4 例; 名古屋大学医学部附属病院 22 例; 名古屋市立大学病院 37 例) FCGRT 遺伝子の発現量との相関が既に報告されている反復配列多型 (VNTR) について、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR 法) により解析した。サンガー法を用いた遺伝子内の翻訳領域及びその周辺配列のシーケンシング解析により、他の遺伝子多型の探索を行い、検出された各遺伝子多型についても同様にケース-コントロール関連解析を行った。

〔結果〕

ケース-コントロール関連解析の結果、FCGRT 遺伝子上の VNTR 型遺伝子多型において、2 回繰り返し配列を示すアリル保有者の頻度はコントロール群で有意に高かった。(p=0.0399, オッズ比 0.082 (95% 信頼区間 0.004-1.595))。サンガー法による探索では、翻訳領域及びその周辺に 11 の遺伝子多型を検出した。このうち、2 つの SNP (rs59774409 及び rs2878342) について、IR との有意な関連を認めた (いずれも p=0.0399, オッズ比 0.082 (95% 信頼区間 0.004-1.595))。

〔統括〕

リツキシマブ誘発性 IR の発症に関連する FCGRT の遺伝子多型を同定した。サンプルサイズが小さいことによる偏りも考えられ、追加症例による再現性の確認が必要である。

072

Dengue virus 4 (H241 株) のゲノムクローニング

島袋 恵多 (学籍番号: 144166D)
指導教員: ○大野 真治
琉球大学大学院医学研究科ウイルス学講座

デングウイルスは主にネッタイスマカに媒介されてヒトに感染する。多くは不顕性感染に終わるが、デング熱やデング出血熱を発症することもある。現在、治療は対症療法のみで、ワクチンはない。

遺伝子組み換えデングウイルスの作成技術があれば、蛍光タンパク質を利用した体内感染拡大経路の特定や、ワクチン開発に応用することができる。これらの基盤となるウイルスゲノムのクローニングを行うのが本実験の目的である。デングウイルスには 4 つの血清型があるが、今回は血清型 4 型を用いた。

ウイルスストック液からキットを用いてデングウイルス RNA を回収し、Primescript II 1st strand cDNA Synthesis kit とデングウイルス特異的プライマー (NX-R-GSP) を用いて cDNA を合成した。PCR 法を組み合わせる複数の PCR 産物を繋ぎ合わせる Overlap Extension (OE)-PCR 法、相同組換えによる PCR 産物の連結反応、プラスミドへの段階的なクローニング法の 3 つの方法を試みた。

OE-PCR 法では、二つの PCR 産物を繋ぎ合わせる過程で、目的の大きさの PCR 産物を得ることができなかった。相同組換え反応を用いた方法では、予定していた 6 つの PCR 産物のうち、一つが増幅されなかった。段階的なクローニング法では 4 分割したウイルスゲノムの PCR 産物をプラスミドにクローニングでき、そのうちの 2 つを一つにまとめることができたが、想定していた制限酵素で切断できないなどの問題が生じ、期間内に全ゲノムを一つにまとめることができなかった。

OE-PCR 法と相同組換え反応でうまくいかなかった PCR は、ポリメラーゼの変更や条件検討を細かく行ったが改善しなかった。使用するプライマーを変更についても検討の余地がある。段階的クローニングについては、切断できなくなった制限酵素認識部位の配列確認が必要となる。

073

日本脳炎ウイルス（北京株）の
全長ゲノムクローニング

服部 春香（学籍番号：154137E）

指導教員：○大野 真治，只野 昌之，玉城 和美
琉球大学大学院医学研究科ウイルス学講座

【目的】日本脳炎ウイルスの全長ゲノムをクローニングし、感染性を持った遺伝子組換えウイルスを作る実験系を立ち上げることを目的とする。応用として、蛍光タンパク質発現ウイルスを作成し個体内感染経路の検討やワクチン開発を検討している。

【方法】市販のキットを用いてウイルス溶液から RNA の回収を行い、特異的プライマー（Gene specific primer）法で cDNA を合成した。ゲノムのクローニングには次の 3 つの方法を検討した：①全長ゲノムを 4 つに分割して PCR 増幅を行い、PCR 法を用いて 1 本に連結する Overlap Extension PCR 法、②市販の組換え酵素（NEBuilder アッセムブリー）を用いた PCR 産物連結法、③プラスミドへの段階的クローニング。PCR には高正確 DNA ポリメラーゼの KOD Plus Neo を用いた。

【結果】

- ① Overlap Extension PCR 法：ゲノムを 4 つに分割した PCR 産物を 2 本に連結することはできたが、最終的に 1 本にすることができなかった。
- ② 組換え酵素による PCR 産物連結法：ゲノムを 6 本に分割して PCR を行い、組換え反応を行ったが産物を用いたが、連結反応がうまくいかなかった。
- ③ 段階的クローニング：①の PCR 産物をそれぞれプラスミドにクローニングすることはできたが、一本にまとめるまで至らなかった。

【考察】いずれの方法でも、最初の PCR での増幅は成功したが、その後の過程が成功しなかった。アニーリング温度やサイクル数の変更、PCR に用いる DNA ポリメラーゼを変えるなど、実験条件の変更を検討してみるべきだと考えられる。日本脳炎には抗ウイルス薬がなく、対処療法とワクチンによる予防が主な対応法となる。今回の全長ゲノムクローニングを応用することでより良い治療法を開発できるかもしれない。

074

日本脳炎ウイルスの粒子形成における
E タンパク質セリン残基の重要性検証

又吉 貴也（学籍番号：154210K）

指導教員：○大野 真治
琉球大学大学院医学研究科ウイルス学講座

【背景と目的】日本脳炎ウイルス（JEV）はフラビウイルスの一種であり、ゲノム上には 3 つの構造タンパク質と 7 つの非構造タンパク質遺伝子をもつ。E タンパク質は構造タンパク質の 1 つであり、ウイルス粒子が受容体と結合したり、膜融合したりする際に重要な役割を果たす。フラビウイルス間で保存性の高い E タンパク質の特定の細胞質内セリン残基が高率にリン酸化を受けていることが予測プログラムによって示されたことから、このセリン残基が E タンパク質の構造・機能に深く関係しているという仮説を立てた。

【実験と結果】JEV の E タンパク質をコードする領域を含んだプラスミドを細胞へ導入すると、エンベロープタンパク質のみで構築される VLP（Virus-like Particle）が細胞上清中に出現する。野生型 E タンパク質と、セリン残基をアラニンに置換した変異体を用意し、それぞれの発現量、VLP 量、細胞内局在について比較・検討を行った。

E タンパク質の発現と VLP 量に関しては、サンプル取り違いの可能性があるものの、野生型と変異型のどちらにも 54kDa のバンドが見られ、両者間で大きな差は見られなかった。蛍光抗体法でも、同じく野生型と変異型で E タンパク質の局在に大きな変化は見られなかった。Phos-tag を用いたリン酸化の検討では、リン酸化タンパク質は非リン酸化タンパク質に比べて電気泳動の移動度が遅くなるが、両者間で大きな差は見られなかった。

【考察】野生型と変異体の間で、作られる VLP の量に差異が見られないこと、タンパク質の局在変化がないこと、同定したセリン残基がリン酸化されていなかったという結果より、JEV の E タンパク質における特定のセリン残基はタンパク質の発現や VLP の産生には関係していないと結論付けた。しかし、サンプル取り違いの可能性があることから、きちんとした結論を導き出すためには実験を繰り返す必要がある。

075

ゲノムワイド関連解析による
日本人アトピー性皮膚炎の
疾患感受性遺伝子領域の探索

城間 瑞萌（学籍番号：154184G）

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】アトピー性皮膚炎（Atopic Dermatitis: AD）は遺伝要因と環境要因により発症する。これまでにゲノムワイド関連解析（GWAS）により複数の AD 疾患感受性遺伝子座が同定されているが日本人のみを対象とした研究は少ない。そこで本研究では日本人を対象とした GWAS を行った。

【方法】National Bioscience Database Center が公開している研究データ [Research ID: hum0014.v6] より High-density oligonucleotide arrays (Perlegen 社) による遺伝型やアレル頻度、染色体上の位置などのデータを使用し、AD 患者を case (n=195)、その他 33 疾患を control (n=6,418) とした。Quality Control (QC) として、34 疾患のデータのうち Hardy-Weinberg 平衡試験の P-value が 1×10^{-6} 未満、疾患ごとのアレル頻度の標準偏差が 0.05 より大きい一塩基多型 (SNPs) を除外、さらに 15 疾患以上でデータがある SNPs を選択した。また、case では suspicious SNPs、control ではマイナーアレル頻度が 0.05 未満の SNPs を除外した。QC 後の SNP 数は 163,895 であった。関連解析には Cochran Armitage 検定、expression quantitative trait loci (eQTL) 解析には公共データベース上の GTEx を用いた。

【結果】ゲノムワイド水準 ($P < 5 \times 10^{-8}$) を満たす SNPs は得られなかったが、新規 AD 関連遺伝子座候補 ($P < 1 \times 10^{-4}$) を 13 領域 (19SNPs) 同定した。最も関連の強い SNP は 1 番染色体上、BRINP3 遺伝子のイントロン内の rs1540513 で、 $P = 1.7 \times 10^{-6}$ 、オッズ比 = 1.69、95% 信頼区間 1.36-2.10 であった。rs1540513 のリスクアレルと BRINP3 の発現量は皮膚組織において負の相関 ($P = 0.037$) を示した。

【結論】AD 疾患感受性遺伝子領域候補が複数同定された。いずれの SNPs もゲノムワイド水準には達していないことから、control から免疫疾患を除くなどのサブ解析、さらには独立した AD 集団を用いて検証を行うことが必要である。

076

ゲノムワイド関連解析による日本人脳梗塞の
疾患関連遺伝子座の同定

徳門 佳乃（学籍番号：154199E）

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】過去の疫学研究により脳梗塞発症には遺伝要因の関与が示されているが、その詳細は明らかではない。本研究では脳梗塞疾患関連遺伝子座を同定するために日本人集団を対象としたゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行った。

【方法】National Bioscience Database Center が公開している研究データ Research ID: hum0014.v6 より日本人脳梗塞患者 194 人 (case)、それ以外の疾患をもつ日本人患者 6,418 人 (control) の High-density oligonucleotide arrays (Perlegen Sciences 社) により決定された遺伝型のアレル頻度などのデータを得た。Quality Control (QC) として、ハーディ・ワインバーグ平衡試験の P-value が 1.0×10^{-6} 未満の一塩基多型 (SNPs)、疾患ごとのアレル頻度の標準偏差が 0.05 より大きい SNPs を除外し、15 疾患以上でデータがある SNPs を選択した。さらに case における suspicious SNP、control でマイナーアレル頻度が 0.05 未満の SNPs を除外した。QC 後の SNP 数は 153,764 であった。Cochran Armitage 検定を用いて、Case-control 関連解析を、また公共データベース GTEx を利用して、expression Quantitative Trait Loci (eQTL) 解析を実施した。

【結果】ゲノムワイド水準 ($p < 5.0 \times 10^{-8}$) を達成した SNPs は得られなかったため、 $P < 1.0 \times 10^{-4}$ である SNPs を疾患関連候補 SNPs として調査した。最も関連の強い SNP は 8 番染色体に位置する rs2201261 で、 $p = 4.11 \times 10^{-7}$ 、リスクアレルあたりの odds 比は 1.68、95% 信頼区間は 1.37-2.05 であった。eQTL 解析では rs2201261 の近傍に位置する ASPH の遺伝子発現はリスクアレルと正の相関を示した ($p = 0.017$)。

【結論】ゲノムワイド水準を超えて脳梗塞と関連する SNP は検出されなかったが、疾患関連候補 SNPs として rs2201261 をはじめとした複数の SNPs が同定された。同定された SNPs と疾患の関連を明らかにするためには、独立した case と control のサンプルを用いて検証を行う必要がある。

077

地域在住の高齢者における認知機能と血管機能の関連性

古謝 幸宏 (学籍番号: 154158H)

指導教員: ○波平 幸裕, 石田 明夫, 大屋 祐輔
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】超高齢化社会を迎える本邦において、認知症は今後より大きな問題になることが懸念され、その原因の解明およびより効果的な予防法の確立が急務となっている。【目的】健全な認知機能保持に関連する因子を探索する。【対象と方法】地域在住の80歳以上の高齢者(n=66, 解析時)を対象とし、生活基本調査や血液検査、血管機能検査、高次認知機能検査、MRI画像検査を施行し、その中で血管機能と認知機能の関連について横断的に、一部対象者については縦断的に検討した。【結果】横断的評価ではMobile-O-graphで測定された動脈スティフネスの指標である脈派伝達速度(pulse wave velocity, PWV)と認知機能に負の相関が見られた。歩行速度検査(Timed up & go test, TUGテスト)による歩行機能が高いほど認知機能が保たれていた。前者の有意差は年齢補正により消失したが、後者はそれが残った。その他測定した上腕動脈-足関節動脈波伝播速度(brachial-ankle PWV), Ankle Brachial Index, Reactive Hyperemia Peripheral Arterial Tonometry Indexなどの血管機能と認知機能との相関は認めなかった。【考察】今回の評価では認知機能に年齢が大きく影響していると考えられる。歩行機能と認知機能の関連については、運動機能と認知機能が低下する際にどちらに原因があったのかは不明である。今後、追跡調査などを通してそれらの関係を明らかにする必要がある。

078

外来通院中高血圧患者におけるカリウム摂取状況の調査

高橋 信之介 (学籍番号: 154170G)

指導教員: 仲程 舞衣, ○中村 卓人, 石田 明夫, 山里 正演,
古波蔵 健太郎, 大屋 祐輔
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: 高血圧の治療には生活習慣の改善が重要である。食事療法として食塩制限が最も注目されているが、腎機能障害(eGFR<45ml/min/1.73m²)がない場合、カリウム(K)摂取励行も重要である。高血圧予防のためのKの摂取目標は3,500mg/日だが、H27年度の国民栄養調査では成人のK摂取量は2,219mg/日と不十分である。一方で腎機能障害がある場合は高K血症を来し易く、K制限が必要になる。今回、高血圧患者でK摂取状況を調査し、食事指導を改善させる目的で本研究を実施した。

方法: 外来通院中の高血圧患者200人を対象とした。問診、身体所見、血液検査、尿検査と共に食事摂取状況の調査として簡易型自記式履歴質問票(BDHQ)および食塩やKに対する意識調査を行った。K摂取量は、随時尿中K排泄量を用いて推定した。

結果: エントリー症例100例の時点で中間解析を行った。7例はデータ不備のため除外した。BDHQ結果は未報告のため、今回は解析しなかった。腎機能障害がある群が70例、腎機能障害のない群が23例だった。推定K摂取量はそれぞれ1784mg/日、2033mg/日であり、腎機能障害の有無で有意差はなかった。病気と食塩の関連、病気とKの関連を知っている人はそれぞれ93%、55%であった。K摂取の制限を意識している群は推定K摂取量1638mg/日でK摂取を意識していない群2015mg/日と比較して有意に低値だったが、K摂取の増量を意識している群は2154mg/日でK摂取を意識していない群と有意差がなかった。

考察: 外来高血圧患者のK摂取量は国民栄養調査と同様に低値であった。Kの認知度は食塩の認知度と比べて低く、K摂取制限はK摂取の減量につながるもの、K摂取励行はK摂取の増量にはつながらなかった。今後、Kに関する啓発活動や有効なK摂取方法の検討を行う必要がある。

079

心血管イベントのバイオマーカーとしてのアキレス腱肥厚の有用性に関する横断的研究

新城 翔大 (学籍番号: 154178B)

指導教員: ○池宮城 秀一, 石田 明夫, 大屋 祐輔
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: アキレス腱肥厚は家族性高コレステロール血症の診断根拠として重要であり、家族性高コレステロール血症患者ではアキレス腱が厚いほど心血管イベントの発症リスクが高いことが報告されている。しかし、非家族性高コレステロール血症患者のアキレス腱肥厚に関する報告はほとんどない。今回、「非家族性高コレステロール血症患者でもアキレス腱が厚いほど動脈硬化が進行しており、心血管イベント発症のリスクが高い」という仮説を検証する。

方法: 2016年8月から2017年1月までの半年間に循環器疾患の精査加療目的に入院し、X線軟線撮影により両側のアキレス腱の厚さが測定可能であった連続140症例(男性88名

性52名)を対象として、①アキレス腱の厚さと心血管イベント、②アキレス腱の厚さと動脈硬化危険因子、高血圧、脂質異常症、喫煙、慢性腎臓病)との関連について評価した。

結果: 患者背景は平均年齢70歳、男性63%であった。心血管イベントの罹患率は虚血性心疾患68%、脳血管障害14%、末梢動脈疾患14%であった。動脈硬化危険因子の保有率は糖尿病41%、高血圧症82%、脂質異常症69%、慢性腎臓病55%、喫煙42%であった。

年齢とアキレス腱の厚さには相関が見られなかった。男性は女性に比べてアキレス腱が有意に厚かった(6.2±0.1mm vs 5.8±0.1mm p=0.0063)。虚血性心疾患、脳血管障害、末梢動脈疾患のうちいずれかの既往を持つ患者は既往が無い患者に比べてアキレス腱が有意に厚かった(6.2±0.1mm vs 5.8±0.1mm p=0.0163)。動脈硬化危険因子とアキレス腱の厚さには有意な相関は見られなかった。

結論: 今回の研究により、虚血性心疾患、脳血管障害、末梢動脈疾患といった心血管イベントとアキレス腱の厚さに有意な関連が見られたことによりアキレス腱の厚さは心血管イベントのバイオマーカーとなる可能性がある。

080

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL)の悪性度と末梢血リンパ球におけるCell adhesion molecule 1 (CADM1)発現との関連性

横田 雄太郎 (学籍番号: 154159F)

指導教員: ○玉城 啓太, 野村 育美, 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】Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL)はhuman T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I)に起因する予後不良な末梢血T細胞腫瘍である。Cell adhesion molecule 1 (CADM1)は正常リンパ球には発現せず、HTLV-I感染細胞とATL細胞に特異的に発現しており、flow cytometryを用いたATL細胞検出に用いられる分子マーカーである(Clin Cancer Res. 2014; 20: 2851-61)。ATL患者の末梢血リンパ球のCADM1陽性率や発現強度がATLの悪性度と相関する可能性を検討した。

【方法】ATL 11症例(急性型: 7例, 慢性型: 4例)の末梢血単核球を抗CADM1-FITC, 抗CD4-APC/Cy7で染色し、flow cytometryで解析した。リンパ球分画中のCD4⁺CADM1⁺細胞率(%positive cell; %PC)とCADM1のmean fluorescence intensity (MFI)を急性型と慢性型と比較した。

【結果】急性型%PC: 68.8%(95%CI, 47.1-90.5), 慢性型%PC: 91.7%(95%CI, 88.5-94.9)で両者に有意差は無かった(p=0.16)。一方、急性型MFI: 7055(95%CI; 4426-9684), 慢性型MFI: 4258(95%CI; 866-7650)で、MFIは急性型で高い傾向にあった(p=0.06)。

【考察】ATLの悪性度の指標としてCADM1の発現レベルが有用である可能性が示唆された。CADM1はATL細胞の臓器浸潤能の獲得に重要と考えられており(J Biol Chem. 2010; 285: 15511-22)、急性転化に伴う腫瘍細胞のCADM1発現増強が臓器浸潤能と関連する可能性が注目される。

081

肥満後に減量させたマウスの視床下部室傍核で変動する遺伝子の探索と機能的意義

田口 泰透 (学籍番号: 154148A)

指導教員: ○岡本 士毅, 興那嶺 正人, 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)

無理な減量を行うとリバウンドを来し易いが、分子基盤の詳細は明らかでない。標準体重マウス (Lean) に高炭水化物食と高脂肪食を同時に与えると高脂肪食を好んで摂食するが、一日絶食させると高脂肪食よりも高炭水化物食を好むようになる。この嗜好性の制御には視床下部室傍核 (PVH) の神経活動が深く関与している (Okamoto S et al, Cell Reports, 2018)。一方、高脂肪食による食餌性肥満マウス (DIO) では絶食後も高脂肪食を好むようになる。さらに DIO マウスを普通食によって減量させたマウス (WR) を一日の絶食後に自由摂食させると Lean マウスと同様に炭水化物嗜好性を示すが、総摂取カロリーは Lean マウスに比べ 10% 以上も増加しており、DIO マウスと同程度だった。DIO および WR マウスの PVH においては幼若神経細胞のマーカーである微小管関連タンパク質 doublecortin (Dcx) mRNA が 2 倍以上増加し、GABA 神経終末のミトコンドリアに局在する GABA 合成酵素 GAD65 の mRNA 発現は 5 倍以上増加していた。そこで肥満後の減量における摂食調節の脳内分子機構を探索する目的で二重免疫染色法を用いて Lean, DIO, WR それぞれの PVH における Dcx および GAD65 タンパク質の発現を解析した。Lean に比べ、DIO と WR マウスの PVH において、Dcx 陽性神経細胞数が 2 倍以上増加していた。また GAD65 発現も 2 倍以上増加しており、Dcx 陽性細胞の大半と共局在していた。以上の結果から、肥満時の PVH において、神経新生が生じ、新生した幼若神経細胞への GABA 神経の投射が増加している可能性が示唆された。肥満時に形成された新しい神経ネットワークが、急激な減量後に見られたリバウンドしやすき摂食調節に寄与する可能性が注目される。

082

ヒトと類人猿の皮膚における遺伝子発現の違い

井上 敢之 (学籍番号: 154200B)

指導教員: ○内海 大介, 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】実験動物として頻用されるマウスなど齧歯類と比べ、類人猿はヒトと進化的に非常に近縁であるが、皮膚に関しては形態学的に大きな差がある。例えばヒトの皮膚は類人猿のそれと比べて毛が少なく、皮膚は浅黒い。

【目的】ヒトと類人猿の皮膚の遺伝子発現解析を行い、皮膚の形態学的・機能的な違いを説明する遺伝子を探索する。

【方法】ヒト、チンパンジー、ゴリラ、オラウータンの次世代シーケンスデータを取得し、ソフトウェア STAR や edgeR を用いて遺伝子発現変動解析を行った。ヒトと類人猿の皮膚で発現量に有意な差があり、かつ他臓器よりも皮膚に強く関連する遺伝子を抽出した。特に、ヒトの皮膚に有意に高発現かつ重要と考えられた 2 つの遺伝子 *SOX10*, *CD207* に着目した。前者はメラノサイトのメラニン産生に中心的な役割を持ち、後者はランゲルハンス細胞に特異的に発現する。*SOX10* と *CD207* の免疫染色を行い、ヒト・ゴリラ・ヒヒの皮膚中のメラノサイトとランゲルハンス細胞数を数えた。フォンタナマッソン染色を行い、皮膚におけるメラニン分布を確認した。各動物種の表皮の厚さを測定した。

【結果】遺伝子発現解析によると、*SOX10* と *CD207* はヒトに有意に強く発現していた。免疫染色では、ヒト皮膚には *SOX10* 陽性メラノサイトが有意に多く観察され、*CD207* 陽性ランゲルハンス細胞が有意に多く観察された。フォンタナマッソン染色では、ヒヒに比べてゴリラとヒトの皮膚にはメラニンが豊富に観察された。ヒヒとゴリラに比べてヒトの表皮は厚かった。

【考察】ヒト皮膚は進化の過程で毛を失い、外界に対する防御の必要性が高まった。ヒトは *SOX10* の発現を高めてメラニンを大量に合成して紫外線への防御能を獲得するとともに、*CD207* の発現を高めて免疫学的な防御能を獲得した。また、毛の喪失に伴う物理的な防御機構の必要性から皮膚の肥厚化が進んだと思われる。

083

PRKAR1A のヘテロ接合変異によるカーニー複合の発症機序の理解

上間 道仁 (学籍番号: 154149J)

指導教員: ○山口 さやか, 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

はじめに: カーニー複合 (Carney complex) は、粘液腫、皮膚の色素斑、内分泌機能亢進を合併する疾患で、このうち 2 つ以上の症状の存在により臨床的に診断される多発性腫瘍症候群である。クッシング症候群、先端肥大症、女性性乳房、思春期早発症、内分泌腫瘍など内分泌疾患の合併も多い。原因遺伝子座位として、17q2 (Carney complex type 1) と 2p16 (Carney complex type 2) との連鎖が示唆され、Carney complex type 1 の原因遺伝子として *PRKAR1A* が同定されている。

目的: 右大腿部の腫瘤を主訴に来院した患者の既往歴からカーニー複合を疑った。患者および患者家族について、カーニー複合の原因遺伝子 *PRKAR1A* について検討する。

方法: 患者および家族の末梢血リンパ球、粘膜組織より DNA を抽出し、PCR 法、ダイレクトシーケンスにて、*PRKAR1A* の全翻訳領域の塩基配列を決定する。患者皮膚について、リアルタイム PCR を用いて *PRKAR1A* の mRNA の発現を調べる。

結果: 患者由来の *PRKAR1A* のエクソン 5 のアレルの 1 つで、491 番目のチミンと 492 番目のグアニンが欠失 (c.491_492delTG) し、フレームシフトが生じた結果、ストップコドンとなっていた。患者父は乳腺腫瘍の既往があったが、同じ変異はなかった。リアルタイム PCR では、*PRKAR1A* の患者皮膚由来 mRNA は、健常人の皮膚の約半分に発現が低下していた。

考察: 患者の遺伝子検査から Carney complex type I と診断した。患者父は同じ変異が無く、カーニー複合の孤発例と考えた。患者皮膚での *PRKAR1A* の mRNA 発現が半減しており、プレターミネーションコドンをもつ mRNA が nonsense-mediated mRNA decay で排除されたことを示唆する。

084

Prognostic significance of ALDH2 expression level in human melanoma

北野 貴之 (学籍番号: 154217G)

指導教員: ○藤田 真由美^{1,3)}, Aik-Choon Tan²⁾, 高橋 健造⁴⁾¹⁾ Department of Dermatology, University of Colorado²⁾ Department of Medicine, University of Colorado³⁾ Denver Veterans Affairs Medical Center⁴⁾ Department of Dermatology, University of the Ryukyus

近年、がん特異的に発現している酵素を特定し、これを低分子化合物により阻害する治療法が注目を集めている。ヒトの悪性黒色腫 (メラノーマ) を初めとする様々な癌で、ALDH が特異的に発現する事が知られている。ALDH は毒性物質のアルデヒドを酸化分解する酵素である。本研究では、多様な ALDH 同位体の発現と、メラノーマ患者の予後の関係について解析した。ALDH には 19 の同位体が存在する。ヒトメラノーマ腫瘍組織においては、Aldefluor で特定可能な 7 つの同位体のうち、ALDH1A1 と ALDH1A3 の発現量が顕著に亢進しており、アルコール代謝に関係している ALDH2 は低下していることが明らかとなった。以下に ALDH2 の発現に関して解析を続けた。

ALDH2 の発現量が高い患者群と低い患者群間で予後を比較したところ、発現量が高い患者の方が、予後が悪いということが分かった。この理由を理解するために、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データを Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) へ入力し、遺伝子発現のビッグデータ解析を行った。

解析の結果、ALDH2 の発現量が高い患者群では、免疫応答に関わる 6 つの分子経路が活性化されていることが分かった。一方、ALDH2 の発現量が高い患者検体では腫瘍増殖に関わる分子経路が活性化されていた。

免疫に関わる分子経路が腫瘍組織自体で活性化されているのか、周囲の非腫瘍組織で活性化されているのかを知るために、それぞれの腫瘍の純度を調べ比較した。その結果、ALDH2 の発現量が高い患者群の組織検体の方が、腫瘍細胞自体の純度が低く、腫瘍免疫に関わる分子経路が、腫瘍周囲の組織で活性化されている可能性の方が高いことを示唆された。さらに ALDH2 の発現量の違いにより、どんな種類の免疫細胞の浸潤に差が生じるのかを知るために、先行研究で定義されている各免疫細胞の組織への浸潤スコアを本研究にも適用することで、27 種類の免疫細胞の存在を比較検討した。その結果、T 細胞、Tfh, Th1, 樹状細胞, マクロファージ等の 13 種類の免疫細胞が、ALDH2 の発現が高い患者群で有意に多かった。

085

琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科を受診した下顎骨後方移動術後の顎顔面形態の変化に伴う咽頭気道形態、および舌骨位置の評価

上原 ゆうか (学籍番号: 154130H)
指導教員: ○片岡 恵一¹⁾, 新崎 章²⁾

¹⁾ 琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科

²⁾ 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】下顎骨後方移動術に伴い、咽頭気道の狭窄や舌骨の後下方への位置移動が起こることが知られている。さらに術後の合併症として咽頭気道の狭小化により睡眠時無呼吸症候群 (OSAHS) などの呼吸障害を起こす可能性があり、考慮する必要がある。今回われわれは、顎顔面形態の変化に伴う咽頭気道形態、および舌骨位置の変化を評価し比較検討したので報告する。【方法】当科を受診し、顎変形症と診断され下顎枝矢状分割術 (sagittal split ramus osteotomy, 以下 SSR0) を施行された骨格性下顎前突症患者 13 名 (男性 6 名, 女性 7 名, 年齢 17 歳 ~ 44 歳) である。検討項目は側面頭部 X 線規格写真を用い、1) 水平距離, 角度, 軟部組織, 2) 舌骨位置 3) 咽頭気道径の計測を行った。また、3D シミュレーションソフト (Dolphin imaging, 株式会社ジーシーオールソリー) にて 4) 咽頭気道体積を計測した。【結果】1) 術後、下顎骨は有意に後方に下がった。下唇は有意に後方へ移動した。2) 術前後において、 $\angle NSH2$ は有意な増加があった。 $\angle H1C3H2$, $\angle NSH1$, C3-H1, C3-H2 は有意な差はなかった。3) 術後、咽頭気道径は有意に減少した。4) 術後、咽頭気道体積は有意に減少した。【考察】下顎骨後方移動術によって、下顎骨は有意に後方に下がった。術後、咽頭気道は有意に狭窄すると考えられる。舌骨は後下方に移動する傾向があり、これは、舌骨上筋群が弛緩し、相対的に舌骨下筋群の牽引力が強くなったためと考えられる。咽頭気道径と咽頭気道体積の結果はいずれも有意に気道が狭窄することを示したが、関連性は認められなかった。術後、咽頭気道が狭小化すると OSAHS の発症リスクも増加すると考えられる。

086

三次元画像から再構成した側面頭部エックス線写真を用いた現代琉球人の顎顔面形態の特徴について

川端 惇也 (学籍番号: 154190B)
指導教員: ○片岡 恵一¹⁾, 新崎 章²⁾

¹⁾ 琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科

²⁾ 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】コーンビーム CT (CBCT) からソフトウェアを用いてセファロを再構成し、現代の琉球諸島の集団における顎顔面形態の特徴について、他の集団のデータとの比較を行った。また、外胚葉の形態に関与し、アジア特有の髪の毛の厚みや歯の形質と関連のある EDAR 1540C の一塩基多型と顎顔面形態の関連についても検討し、顎顔面形態の地域性と遺伝学的な要因を同定することを本研究の目的とした。【方法】琉球諸島に由来をもち、研究への同意が得られた患者 30 名 (男性 15 名, 女性 15 名, 平均年齢 21.7 歳) で、EDAR T1540C の祖先型ホモ (T/T)、派生型ホモ (C/C)、ヘテロ (T/C) を男女各 5 名が有したもので検討を行った。ソフトウェア (Dolphin imaging, 株式会社ジーシーオールソリー, 日本) を用いて CBCT のセファロへの再構築を行い様々な硬組織の角度、軟組織の角度、軟組織の距離を計測した。【結果】琉球男性と全国男性平均値を比較したところ、Y axis (SGn-FH), U1-FH, UL-Protrusion が $\pm 1S.D.$ を超えていた。沖縄女性の場合は、Gonial angle, U1-FH, Nasolabial angle で $\pm 1S.D.$ を超えていた。琉球男性と女性を比較すると、Ramus angle と Mental angle で有意差が認められた。EDAR のアリルでの比較では有意に IMPA, Facial convexity で T/T 群が C/C 群に比べて小さかった。【考察】琉球の女性は全国女性平均と比べ鼻尖の後方位で、切歯、上唇の前方位が認められた。琉球の男性は、全国男性平均と比べオトガイの後方位、下顎切歯、上唇の前方位が認められた。沖縄の男女間の比較では、男性で有意に Ramus angle, Mental angle が小さかった。これは女性に比べ男性は咬合力が大きく咀嚼筋の牽引力で下顎枝が前方位をとっているためと推測される。EDAR T1540C のアリル比較において、本研究では C/C 群は T/T 群に比べ下顎骨の前方突出と下顎切歯の舌側傾斜がみられたため、過去の報告にあるようにオトガイの形態との関連が示唆された。今後さらに症例数を増やし、現代琉球人の顎顔面の形態と、顎顔面形態形成に影響を与えると考えられる遺伝子の作用を調べる必要がある。

087

沖縄県の離島における津波に対する災害脆弱性評価

伊志嶺 朝哉 (学籍番号: 154198G)
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: 石垣島をはじめとする離島の多くは周りが海で囲まれており海拔が低い。津波に対する災害対策の評価が必要であると考えた。沖縄県の離島における津波災害発生時の被害や発生する可能性を推察し評価することで防災対策に役立つ指標を作成する。

方法: 沖縄県の資料や過去の災害の例から Hazard Vulnerability Analysis (HVA) という災害評価基準を用いて災害を 3 つの項目ごとに定量的に評価する。Probability (可能性) は 0 ~ 3 の 4 段階, Risk (危険性) を 1 ~ 5 の 5 段階, Preparedness (準備) を 1 ~ 3 の 3 段階で評価し、この 3 つの点数を掛け合わせた値 (0 ~ 45) で災害脆弱性を評価する。この値が大きいほど災害脆弱性も大きいと判断できる。

結果: Probability: 2 Risk: 5 Preparedness: 2 (計 20)

考察: Probability: 沖縄県の周囲では津波被害は無いものの、震度 5 以上の地震が 2000 年, 2004 年, 2010 年とやや高頻度で起こっており、与那国島周辺では 30 年以内にマグニチュード 7.8 の地震が発生する確率が 30% とされている。また、過去には遠方の地震による津波の被害もあることから、津波の発生する可能性は低いとはいえない。よって、Probability は 2 とした。

088

沖縄県における土砂災害に対する災害脆弱性評価

檜原 せりあ (学籍番号: 144125G)
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】沖縄県における災害時の脆弱性について、定量的に評価する。主に沖縄県中南部に分布する島尻層泥岩は降雨により脆弱化しやすく滑りやすい。沖縄県では梅雨や台風など豪雨を伴う自然災害が多い。また、県土が狭いうえに、平地部では駐留軍用地が占有していることから地形条件の悪い丘陵地や急傾斜近くまで、住宅や老人ホーム等の各種施設の立地が進行しており、そのため、大雨による土砂災害が毎年のように発生している。これらの状況を踏まえて、沖縄県における土砂災害の過去の被害や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つ指標となる。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ほど災害に対する脆弱性が大きいと判断する。

【結果】Probability: 3 Risk: 5 Preparedness: 3 合計: 45

【考察】Probability について、沖縄県には本島中南部を中心に多数の地滑り危険箇所、土砂災害警戒区域が指定されている。また、沖縄県には土砂災害の引き金となる豪雨が多い。さらに沖縄県も震度 5 以上の地震による斜面崩壊の可能性が指摘されている。以上より 3 とした。

Risk について、大規模な土砂災害が同時多発的に発生した場合、特に被害の大きい老人ホーム等の施設が傾斜地に集中している。よって 5 とした。Preparedness について、技術的な課題や費用の問題により、ハード面での整備が急速には進まない状況である。一方、ソフト面の対策の必要性が提唱されているものの、現段階ではまだ不十分である。沖縄県では平成 29 年 3 月に県全体の災害時医療マニュアルは策定されたが、各拠点病院での被災時マニュアルの整備は遅れている。以上を踏まえて 3 とした。

089

HVAを用いた沖縄県における Mass Casualty Incident (trauma) に対する脆弱性評価

又吉 純哉 (学籍番号: 154189H)
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・方法 沖縄県で大規模災害が起きた時の mass casualty incident (trauma) に対する脆弱性を Hazard Vulnerability Analysis (以下 HVA) を用いて定量的に評価し、どれだけ脆弱性があるのかを考察し、災害対策の一助とする。方法としては災害脆弱性を定量的に評価できる HVA スケールを用いた。HVA では災害を Probability, Risk, Preparedness の 3 つの観点に分けそれぞれ 4 段階, 5 段階, 3 段階で評価した。

結果・考察 Probability: 2 点, Risk 5 点, Preparedness 3 点 積: 30 点
以下各項目の考察

沖縄県周辺には多数のプレートがあること、今後 30 年以内に起こるとされる南海トラフの被害予想地域に入っていることから大規模な地震が起こる可能性は低いと判断するのは危険である。よって Probability (可能性) を 2 点とした。沖縄県全体の問題として①島嶼のため、島外との運輸と物流は空路や海路に限られること②電力、石油、ガス等の燃料、上下水道の主要な施設が海岸低平地に立地していること③主要道路網も海岸低平地の区間が多いことがある。これら 3 つの問題点により大規模災害発生直後大規模な混乱が生じ、災害時の急性期医療の大きな妨げになる。よって Risk (危険性) を 5 点とした。沖縄県は大規模災害の際に関係機関が相互に連携協力できるような沖縄県災害医療マニュアルを作成している。しかし Risk の項目にあげた①②③の問題の根本的解決には至っていない。よって Preparedness を 3 点とした。

091

Benzodiazepines の使用と Alzheimer Disease 発症との関連性に関する システムティックレビュー

仲地 政也 (学籍番号: 154193F)
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

概要

睡眠薬や鎮静剤 (麻酔)、抗不安薬、精神安定剤など幅広い用途で用いられる Benzodiazepine (以下 BZD) 系薬剤について、Alzheimer Disease (以下 AD) の発症との関連性がないかシステムティックレビューを行った。

方法

1995 年 8 月から最近までのオンラインで検索可能な論文を PubMed を用いて検索した。PubMed を用いて文献検索を行う際に以下の MeSH 用語を用いて検索を行った。

- ① "Alzheimer Disease" [MeSH] AND "Benzodiazepines" [MeSH]
- ② "Alzheimer Disease" [MeSH] AND "Hypnotics and Sedatives" [MeSH]
- ③ "Alzheimer Disease" [MeSH] AND "Anti-anxiety agents" [MeSH]
- ④ "Alzheimer Disease" [MeSH] AND "Tranquilizing agents" [MeSH]

加えて、"language English", "Humans", "Full text available" でフィルター検索をかけた。

結果

PubMed を用いて文献検索を行なった結果、MeSH 用語のみの検索で合計 1,190 件の論文が特定され、上記のフィルターをかけて合計 807 件の論文が特定された。ここから、今回調べたい内容に的確かどうかを実際に論文を読んで判定した。これにより、最終的に必要な論文を特定した。特定した論文については表にまとめたのでポスターに記載、後日提示する。今回該当した論文は(1)AD 患者における BZD 処方頻度、(2)認知機能に対する BZD の効果、(3)AD 患者における BZD 使用による BPSD、睡眠障害の 3 つのカテゴリーに分けることができ、それぞれのカテゴリーで考察を行った。

考察

今回の解析では研究期間やサンプル数にばらつきがあったが、基本的に BZD が AD との関連の前に高齢者に対して転倒や認知機能の面から見ても潜在的に不適切な薬物であることがわかった。

090

インフルエンザにおける 麻黄湯の有効性と安全性

前原 大毅 (学籍番号: 144173G)
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: インフルエンザにおける治療薬としてオセルタミビル (タミフル) やザナミビル (リレンザ), イナビル (ラニナミビル) が使われるが、漢方薬である麻黄湯もよく処方されている。

目的: 前 3 者と違い抗ウイルス剤でもない漢方薬である麻黄湯が保険適応となっており、その有効性、安全性について十分なエビデンスがあるのか関心があり調査した。

方法: インフルエンザにおける麻黄湯の有効性について "influenza" AND "maoto" のキーワードを用いて Pubmed と Cochrane Library で論文検索を行い、最新のレビューを検索し参考文献から主要論文を見つけるという backward citation searching を行った。関連する主要な論文は 4 つあり、それらを比較して麻黄湯の効果や他の治療薬との治療効果の違いを明らかにした。

結果: ランダム化比較試験は 2 編、前向き観察研究は 2 編であった。オセルタミビルは 1 歳未満の乳幼児において、安全性が確立されていないため使用することができないが、麻黄湯は乳幼児においても処方することができ、成人におけるオセルタミビル、リレンザ、麻黄湯の投与比較実験において、麻黄湯による筋肉痛、関節痛、発熱などといったインフルエンザの症状に対して、より和らげる効果があるとわかった。治療薬としての効果も他の薬と比較してもほぼ同等の効果があることが実証されていた。

考察: 抗インフルエンザ薬と比較しても有効性が劣っておらず、乳幼児にも使用できるといった安全性が非常に高い薬剤であることが分かった。また、抗インフルエンザ薬とも併用できるため、処方メリットは大きい。しかし、いずれも小規模な研究であり、その有効性についてはより大規模なランダム化比較試験での検証が必要と考えられる。

092

アセトアミノフェンは血圧を上昇させるのか?

林 侑里 (学籍番号: 154202J)
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

非ステロイド系抗炎症薬 (Non steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) が血圧を上昇させたり、血圧コントロールを妨げることはよく知られているが、その一方でアセトアミノフェンは血圧上昇作用や血圧コントロールを妨げる作用を持たないと考えられてきた。しかし、今日のいくつかの観察研究やランダム化比較試験ではアセトアミノフェンも NSAIDs と同様に血圧上昇作用を持つ可能性が示唆されている。

目的

アセトアミノフェンと血圧に関する文献を検索し、網羅的にレビューを行った。

方法

検索エンジンは Pubmed, Google scholar, web of science を使用し、検索ワードとしては、acetaminophen and drug induced hypertension, acetaminophen and blood pressure, NSAIDs and hypertension を使用した。なお NSAIDs のみの血圧に関する作用については個々の論文ではなくシステムティックレビューあるいはメタ解析を参照した。観察研究 6 及びランダム化比較試験 4 つが存在した。

結果と考察

文献検索の結果、アセトアミノフェンと高血圧発症に関する 7 つのコホート研究と血圧を評価項目としたアセトアミノフェンとプラセボを比較した 4 つのランダム化比較試験が存在した。しかしアセトアミノフェンと高血圧発症に関しても、アセトアミノフェンの血圧上昇作用に関しても一貫した結果は得られておらず、アセトアミノフェンが血圧を上昇させるか、高血圧発症のリスクをあげるかについては明らかではない。臨床試験はデザインがかなり異なることから統合的解析は不可能であった。

093

ALL 患者へのフォローアップ治療としての 骨髄移植の比較検討

國吉 真斗 (学籍番号: 154128F)
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

ALL 患者への化学療法後の寛解治療として骨髄移植は、臍帯血移植や末梢血幹細胞移植と比べどのような差があるのか不明である。また骨髄移植でも自家移植や他家移植があり、これも有益性や有害事象にどのような違いがあるのかははっきりしない。

目的

ALL 患者への骨髄移植と他の寛解治療との比較試験と、ALL 患者への骨髄移植での自家移植、他家移植の比較試験を論文検索しまとめ、現状の ALL 後のより良い治療法を文献的に検討した。

方法

同一の検索ワード“Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma” AND “Bone marrow transplantation”を用いて PubMed と Cochran library のそれぞれで検索を行った。

PubMed (Trialのみ) ヒット数 325 件

Cochran library ヒット数 94 件

そのうち共通した主要な文献から 4 件を抽出し評価を行った。

臍帯血移植に関しては ALL での骨髄移植との比較研究は見つけられなかった。

結果

骨髄移植は臍帯血移植や末梢血幹細胞移植と比べ好中球と血小板の回復を早め、慢性 GVHD の発症率を下げる、というメリットは共通で報告されており、その中でも一つの論文では入院期間の短縮も報告されていた。しかし、生存率は他の方法と変化しない、急性 GVHD や治療関連死に関しては他の方法が良いという報告もあった。

考察

今回の結果から、ALL に関する治療法は利点、欠点がそれぞれあり、必ずしもどの方法が良いと断言はできなかった。同種移植、自己移植に関してもそこまでの差は認められなく、造血幹細胞移植は患者の状態、要望、そのときの背景からどうするかを決めるのが現時点では最適であると考えられる。しかし、骨髄移植と臍帯血移植の直接的な比較研究がないように、ALL 単独での治療法比較研究は非常に少ないのが現状であった。

094

両親の離婚および自閉スペクトラム症が 摂食障害の気質・性格傾向に及ぼす影響

酒井 雅史 (学籍番号: 154144H)
指導教員: ○甲田 宗良, 外間 宏人, 三原 一雄, 近藤 毅
琉球大学大学院医学研究科精神病態医学講座

【問題と目的】摂食障害 (Eating disorders: ED) の精神科治療は、精神療法や環境調整が主体であり、気質・性格などのパーソナリティを精査し、個別対応が必要である。ED の発症は、家庭環境要因が指摘され、両親の離婚や不和を経験する者が多い (大場ら, 2002)。こうした経験のパーソナリティ形成への影響は十分想定される。また近年、典型的でない病態の ED 患者には、自閉スペクトラム症 (ASD) が合併しているとの報告がある。そこで本研究では、ED 患者のパーソナリティにおける幼少期の両親の離婚歴や ASD の合併が及ぼす影響について検討した。

【方法】

1. 指標: 気質・性格評価は、TCI (木島ら, 1996) と TEMPS-A/MPT (Matsumoto et al., 2005) を用いた。

2. 対象者: TCI の比較では ED 患者 57 名 (両親の離婚歴あり=41 名, ASD 合併=10 名), TEMPS-A の比較では ED 患者 35 名 (両親の離婚歴あり=26 名, ASD 合併=2 名) を対象とした。健常対照群 (Control) は、ED 患者と年齢・性別を適合させたサンプルを抽出した。

3. 手続き・倫理的配慮: 口頭および紙面による説明を行い、書面による同意を得て、指標の回答を求めた。

【結果と考察】各指標とも、両親の離婚歴 (ASD 合併) ありー無しー Control の 3 群比較 (分散分析) を行った。その結果、両親の離婚歴や ASD の合併がある ED 患者は、必ずしも損害回避が高くなく、よりスピリチュアルな傾向が強かった。

以上の結果より、両親の離婚歴あるいは ASD を合併する ED 患者は、ある程度不安に耐える力を有し、現実離れた考え方をしやすいパーソナリティを特徴とする。よって、不安耐性を治療への能動的な参加に活用し、現実的な問題解決策を構築する治療が有効だろう。

095

自閉スペクトラム症の気質・性格特性の検討 —併存疾患のリスクと高める要因に焦点を当てて—

松本 菜月 (学籍番号: 154152J)
指導教員: ○甲田 宗良, 外間 宏人, 三原 一雄, 近藤 毅
琉球大学大学院医学研究科精神病態医学講座

【問題と目的】自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder: ASD) は、コミュニケーションや人間関係に困難を抱えたり、生活に支障を及ぼすほどの強いこだわりを特徴とした発達障害である。ASD 者は他者や環境に合わせる事が苦手であり、不適応や他の精神疾患の併存をきたしやすい。気質・性格の詳細な評価は、ASD 者のどのような人格特性が、精神疾患の併存に関与するのかを解明できるだろう。本研究では、ASD 者の気質・性格特性を明瞭に描出すべく、健常対照群 (Control) との比較および併存疾患の有無ごとの比較を行った。

【方法】

1. 指標: 気質・性格評価は、TCI (木島ら, 1996) と TEMPS-A/MPT (Matsumoto et al., 2005) を用いた。

2. 対象者: TCI の比較では ASD 者 24 名、TEMPS-A/MPT の比較では別の ASD 者 18 名を対象とした。Control 群は、各指標とも ASD 者と年齢・性別を適合させたサンプルを抽出した。

3. 手続き・倫理的配慮: 口頭および紙面による説明を行い、書面による同意を得て、指標の回答を求めた。

【結果と考察】ASD 者と Control の各指標を比較した結果、ASD 者は、新奇性追求、報酬依存、自己志向性、協調性、焦燥気質が低く、自己超越性、不安および抑うつ気質が高かった。次に、併存疾患を有する ASD 者は、有しない ASD 者、Control を比較した結果、併存疾患を有する ASD 者は、有しない ASD 者よりも自己志向性が有意に低かった。以上より、ASD 者は、変化を好まず、感情に流されにくく、独自の価値観を持つ性格と推察される。また、不安や抑うつを抱えやすく、自信が無く、この傾向が強いと、他の精神疾患を併存しやすいことが示唆された。ASD 者の精神疾患の併発予防には、独自の価値観を活用した自己効力感向上を志向したアプローチが有効かもしれない。

096

双極性障害における希死念慮・自殺企図と 気質・性格の関係とは?

沢岬 夏海 (学籍番号: 154154E)
指導教員: ○甲田 宗良, 外間 宏人, 三原 一雄, 近藤 毅
琉球大学大学院医学研究科精神病態医学講座

【問題と目的】双極性障害 (Bipolar disorder: BD) の自殺リスク評価・対策において、気質・性格評価が有用とされる。Anamarijia et al. (2017) は、自殺企図歴のある BD 患者の気質・性格は、不安が強く、持続力、好奇心、自己肯定感、協調性が低いと示している。本研究では、自殺企図歴の有無に加えて、希死念慮の有無においても、気質・性格が異なるのかを検証した。また、気質・性格が希死念慮や自殺企図の有無をどの程度予測するかも検証した。

【方法】

1. 指標: 気質・性格評価は、TCI (木島ら, 1996) と TEMPS-A/MPT (Matsumoto et al., 2005) を用いた。

2. 対象者: TCI の比較では BD 患者 56 名、TEMPS-A/MPT の比較では別の BD 患者 51 名を対象とした。健常対照群 (Control) は、各指標とも BD 患者と年齢・性別を適合させたサンプルを抽出した。

3. 手続き・倫理的配慮: 口頭および紙面による説明を行い、書面による同意を得て、指標の回答を求めた。

【結果と考察】各指標とも、希死念慮/自殺企図ありーなしー Control の 3 群比較を行った結果、BD 患者と Control との間には複数の気質・性格指標で有意差を認めた。希死念慮の有無間では有意差はなく、自殺企図の有無間では、TCI の自己志向が、自殺企図ありの方が有意に低かった。

次に、気質・性格指標を独立変数、希死念慮/自殺企図の有無を従属変数とした重回帰分析を行った結果、TCI の損害回避および自己志向の自殺企図に対する負の影響が有意であった。

以上の結果より、自己肯定感の低さが自殺の行動化を引き起こすと考えられる。早期の寛解導入や自尊心回復を志向した精神療法などが必要だろう。また、失敗や困難を恐れないう傾向が自殺企図を促進することから、衝動性やリスク親和性が顕在しないよう、人的・社会的保護因子を手厚くすべくだろう。

097

体外循環時間と溶血量の相関について

清水 直貴 (学籍番号: 154188K)

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

[目的]

開心術の際には、心内操作を行うために人工心肺装置を用いた体外循環を必要とする。

体外循環は非生理的な循環環境であるため溶血をきたし、腎機能に影響を与えることが危惧されている。本研究では開心術における体外循環時間と溶血量の相関について検討し、また溶血の程度と周術期の腎機能の変化について検討した。

[対象および方法]

対象は平成 29 年 12 月～2 月の間の開心術連続 19 症例とした。体外循環を用いなかった症例は 2 例 (コントロール群) で、体外循環を用いた症例は 17 例 (術式内訳: 胸部大動脈瘤切除術 5 例, 大動脈弁置換術 5 例, 大動脈弁形成術 3 例, 僧帽弁・三尖弁置換術 4 例) であった。

体外循環開始時点での血漿遊離ヘモグロビン (PF-Hb) 値を測定し、その後 30 分経過毎に同項目を測定した。連続 19 例の体外循環時間 (コントロール群の 2 例は体外循環時間を用いていない) と溶血量の相関について調べた。また、手術前後 (手術前, 術直後, 術 2 日後, 術 3 日後, 術 7 日後) の CRE 値を測定し、溶血の程度と腎機能への影響について検討した。

[結果]

開心術における体外循環時間と溶血量について高い正の相関を認めた ($r^2=0.93, p<0.001$)。

術式別でみると、溶血の程度が高い群は胸部大動脈瘤手術、僧房弁・三尖弁手術、大動脈弁手術の順であり、術式によって溶血の程度が異なる傾向を認めた。

溶血の程度と腎機能障害についてその傾向を認めたが、相関は示せなかった。

[結語]

体外循環時間と溶血量について正の相関が示された。溶血量と腎機能障害について相関は認めなかった。

098

開心術時における体血管抵抗および血管径の変化に関する検討

川満 彰吾 (学籍番号: 154151A)

指導教員: 喜瀬 勇也¹⁾, 兼城 悠司²⁾, 國吉 幸男¹⁾¹⁾ 琉球大学大学院 医学研究科 胸部心臓血管外科学講座²⁾ 琉球大学医学部附属病院 ME センター

[目的]

体外循環を用いた開心術では定常流、低体温と非生理的な循環環境であるが、その際の臓器灌流を担う血管の反応性については不明確な事項も多い。本研究では体外循環使用時の体血管抵抗および血管径の変化について検討した。

[対象と方法]

体外循環を用いた開心術連続 12 症例。術式内訳は大動脈瘤切除術 5 例, 大動脈弁置換術 5 例, 僧房弁形成術 2 例。

測定手順

1. 麻酔導入時から手術終了まで 1 分間隔で平均動脈圧と心拍出量を測定し (A) 式を用いて体血管抵抗値 (SVR) を算出した。
2. 麻酔導入後 10 分間の SVR の平均値を基準とし、手術時間全体と体外循環前、完全体外循環時、体外循環終了後それぞれの SVR の変化率を算出した。
3. 鼓膜温から血液粘性 η の変化率を算出し、SVR と血液粘性の変化率からポアズイユの式を用いて血管収縮・拡張による血管径の変化率をもとめた。
(A) $SVR(\text{dyne} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2) = \{\text{MAP}(\text{mmHg}) / \text{CO}(\text{L}/\text{min})\} \cdot 79.92$
(SVR: 体血管抵抗, MAP: 平均動脈圧, CO: 心拍出量 (SG データ, 体外循環中は人工心肺流量))

[結果]

手術時間全体において、SVR 値は基準値の 0.50 倍～1.78 倍、血管径は 0.89～1.21 倍の変化が見られた。体外循環前中後において、SVR 値はそれぞれ基準値の 0.64～1.51 倍, 0.61～1.47 倍, 0.63 倍～1.57 倍、血管径は基準値の 0.93～1.13 倍, 0.97～1.20 倍, 0.92～1.14 倍の変化が見られた。

[結語]

開心術時の体血管抵抗値の変化率は大きく、これは手術侵襲に対する生体反応、体外循環や麻酔薬、循環作動薬の影響を受けた結果だと思われる。

血管径の変化率には体外循環使用による有意な差はみられなかったことから、体外循環による低体温・定常流の非生理的な循環環境でも、血管径としては生理的な状態を維持することができていたと考えられた。

099

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～軟膜によるバリアか?～

川満 桐 (学籍番号: 154168E)

指導教員: 〇神里 興太, 垣花 学

琉球大学大学院医学研究科麻酔科学講座

近年、軟膜下投与方法 (軟膜下) が報告され、新たな高効率遺伝子導入法として注目されるが、薬物投与方法としての効果は不明。臨床的に用いられている脊髄も膜下投与 (IT) と軟膜下投与をラット疼痛モデルと比較した。

方法:

薬物投与は以下の 3 つの方法で行った (各群 $n=4$, 総量は全て $10 \mu\text{L}$)。

- ・IT 群: 大後頭孔よりカテーテル (8.5cm) 挿入。5 日後にモルヒネ投与 (投与量 $0 \mu\text{g}$, $0.001 \mu\text{g}$, $0.003 \mu\text{g}$, $0.01 \mu\text{g}$)。
 - ・軟膜下群: 腰部椎弓切除術にて脊髄を露出し、軟膜下注入針 (35G 鈍針) 挿入。鈍針からモルヒネ投与 (投与量 $0 \mu\text{g}$, $0.03 \mu\text{g}$, $0.1 \mu\text{g}$, $0.3 \mu\text{g}$ ($\times 10^{-3}$))。
 - ・軟膜上投与 (軟膜上) 群: 腰部椎弓切除術後にて脊髄を露出し、硬膜を切除し脳脊髄液除去。軟膜上に薬剤散布。モルヒネ投与量 $0.0001 \mu\text{g}$ 。
- ホルマリンテスト (疼痛モデル): 麻酔から完全覚醒したラットの右後肢足背部に 2% ホルマリン 0.05ml を皮下注射。注射直後から 90 分まで疼痛行動の回数測定 (5 分毎に 1 分間の疼痛行動回数積算)。そして疼痛行動の累積回数を元に、モルヒネの 50% 有効量 (ED50) 算出。

結果: IT 群の ED50 は $0.10 \mu\text{g}/0.17 \mu\text{g}$, 軟膜下群の ED50 は $0.003 \mu\text{g}/0.004 \mu\text{g}$ で、軟膜下群で疼痛行動が有意に抑制 ($p<0.05$)。また、同一濃度の軟膜下群と軟膜上群では、軟膜下群で疼痛行動が有意に抑制 ($p<0.05$)。

考察: 結果から軟膜下投与は IT より鎮痛効果が強いことが証明された。さらに、軟膜下群と軟膜上群の比較から鎮痛効果の差に軟膜が関与していることが示唆された。軟膜は非常に薄い組織だが薬物の浸潤に対して障壁となることが判明。軟膜下による薬物投与は非常に効率的な投与である。総投与量が少ない為安全性は高いと推定されるが副作用の発現等に関する検討が必要である。

100

沖縄県における小児肘関節周囲骨折の疫学調査

新崎 里奈 (学籍番号: 154129D)

指導教員: 〇大久保 宏貴, 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】小児の肘関節周囲骨折は頻度の高い骨折の 1 つで、近年増加傾向にある。沖縄県の小児は体力・運動能力調査において全国平均を大きく下回り、肥満率は全国平均よりも高い。そのため沖縄県は小児骨折において他県とは異なる特徴を有する可能性がある。今回、沖縄県における小児肘関節周囲骨折の疫学調査結果を報告する。

【対象と方法】本研究は医学系研究倫理審査委員会の承認を得ている。2015 年と 2016 年の 2 年間に県内総合病院 12 施設で肘関節周囲骨折と診断された 15 歳以下の 452 例 (男児 285 例, 女児 167 例) を対象とした。調査項目は年齢・性別・骨折型・月別の症例数、年齢階級別の受傷機転とした。また、手術を要した骨折のリスクファクターとして年齢、体重、受傷機転との関連を統計学的に調査した。

【結果】年齢では 4 歳～6 歳で頻度が高く、以降年齢とともに減少した。ほぼ全年齢で女児よりも男児の頻度が高かった。骨折型は頰上骨折が最多で (43%)、次いで外側顆骨折の頻度が高かった (23%)。月別では 8 月の症例数が最も少なく、夏に頻度が低かった。受傷機転は未就学児では転倒と転落で全体の約 80% を占め、特に 3 歳以下において椅子やソファナーなどの屋内転落の頻度が多かった。小学生ではスケートボード (ブレイブボード[®], リップスティック[®]を含む) による受傷が 3 番目に多い受傷機転であった (低学年 21%, 高学年 16%)。年齢が高くなるほど有意に手術を要した骨折の頻度が高かった。体重・受傷機転と手術を要した骨折の間に相関を認めなかった。

101

3次元CT画像を用いた骨盤創外固定器ピンの新しい刺入法の検討

林 春菜 (学籍番号: 154203G)

指導教員: ○仲宗根 哲, 石原 昌人, 神谷 武志, 東 千夏,

松田 英敏, 親川 知, 山中 理菜, 平良 啓之,

武市 憲英, 金谷 文則

琉球大学大学院医学研究科整形外科科学講座

【はじめに】

骨盤創外固定器術において、腸骨稜刺入法は、触知できる上前腸骨稜からピン刺入が可能であり、神経血管損傷も少ないが、ピンを固定するためのフレームが大きく早期離床やリハビリテーションの妨げになる。一方で下前腸骨刺入法は、ピンを下前腸骨稜から後柱の骨質が良好の部位へ挿入するため固定性が良いが、神経損傷の危険性があり、またピンやフレームが鼠径部に近いためピン刺入部感染や可動域が制限されるという問題がある。これら刺入法の利点欠点を踏まえ、上前腸骨稜（以下ASIS）から大坐骨切痕に向かうピンのルート法（ASIS法）について3次元CTを用いて検討した。

【対象と方法】

当院および関連施設で骨盤CTを撮影した58例116ルートを対象とした。男性20例、女性38例で平均年齢は78歳（38～95）、平均BMI 24.3であった。まず、3次元解析ソフト上で両ASISをCT台に平行に補正し、機能的骨盤基準面（FPP）を作成した。両ASISを結ぶ線をX軸、X軸に垂直でCT撮影面に平行な線をZ軸、X軸とZ軸に対して垂直な線をY軸とした。ASIS法のシミュレーションでは、ASIS近位からピンを刺入し、腸骨内を通り大坐骨切痕へ向かう最狭部直径が4mm以上のルートを作成した。ピン刺入点とASISまでの距離および対側皮質骨までの長さ、ルート内の最狭部直径、ピンの刺入角度としてFPPに対してそれぞれXZ面、YZ面、XY面へ投影した角度を計測した。

【結果】

94.8%（110/116ルート）でASIS法が可能であった。ピンの最大長は平均92.7mm（79-109mm）で、最狭部直径は平均5.7mm（3.4-9.9mm）であった。ピンはASISから近位12.3mm（3.2-22.6mm）から刺入し、FPPに対してXZ面へは平均26.6°（-3-48°）、YZ面へは21.3°（-1-50°）、XY面に対しては37.2°（0-54°）であった。

【考察・結論】

本法はピンの固定性が良好で、創の管理やリハビリテーションも容易と思われる。骨盤創外固定器装着術の新しいルート法になると考えられた。

102

遺伝子編集による前立腺癌細胞株のST3Gal2遺伝子改変とSSEA-4/MSGb5発現の変化

金澤 伯弘 (学籍番号: 154216J)

指導教員: ○須田 哲司, 須川 愛, 仲西 昌太郎, 斎藤 誠一

琉球大学大学院医学研究科腎泌尿器外科科学講座

SSEA4 (Stage-specific embryonic antigen-4) は初期胚に発現する幹細胞マーカーであり、ガングリオシドのMSGb5 (Monosialosyl globopentao-sylceramide) として同定された (Kannagi R, EMBO J 1983)。我々は、糖転移酵素ST3Gal2 ($\alpha 2, 3$ -Sialyltransferase) によるSSEA3/Gb5へのシアル酸転移によりSSEA-4/MSGb5が合成されることを明らかにした (Saito S, JBC 2003)。また、このSSEA-4/MSGb5は、腎癌や化学療法抵抗性になった乳癌、膠芽腫においてSSEA-4/MSGb5ならびにST3Gal2の高発現が報告されており、癌の悪性進展との関連性も示唆されている。これらの報告から、前立腺癌の悪性進展においても、SSEA-4/MSGb5ならびにST3Gal2の高発現が想定された。そこで、本研究では前立腺癌におけるSSEA-4/MSGb5の悪性進展機序を明らかにするため、CRISPER/Cas9を用いたST3Gal2遺伝子改変によるSSEA-4/MSGb5欠損前立腺癌細胞株の作成を試みた。前立腺癌細胞株に対し、CRISPR/Cas9による変異導入と薬剤耐性遺伝子を持つターゲティングベクターによる遺伝子組換えを誘導した後、薬剤選択により候補クローンを得た。この候補クローンについて、DNAを抽出後、PCRを用いたターゲティングベクター遺伝子領域の確認、組換え領域の解析およびシーケンス解析による遺伝子解析を行った。更に、候補クローンから糖脂質（ガングリオシド）を抽出し、SSEA-4/MSGb5認識抗体を用いた薄層クロマトグラフィーによりSSEA-4/MSGb5の発現について解析したので、その詳細を報告する。

103

原発性アルドステロン症における副腎静脈血サンプリングの採血箇所の検討

伊佐 碧 (学籍番号: 154174K)

指導教員: ○與儀 彰, 安座間 喜明, 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

原発性アルドステロン症 (PA) は、副腎からの過剰なアルドステロン分泌によって難治性高血圧を来す疾患である。副腎静脈血サンプリング (AVS) によって過剰分泌側を判定するが、病変が片側のみの場合は切除術が施行され、内服治療より予後がよい。AVSにて左副腎静脈血の採血は、左副腎静脈本幹 (CAV) か下横隔静脈合流部より近位 (CTV) で行われるが、適切な採血部位について統一見解は得られていない。そこで我々は、CTVとCAVの両部位で得られた採血結果に差異はないか、後ろ向きに検討した。

対象と方法

2011年～2016年に当院でAVSを実施したPA患者119例を対象とした。全例とも、左副腎静脈血はCAVとCTVの2ヶ所で採血した。その他、右副腎静脈血、IVCからも採血を行った。検体からaldosterone値 (Ald.) とcortisol値 (Cort.) を測定し、各群で左副腎静脈血のACR (= (Ald.) / (Cort.)) を算出。さらに、各群のLR (= (左右副腎静脈でより高値を示すACR) / (より低値のACR))、CR (= (左右副腎静脈でより低値を示すACR) / (IVCのACR)) を算出した。CAV群とCTV群の間で、左副腎静脈のACRの相関と、LR、CRによる局在判定結果の一致性についてを検討した。

結果

ACRは両群間で強い相関を示した ($r=0.892, p<0.01$)。LR、CRによる判定結果も、それぞれ $k=0.867 (p<0.01)$ 、 $k=0.981 (p<0.01)$ と高い一致を認めた。

考察

ACRは両群間で強い相関を示し、また過剰分泌側の判定も高い一致を認めた。以上の結果より、左副腎静脈血の採血部位に関わらず、同様な局在判定結果が得られる可能性が示された。CTVでの採血にはマイクロカテーテルを必要としないため、検査時間の短縮による患者負担の軽減、さらに医療コスト削減が期待される。

104

子宮頸癌および子宮体癌患者において根治的治療後の傍大動脈リンパ節 (PAN) 再発例に対する放射線治療の検討

玉城 浩人 (学籍番号: 154113H)

指導教員: ○有賀 拓郎, 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

背景と目的

子宮頸癌・体癌におけるPAN再発例に対する適切な照射線量に関する報告は少ない。線量と生存率、局所制御率、有害事象の関連を検討した。

対象と方法

2012年から2018年2月28日までの期間に琉球大学医学部附属病院で、子宮頸癌もしくは子宮体癌の根治的治療後の傍大動脈リンパ節再発に対して放射線治療を受けた者。

対象症例の情報をカルテから収集し、整理し、統計解析を行った。研究対象となったのは頸癌8例、体癌7例。観察期間中央値は9ヶ月（1～67）。年齢の中央値は59歳（44-81）。

結果

本研究における、1年生存率は76%、1年局所制御率は52%となった。54G以上の照射線量で有意な生存率改善が得られた（100%: dose \geq 54Gy vs 28%: dose < 54Gy, $p=0.039$ ）。有害事象に関して、 \geq 54GyでG1が1名、< 54GyでG2が3名とG3以上の例は認められなかった。線量と局所制御率に有意相関を示すデータは認められなかった。

考察

新部氏らが行った先行研究によると、子宮頸癌における限局性PAN再発例の3年生存率は49.5%であり、51G以上の群と50G以下の群の比較で、3年生存率はそれぞれ58%と42.8%（ $p=0.07$ ）。新部氏らは51G以上の照射で生存率改善の有意傾向を示す結果を得た一方、本研究では54G以上の照射で生存率改善が得られた。先行研究及び本研究において、G3以上の有害事象は認められなかった。

結論

PAN再発例に対する放射線治療の治療成績を解析した。dose \geq 54Gyとdose < 54Gyの比較で前者に生存率改善が得られ、G3以上の深刻な有害事象が認められなかったことより、54Gy以上の照射が考慮されるべきである。

105

Multiplex PCR による 先進的院内感染対策の実践

玉城 優志 (学籍番号: 154112K)
 指導教員: ○金城 武士, 西山 直哉, Gretchen Parrott,
 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)

感染症のアウトブレイクが発生した場合、有症状者を隔離し(コホーティング)、感染を拡大させないことが対策として挙げられるが、症状が同じであってもその原因ウイルス、細菌が同一とは限らない。有症状者をまとめてコホーティングすることによって、患者同士が別のウイルス、細菌に暴露される可能性も十分考えられる。この問題点を解決する手段として multiplex PCR による原因ウイルス、細菌の同定が挙げられる。琉球大学第一内科では multiplex PCR を導入しているが、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えたので報告する。

Multiplex PCR では複数の病原体遺伝子を検出することが可能である。Anyplex RV16 では 16 種類のウイルス、Anyplex RB5 では 5 種類の細菌を検出できる。今回はこれを用い、院内感染での病原体の同定を行った。

琉大病院内で発生した感染症アウトブレイクにおいて同症状を示す患者、職員が 16 人いたが、multiplex PCR 法を行うことで 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ロタミビル投与、面会制限など適切な感染対策を行うことができ、早期のアウトブレイクの収束を可能にすることができた。

Multiplex PCR による先進的な院内感染対策を今回は講じることができたが、現在日本において multiplex PCR による感染症の原因ウイルス、細菌の同定は保険適用外である。欧米では multiplex PCR による呼吸器ウイルスのスクリーニングをするシステムが確立しているが、これは 2 万円から 7 万円する高額な検査となる。不要な抗菌薬の投与の減少、それによる医療費の削減、院内感染防止などの有用性が認められる正確なデータと照らし合わせながら、日本の保険制度に適した multiplex PCR の利用がこれからの課題である。

107

Panton-Valentine leukocidin 陽性メチシリン感性黄色ブドウ球菌の 分離頻度と分離例の臨床的背景

有馬 聖志朗 (学籍番号: 154176F)
 指導教員: ○西山 直哉, Gretchen Parrott, 金城 武士,
 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)

【目的】Panton-Valentine leukocidin (PVL) は黄色ブドウ球菌が産生する白血球破壊毒素であり、市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) で多く産生されることが知られている。健康者において、皮膚・軟部組織感染症を起こし、特に呼吸器感染や敗血症など致死的な経過をとることが特徴である。メチシリン感性黄色ブドウ球菌 (MSSA) において、PVL 産生能を有する頻度は明らかにされてなく、今回 MSSA における PVL 遺伝子保有株の頻度と、その臨床的背景を明らかにすることを研究目的とした。

【方法】2016 年 1 月から 12 月に琉球大学医学部附属病院において臨床検体より分離された MSSA 260 株を対象とした。PVL に特異的な PCR プライマーを用いて、PCR 法で PVL 遺伝子の有無を同定した。MSSA を分離した患者の臨床背景を収集し、PVL 陽性株分離例と PVL 陰性株分離例を比較検討した。

【結果】検討菌株数は 259 株で 8 株 (3.1%) において PVL 遺伝子陽性であった。PVL 陽性株の検出検体は、鼻腔分泌物 3 検体、膿・喀痰・眼脂・耳漏・舌苔が各 1 検体であった。PVL 陽性 MSSA 株が感染に関与していた例は、蜂窩織炎・中耳炎が各 1 例ずつであり、他 6 例は保菌として治療対象となっていなかった。検体採取場所は外来由来 6 株、入院由来 2 株であった。陽性株と陰性株において年齢、性別、入院・外来を項目として統計学的に比較したが有意差は認められなかった。

【考察】過去の報告では MRSA における PVL 陽性率は約 10% であり、今回の研究では MSSA の PVL 陽性率は 3.1% で、MRSA よりも低い頻度であった。PVL 陽性株検出例で臨床的背景に特徴的な傾向は認めず、保菌例が多く PVL の特徴である致死的な感染症例は認められなかった。感染の成立・重症化には、PVL 遺伝子有無のみが因子となるのではなく、実際には PVL 産生量の違いや他の病原因子が関与すると考えられた。今後、PVL 陽性株を集積し更なる解析を進めたい。

106

多項目同時遺伝子検出システムの 百日咳診断への応用

前花 貴大 (学籍番号: 154116B)
 指導教員: ○金城 武士, 西山 直哉, Gretchen Parrott,
 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る急性気道感染症である。特徴的な症状として痙攣性の咳発作(痙咳発作)、吸気性笛声、咳き込み後の嘔吐などがあり、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原因となる。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、培養検査がゴールドスタンダードである。しかし培養検査は特殊な培地が必要なこと、培養に時間を要すること、発症初期にしか菌を検出できないなどの欠点があるため、臨床現場ではあまり利用されていない。血清検査は、生後 3 ヶ月未満の新生児では抗体価上昇が期待できないこと、成人においても偽陽性、偽陰性の問題がつきまとう。Polymerase Chain Reaction (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り、感度が高いことが利点となる。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できる手法であるが、琉球大学第一内科ではこの 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、multiplex PCR を用いて 13 例の百日咳症例の確定診断を行っていた。内訳は新生児肺炎症例 7 例と成人の慢性咳嗽症例 6 例であった。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ても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。新生児肺炎の 6 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。新生児肺炎症例の 1 例は PCR 法では陽性となったが、臨床症状が鼻汁・発熱と百日咳の主症状とは異なったものであった。よって、この症例は偽陽性であった可能性もある。以上から、multiplex PCR は早期の確定診断に有用であるが、PCR 法のみでの診断ではなく、臨床症状や抗体価なども用いた総合的な判断が必要だと考えられた。

108

頭頸部腫瘍における γグルタミルトランスフェラーゼ 1 と ジペプチジルペプチターゼ -4 の発現

屋島 福太郎 (学籍番号: 154173B)
 指導教員: ○池上 太郎, 鈴木 幹男
 琉球大学大学院医科学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

頭頸部癌では、放射線治療や薬物治療などが用いられてきているが、現在も外科治療がゴールドスタンダードである。手術では病変を遺残すれば再発し、逆に大きく切除した場合には術後の QOL が低下する可能性もある。最近、癌細胞を特異的に光らせる蛍光色素プロテオグリンと EP-HMRG が開発された。これらの試薬は多くの癌細胞で発現が亢進している γ-グルタミルトランスペプチターゼ 1 (GGT1) や、ジペプチジルペプチターゼ -4 (DPP-4) の酵素反応を標的にしており、微小癌も可視化することが可能。そこで本研究では、頭頸部癌においてもこれらの新規蛍光試薬を用いた癌細胞の可視化ができるのかどうかを調査するため、頭頸部腫瘍における GGT1 および DPP-4 の発現部位を明らかにすることを目的とした。用いた頭頸部腫瘍は、口腔癌、中咽頭癌、下咽頭癌、喉頭癌、副鼻腔癌、原発不明癌、耳下腺腫瘍、組織型は扁平上皮癌が 12 例、腺房細胞癌が 1 例、多形腺腫が 1 例であった。

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ・頭頸部腫瘍ブロックから、4 μm の薄切片を作製した。また GGT1 および DPP-4 の免疫染色の条件を確立するため、子宮頸癌細胞株 Caski と舌癌細胞株 SCC-4 から FFPE 細胞株を作製し、切片を作製した。免疫染色は、抗原賦活化液の pH、洗いに用いる緩衝液、抗体の希釈率を検討し、GGT1 および DPP-4 は、ともに抗原賦活化液は pH8、緩衝液はトリス緩衝生理食塩水 (Tween20 含有) が最適であった。また抗体希釈率は、GGT1、DPP-4 はそれぞれ 100 倍、50 倍が最適であった。確立した免疫染色の条件をもとに、全ての組織切片の免疫染色を行った。また腫瘍部と正常部を見極めるため、全ての組織切片はヘマトキシリン・エオシン染色も行った。現在、GGT1 と DPP-4 の発現部位と腫瘍部が一致するのかが精査している。

109

ヒトパピローマウイルス (HPV) の ウイルス粒子様タンパク質の作製 : HPV 受容体の同定を目指して

赤嶺 もな (学籍番号: 144129K)
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

近年, 中咽頭癌では約 50% でヒトパピローマウイルス (HPV) が検出され, HPV が発癌に関与することが明らかになってきた。HPV は現在 200 種類以上が同定されているが, 中咽頭組織で感染が見られる HPV 型は約 90% が HPV16 である。一方, 喉頭では HPV16 はまれに喉頭癌で見られるだけであり, ほとんどが HPV6 または HPV11 の感染である。そして, HPV6/HPV11 は良性の喉頭乳頭腫を形成する。このように HPV は HPV 型ごとに限定された組織のみに感染するが, その感染のメカニズムは未だ明らかになっていない。HPV は組織に感染する際には, カプシドが感染細胞の細胞膜に発現する HPV 受容体と結合することで感染が起ると予想される。そこで, 本研究では HPV16, HPV6 および HPV11 型の感染の鍵となっている HPV 受容体の同定を目指し, その第一歩として HPV のカプシドタンパク質を作製することを目的とした。HPV のカプシドは L1 と L2 の 2 種類のタンパク質からなる。そこで, HPV16, HPV6, HPV11 の L1 および L2 の両遺伝子を入った発現ベクターをポリエチレンイミン MAX で HEK293T 細胞にトランスフェクションし, 2 日間培養した。つづいて細胞を破砕し, iodixanol を用いた密度勾配遠心分離法により超遠心し, 33-39% iodixanol の層から 10 分画を回収した。各分画をポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) し, クマシーブリリアントブルー染色を行った。VLP の L1 タンパク質のサイズ (56 kDa) のバンドが見られる分画を VLP 溶液とした。さらに, VLP 溶液を ELISA プレートに固相化し, 市販の抗 HPV6 L1 抗体, 抗 HPV11 L1 抗体, 抗 HPV16 L1 抗体を用いて ELISA を行った。ELISA により, HPV6, HPV11, HPV16 の VLP が作製できたことが確認できた。

011

Provox[®] 装用者の発話明瞭度に対する UD トーク[®] を用いた客観的評価の試み

塚本 英里 (学籍番号: 144114B)
指導教員: ○吉田 崇正¹⁾, 松本 希¹⁾, 中川 尚志¹⁾,
鈴木 幹男²⁾
¹⁾九州大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科学教室,
²⁾琉球大学大学院医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

喉頭摘出後は気管と食道が分離されて声帯を失うため, 音声言語によるコミュニケーションに障害が出る。音声言語機能の喪失を補完するために用いられているのが代用音声で, 現在主流なのは電気喉頭, 食道発声, シャント発声の 3 つである。Provox[®] はそのうちの 1 つ, シャント発声で用いる人工喉頭である。気管と食道の間にシャントを作る目的で手術によって埋め込む。

今回我々は UD トークを用いて健常者と Provox[®] 装用者の発話明瞭度を客観的に, かつ定量的に評価することを試みた。UD トークは音声認識機能を用いて難聴者と健聴者とのコミュニケーションを支援するソフトである。発話が不明瞭であったり, 周囲に雑音があったりすると誤認識する。被験者が標準ディサースリア検査の教材用音源を音読した音声を UD トークに聴取させたところ, Provox[®] 挿入直後と挿入 1 ヶ月後の発話明瞭度のスコアは「挿入からしばらくすると慣れて発話のコツをつかみ, 聞き取りやすい声が出せるようになる」という我々の知る結果と一致した。

この評価方法を利用し, 従来言語聴覚士の主観的評価に頼っていた構音障害患者の発話明瞭度が客観的に評価できる可能性が示唆された。

110

ヒトパピローマウイルス 6 型感染・喉頭乳頭腫 における E4 遺伝子発現細胞の同定

前田 和俊 (学籍番号: 154187B)
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, ヒトパピローマウイルス 6 型または 11 型 (以下, HPV6, HPV11) が喉頭に感染することで形成される腫瘍で, 多発性かつ再発性であり, 難治性の疾患である。HPV は 9 つの遺伝子 (E1, E2, E4, E5a, E5b, E6, E7, L1, L2) を持つが, 喉頭乳頭腫における HPV の各遺伝子の詳細な機能はまだよくわかっていない。当科では, これまでに HPV6 感染の喉頭乳頭腫において E5a を除く 8 つの遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量してきた。その結果, HPV の 8 つの遺伝子の中で E4 遺伝子は最も強く発現していた (E4 遺伝子は他の 7 つと比較して 10 倍以上高く発現していた)。E4 は, HPV6 ではまだ機能がわかっていないが, HPV1 および HPV16 においては有棘細胞の上層から顆粒細胞層に局限して発現し, ウイルスの構築に関与すること, またウイルスの放出にも関与することが示唆されている。そこで本研究では, 喉頭乳頭腫の形成における E4 の機能を明らかにする第一歩として, HPV6 感染・喉頭乳頭腫内における E4 mRNA の局在を明らかにすることを目的とした。ホルマリン固定パラフィン包埋・喉頭乳頭腫組織をミクロトームで 4 μm の厚さの組織切片を作製した。組織切片は, ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。さらに HPV に感染した細胞の局在を明らかにするために, HPV types 6/HPV11 Biotinylated DNA probe を用いて DNA in situ hybridization を行った。最後に, E4 mRNA の局在を明らかにするため, HPV6 E4 遺伝子を組み込んだ pGEM-T Easy vector のプラスミドを制限酵素 *Spe* I で切断し, T7 RNA polymerase と DIG RNA Labelling mix を用いて, HPV6 E4 RNA の anti-sense probe を作製し, RNA in situ hybridization を行った。HPV DNA のシグナルは基底細胞から顆粒細胞まで広く見られ, 特に有棘細胞の上層で最も強かった。この結果から, HPV DNA は有棘細胞の上層で最もコピーされていることが示唆された。一方, E4 mRNA は有棘細胞の上層から顆粒細胞に局限して発現していた。これは, HPV1 および HPV16 の先行研究の結果と一致していた。以上の結果から, HPV 6 においても, E4 は, ウイルスの構築, ウイルスの放出に関与している可能性がある。

012

DNA 修復酵素の遺伝子多型と 頭頸部がんの予後予測

門口 佳乃子 (学籍番号: 154110C)
指導教員: ○池上 太郎, 平川 仁, 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

頭頸部がんは QOL に直結する疾患でありその予後は一般的に不良とされ, 治療するにあたり予後予測は重要である。しかし現在, 頭頸部がんの予後予測因子として HPV 関連がん以外に明確なものはない。よって今回は採血検体から DNA 修復酵素の多型遺伝子を調べ, それが予後予測因子となるかを調べた。

2013 年 1 月から 2017 年 6 月までに琉球大学医学部耳鼻咽喉科を受診し治療を行った 280 人を対象とした。うち男性 249 例女性 31 例で年齢は中央値 67 歳 (38-91 歳) であり対象疾患は喉頭癌 80 例, 中咽頭癌 83 例, 下咽頭癌 117 例であった。

肺癌などにおいて化学療法の治療効果と相関がある ERCC1, XRCC1 の DNA 修復酵素の遺伝子多型について調べた。まず患者の血液検体から Buffy coat 採取し, DNA を抽出した。ERCC1 と XRCC1 の両遺伝子は, PCR 法で増幅し, それぞれ制限酵素 *Mbo*II, *Msp*I で消化し, アガロースゲルに電気泳動し, 切断された DNA 断片の長さから各遺伝子の多型を調べた。生存率については Kaplan-Meier 曲線で検討した。

ERCC1 遺伝子において C/C, C/A, A/A の遺伝子頻度は, 喉頭がんではそれぞれ 75, 21, 4% で, 中咽頭がんでは 65, 33, 2% で, 下咽頭がんでは 69, 25, 6% であった。一方, XRCC1 遺伝子では wild type, hetero, mutant の遺伝子頻度が喉頭がんではそれぞれ 42, 48, 10% であり, 中咽頭がんでは 40, 47, 13% で, 下咽頭がんでは 52, 42, 6% であった。以上より, 頭頸部がんにおける DNA 修復酵素の遺伝子多型の頻度は同程度の割合であった。Kaplan-Meier 曲線より, ERCC1 遺伝子の C/C は他の多型群に比べて予後が良い傾向にあり, 予後予測に有用である可能性がある。一方で XRCC1 遺伝子では生存曲線に差は認められなかった。